

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse N° 45-2013

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

présentée et soutenue par

Caroline BRUN

le 22 novembre 2013

Etude des conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la myostatine par GASP-1 au cours du développement musculaire

Thèse dirigée par le Professeur Véronique BLANQUET

JURY

Rapporteurs

Pascal MAIRE, D.R. INSERM, Institut Cochin, Paris

Didier MONTARRAS, D.R. CNRS, Institut Pasteur, Paris

Examineurs

Anne BONNIEU, D.R. INRA, Montpellier

Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN, P.U.P.H., Université de Limoges

Ahmad OULMOUDEN, Professeur, Université de Limoges

Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse N° 45-2013

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

présentée et soutenue par

Caroline BRUN

le 22 novembre 2013

Etude des conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la myostatine par GASP-1 au cours du développement musculaire

Thèse dirigée par le Professeur Véronique BLANQUET

JURY

Rapporteurs

Pascal MAIRE, D.R. INSERM, Institut Cochin, Paris

Didier MONTARRAS, D.R. CNRS, Institut Pasteur, Paris

Examineurs

Anne BONNIEU, D.R. INRA, Montpellier

Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN, P.U.P.H., Université de Limoges

Ahmad OULMOUDEN, Professeur, Université de Limoges

Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges

*“Go confidently in the direction of your dreams!
Live the life you've imagined.”*

- Henry David Thoreau -

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps d'examiner mon travail.

J'adresse donc mes plus sincères remerciements à Didier MONTARRAS et à Pascal MAIRE de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à Anne BONNIEU, Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN et Ahmad OULMOUDEN d'avoir accepté de prendre connaissance de mon travail et de le juger en tant qu'examineurs.

Anne et Pascal, je vous remercie également pour le temps que vous m'avez accordé au cours de ces trois années, votre intérêt pour mes travaux, nos échanges et votre soutien dans mes démarches de post-docs. Je suis très fière de vous compter parmi les membres de mon jury.

Ahmad, j'ai toujours apprécié nos discussions furtives autour d'un café. Je suis touchée de la confiance que tu as pu m'accorder et du regard bienveillant que tu as toujours eu à mon égard.

Je remercie également Fabrice LALLOUE de m'avoir suivi tout au long de ces trois années en tant que membre de mon comité de thèse. Nos discussions ont toujours été très enrichissantes et m'ont apporté un autre regard et de belles perspectives sur mes résultats. Merci à vous.

Je remercie Barbara VERNUS qui m'a tout appris sur l'isolement des cellules myoblastiques primaires chez la souris. Merci pour ton accueil montpelliérain et ta disponibilité tout au long de ma thèse. Je tiens à remercier également Claire CARRION pour sa disponibilité lors de nos échanges sur la microscopie confocale.

Un grand merci à Martine de l'accueil pour vos encouragements et votre bonne humeur permanente qui illuminent l'administration.

Bien entendu, je remercie l'ensemble des membres de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale sans qui ces trois années n'auraient pas été aussi intenses.

Je remercie Débora, secrétaire de choc, toujours disponible quelle que soit la demande ; nos « bonjours » matinaux me manqueront.

Agnès, merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire il y a quelques années déjà, merci de m'avoir confié ce « petit » projet, merci pour les bootstraps !, merci à tous les manchots, pingouins, gorfous (« les plus classes de la clique ! ») et autres sphéniscidés. Merci également à Fabrice pour ton aide sur ce projet.

François et Laëtitia, je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée lors de mes enseignements. François, pour ces TP mémorables de police scientifique et les joies des colorants en microbio. Laëti, je ne suis plus sûre de vraiment me souvenir de ce qu'est le pourcentage d'hétérozygotie... Qu'importe ! Merci pour ton inestimable soutien tout au long de cette thèse.

Mes amis et collaborateurs sucrés, Daniel et Anne, mes nouveaux voisins de palier du 107 avec qui les discussions étaient toujours agréables. Anne, merci d'avoir veillé chaque instant à ce que ma thèse avance. Daniel, merci pour ton aide sur nos projets phylogéniques, merci pour ta bonne humeur et ton écoute (« Ça vit vraiment dans les arbres les poules ? »). Seb, je te remercie pour ton aide sur mon projet glycosylé. Merci pour ton soutien scientifique, ton aide technique, nos échanges de jour comme de nuit, nos pauses café et nos soirées à refaire le monde et j'en oublie certainement... Encore merci à vous !

Je remercie également l'ensemble des doctorants : GargAmel, pour mes coupes de cheveux toujours au top, nos p'tites pauses cafés et tes samossas ; D'Artagnan, parce qu'on a toujours besoin d'un mousquetaire ; Stéphane, pour nos sessions nocturnes au laboratoire (mon cœur en est encore fragilisé...); et tous les autres. Bonne continuation à tous et bon courage pour la fin ! Une petite pensée aux anciens avec qui j'ai tant partagé, Marie-Clémence, Xavier, Antoine et Renaud.

Vincent, « Sergent », quelle chance d'avoir eu un collègue de promo et un coreprésentant de l'Ecole Doctorale comme toi ! Promis, ce qui s'est passé à Egletons, reste à Egletons ! Merci pour tout ton soutien quotidien, nos échanges, nos pauses café, nos soirées et nos délires. Courage, le bout du tunnel n'est plus très loin...

J'aimerais également remercier l'équipe « technique » qui m'a soutenue et qui a contribué à l'aboutissement de ce travail dans une super ambiance. Karine, pour tes précieux conseils en Western blot, nos tentatives de fluorescence (« la classe ! ») et nos batailles de pissettes d'eau... Lionel, je garderai longtemps le souvenir de ces quelques jours de fin d'été à lézarder au soleil avant la reprise, merci pour ton aide sur la conception des manips d'« expression », ton regard critique sur mes résultats, mais également pour tous nos délires indispensables à la réussite en recherche ! Fabienne, merci pour ta motivation, ta patience et ta dextérité sans égale au cryostat (« Mais c'est froid en plus ! »). Merci pour ton soutien permanent et toutes ses heures partagées au microscope à fluorescence.

Je souhaiterais également adresser mes remerciements les plus sincères à la fine équipe du « poney club » ! Patrick, merci pour ton écoute, ton soutien et pour le temps que tu as toujours accordé à mes questions, mêmes les plus naïves (« 12N, c'est quoi déjà exactement ? »).

Romain, merci d'avoir participé à la relecture de cette thèse où le blé n'a pas su trouvé la place « indispensable à la vie » qu'il mérite. Merci pour tes encouragements et ton soutien ces derniers mois.

Laure et Didier, je ne trouverai jamais les mots justes pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi. Laure, tu as été ma cellule psychologique d'urgence pendant ces trois ans. Merci pour tes encouragements, pour nos « escapades » jordaniennes (« d'ailleurs, on y va quand ? »), pour tous ces petits moments autour d'un thé qui n'appartiennent qu'à nous. Didier, cette thèse ne serait probablement ce qu'elle ait si tu n'avais pas été là. A l'image d'un « papa bio », tu as souvent été protecteur, parfois autoritaire mais toujours bienveillant. J'espère que tu seras fier du travail que j'ai accompli jusqu'ici. Merci (au moins) mille fois.

Au cours de ces quelques années passées au laboratoire, j'ai eu la chance de travailler avec des personnes qui sont devenues bien plus que de simples collègues de thèse. Carole, ma jumelle libanaise (ce sera notre petit secret), merci pour ton soutien, tes encouragements et ta bonne humeur permanente ! Olivier, je te remercie de m'avoir accordé ta confiance dès mon arrivée en master et de m'avoir tant appris. Ces années partagées ensemble ont été aussi riches scientifiquement qu'humainement.

La dream team du 108, Luce et Katy ! Tellement de choses à dire. Luce, je n'oublierai jamais ces derniers mois passés dans le 108. Merci pour ton soutien scientifique, technique et psychologique de ces derniers jours. Tout est passé si vite... Un mois de Juillet incroyable, un Skype, un western raté, un aller-retour en Suisse (« Vivement la retraite sur le Lago Maggiore ! »), un western réussi (« Enfin ! »), des nuits blanches et surtout, beaucoup, beaucoup de fous-rires ! Arrivedeciiaiiiiii et à très vite !

Katy, ma colocataire de toujours ! Voilà 4 ans que nous partageons absolument tout. Tu m'as tellement appris à la paillasse, tu as toujours été patiente envers moi, à l'écoute de mes moindres agacements. Tes anecdotes guyanaises et tes blagues dont toi seule a le secret résonneront longtemps dans ma mémoire. Cette thèse n'aurait pas été aussi belle sans toi ! De tout mon cœur, merci ma Katy !!!

Brice, ça y est, on y est presque ! Que le temps a filé vite depuis notre rencontre dans une salle de classe où je ne saurai plus vraiment dire pourquoi nous y étions... 10 ans que nous partageons tout, nos déceptions, nos rires, nos fous-rires, nos apéros hebdomadaires manqués (« Je suis encore en culture. » « Je suis encore au cytomètre. »), nos soirées « annuelles » presque pas manquées et ce n'est pas fini ! Merci pour tout et vivement la suite ! Je suis fière de te compter parmi mes amis.

Je remercie tous mes amis pour qui il n'a pas toujours été simple de comprendre que les myoblastes nécessitaient une attention quotidienne. Sweetiiiiie et Ben, Bikoune et Mat, Caillou et

Ch'tiot, Chacha et JC, Mél et Yan, et la fine équipe des Estivales, Fanfan, Fofie, Cyril, Vicky, les M&M's, Aymeric et Valy. Tous les moments partagés ensemble ont été sources d'excellents souvenirs, indispensables bulles d'oxygène à ma survie au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier ma famille : mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes choix, Papa, ça y est, j'ai fini mes études ! Merci pour les mouettes qui illuminaient mes journées lorsqu'elles arrivaient jusqu'à moi... Maman, mention spéciale pour tes relectures jusqu'à la dernière minute ! Merci pour ton écoute et ton soutien de tous les jours. Babeth, sans qui mon arrivée à Limoges n'aurait pas été aussi agréable, my little sis' Hélène (special mention for your proofreading until the last minute !), my bro' Ed (ton tour approche...) et Julie, Aurélien et Emilie (nous allons bientôt pouvoir reprendre un rythme d'apéro correct, promis), ma « grande » Elsa.

Ben, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as supporté au cours de ces trois années... Auteur secret de nos idées sucrées, soutien de tous les instants, patient quelle que soit mon humeur (quelque peu changeante au gré des manips, il faut bien l'admettre), tu as toujours su trouver les mots justes pour me faire avancer et ne jamais m'abandonner. Merci !

Pour terminer, je souhaite remercier ma directrice de thèse, « Chef » Véronique BLANQUET. Quelle aventure ! Je ne pense pas qu'il y ait de mots assez puissants (facile...) pour vous remercier et décrire tout ce que nous avons vécu. Ces trois années n'ont pas toujours été simples, probablement en raison de nos caractères « fortes têtes ». Je vous suis tellement reconnaissante de ne jamais m'avoir lâchée et de m'avoir toujours fait confiance même dans les moments les plus sombres de cette thèse. Merci pour toutes nos discussions (pas toujours) très scientifiques, merci pour cette formation au monde de la recherche, merci de m'avoir offert l'opportunité de communiquer mes résultats en congrès. De tout ce parcours universitaire, ma plus belle chance est de vous avoir eu comme directrice de thèse. New York restera sans aucun doute le plus beau souvenir de ces trois ans ! Merci Chef !

Merci à tous.

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Publications

Brun C., Périé L., Forestier L. & Blanquet V. *myostatin inhibition by GASP-1 overexpression leads to an up-regulation of its expression.* (En préparation)

Brun C., Périé L., Baraige F., Vernus B., Bonniou A. & Blanquet V. *Myostatin acts independently of its canonical pathway to regulate embryonic muscle development* (Soumis dans Skeletal Muscle Journal)

Monestier O., **Brun C.**, Heu K., Passet B., Malhouroux M., Magnol L., Vilotte J.L. & Blanquet V. *Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype.* BMC Genomics 2012, 10;13:541

Monestier O., **Brun C.**, Cocquempot O., Petit D. & Blanquet V. *GASP/WFIKK proteins: evolutionary aspects of their functions.* PLoS ONE 2012, 7(8):e43710

Brun C., Monestier O., Legardinier S., Maftah A. & Blanquet V. *Murine GASP-1 N-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion.* Cell Physiol Biochem 2012, 30(3):791-804

Communications écrites

Conférences internationales

2012 **Brun C.**, Legardinier S., Monestier O., Heu K., Maftah A., Magnol L. & Blanquet V. *Post-translational modifications of mGASP-1 protein: Effects on its myogenic activity.*

Development, function and repair of the muscle cell, New York, USA

Monestier O., **Brun C.**, Heu K., Malhouroux M., Vuillier-Devillers K., Magnol L. & Blanquet V. *In vivo characterization of the role of Gasp-1 in skeletal muscle function.*

Development, function and repair of the muscle cell, New York, USA

2011 **Brun C.***, Monestier O.*, Heu K., Malhouroux M., Vuillier-Devillers K., Magnol L. & Blanquet V. *Ubiquitous Gasp-1 overexpression in mice leads to a hypermuscular phenotype without any obvious effect on other organs. (* equal contribution)*

AFM-Myology 2011, Lille, France

Monestier O., **Brun C.**, Heu K., Malhouroux M., Vuillier-Devillers K., Magnol L. & Blanquet V. *Contribution of mouse models to analyze muscle characteristics in cattle.*

4th International Symposium on Animal Functional Genomics 2011, Dublin, Ireland

Conférences nationales

2013 Périé L., **Brun C.**, Magnol L., Passet B. & Blanquet V. *Molecular mechanisms modulating skeletal muscular mass: role(s) of the GASP-2 protein.*

16th PhD Student Seminar - Department of Animal Genetics-INRA, Amboise, France

2011 **Brun C.**, Monestier O., Magnol L. & Blanquet V. *Characterization of new proteins associated with GASP-1 in muscular tissue.*

14th PhD Student Seminar - Department of Animal Genetics-INRA, Limoges, France

Communication orale

2012 Characterization of new proteins associated with GASP-1 in muscular tissue.

15th PhD Student Seminar - Department of Animal Genetics-INRA, Ile d'Oléron, France

ABRÉVIATIONS

4E-BP1 : eIF4E-binding protein	FLST3 / FLRG : Follistatin-like 3 / Follistatin related-gene
AAV : AdénoVirus Associé	FoxO : Forkhead box protein O
ACh : AcétylCholine	FSH : Follicle-Stimulating Hormone
ActRIIa/IIb : Activin Receptor type-IIa/IIb	FST/FS : Follistatine
Akt : Protein kinase B	Gab1 : GRB2-associated binder-1
Alk : Activin-like kinase	GASP : GDF-Associated Serum Protein
AMPK : AMP-activated protein Kinase	GDF : Growth and Differentiation Factor
ARE : Eléments de Réponse aux Androgènes	GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2
ASA : Avian Skeletal α -Actin	GRE : Eléments de Réponse aux Glucocorticoïdes
ATP : Adénosine TriPhosphate	GRMD : Golden Retriever Muscular Dystrophy
bHLH : basic Helix-Loop-Helix	GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
BMP : Bone Morphogenetic Protein	Hesr : Hairy/Enhancer of Split Related protein
BMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor	HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
Ca²⁺ : Ion calcium	hSGT : human Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat-containing protein
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	HuSkMC : Human Skeletal Muscle Cell
CHO : Chinese Hamster Ovary cell	Id : Inhibitor of differentiation
CKI : Cyclin-dependent Kinase Inhibitor	Ig : Immunoglobuline
CMV : CytoMégaloVirus	IGF : Insulin-like Growth Factor
Co-SMAD : Common-mediator SMAD	IGF-R : Insulin-like Growth Factor-Receptor
Cre : Cyclic recombinase	IRES : Site d'Entrée Spécifique des Ribosomes
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	I-SMAD : Inhibitory SMAD
Dcn : Décorine	JNK : c-Jun N-terminal Kinase
DGCR8 : Di George Critical Region 8	KO : KnockOut
DTA : Toxine Diphtérique (fragment A)	LAP : Latency Associated Peptide
EAA : Acide aminé essentiel	Lbx1 : Ladybird homeobox protein homolog 1
EDL : <i>extensor digitorum longus</i>	LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3
EGF : Epidermal Growth Factor	LEF : Lymphoid Enhancer Factor
eIF : eukaryotic translation Initiation Factor	LLC : Large Latent Complex
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase	Lnfg : Lunatic fringe
ERT : Estrogen Receptor activated by Tamoxifen	LTBP : Latent TGF- β -Binding Protein
Eya : Eyes absent homolog protein	MADS : MCM1, Agamous, Deficiens, SRF
FACS : Fluorescent-Activated Cell Sorting	MAFbx : Muscle Atrophy F-box (Atrogin-1)
Fc : Fragment cristallisable des Ig	
FGF : Fibroblast Growth Factor	

MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCK : Muscle Creatine Kinase
Mdx : Mucular Dystophy X-linked
Mef2 : Myocyte specific Enhancer Factor 2
Mesp2 : Mesoderm Posterior protein 2
miARN, miR : microARN
MIS : Müllerian Inhibiting Substance
MLC : Myosin Light Chain
MMP : Matrix MetalloProteinase
MRF : Myogenic Regulatory Factor
Mstn : Myostatine
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
mTORC : mTOR signaling Complex
MuRF1 : Muscle RING-Finger protein-1
Myf : Myogenic factor
MyHC : Myosin Heavy Chain
MyoD : Myoblast Determination protein 1
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cell
NFκB : Nuclear factor NF-kappa-B
NTR : Nétrine
ORF : Open Reading Frame
Pax : Paired box protein
PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator -1α
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PICs : PW1⁺ Interstitial cells
Pitx2 : Pituitary homeobox 2
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PSM : Mésoderme Pré-Somitique
Raldh : Retinal dehydrogenase
Raptor : Regulatory-Associated Protein of mTOR
Rb : Rétinoblastome

RE : Réticulum Endoplasmique
Rictor : DEP domain containing mTOR-interacting protein
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
R-SMAD : Receptor-regulated SMAD
S20 : myoblastes surGasp1-20
S6K1 : ribosomal protein S6 Kinase 1
sFRP : secreted Frizzled-Related Protein
Shh : Sonic hedgehog
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
Six : Sine oculis homeobox homolog protein
SLC : Small Latent Complex
SMAD : Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog
SRF : Serum Response Factor
TA : *tibialis Anterior*
TAK1-MKK : TGF-β-Activated Kinase 1-Mitogen-activated protein Kinase Kinase
Tbx1 : T-box transcription factor 1
TCF : T-Cell Factor
TGF : Transforming Growth Factor
TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TLDA : Taqman Low Density Array
TNF : Tumor Necrosis Factor
UTR : UnTranslated Region, region non traduite
WAP : Whey acidic protein
WFIKKN : WAP, Follistatin, Kazal, Immunoglobulin, Kunitz, Kunitz, Netrin-containing protein
Wnt : Wingless-type MMTV integration site family member

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
MYOGENESE DU MUSCLE SQUELETTIQUE CHEZ LES VERTEBRES	6
Structure et fonction du muscle squelettique	6
Développement embryonnaire des muscles	10
Des somites aux bourgeons des membres	11
Différenciation myogénique terminale.....	18
Croissance post-natale et régénération du muscle squelettique	25
Les cellules satellites.....	25
Encart 1. Etude fonctionnelle des cellules satellites chez la souris	28
La régénération du muscle squelettique.....	30
MECANISMES MOLECULAIRES REGULANT LA MASSE MUSCULAIRE.....	35
Hypertrophie / Atrophie	35
Augmentation physiologique de la masse musculaire.....	35
Perte de la masse musculaire.....	35
Régulation de la masse musculaire : le dialogue entre la myostatine et IGF-1	38
La myostatine, un régulateur négatif de la masse musculaire	41
Voies de signalisation et régulation intracellulaire de la myostatine	50
Voie de signalisation canonique des SMADs	50
Autres voies de signalisation	52
Régulation de l'expression de la myostatine.....	54
Régulation extracellulaire de la myostatine.....	57
LES PROTEINES GASPS	64
Caractéristiques des protéines GASPs.....	64
GASP-1, un antagoniste de la myostatine	68
RESULTATS	71
ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE GASP-1 AU COURS DU DEVELOPPEMENT	
MUSCULAIRE	71
Caractérisation <i>in vivo</i> du rôle de GASP-1	71
<i>Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype.</i>	71
Caractérisation des cultures primaires surGasp1-20.....	74
<i>Myostatin acts independently of its canonical pathway to regulate embryonic muscle development.</i>	74

<i>myostatin inhibition by GASP-1 overexpression leads to an up-regulation of its expression.</i>	79
Encart 2. Régulation post-transcriptionnelle des processus myogéniques	80
RELATIONS STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE MURINE GASP-1.....	81
<i>Murine GASP-1 N-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion.</i>	82
Encart 3. La glycosylation, une modification post-traductionnelle majeure des protéines	84
DISCUSSION GENERALE	85
RÉFÉRENCES	93
ANNEXES.....	115
Annexe 1. Données supplémentaires Publication 1	115
Annexe 2. Carte des vecteurs pGL4.10[<i>luc2</i>] et pGL4.75[<i>hRluc</i> /CMV].....	118
Annexe 3. Liste des 192 sondes Taqman® microRNAs sélectionnées	119
Annexe 4. Donnée supplémentaire Publication 1	123
Annexe 5. Etude phylogénétique des protéines GASPs	124
<i>GASP/WFIKKN proteins: evolutionary aspects of their functions</i>	124

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. Les différents types de cellules musculaires.....	5
FIGURE 2. Anatomie du muscle squelettique et structure de la myofibre.....	7
FIGURE 3. Aperçu des divers réseaux génétiques régulant le devenir des futures cellules musculaires squelettiques.....	10
FIGURE 4. Modèle de la somitogenèse chez les vertébrés.....	11
FIGURE 5. Représentation schématique d'une coupe transversale d'embryon au stade précoce de la somitogenèse.....	13
FIGURE 6. Représentation schématique de la formation du muscle squelettique des somites jusqu'aux bourgeons des membres.....	14
FIGURE 7. Réseau génique impliqué dans la délamination et la migration des précurseurs myogéniques.....	16
FIGURE 8. Expression des MRFs au cours du développement embryonnaire chez la souris.....	19
FIGURE 9. Hiérarchie des facteurs impliqués dans les différentes étapes de la myogenèse squelettique.....	20
FIGURE 10. Régulation de la différenciation myogénique par les différentes protéines du cycle cellulaire.....	21
FIGURE 11. Les trois phases de la myogenèse au cours du développement musculaire chez la souris.....	23
FIGURE 12. Les cellules satellites et leur environnement.....	26
FIGURE 13. Destin des cellules satellites au cours de la régénération musculaire.....	30
FIGURE 14. Divisions asymétrique et aléatoire des cellules satellites.....	32
FIGURE 15. Chronologie du nombre de publications répertoriées dans PubMed et relatives aux termes « primary myoblast » et « primary muscle cell » en fonction de l'année de parution.....	34
FIGURE 16. Voie de signalisation d'IGF-1.....	40
FIGURE 17. Biosynthèse de la myostatine.....	42
FIGURE 18. Structures gène/protéine de la myostatine chez la souris.....	43
FIGURE 19. Phénotype hypermusclé résultant de l'inactivation du gène de la <i>myostatine</i>	44
FIGURE 20. Conséquences de l'inactivation de la <i>myostatine</i> au cours du développement musculaire squelettique.....	46
FIGURE 21. Voies de signalisation canonique et non canoniques de la myostatine.....	51
FIGURE 22. Dialogue entre IGF-1 et la myostatine dans la régulation de la masse musculaire.....	53

FIGURE 23. Régulation de l'expression de la <i>myostatine</i>	55
FIGURE 24. Deux isoformes protéiques de la follistatine issues d'un épissage alternatif.....	58
FIGURE 25. Structures des gènes & protéines GASPs chez la souris.	65
FIGURE 26. Fonctions potentielles des protéines GASPs dans la régulation de la myostatine.	67
FIGURE 27. Conclusion schématique des observations phénotypiques relevées sur le modèle surGasp1.....	73
FIGURE 28. Conclusion schématique des voies de signalisation dérégulées au sein des cellules myoblastiques surGasp1-20.	75
FIGURE 29. Représentation schématique d'une glycoprotéine sécrétée.	81
FIGURE 30. Conclusion schématique de l'incidence des <i>N</i> -glycanes sur la protéine GASP-1.....	83
FIGURE 31. Prédiction des sites de <i>O</i> -glycosylation de type mucine sur la protéine GASP-1 murine par l'analyse de la séquence peptidique sur le server 4.0 NetOGlyc.	83
FIGURE 32. Diversité des <i>N</i> -glycanes et évolution.....	84
FIGURE 33. Vue d'ensemble des différents monosaccharides <i>O</i> -liés aux acides aminés hydroxylés d'une séquence peptidique.	85
FIGURE 34. Biosynthèse et déglycosylation des <i>O</i> -glycanes de type mucine.....	86
FIGURE 35. Modèle de régulation de <i>Pax7</i> par la myostatine dans les myoblastes S20.....	87
FIGURE 36. La signalisation BMP contrôle le maintien, la croissance et l'atrophie du muscle adulte. ..	89

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Classement des fibres musculaires selon leurs caractéristiques structurales, métaboliques et fonctionnelles.	9
TABLEAU 2. Liste non exhaustive des phénotypes associés aux knockout de gènes impliqués dans la myogenèse précoce des muscles squelettiques des membres.	17
TABLEAU 3. Phénotypes des modèles murins modifiés pour les gènes <i>Mstn</i> et <i>Igf-1</i>	38
TABLEAU 4. Membres de la superfamille des TGF- β et leurs récepteurs et voies de signalisation associés.	50
TABLEAU 5. Partenaires protéiques de la myostatine.	57
TABLEAU 6. Phénotypes musculaires obtenus par l'utilisation de différents inhibiteurs de la myostatine.	60
TABLEAU 7. Liste des miARNs sélectionnés et de certains de leurs gènes cibles.	77
TABLEAU 8. Glycosidases utilisées pour la <i>N</i> -déglycosylation et la <i>O</i> -déglycosylation de type mucine.	87
TABLEAU 9. Deux lectines liant spécifiquement les acides <i>N</i> -acétylneuraminiques.	87

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Indispensable à la vie chez les mammifères, le tissu musculaire représente près de la moitié de la masse du corps. La capacité de transformer l'énergie chimique en énergie mécanique lui permet d'exercer un grand nombre de fonctions allant de la motricité jusqu'à la respiration. De la spécification des cellules précurseurs à la maturation des fibres musculaires, la myogenèse est orchestrée par de nombreux facteurs moléculaires dont chacune des actions qu'ils exercent est extrêmement régulée (Buckingham, 2006, Bentzinger *et al.*, 2012).

Parmi ces facteurs moléculaires, la myostatine est un régulateur négatif important de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires si bien que la perte de la protéine fonctionnelle conduit à une augmentation spectaculaire de la masse musculaire (McPherron *et al.*, 1997). En agronomie, les bovins présentant un phénotype hypermusclé dû à des mutations « perte de fonction » du gène de la *myostatine* sont sélectionnés depuis longtemps puisqu'ils présentent un intérêt économique évident du fait de leur potentiel à produire une quantité plus importante de viande (Kambadur *et al.*, 1997, McPherron et Lee, 1997). Chez la souris, cette invalidation du gène *myostatine* conduit à une hyperplasie (augmentation du nombre) et à une hypertrophie (augmentation de la taille) des fibres musculaires, responsables de l'augmentation importante de la masse musculaire.

Chez l'homme, l'atrophie musculaire ou la perte de masse musculaire est un caractère commun à la plupart des dystrophies musculaires, mais aussi à la cachexie cancéreuse, à l'insuffisance cardiaque ou au syndrome d'immunodéficience acquise (Bonaldo et Sandri, 2013, Romanick *et al.*, 2013). En outre, cette perte excessive de masse musculaire peut augmenter la morbidité et nuire à l'efficacité des traitements thérapeutiques. Par conséquent, il existe un intérêt évident à développer des stratégies favorisant la croissance musculaire aussi bien dans le cadre thérapeutique, afin de mettre en place des traitements efficaces contre les pathologies musculaires citées, que dans le cadre agronomique, pour le déterminisme génétique des caractères liés à la quantité des viandes.

Depuis sa découverte en 1997, la myostatine reste à ce jour le plus puissant inhibiteur du développement musculaire (McPherron *et al.*, 1997). Fort de ce constat, bon nombre de stratégies thérapeutiques visant à augmenter la masse musculaire sont maintenant développées pour inhiber son action, soit par ciblage direct du gène, soit par l'utilisation de ses inhibiteurs naturels tels que la follistatine, ou artificiels comme la protéine sActRIIB-Fc, notamment chez les souris *mdx* (Muscular Dystrophy X-linked) (Bogdanovich *et al.*, 2002, Wagner *et al.*, 2002, Nakatani *et al.*, 2008). Ces souris

présentent un déficit en dystrophine, similaire à celui observé dans la myopathie de Duchenne, maladie neuromusculaire la plus fréquente chez l'enfant. Différents projets actuellement soutenus par l'Association Française contre les Myopathies (AFM), consistent à analyser le bénéfice apporté par l'inhibition de la myostatine dans de telles pathologies. Ainsi, l'action de la protéine sActRIIB-Fc, couplée à celle d'un adénovirus associé (AAV)-U7 qui restaure par saut d'exon la *dystrophine*, permet d'augmenter la masse musculaire et d'améliorer sa fonction chez les souris *mdx* (Hoogaars *et al.*, 2012). L'inhibition de la myostatine par cette protéine artificielle s'avère être aussi une méthode prometteuse dans le traitement des cachexies cancéreuses (Zhou *et al.*, 2010).

L'inhibition exercée par la myostatine est telle qu'elle est dépendante d'une régulation physiologique très fine, majoritairement effectuée par ses inhibiteurs tels que son propeptide, la follistatine ou GASP-1, une protéine sécrétée à multiples domaines majoritairement retrouvés dans les inhibiteurs de protéases (Lee et McPherron, 2001, Thies *et al.*, 2001, Hill *et al.*, 2003). Bien que de nombreuses analyses aient été menées sur l'inhibition de la myostatine induite par son propeptide ou par la follistatine, les quelques études concernant la protéine GASP-1 se sont principalement concentrées sur la caractérisation fonctionnelle de ses domaines anti-protéases (Trexler *et al.*, 2001, Trexler *et al.*, 2002, Nagy *et al.*, 2003, Liepinsh *et al.*, 2006).

En 2006, l'équipe du Pr Véronique Blanquet au sein de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale initie l'analyse fonctionnelle de la protéine GASP-1 et de son paralogue GASP-2 au cours du développement musculaire squelettique. Dans cet objectif, différentes stratégies d'inactivation ou de surexpression de ces gènes sont mises en place chez la souris. Au commencement de ma thèse en 2010, l'équipe vient de générer différentes lignées de souris transgéniques surexprimant le gène *Gasp-1*. Je participe alors aux analyses phénotypiques de ces souris. L'ensemble des lignées présentant un phénotype musculaire similaire, nos efforts se sont concentrés sur la caractérisation de la lignée surGasp1-20 dont le phénotype est le plus marqué. La lignée surGasp1-20 présente une augmentation globale du poids des muscles squelettiques et une hypertrophie de l'ensemble des fibres musculaires, conséquences d'une inhibition de la myostatine (Monestier *et al.*, 2012b). Pourtant, à la différence des souris *Mstn*^{-/-} dont le gène de la *myostatine* est invalidé, le nombre total de fibres des souris surGasp1-20 et leur métabolisme ne présentent pas de variation par rapport aux souris sauvages. Aucune variation morphologique sur l'ensemble des autres organes n'a été observée. L'ensemble des analyses réalisées nous laisse alors supposer que la surexpression de *Gasp-1* dans nos lignées transgéniques n'a pas d'effet sur le développement musculaire prénatal.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires régulés par la protéine GASP-1 au sein de ces lignées, j'ai développé une étude *in vitro* des cellules myoblastiques dérivées des cellules satellites de

la lignée surGasp1-20, appelées cellules S20. Comme attendu, les premières analyses phénotypiques de ces cultures primaires ont révélé une augmentation des processus de prolifération et de différenciation des cellules S20 par rapport aux sauvages, cependant moindre que celle observée sur les cellules issues des souris *Mstn*^{-/-}. Différents travaux ont montré que la myostatine régule les processus myogéniques selon trois voies : elle active la voie des SMADs et les voies des MAPKs ERK1/2 et p38, et elle inhibe la voie Akt, ceci aboutissant à l'inhibition globale des processus myogéniques (Langley *et al.*, 2002, Philip *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2007, Trendelenburg *et al.*, 2009). Notre intérêt s'est donc porté sur les cascades de signalisation mises en jeu par la myostatine et GASP-1 dans les cellules primaires et sur les gènes dérégulés en aval de ces cascades, afin d'expliquer le phénotype intermédiaire obtenu (Brun C *et al.*, soumis dans Skeletal Muscle Journal).

Au cours de la caractérisation des cellules, nous avons mis en évidence une surexpression de la *myostatine*, aussi observée au sein de la lignée murine surGasp1-20. Pour expliquer un tel phénomène, deux hypothèses de travail ont été proposées. Notre première hypothèse consiste à penser que la surexpression de *Gasp-1* est telle qu'elle induit l'autorégulation de la myostatine (Forbes *et al.*, 2006). Pour le vérifier, j'ai réalisé le clonage du promoteur de la *myostatine* en amont de la luciférase afin de tester son activité dans nos cellules S20 par rapport aux cellules sauvages. La seconde hypothèse consiste à penser que la surexpression de *Gasp-1* dérégule l'expression de certains miARNs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de la myostatine. Pour les identifier, j'ai donc créé une carte TLDA (Taqman Low Density Array) dont les sondes ont été spécifiquement sélectionnées d'après un crible bibliographique (Brun C *et al.*, en préparation).

Enfin, j'ai réalisé une étude structure-fonction de la protéine GASP-1 (Brun *et al.*, 2012). L'émergence de l'industrie biopharmaceutique représente une révolution majeure pour la médecine moderne à travers le développement de protéines thérapeutiques recombinantes. La demande croissante pour ces traitements impose une évolution technologique constante afin d'accroître les rendements des produits tout en préservant leurs propriétés dont la glycosylation. En effet, la glycosylation influence l'activité biologique, la demi-vie sérique mais aussi l'immunogénicité de la protéine recombinante. Ainsi, connaître l'état de glycosylation de la protéine GASP-1 et l'influence de la glycosylation sur son activité est une étape essentielle avant d'envisager une éventuelle production de la protéine dans un objectif thérapeutique.

L'ensemble de ces résultats sera présenté dans la deuxième partie de mon manuscrit sous forme de trois articles commentés après avoir décrit dans une première partie les connaissances sur la myogenèse du muscle squelettique chez les vertébrés, les mécanismes moléculaires régulant la masse musculaire et les protéines GASPs. Enfin, la troisième partie de mon manuscrit sera dédiée à une discussion prospective sur la (les) fonction (s) de la protéine GASP-1.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Représentant 40 à 50 % de la masse corporelle totale chez l'Homme, le muscle est un tissu contractile dédié aux mouvements et au métabolisme énergétique. Au regard de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, trois types de muscles peuvent se distinguer : lisse, cardiaque et squelettique. Les cellules musculaires lisses sont localisées dans la lumière des organes creux comme les vaisseaux sanguins ou les tractus gastro-intestinaux et respiratoire. Les cellules musculaires cardiaques, uniquement retrouvées dans le cœur, fournissent la force nécessaire pour propulser le sang à travers le système circulatoire. Les muscles lisses et cardiaque sont dits involontaires, c'est-à-dire que leur contraction est dépendante d'impulsions inconscientes. Ils participent à des fonctions vitales de l'organisme, telles que la circulation sanguine, la digestion ou la respiration. A l'inverse, le muscle squelettique est dit volontaire puisque sa contraction, coordinatrice des mouvements et de la motricité, est contrôlée par le système nerveux central. Comme les cellules du muscle cardiaque, les cellules musculaires squelettiques apparaissent striées du fait de leurs arrangements cytosquelettiques et présentent un profil en bandes lorsqu'elles sont observées par microscopie (**Figure 1**).

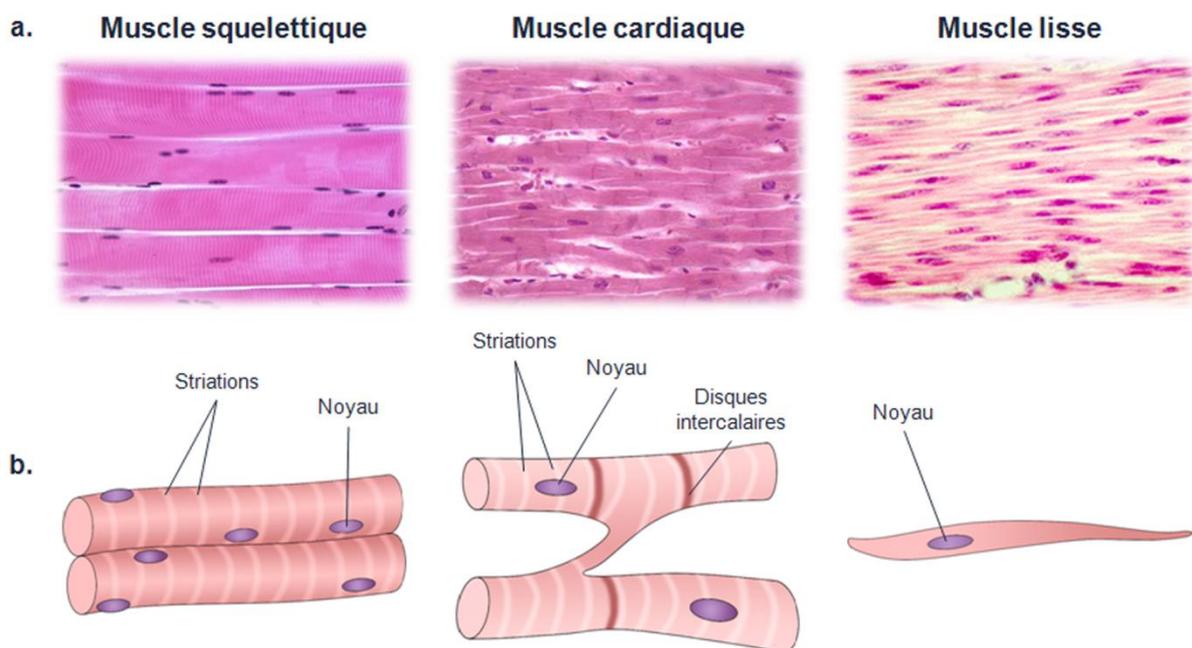


FIGURE 1. LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES MUSCULAIRES. (a) Microscopie optique des sections longitudinales colorées en hématoxyline/éosine de chaque type de fibres musculaires (rose) et leurs noyaux (violet). (b) Représentation schématique de chaque type de cellules musculaires. Les fibres musculaires squelettiques sont des cellules longues, multinucléées et striées. Les cellules cardiaques sont des cellules striées de un à deux noyaux, séparées par des disques intercalaires permettant la communication cellulaire et une contraction synchronisée. Les cellules musculaires lisses sont mononucléées, longues et en forme de fuseau.

Myogenèse du muscle squelettique chez les vertébrés

Structure et fonction du muscle squelettique

Comme leur dénomination le suggère, les muscles squelettiques sont ancrés à un os au minimum par des faisceaux de fibres de collagène formant les tendons. Le muscle squelettique est composé de dizaines à centaines de fibres musculaires cylindriques, aussi appelées myofibres, mesurant de 10 à 100 μm de diamètre et quelques centimètres de longueur. Ces cellules multinucléées résultent de la fusion de cellules progénitrices du muscle, lors de l'embryogenèse ou de la réparation du muscle adulte. Chaque myofibre est entourée par une fine couche de tissu conjonctif appelée endomysium (ou lame basale). Environ 20 à 80 fibres musculaires ou myofibres, sont regroupées parallèlement en faisceaux, ou fascicules musculaires, entourés par le pérимыsium. Chaque muscle est ainsi formé par un ensemble de faisceaux musculaires enfermés dans un dernier tissu conjonctif, véritable prolongement des tendons, l'épimysium ou *fascia*. Les différentes couches de tissus conjonctifs forment à la fois le cadre et les points d'ancrage des fibres musculaires (**Figure 2 a**).

La fibre musculaire est elle-même constituée d'un grand nombre de myofibrilles alignées, entourées par le sarcolemme et intégrées dans le réticulum sarcoplasmique. Une série de bandes claires et sombres perpendiculaires à leur axe longitudinal constitue la caractéristique microscopique la plus frappante des myofibrilles et des muscles striés. Les myofibrilles sont les unités contractiles de la fibre musculaire. Chacune d'entre elles contient de nombreuses structures fonctionnelles : les filaments fins et les filaments épais. Ces filaments sont disposés de façon répétitive sur toute la longueur de la myofibrille et constituent le sarcomère (**Figure 2 b**) (Sanger *et al.*, 2010).

Situé au milieu de chaque sarcomère, les filaments épais sont presque exclusivement composés de la protéine motrice, la myosine. Leur arrangement parallèle et parfaitement ordonné produit une large bande sombre connue sous le nom de bande A. Recouvrant une partie des filaments épais, les filaments fins se composent de la protéine cytosquelettique actine, ainsi que deux autres protéines, la troponine et la tropomyosine, jouant un rôle majeur dans la régulation de la contraction. Chaque sarcomère contient deux séries de filaments fins ancrés à un réseau de protéines constituant la ligne Z. Deux lignes Z successives définissent les frontières d'un sarcomère. La bande claire se situant entre les bandes A de deux sarcomères adjacents est appelée bande I. Enfin, une bande étroite et sombre nommée ligne M correspond aux protéines qui lient les régions centrales des filaments épais (**Figure 2 b, c**) (Huxley, 1985, Sanger *et al.*, 2010).

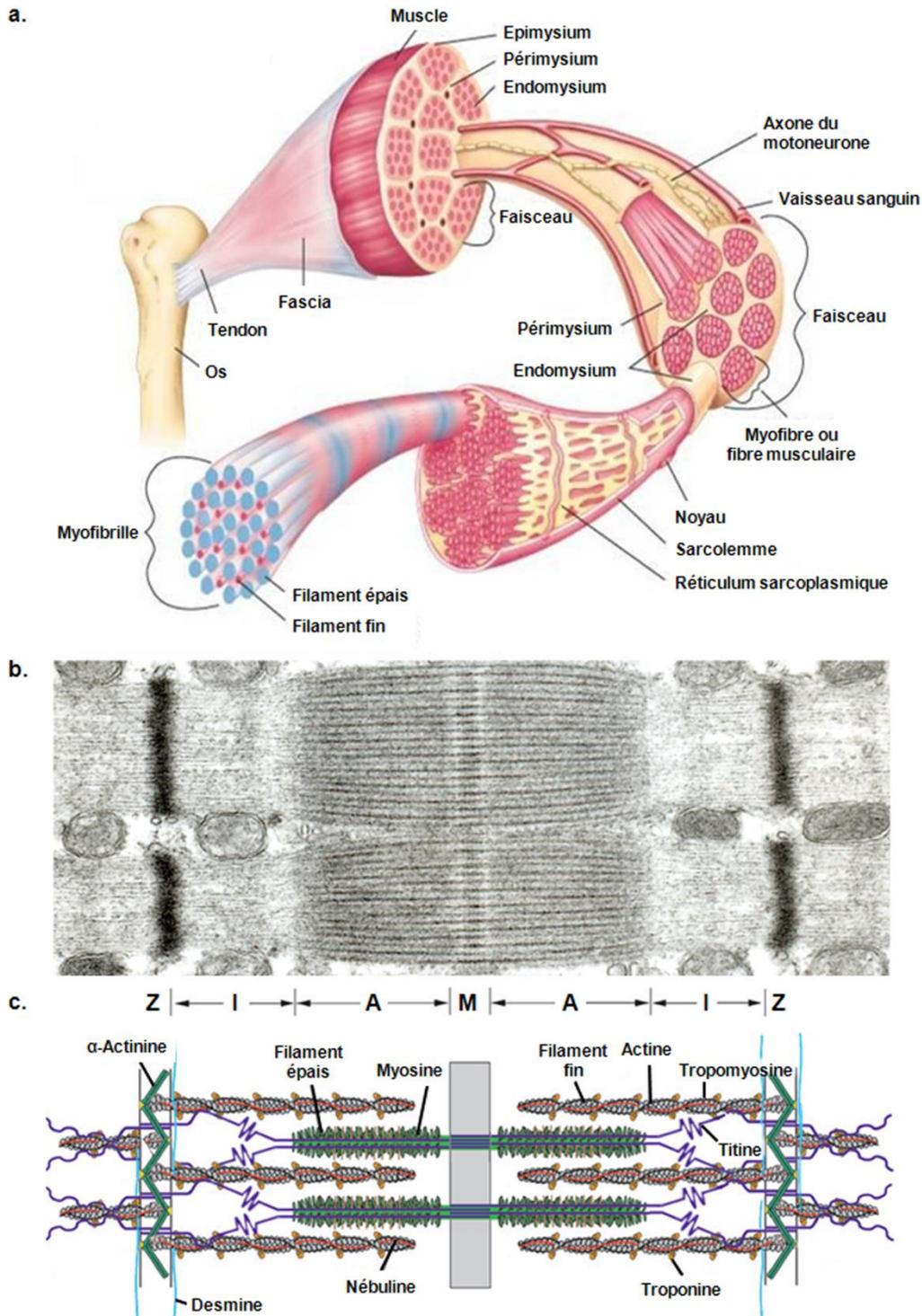


FIGURE 2. ANATOMIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE ET STRUCTURE DE LA MYOFIBRE. (a) Le muscle squelettique contient un grand nombre de myofibres comprises en faisceaux et entouré de tissus conjonctifs. Les myofibres sont des cellules multinucléées constituées de filaments fins et filaments épais établissant la myofibrille, véritable unité contractile du muscle. (b) Photographie en microscopie électronique de l'organisation ultrastructurale des sarcomères organisés en parallèle. (c) Représentation schématique du sarcomère. Le sarcomère comprend des filaments fins d'actine, des filaments épais de myosine, ainsi qu'une protéine géante et filamenteuse, la titine. Les filaments fins sont ancrés au niveau de la ligne Z, où ils sont réticulés par l' α -actinine. Les filaments épais sont situés au centre du sarcomère et constituent la bande A. La ligne M est la bande sombre correspondant aux régions centrales des filaments épais adjacents. La bande I est la région claire où les filaments fins ne sont pas recouverts par les filaments épais. (Adaptée de Ottenheijm *et al.* (2008))

La contraction des muscles squelettiques induite par les myofibrilles est dépendante de l'augmentation du taux de calcium intracellulaire (Ca^{2+}). La concentration de Ca^{2+} cytosolique est contrôlée par des événements électriques sur la membrane plasmique des myofibrilles. En effet, chaque fibre musculaire est innervée par un motoneurone au niveau de la jonction neuromusculaire (Hirsch, 2007). Lorsqu'un potentiel d'action arrive, le motoneurone libère de l'acétylcholine (ACh) à la jonction neuromusculaire entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique de la fibre. Cette dépolarisation conduit à la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme, conduisant à la contraction musculaire par raccourcissement des sarcomères (Schiaffino et Reggiani, 2011). Le raccourcissement des sarcomères est induit par le glissement des filaments fins sur les filaments épais tout au long de la myofibrille (Huxley, 1969).

Les muscles squelettiques étant adaptés à différents types de mouvements comme la locomotion, le maintien de la posture ou la respiration, ils ne partagent pas tous les mêmes caractéristiques concernant la mécanique et le métabolisme de leurs fibres. En effet, les fibres musculaires sont classées en fonction de leurs vitesses maximales de raccourcissement : rapide ou lente, et en fonction de la voie métabolique principalement utilisée pour produire de l'ATP : oxydative ou glycolytique (**Tableau 1**) (Schiaffino et Reggiani, 2011). La vitesse de contraction dépend de l'isoforme exprimée de chaîne lourde de myosine (MyHC) et de son activité ATPasique. Ainsi, les fibres contenant des myosines avec une forte activité ATPasique sont classées parmi les fibres à contraction rapide ou de type II. En revanche, les fibres dont les myosines ont une faible activité ATPasique sont définies comme des fibres lentes ou de type I.

Une autre façon de classer les fibres musculaires squelettiques est de considérer le type de voie métabolique majoritaire utilisé pour synthétiser l'ATP. Les fibres lentes ou de type I apparaissent rouges car elles sont entourées d'un réseau capillaire dense pour drainer la myoglobine liée à l'oxygène ainsi que les nutriments essentiels à la production d'ATP. Elles contiennent de nombreuses mitochondries ce qui les classe parmi les fibres oxydatives. Ces fibres de type I sont résistantes à la fatigue et impliquées dans des mouvements réguliers et prolongés. Les fibres à contraction rapide ou de type II sont classées en deux catégories en fonction de leur fatigabilité. Les fibres de type IIa partagent certaines caractéristiques avec les fibres lentes : elles reposent aussi sur le métabolisme oxydatif mais possèdent une quantité abondante de glycogène et contiennent plus de mitochondries. Elles sont utilisées pour des activités à long terme et des contractions rapides. Les fibres de type IIb/x reposent sur le métabolisme glycolytique utilisant le glycogène stocké comme source d'énergie. Elles ont peu de mitochondries, un réseau sanguin environnant faible et sont plus facilement fatigables. Elles apparaissent blanches en raison de leur faible teneur en myoglobine. Ces fibres sont mieux adaptées pour des actions rapides et intenses (**Tableau 1**) (Westerblad *et al.*, 2010).

TABEAU 1. CLASSEMENT DES FIBRES MUSCULAIRES SELON LEURS CARACTERISTIQUES STRUCTURALES, METABOLIQUES ET FONCTIONNELLES.

Caractéristiques	Lente – Oxydative Type I	Rapide – Oxydative Type IIa	Rapide – Glycolytique Type IIb/x
Structurales			
Isoformes de MyHC	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIb ou IIx
Mitochondries	Nombreuses	Nombreuses	Rares
Réseau sanguin	Dense	Dense	Pauvre
Métaboliques			
Métabolisme	Oxydatif	Oxydatif / Glycolytique	Glycolytique
Activité ATPasique	Faible	Elevée	Elevée
Contenu en myoglobine	Elevé	Elevé	Faible
Contenu en glycogène	Faible	Elevé	Elevé
Fonctionnelles			
Vitesse de contraction	Lent	Rapide	Rapide
Fatigabilité	Lent	Intermédiaire	Rapide

ATP, adénosine triphosphate ; MyHC, myosin heavy chain

La structure du muscle squelettique des vertébrés est donc complexe, composée d'unités fonctionnelles discrètes mais essentielles pour produire l'énergie nécessaire aux mouvements de l'organisme. La génération de ce cœur fonctionnel jusqu'au muscle entier, ou myogenèse, dépend d'une série d'évènements morphogénétiques très régulés au cours du développement embryonnaire et qui varient considérablement en fonction du type de muscle formé. La myogenèse se définit donc comme l'ensemble des étapes nécessaires à l'édification et au développement du tissu musculaire.

Développement embryonnaire des muscles

Bien que le développement myogénique soit le même pour l'ensemble des muscles squelettiques, l'initiation du programme myogénique est différente selon l'origine des cellules progénitrices (Mootoosamy et Dietrich, 2002). Au cours de l'embryogenèse des vertébrés, les cellules progénitrices qui constitueront les futurs muscles squelettiques du tronc et des membres se forment à partir du mésoderme paraxial. En revanche, certains muscles de la tête, aussi appelés cranio-faciaux, qui regroupent les muscles extra-oculaires, axiaux, pharyngo-lingual et les muscles issus des arcs branchiaux, prennent leur origine au sein du mésoderme crânial et non segmenté, des somites pré-otiques et du mésoderme préchordal (Noden et Francis-West, 2006, Kuratani, 2008). Les cascades de signalisation initiant le lignage myogénique diffèrent donc entre les deux catégories de muscles (**Figure 3**) (Sambasivan *et al.*, 2009). Les muscles du tronc et des membres sont dépendants de l'expression de *Pax3* (paired box protein 3) alors que le facteur indispensable à la formation des muscles de la tête est *Pitx2* (pituitary homeobox 2) (Shih *et al.*, 2008, Sambasivan *et al.*, 2011a).

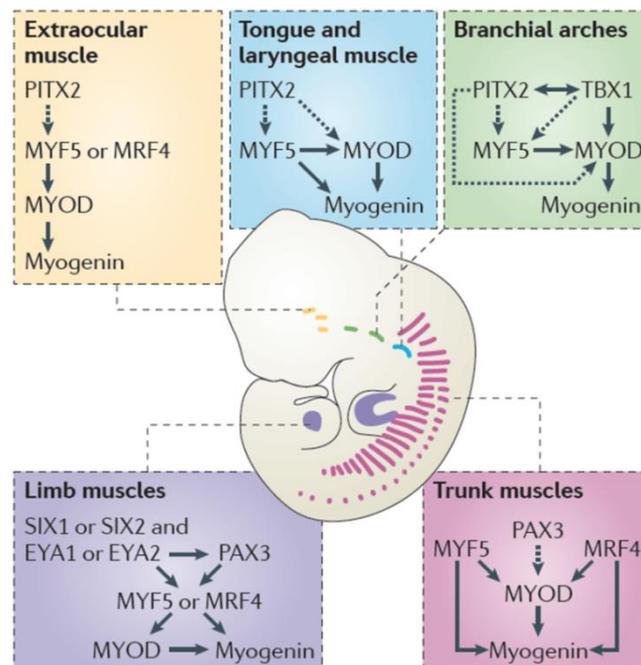


FIGURE 3. APERÇU DES DIVERS RESEAUX GENETIQUES REGULANT LE DEVENIR DES FUTURES CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES. Toutes les cellules musculaires expriment le même jeu de facteurs myogéniques (Myf5, MRF4, MyoD et myogénine) indispensables à la différenciation myogénique. Les autres facteurs, exprimés plus précocement, reflètent des différences spécifiques du lignage cellulaire. Le programme myogénique des muscles extra-oculaires, de la tête et des arcs branchiaux est principalement initié par le facteur Pitx2. Les muscles du tronc et des bourgeons des membres dérivent tous des somites du tronc et l'initiation de leur différenciation est sous la dépendance des facteurs Pax3, Six et Eya. Les lignes pleines représentent un contrôle direct, les lignes en pointillés correspondent à un contrôle indirect. *Eya*, eyes absent homolog protein ; *Mrf4*, myogenic regulatory factor 4 ; *MyoD*, myoblast determination protein 1 ; *Myf5*, myogenic factor 5 ; *Pax3*, paired box protein 3 ; *Pitx2*, pituitary homeobox 2 ; *Six*, sine oculis homeobox homolog protein ; *Tbx1*, T-box transcription factor 1. (D'après Braun et Gautel (2011))

Des somites aux bourgeons des membres

Chez tous les vertébrés, le développement embryonnaire se caractérise par une différenciation bilatérale progressive du mésoderme paraxial ou mésoderme pré-somitique non segmenté (PSM) en somites de part et d'autre du tube neural, de la tête vers la queue de l'embryon (Aulehla et Pourquie, 2006) (**Figure 4 a**). Les somites sont des structures épithéliales transitoires qui donneront naissance aux muscles squelettiques, au squelette axial et à une partie du derme (Dequeant et Pourquie, 2008). La somitogenèse est un processus rythmique, extrêmement fin et régulé par un oscillateur moléculaire comparable à une horloge qui entraîne la formation périodique des somites à partir du PSM. Cette production rythmique des somites a inspiré le modèle théorique « clock and wavefront » (**Figure 4 b**) (Cooke et Zeeman, 1976).

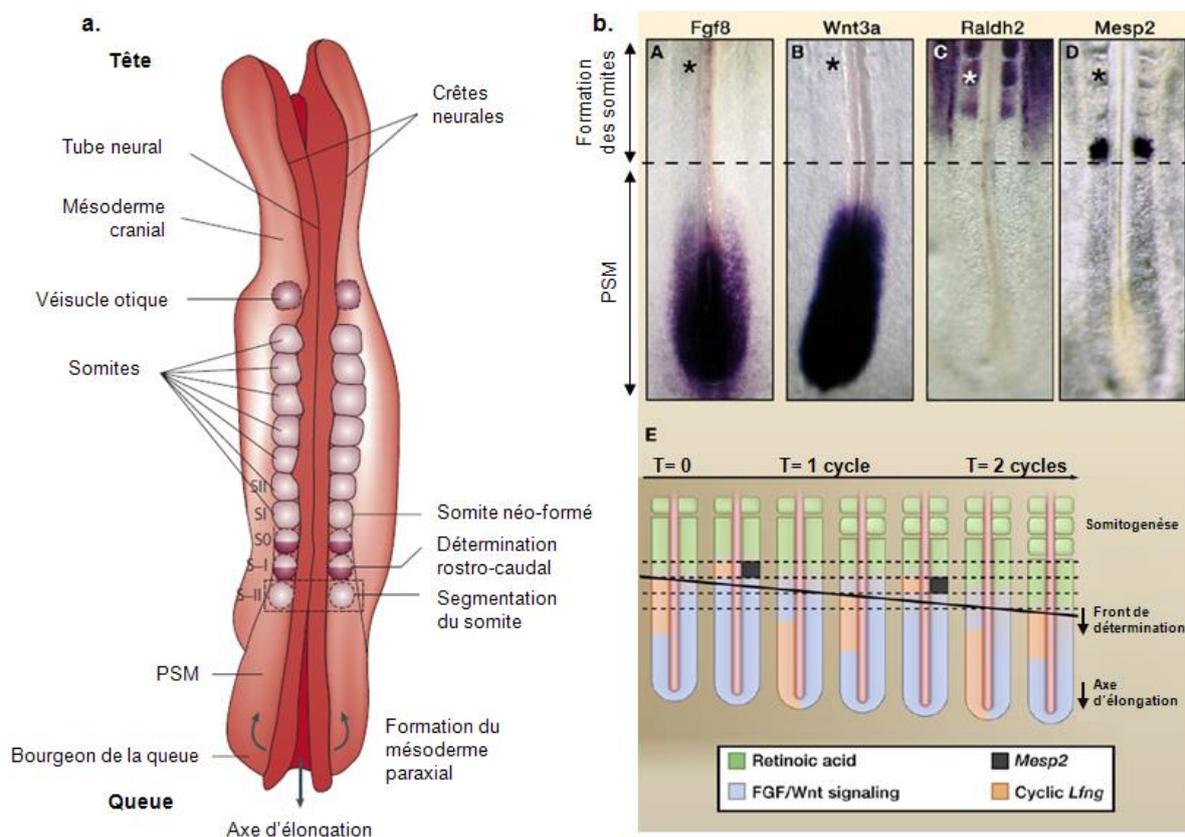


FIGURE 4. MODELE DE LA SOMITOGENESE CHEZ LES VERTEBRES. (a) Vue dorsale d'un embryon présentant les somites et le mésoderme paraxial (PSM) autour de l'axe du tube neural et les différentes phases permettant la formation des somites à partir du PSM. Les flèches indiquent le mouvement suivi par des cellules du bourgeon de la queue pour former le PSM. (b) (A-D) Domaines d'expression des molécules clés impliquées dans la somitogenèse. L'expression des gènes *Wnt3a* (A), *Fgf8* (B), *Raldh2* (C) et *Mesp2* (D) est analysée par hybridation *in situ*. Les astérisques correspondent aux somites néoformés. (E) Représentation schématique du modèle théorique « clock and wavefront ». Les gradients antagonistes de FGF/Wnt (violet) et de l'acide rétinoïque (vert) positionnent le front de détermination. Le signal périodique induit par l'horloge moléculaire est indiqué en orange. *Fgf*, fibroblast growth factor; *Lnfg*, lunatic fringe; *Mesp2*, mesoderm posterior protein 2; *Raldh*, retinaldehyde dehydrogenase. (Adaptée de Dequeant et Pourquie (2008) et Pourquie (2011))

L'existence de cet oscillateur moléculaire couplé à la somitogenèse a été démontrée *in vivo* pour la première fois par l'équipe d'Olivier Pourquie grâce à l'analyse de l'expression du facteur de transcription *hairy1* sur des embryons de poulet (Palmeirim *et al.*, 1997). A chaque cycle de somitogenèse, l'expression de *hairy1* commence dans la partie postérieure du PSM avant de remonter progressivement vers les cellules plus antérieures, ce phénomène étant comparable à une onde d'expression génique traversant le PSM (Palmeirim *et al.*, 1997). Grâce à des stratégies microarrays, les études ultérieures ont permis de montrer la conservation de cet oscillateur moléculaire à travers les espèces, et d'identifier de nombreux autres gènes impliqués dans ce processus spatio-temporel et liés aux voies de signalisation Notch, Wnt/ β -caténine et FGF (fibroblast growth factor) (**Figure 4 b**) (Dequeant *et al.*, 2006, Krol *et al.*, 2011). Du fait de cette expression périodique, ces gènes sont dits cycliques. Les gradients antagonistes des voies de signalisation des FGF/Wnt/ β -caténine et de l'acide rétinoïque sont établis en réponse à l'expression de ligands sécrétés tels que *Fgf8* ou *Wnt3a* et positionnent le front de détermination, véritable frontière entre le PSM et les futurs somites (**Figure 4 b A-B**) (Aulehla et Pourquie, 2008). Situées dans la partie postérieure du PSM, les cellules exposées à de fortes concentrations de FGF et Wnt se maintiennent dans un état indifférencié et immature (Aulehla et Pourquie, 2010). Ces voies de signalisation contrôlent l'activité périodique de la voie Notch, qui à son tour, régule l'expression de gènes cycliques impliqués dans la formation des somites (Hofmann *et al.*, 2004). Une fois le départ des cellules du PSM postérieur effectué, l'expression des gènes cycliques stoppe et l'augmentation du taux d'acide rétinoïque établit la polarité des somites (**Figure 4 b C**). La transition de l'état indifférencié des somites à un état dit compétent est liée à l'activation de *Mesp2*. La bande d'expression de *Mesp2* formée au niveau du PSM antérieur en réponse au signal périodique induit par l'horloge moléculaire définit les futures limites du somite (**Figure 4 b D**).

La myogenèse squelettique est initiée suite à la spécification des cellules somitiques, spécification dépendante de signaux moléculaires émis par les structures avoisinantes que sont la notochorde, le tube neural, le mésoderme latéral et l'ectoderme dorsal (**Figure 5**) (Buckingham *et al.*, 2003, Bryson-Richardson et Currie, 2008, Bentzinger *et al.*, 2012). Cet événement conduit à la régionalisation dorso-ventrale des somites. Le compartiment ventral donnera le sclérotome à l'origine des os et des cartilages. Le compartiment dorsal donnera le dermomyotome subdivisé selon leur position anatomique en deux régions : épaxiale et hypaxiale, participant à la mise en place des muscles du dos d'une part, et des muscles des membres et du tronc d'autre part. La compartimentation des somites est orchestrée par la signalisation moléculaire des tissus environnants majoritairement exercée par les voies des Wnts, de Shh (Sonic hedgehog), de Notch et des TGF- β (transforming growth factor- β) (**Figure 5**) (Marcelle *et al.*, 1997).

Essentielles à la détermination myogénique, les protéines Wnts agissent par l'intermédiaire de leur voie canonique liée à l'activation du complexe β -caténine/TCF (T-cell factor), ou de leurs voies non canoniques (von Maltzahn *et al.*, 2012). Les protéines Wnt1 et Wnt3a sécrétées par la région dorsale du tube neural et les protéines Wnt4, Wnt6 et Wnt7a sécrétées par l'ectoderme spécifient le compartiment dorsal des somites et permettent ainsi la formation du dermomyotome (**Figure 5**) (Tajbakhsh *et al.*, 1998, Otto *et al.*, 2006). Sécrétée à partir du plancher du tube neural et de la notochorde, la protéine Shh régule quant à elle la spécification du dermomyotome épaxial et du sclérotome (**Figure 5**) (Zhang *et al.*, 2001, Anderson *et al.*, 2012).

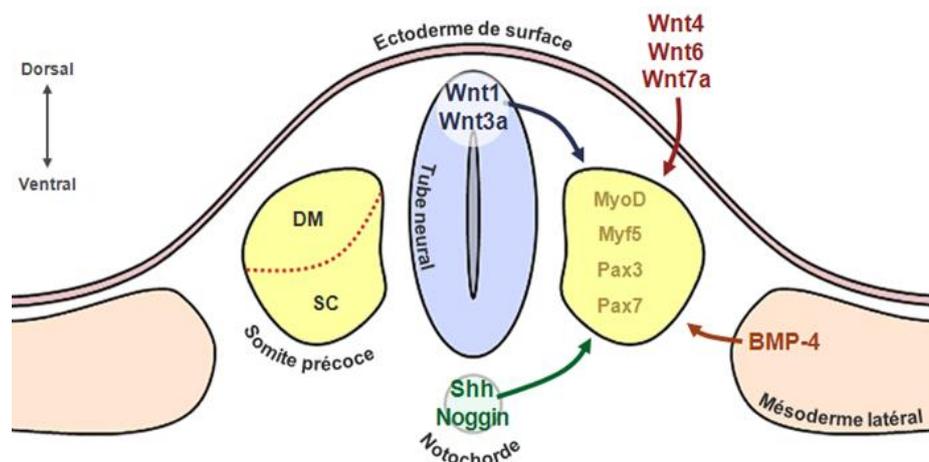


FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COUPE TRANSVERSALE D'EMBRYON AU STADE PRECOCE DE LA SOMITOGENESE. Les morphogènes sécrétés des différents domaines de l'embryon régionalisent les somites précoces pour former les futurs dermomyotome et sclérotome. Les facteurs Wnts sont sécrétés de l'ectoderme de surface et du côté dorsal du tube neural et participent activement à la formation du dermomyotome. Sécrété du plancher du tube neural et de la notochorde, Shh permet la spécification du dermomyotome épaxial et du sclérotome. L'action conjointe du TGF- β BMP-4 et de son inhibiteur Noggin sécrétés de la notochorde et de la plaque latérale du mésoderme respectivement participent à cette régionalisation. *BMP*, bone morphogenetic protein ; *DM*, dermomyotome ; *MyoD*, myoblast determination protein 1 ; *Myf5*, myogenic factor 5 ; *Pax*, paired box protein ; *SC*, sclérotome ; *Shh*, sonic hedgehog ; *TGF*, transforming growth factor.

A l'inverse des protéines Wnts et Shh qui régulent positivement la spécification cellulaire, les facteurs BMPs (bone morphogenetic proteins) et le récepteur Notch ont plutôt un rôle inhibiteur sur l'expression des facteurs myogéniques (**Figure 5**). Ils maintiennent les cellules dans un état indifférencié et favorisent ainsi l'expansion du pool de cellules progénitrices plutôt que leur différenciation (Pourquie *et al.*, 1995, Hirsinger *et al.*, 1997, Hirsinger *et al.*, 2001, Schuster-Gossler *et al.*, 2007). Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces voies de signalisation régule l'expression de différents facteurs clés dans la détermination des cellules myogéniques, notamment les facteurs de transcription Pax3 et Pax7 (Buckingham et Relaix, 2007). En effet, les cellules du dermomyotome à l'origine des futures cellules musculaires se distinguent par l'expression de ces facteurs de transcription (Jostes *et al.*, 1990, Goulding *et al.*, 1991).

Aux alentours du 10^{ème} jour de développement embryonnaire (E10.0) chez la souris et sous l'influence de nouveaux signaux, ces cellules progénitrices du muscle subissent une délamination du dermomyotome hypaxial permettant leur migration vers les bourgeons des membres où elles se différencieront enfin pour former les premières fibres musculaires (**Figures 6**) (Buckingham *et al.*, 2003).

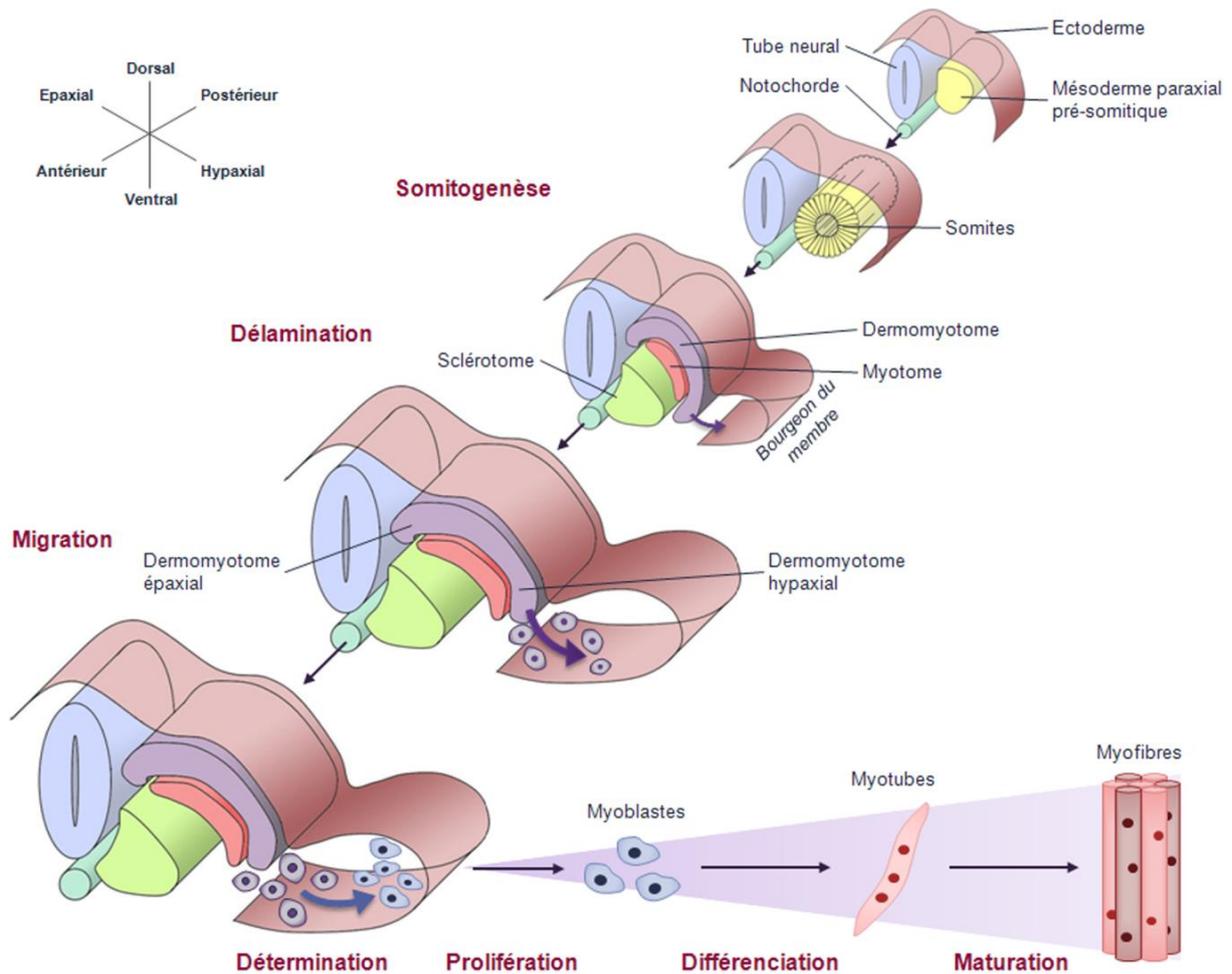


FIGURE 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE DES SOMITES JUSQU' AUX BOURGEONS DES MEMBRES. Durant l'embryogenèse des vertébrés, le muscle squelettique se forme à partir du mésoderme paraxial qui se segmente en somites de part et d'autre de la notochorde et du tube neural au cours de la **somitogenèse**. La fraction dorsale des somites, ou dermomyotome, participe à la formation du derme et des muscles squelettiques. Cette spécification des cellules somitiques est dépendante de signaux moléculaires émis par les structures avoisinantes (notochorde, tube neural et ectoderme dorsal). Le dermomyotome peut être divisé en deux régions, épaxiale et hypaxiale, selon leurs positions anatomiques. Sous l'influence de nouveaux signaux, les cellules du dermomyotome hypaxial subissent une **délamination** autorisant leur **migration** vers les bourgeons des membres. Ces cellules activent alors leur programme myogénique suite à la **détermination**, elles prolifèrent et se différencient pour permettre la formation du muscle squelettique.

La délamination est indissociable de l'expression du récepteur à activité tyrosine kinase c-Met induite par Pax3 dans les cellules épithéliales du dermomyotome et de son ligand HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) par les cellules mésenchymateuses des bourgeons des membres (**Figure 6**) (Bladt *et al.*, 1995, Brand-Saberi *et al.*, 1996b, Epstein *et al.*, 1996). Il a d'ailleurs été montré que les mutants murins pour les gènes *c-Met* et *HGF/SF* présentent des phénotypes similaires correspondant à une absence complète des muscles des membres, conséquence de l'incapacité des cellules du dermomyotome hypaxial à se détacher (**Tableau 2**) (Bladt *et al.*, 1995, Uehara *et al.*, 1995). Par ailleurs, les souris mutantes pour la protéine GAB1 (Growth factor Receptor Bound protein 2 (GRB2)-associated binder-1), partenaire intracellulaire direct du récepteur c-Met, présentent un phénotype assez proche des souris *c-Met*^{-/-}, confirmant le rôle indispensable de ces protéines dans la délamination des précurseurs myogéniques (**Tableau 2**) (Sachs *et al.*, 2000).

Une fois détachées du dermomyotome hypaxial, les cellules progénitrices du muscle migrent vers les bourgeons des membres sous l'influence de nouvelles molécules, notamment le facteur de transcription à homéodomaine Lbx1 (Ladybird homeobox protein homolog 1) (**Figures 6 et 7**). Dépendante du facteur Pax3, l'expression de *Lbx1* est spécifique des précurseurs musculaires en cours de détachement du dermomyotome hypaxial et se poursuit tout au long de la migration de ces cellules (Jagla *et al.*, 1995, Uchiyama *et al.*, 2000). L'invalidation de ce gène chez la souris entraîne une absence spécifique des muscles des membres, liée au défaut de migration des précurseurs myogéniques (**Tableau 2**) (Schafer et Braun, 1999, Brohmann *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2000). En effet, bien que la délamination des cellules progénitrices du muscle de ces mutants ait bien lieu, les cellules restent à proximité du dermomyotome, ceci démontrant le rôle indispensable de Lbx1 dans le contrôle de la migration cellulaire (Brohmann *et al.*, 2000).

D'autres acteurs participent à cette transition des cellules épithéliales vers des cellules mésenchymateuses ainsi qu'à la migration cellulaire, notamment des protéines d'adhésion cellulaire comme la N-cadhérine ou la fibronectine, qui modulent l'adhérence des précurseurs myogéniques aux structures embryonnaires environnantes pour permettre leur migration vers leur localisation finale (Brand-Saberi *et al.*, 1993, Brand-Saberi *et al.*, 1996a).

La délamination et la migration des précurseurs myogéniques sont donc deux processus largement contrôlés par l'expression de Pax3, acteur central d'un important réseau génique complété par l'expression d'autres facteurs, notamment les gènes de la famille *Six* (Sine oculis-related homeobox) (**Figure 7 a, b**) (Bober *et al.*, 1994, Goulding *et al.*, 1994, Epstein *et al.*, 1996, Relaix *et al.*, 2013). Les gènes *Six1* et *Six4* sont exprimés dans les régions épaxiale et hypaxiale du dermomyotome et présentent un rôle essentiel au cours de la myogenèse du muscle squelettique,

l'invalidation de ces gènes chez les souris *Six1*^{-/-}/*Six4*^{-/-} entraîne la dérégulation de *Pax3* et il en résulte ainsi une absence de muscles dans les bourgeons des membres (**Figure 7 a, b**) (**Tableau 2**) (Grifone *et al.*, 2005).

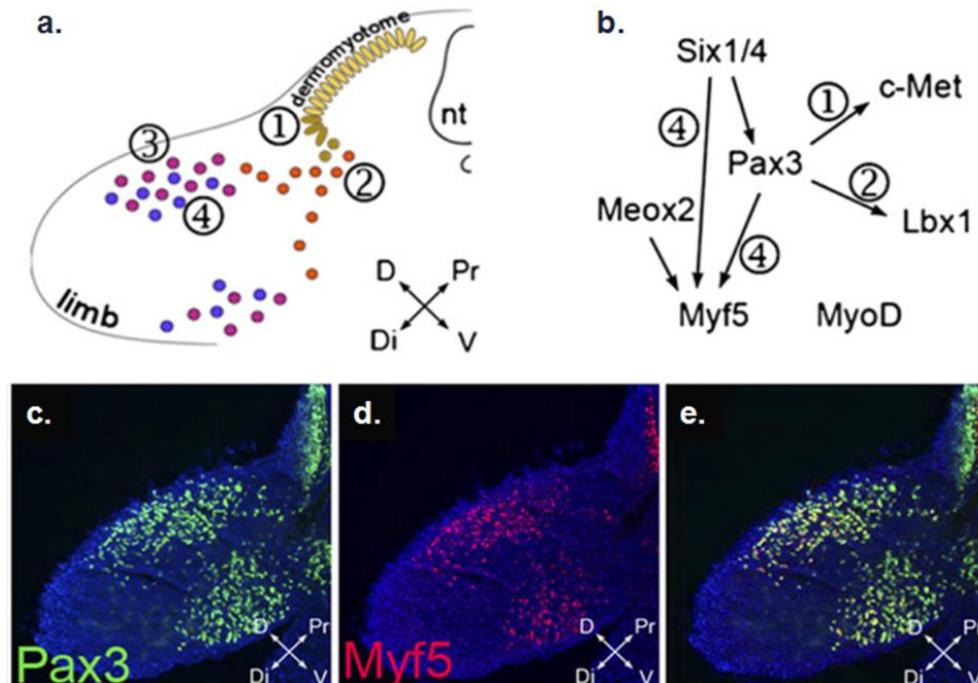


FIGURE 7. RESEAU GENIQUE IMPLIQUE DANS LA DELAMINATION ET LA MIGRATION DES PRECURSEURS MYOGENIQUES. (a) Représentation schématique des étapes successives essentielles à la myogenèse du membre avec la délamination des cellules du dermomyotome hypaxial⁽¹⁾, leur migration dans le bourgeon du membre⁽²⁾, la prolifération et l'expansion de cellules progénitrices des muscles du membre⁽³⁾, et l'activation du programme myogénique grâce à l'expression des gènes *Myf5* et *MyoD*⁽⁴⁾. (b) Réseau génique impliqué dans la régulation des différentes étapes des muscles des membres. (c-e) Analyse par immunofluorescence de l'expression des gènes *Pax3* (vert) (c) et *Myf5* (rouge) (d) sur des sections transversales du bourgeon du membre d'une souris sauvage à E10.5, et fusion (e) des images *Pax3* et *Myf5* pour l'analyse de colocalisation de l'expression de ces gènes. Grossissement x200. D, dorsal; Dt, distal; Lbx1, Ladybird homeobox protein homolog 1; *MyoD*, myoblast determination protein 1; *Myf5*, myogenic factor 5; nt, neural tube; *Pax3*, paired box protein 3; Pr, proximal; *Six*, *Sine oculis*-related homeobox; V, ventral. (D'après Anderson *et al.* (2012))

Cette absence de muscles au sein des bourgeons est directement liée à un défaut de délamination et de migration des précurseurs myogéniques. Ce phénotype est d'ailleurs retrouvé chez les souris *Pax3*^{-/-}, témoignant du rôle indispensable de ce facteur de transcription dans les premières étapes de la myogenèse des muscles squelettiques des membres (**Tableau 2**) (Bober *et al.*, 1994, Epstein *et al.*, 1996, Tajbakhsh *et al.*, 1997).

De plus, en régulant l'expression du gène *Myf5*, les facteurs de transcription *Pax3* et *Six1/4* ont un rôle indispensable dans l'initiation de la différenciation myogénique terminale (Giordani *et al.*, 2007, Daubas et Buckingham, 2013).

TABLEAU 2. LISTE NON EXHAUSTIVE DES PHENOTYPES ASSOCIES AUX KNOCKOUT DE GENES IMPLIQUES DANS LA MYOGENESE PRECOCE DES MUSCLES SQUELETTIQUES DES MEMBRES.

Gènes	Familles	Phénotypes observés	Références
<i>Pax3</i>	FT paired box	Absence de muscles des membres	(Bober <i>et al.</i> , 1994)
<i>Six1, Six4</i>	FT à homéodomaine	Absence de muscles des membres	(Grifone <i>et al.</i> , 2005)
<i>c-Met</i>	Récepteur à tyrosine kinase	Absence de muscles des membres résultant d'un défaut de délamination	(Bladt <i>et al.</i> , 1995)
<i>HGF/SF</i>	Facteur de croissance	Absence de muscles des membres résultant d'un défaut de délamination	(Brand-Saberi <i>et al.</i> , 1996b)
<i>Gab1</i>	Corécepteur de c-Met	Absence de certains muscles des membres résultant d'un défaut de délamination	(Sachs <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lbx1</i>	FT	Absence de nombreux muscles des membres résultant d'un défaut de migration	(Brohmann <i>et al.</i> , 2000)
<i>MyoD</i>	FT à domaine bHLH	Léger retard du développement des muscles des membres	(Rudnicki <i>et al.</i> , 1992)
<i>Myf5</i>	FT à domaine bHLH	Phénotype normal	(Braun <i>et al.</i> , 1992)
<i>MyoD, Myf5</i>	FT à domaine bHLH	Incapacité à former des muscles des membres	(Rudnicki <i>et al.</i> , 1993)

bHLH, basic helix-loop-helix ; *FT*, facteur de transcription ; *Gab1*, Growth factor Receptor Bound protein 2 (GRB2)-associated binder-1 ; *HGF/SF*, hepatocyte growth factor/scatter factor ; *Lbx1*, Ladybird homeobox protein homolog 1 ; *Myf5*, myogenic factor 5 ; *MyoD*, myoblast determination protein 1 ; *Pax3*, paired box 3 ; *Six*, *Sine oculis-related homeobox*

En effet, les cellules progénitrices du muscle présentent aussi une faible expression du facteur de transcription à domaine bHLH (basic helix-loop-helix) *Myf5* (myogenic factor 5) (**Figure 7**) (Goulding *et al.*, 1994, Kiefer et Hauschka, 2001). Cette expression marque le premier signe de la détermination myogénique dans les membres. En plus de la délamination du dermomyotome hypaxial à l'origine de ces cellules myoblastiques, certaines cellules de la partie inférieure et centrale du dermomyotome se détachent pour rejoindre une structure musculaire primitive, le myotome (**Figure 6**). Au sein du myotome, les cellules engagées dans la voie myogénique expriment fortement, en plus de *Myf5*, un autre facteur à domaine bHLH, *MyoD* (myoblast determination protein 1) (Sassoon *et al.*, 1989, Cinnamon *et al.*, 2001, Ordahl *et al.*, 2001). Cette population cellulaire sera à l'origine des muscles fœtaux et adultes du tronc et d'une fraction des cellules satellites résidentes du muscle squelettique adulte (Gros *et al.*, 2005, Schienda *et al.*, 2006).

Les gènes *MyoD* et *Myf5* appartiennent à la famille des MRFs (myogenic regulatory factors) et sont considérés comme les marqueurs de la spécification terminale du lignage musculaire (**Tableau 2**) (Rudnicki et Jaenisch, 1995).

Différenciation myogénique terminale

La famille des gènes MRFs comporte quatre membres correspondant tous à des facteurs de transcription à domaines bHLH : *MyoD* (Davis *et al.*, 1987), *Myf5* (Braun *et al.*, 1989b), *myogénine* (Wright *et al.*, 1989) et *MRF4* (Rhodes et Konieczny, 1989). S'ils sont exprimés dans des lignées cellulaires non musculaires, ils sont tous capables d'induire le programme myogénique pour les convertir en cellules musculaires (Choi *et al.*, 1990, Weintraub *et al.*, 1991).

Les protéines MRFs possèdent une structure particulière qui leur permet, grâce à un domaine basique, de se fixer à l'ADN sur des séquences consensus CANNTG appelées « E-box » retrouvées au sein des séquences promotrices de nombreux gènes spécifiques du muscle (Lassar *et al.*, 1989, Olson et Klein, 1994, Sabourin et Rudnicki, 2000). Le domaine bHLH leur permet de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec d'autres facteurs à domaine bHLH comme les protéines E qui favoriseront la liaison à l'ADN alors que les protéines Id inhiberont cette liaison (Tapscott et Weintraub, 1991). De plus, les protéines MRFs peuvent interagir avec d'autres facteurs, membres de la famille des facteurs de transcription portant un domaine MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF), les protéines MEF2 (myocyte specific enhancer factor-2) (Brand-Saberi et Christ, 1999). Ces protéines agissent en coopération avec certains MRFs sur leurs cibles transcriptionnelles (Molkentin *et al.*, 1995). Indispensables à la formation du muscle squelettique, les MRFs possèdent un profil d'expression temporelle propre aussi bien au cours de l'embryogenèse qu'au cours du développement post-natal et adulte (**Figure 8**).

Au 8^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris, *Myf5* est le premier MRF exprimé (**Figure 8**) (Ott *et al.*, 1991). Son expression précède celle de *MyoD*, dont l'expression débute au jour E10.5 (Sassoon *et al.*, 1989). Malgré des fonctions indispensables au développement musculaire, les embryons murins *MyoD*^{-/-} et *Myf5*^{-/-} ne présentent pas en apparence de phénotype musculaire particulier, suggérant une compensation fonctionnelle (Braun *et al.*, 1992, Rudnicki *et al.*, 1992). La redondance fonctionnelle entre ces deux gènes est confirmée par le double knockout (KO) *MyoD*^{-/-}/*Myf5*^{-/-} qui résulte en l'absence de myoblastes squelettiques (**Tableau 2**) (Rudnicki *et al.*, 1993). La *myogénine* s'exprime dès le jour E8.5 (**Figure 8**) (Sassoon *et al.*, 1989). Elle est essentielle à la différenciation des myoblastes en myofibres, l'inactivation du gène chez la souris entraînant une réduction dramatique du nombre de fibres musculaires squelettiques (Hasty *et al.*, 1993). Le rôle de *MRF4* dans les processus myogéniques est un peu plus complexe. Longtemps considéré comme un acteur de la différenciation terminale, *MRF4* semblerait jouer un rôle supplémentaire dans la détermination précoce des cellules myoblastiques. En effet, l'utilisation de différents mutants alléliques de *Myf5* a révélé la présence de masses musculaires squelettiques en l'absence de *MyoD* et

Myf5 si l'expression de *MRF4* n'est pas compromise (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). Ces données corrélient avec l'expression de *MRF4* qui apparaît transitoirement entre les jours E10 et E11 au cours du développement embryonnaire et ne réapparaît ensuite qu'au 16^{ème} jour (**Figure 8**) (Bober *et al.*, 1991). Le profil d'expression des MRFs dans le bourgeon des membres en développement présente quelques différences (**Figure 8**). *Myf5* n'est exprimé que transitoirement entre le 10^{ème} et 12^{ème} jour de développement embryonnaire, et la *myogénine* et *MyoD* s'expriment ensemble à partir du jour E11 (Sassoon *et al.*, 1989, Ott *et al.*, 1991). *MRF4* s'exprime à partir du 16^{ème} jour (Bober *et al.*, 1991).

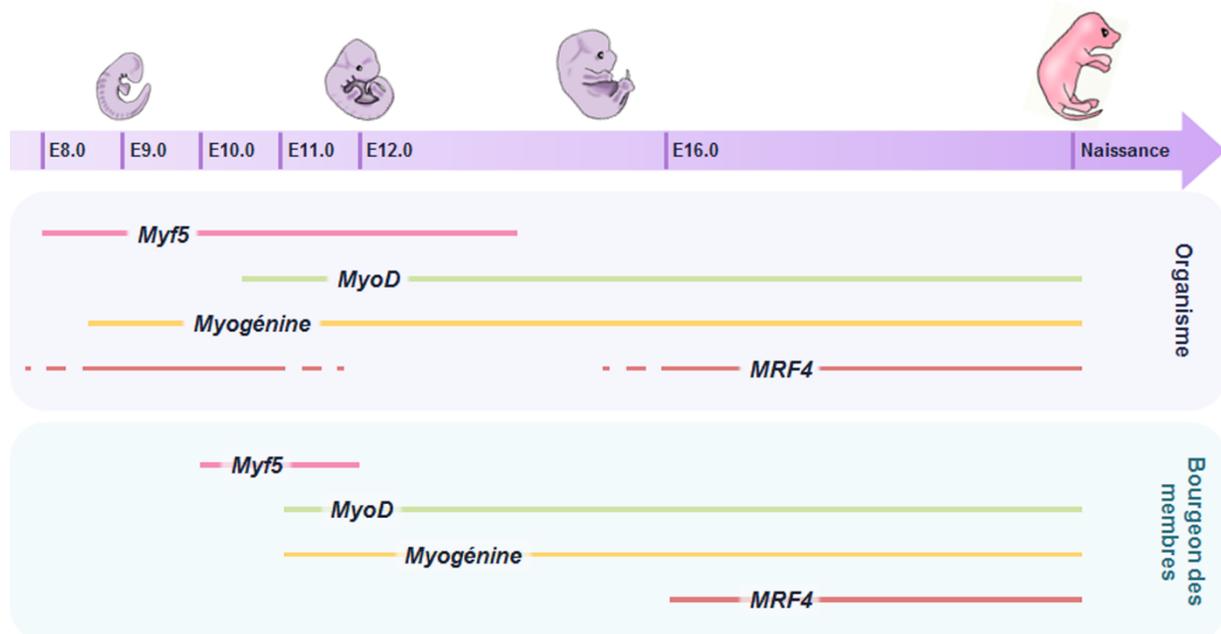


FIGURE 8. EXPRESSION DES MRFs AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS.

Les MRFs sont activés de façon séquentielle au cours du développement du muscle squelettique. (**Organisme**) *Myf5* est le premier MRF exprimé au 8^{ème} jour dans les somites et son expression décroît à partir du 14^{ème} jour. L'expression de la *myogénine* débute au jour E8.5 et perdure tout au long du développement. *MRF4* s'exprime transitoirement entre les jours 10 et 11, et son expression reprend au 16^{ème} jour pour devenir le facteur myogénique le plus abondant après la naissance. Enfin, *MyoD* apparaît au jour 10.5 et son expression se maintient au cours du développement. (**Bourgeons des membres**) Le profil d'expression est légèrement différent dans les bourgeons des membres. *Myf5* s'exprime transitoirement des jours 10 à 12, la *myogénine* et *MyoD* sont co-exprimés à partir du 11^{ème} jour, et *MRF4* s'exprime au 16^{ème} jour. E « x », jour embryonnaire n° « x » ; MRF, myogenic regulatory factor ; *MyoD*, myoblast determination protein.

Enfin, différentes études conduites sur des lignées cellulaires myoblastiques *in vitro* ont révélé le profil d'expression des MRFs au cours des processus de prolifération et de différenciation. Les lignées myoblastiques expriment *Myf5* et *MyoD* au cours de chacun de ces processus, alors que la *myogénine* ne s'exprime qu'à la suite de l'induction de la différenciation par appauvrissement du milieu de culture en facteurs mitogènes. Enfin, *MRF4* s'exprime plus tardivement, après la fusion des myoblastes en myotubes (Braun *et al.*, 1989a, Montarras *et al.*, 1991).

Globalement, l'ensemble de ces données *in vivo* et *in vitro* permet d'établir un modèle où la myogenèse équivaldrait à un processus comportant différentes étapes, la première débutant par l'engagement des précurseurs embryonnaires dans le lignage myogénique, puis la prolifération de ces myoblastes engagés et leur différenciation en cellules post-mitotiques ou myocytes. Ce processus se termine par la fusion de ces derniers en cellules multinucléées, les myotubes, à l'origine des futures fibres musculaires (**Figures 9 et 10**). La maturation des myotubes conduit à une spécialisation des cellules vers leur future fonction contractile grâce à l'assemblage du sarcomère porté par la protéine de structure myosine et à une croissance de la taille des myotubes ou des myofibres, en réponse à des stimuli environnementaux. Dans ce modèle, *Myf5* et *MyoD* agiraient en amont de la *myogénine* et *MRF4* afin de spécifier les myoblastes vers la différenciation myogénique (**Figure 9**) (Rudnicki *et al.*, 1993).

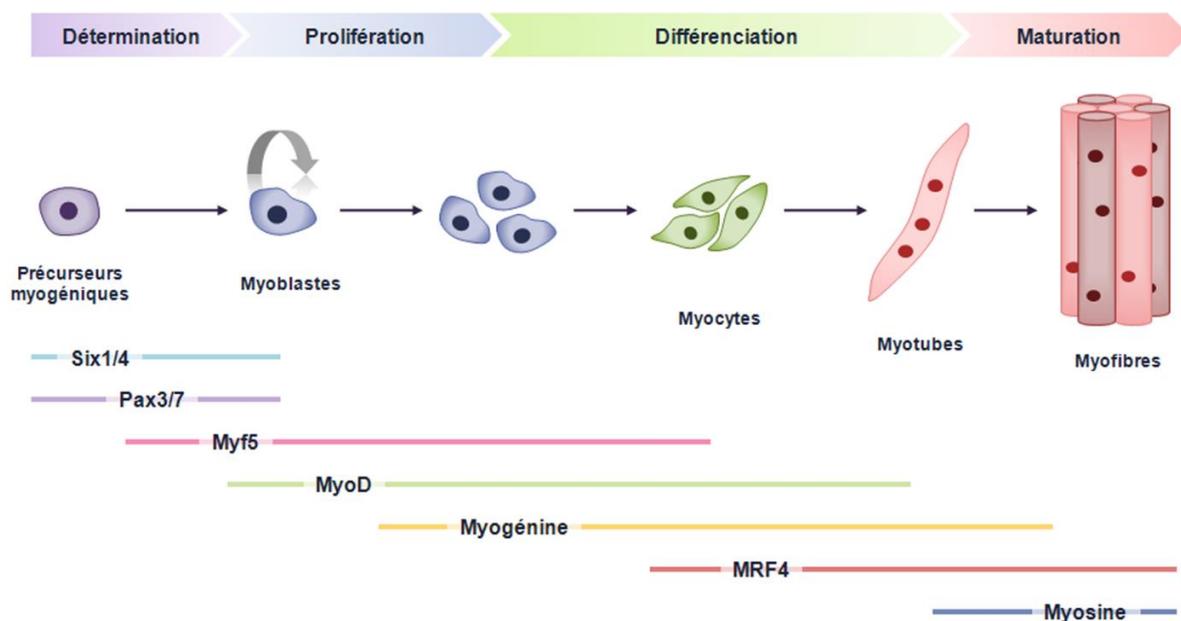


FIGURE 9. HIERARCHIE DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MYOGENESE SQUELETTIQUE. Les cellules progénitrices du muscle expriment Pax3 et Six1/4. Pax7 est un marqueur des cellules progénitrices adultes ou cellules satellites. Ces quatre facteurs sont impliqués dans la détermination précoce alors que Myf5 et MyoD sont nécessaires à l'initiation du programme myogénique. La différenciation est réalisée à la fois par la myogénine et MRF4, et conduit à l'expression de la protéine de structure myosine au cours de la maturation des fibres. *MRF4*, myogenic regulatory factor 4 ; *MyoD*, myoblast determination protein 1 ; *Myf5*, myogenic factor 5 ; *Pax3*, paired box protein 3 ; *Six*, sine oculis homeobox homolog protein.

La croissance du muscle squelettique embryonnaire résulte donc de l'équilibre entre prolifération et différenciation. Une fois leur migration jusqu'aux bourgeons des membres achevée, les myoblastes prolifèrent intensivement. Comme pour les autres types cellulaires, de nombreux facteurs intracellulaires régulent la progression du cycle cellulaire et la prolifération, notamment les cyclines et les kinases cyclines-dépendantes (CDKs) (**Figure 10**) (Guo et Walsh, 1997, Murray, 2004).

Cette progression du cycle cellulaire est majoritairement dépendante de la phosphorylation par les CDKs de la protéine du rétinoblastome (Rb). Lorsqu'elle est phosphorylée, la protéine Rb est incapable d'inhiber la famille des facteurs de transcription E2F dont les activités favorisent la progression du cycle (Nevins, 1992).

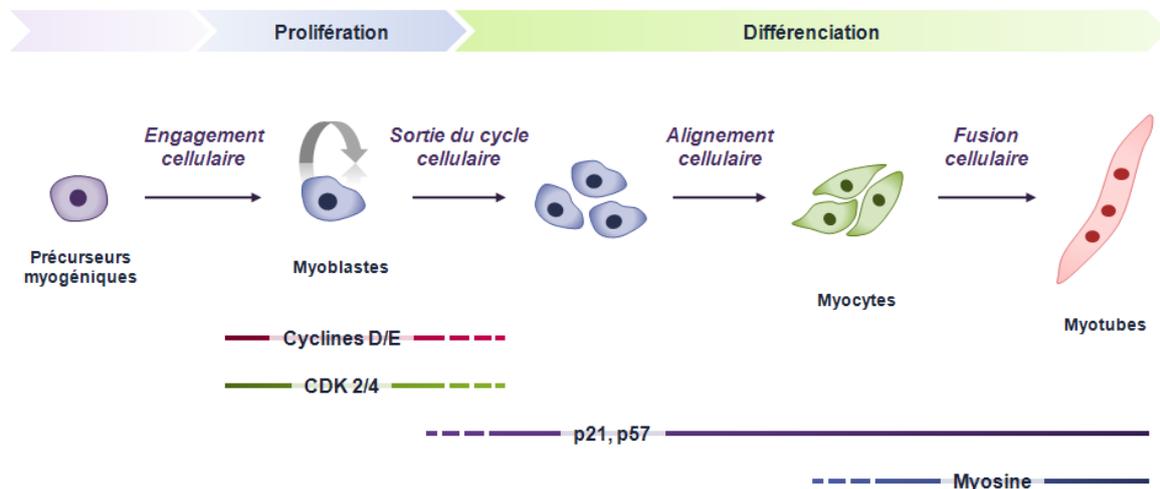


FIGURE 10. REGULATION DE LA DIFFERENCIATION MYOGENIQUE PAR LES DIFFERENTES PROTEINES DU CYCLE CELLULAIRE. Les cyclines D et E et les CDK2/4 agissent conjointement pour activer la prolifération en contrôlant la progression du cycle cellulaire. Leurs expressions diminuent lors de l'entrée des myoblastes en différenciation. La sortie irréversible du cycle cellulaire des myoblastes est associée à la surexpression des CKIs p21 et p57 qui permettent alors l'alignement des cellules corrélant avec l'expression de la protéine de structure MyHC, puis la fusion des myocytes en myotubes. *CDKs*, cyclin-dependent kinases ; *CKIs*, cyclin-dependent kinase inhibitors ; *MyHC*, myosin heavy chain.

De plus, les cyclines et CDKs favorisent la prolifération myoblastique au détriment de la différenciation en dérégulant l'expression de certains gènes clés impliqués dans la différenciation myogénique précoce (Guo et Walsh, 1997). Les complexes cycline E/CDK2 et cycline D/CDK4 peuvent bloquer cette étape en régulant négativement les activités transcriptionnelles de certains MRFs favorisant ainsi la prolifération myoblastique (Figure 10). Le complexe cycline E/CDK2 phosphoryle MyoD sur le résidu sérine en position 200 qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation et prévient ainsi son accumulation et l'engagement des cellules en différenciation (Tintignac *et al.*, 2000). Le complexe cycline D/CDK4 est aussi capable de bloquer l'activité de la myogénine et des protéines MEF2 (Lazaro *et al.*, 2002). En plus de cette régulation intracellulaire, la prolifération myoblastique est modulée par différents facteurs de croissance. Les voies de signalisation activées directement ou indirectement par ces facteurs sécrétés tels que la protéine IGF-1 (insulin-like growth factor-1), les FGFs ou la follistatine favorisent la prolifération myoblastique (Edom-Vovard *et al.*, 2001, Amthor *et al.*, 2002a, Mitchell *et al.*, 2002). A l'inverse, la myostatine est considérée comme un régulateur négatif de la prolifération myoblastique (McPherron *et al.*, 1997).

La diminution de la concentration de ces facteurs de croissance conduit à la sortie du cycle cellulaire des myoblastes et à leur différenciation. Cette sortie du cycle nécessite la diminution d'expression des cyclines et CDKs et l'augmentation conjointe des inhibiteurs des CDKs (CKIs). En inactivant les CDKs, l'expression des CKIs p21 (*cdkn1a*) et p57 (*cdkn1c*) permet une levée d'inhibition de la protéine Rb qui favorise la différenciation myoblastique (**Figure 10**) (Zacksenhaus *et al.*, 1996). L'expression de ces CKIs est intimement liée à l'expression de MyoD : p57 est capable de stabiliser la protéine MyoD par inhibition du complexe cycline E/CDK2 et MyoD augmente l'expression de p21 au cours de la différenciation myoblastique (Halevy *et al.*, 1995, Reynaud *et al.*, 2000). Les souris mutantes pour *p21* et *p57* présentent un phénotype similaire aux souris *myogénine*^{-/-}, elles ne forment que très peu de myotubes et présentent une forte augmentation du taux de prolifération myoblastiques. Ceci souligne bien le rôle indispensable de ces facteurs dans la sortie du cycle cellulaire des myoblastes et dans l'initiation de la différenciation nécessaire à la formation du muscle (Hasty *et al.*, 1993, Zhang *et al.*, 1999).

Une fois sortis du cycle cellulaire, les myoblastes engagés s'alignent, initient l'expression des protéines contractiles comme la myosine et fusionnent en cellules multinucléées, les myotubes (**Figure 10**) (Wakelam, 1985). Le contact cellulaire entre les myoblastes est un prérequis indispensable à cette étape (Krauss *et al.*, 2005). La fusion myoblastique nécessite donc un grand nombre de remaniements cellulaires intervenant dans la migration, la reconnaissance et l'adhésion cellulaire, et les réarrangements cytosquelettiques et membranaires (Abmayr et Pavlath, 2012). Tout au long du développement du muscle squelettique chez les mammifères, les cellules musculaires peuvent subir deux types de fusion myoblastique, primaire et secondaire, qui se distinguent par les acteurs cellulaires mis en jeu (Pavlath et Horsley, 2003). La fusion primaire permet la fusion de deux myoblastes entre eux pour générer la cellule multinucléée initiale. Elle prend place au cours du développement embryonnaire, de la régénération ou de l'hyperplasie (Pavlath et Horsley, 2003). La fusion secondaire correspond à l'addition d'un myoblaste avec un myotube déjà formé. Intervenant au cours des mêmes processus que la fusion primaire, elle est aussi responsable de l'hypertrophie et du maintien de l'intégrité des fibres musculaires tout au long de la vie (Pavlath et Horsley, 2003). Les myotubes subissent ensuite une étape de maturation en fibres musculaires.

La formation du muscle squelettique est finalement caractérisée par deux vagues successives de formation des myofibres, aussi appelées myogénèses primaire et secondaire (**Figure 11**) (Tajbakhsh, 2003). Au cours du développement embryonnaire chez la souris, la myogénèse primaire débute au 11^{ème} jour de développement embryonnaire et permet la formation des premières fibres musculaires, ou fibres primaires, issues de la fusion des myoblastes embryonnaires (**Figure 11 a**) (Kelly et Rubinstein, 1980). Cette étape semble dépendre de l'expression de MRF4 puisque elle est

maintenue chez les embryons murins *Myf5*^{-/-} mais elle est perturbée chez les embryons *Myf5*^{-/-}/*MRF4*^{-/-} (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). Les fibres primaires déterminent la localisation, la forme et le type du futur muscle en développement. Elles établissent aussi une véritable trame pour les fibres générées au cours de la myogenèse secondaire entre le 14^{ème} et le 17^{ème} jour *post-coitum* (j.p.c.), période où l'innervation des fibres prend place (Ontell et Kozeka, 1984).

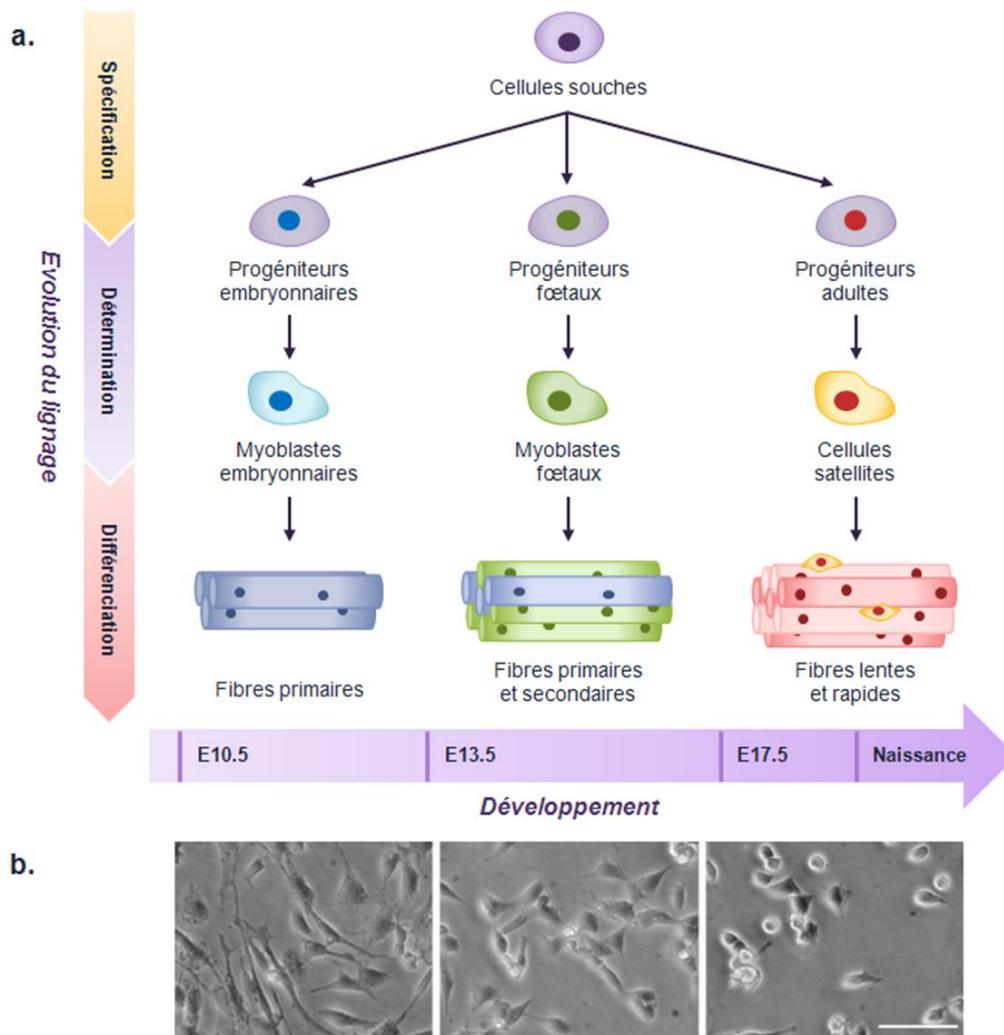


FIGURE 11. LES TROIS PHASES DE LA MYOGENESE AU COURS DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE CHEZ LA SOURIS. (a) Les myoblastes embryonnaires et fœtaux donnent respectivement les fibres primaires et secondaires. Les cellules satellites apparaissent à la fin de la gestation et sont responsables de la croissance post-natale et de la régénération du muscle. (b) Morphologie des différents types de cellules progénitrices murines embryonnaire, fœtale et satellite, *in vitro*. Microscopie en contraste de phase, échelle, 50 µm. E « x », jour embryonnaire « x ». (Adaptée de Biressi *et al.* (2007a))

Ces fibres secondaires, sensiblement plus fines que les primaires, sont issues de la fusion des myoblastes fœtaux entre eux ou avec des fibres déjà établies (**Figure 11 a**), ceci permettant une croissance musculaire aussi bien hyperplasique (augmentation du nombre de fibres) qu'hypertrophique (augmentation de la taille des fibres) (Duxson *et al.*, 1989, Zhang et McLennan,

1995). Les myoblastes embryonnaires et fœtaux présentent des caractéristiques moléculaires propres mais se distinguent également par leur morphologie et le métabolisme des fibres qu'ils génèrent (**Figure 11 b**) (Biressi *et al.*, 2007b). Ainsi, les fibres primaires sont généralement lentes alors que les fibres secondaires sont lentes ou rapides.

Le métabolisme des fibres primaires et secondaires est intimement lié à l'expression d'isoformes spécifiques des chaînes lourdes de myosine par les myotubes embryonnaires ou fœtaux, elle-même dépendante de l'accumulation de certains facteurs de transcription (Kelly et Rubinstein, 1980). Les fibres lentes ou de type I présentent une augmentation des facteurs *myogénine* et *Mef2*, favorisant l'expression des chaînes de myosine à contraction lente (Hughes *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 2000). En accord avec cette hypothèse, la surexpression de *Mef2* chez la souris conduit à une augmentation importante des fibres lentes (Potthoff *et al.*, 2007). Les fibres rapides ou de type II, quant à elles, présentent une accumulation du facteur *MyoD* déterminant l'expression de chaînes de myosine à contraction rapide (Hughes *et al.*, 1993). Il a d'ailleurs été montré que le knockout conditionnel du facteur *FoxO1* (Forkhead box protein O 1), un répresseur de *MyoD*, dans le muscle soléaire (*Musculus soleus*), un muscle à fibres lentes, entraîne une augmentation du nombre de fibres de type II au détriment des fibres de type I confirmant bien l'importance de *MyoD* dans la formation des fibres rapides (Kitamura *et al.*, 2007). En plus de cette signature moléculaire, d'autres facteurs influencent la physiologie des fibres musculaires comme les facteurs de croissance, les hormones ou l'innervation (Wigmore et Evans, 2002). La calcineurine est une phosphatase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante capable de réguler l'expression de certains gènes spécifiques des fibres en agissant sur les facteurs de transcription NFATs (nuclear factor of activated T cells) (Wu *et al.*, 2001). La signalisation calcineurine/NFAT dépend de l'activité du motoneurone et contrôle ainsi la formation des fibres lentes du muscle squelettique (McCullagh *et al.*, 2004). L'ensemble de ces facteurs participe donc à l'adaptation mécanique du muscle permettant une conversion des fibres selon les contractions imposées (Pette et Staron, 2001).

A la fin du développement fœtal à E17.5 chez la souris, une troisième population de cellules progénitrices apparaît à la périphérie des fibres musculaires. Découvertes par Alexander Mauro il y a un demi-siècle, ces cellules sont appelées cellules satellites en raison de leur localisation sous les lames basales et en association intime avec les membranes plasmiques des fibres musculaires (Mauro, 1961).

Croissance post-natale et régénération du muscle squelettique

Depuis leur découverte, de très nombreuses études ont montré que les cellules satellites, véritables cellules souches du muscle adulte, sont les premiers acteurs du développement post-natal, de le maintien et de la régénération du muscle squelettique (**Figure 12 a**) (Buckingham et Montarras, 2008, Yin *et al.*, 2013).

Les cellules satellites

Bien que présentes dans l'ensemble des muscles squelettiques, la fréquence des cellules satellites varie selon les muscles, les types de fibres, les stades de développement et les espèces. Chez l'adulte, la proportion de cellules satellites est souvent 2 à 4 fois plus importante dans les muscles lents comme le muscle soléaire (*Musculus soleus*) que dans les muscles rapides comme les muscles tibial antérieur et EDL (*Musculus tibialis anterior* et *Musculus extensor digitorum longus*) (Snow, 1983). De ce fait, les fibres de type I (lentes) présentent généralement un nombre plus important de cellules satellites que les fibres de type II (rapides) (Gibson et Schultz, 1982). Ces proportions variables selon le métabolisme musculaire semblent être directement liées à la densité du réseau sanguin environnant de chacun des deux types de muscles. En effet, bien que les cellules satellites soient distribuées uniformément le long des fibres, elles sont plus nombreuses dans les régions pré-synaptiques et à proximité des capillaires sanguins (Kelly, 1978, Gibson et Schultz, 1982, Christov *et al.*, 2007) (**Figure 12 d**). Cette proximité témoigne de la nécessité d'un environnement très particulier, une niche, indispensable à la cellule satellite pour qu'elle assure toutes ses fonctions (Pannerec *et al.*, 2012, Montarras *et al.*, 2013, Yin *et al.*, 2013).

Chez les nouveau-nés murins, les cellules satellites représentent 30 à 35 % des cellules situées sous la lame basale mais ce nombre décroît rapidement pour atteindre 2 à 7 % au cours des 21 premiers jours de vie post-natale (Hellmuth et Allbrook, 1971, White *et al.*, 2010). Ce déclin est corrélé à la croissance hypertrophique du muscle squelettique (**Figure 12 a**). En effet, le nombre de myofibres ne varie plus après la naissance, les cellules satellites prolifèrent donc intensément afin de générer un grand nombre de précurseurs myogéniques qui fusionnent avec les fibres préexistantes générées au cours du développement embryonnaire (Schultz, 1989, Schultz, 1996, White *et al.*, 2010). Toutes les cellules satellites présentes à la naissance ne participeront donc pas à l'établissement du pool adulte, essentiel au maintien et à la régénération musculaire. Après le 21^{ème} jour de vie post-natale chez la souris, les cellules satellites restantes entrent en quiescence et la croissance hypertrophique du muscle dépend alors du turn-over protéique au sein des myofibres (**Figure 12 a**) (Schultz *et al.*, 1978, Blaauw *et al.*, 2009, Lepper *et al.*, 2009, White *et al.*, 2010). Cette

entrée en quiescence est dépendante de la voie de signalisation Notch, les souris invalidées pour les deux gènes cibles de Notch, *Hes1* et *Hes3* (Hairy/enhancer-of-split related protein), étant incapable de produire des cellules satellites indifférenciées quiescentes (Fukada *et al.*, 2011). La voie de signalisation Notch est aussi indispensable à leur maintien en quiescence dans le muscle adulte (Mourikis *et al.*, 2012).

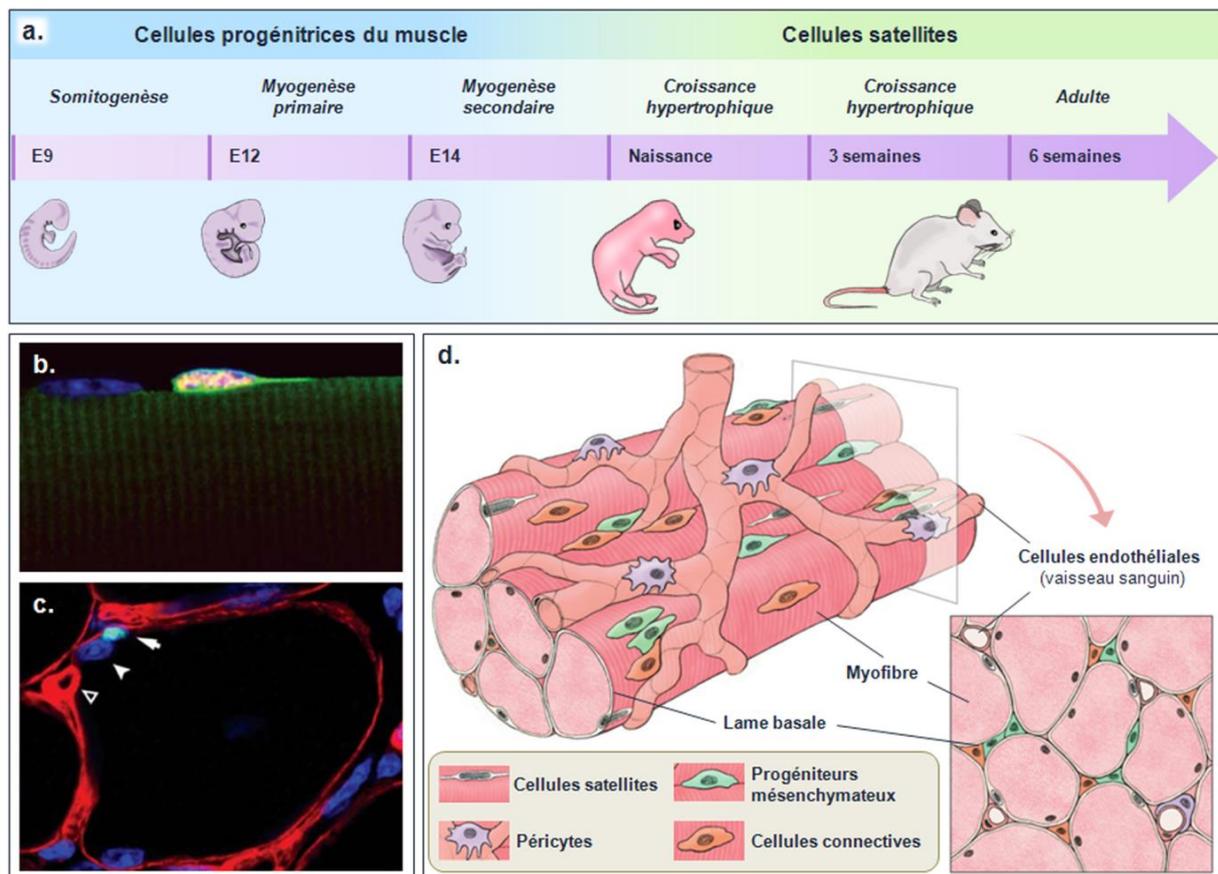


FIGURE 12. LES CELLULES SATELLITES ET LEUR ENVIRONNEMENT. (a) Croissance du muscle squelettique au cours du développement. Les cellules progénitrices du muscle (bleu) interviennent au cours des myogenèses primaire et secondaire alors que les cellules satellites (vert) permettent la croissance post-natale du muscle et sa régénération au stade adulte. (b) Localisée le long de la fibre musculaire hôte, la cellule satellite est marquée par l'expression de Pax7 en vert, le noyau en bleu et le cytoplasme en rouge. (c) Coupe transversale de muscle squelettique. Les cellules satellites exprimant Pax7 (vert, flèche) sont localisées sous la lame basale des fibres musculaires (rouge). Dans le muscle mature, elles sont souvent associées avec un noyau de la fibre (tête de flèche) et à proximité d'un capillaire sanguin (tête de flèche vide). (d) Représentation schématique de l'environnement du muscle squelettique adulte en 3-dimension et en coupe. E « x », jour embryonnaire « x ». (Adaptée de Bentzinger *et al.* (2012), Relaix et Zammit (2012) et de Pannerec *et al.* (2012))

Histologiquement, les cellules satellites sont aisément identifiables en raison de leur position anatomique unique, sous la membrane basale et à l'extérieur de la myofibre (Figure 12 b, c). Elles présentent des caractères morphologiques particuliers avec un rapport noyau/cytoplasme important, peu d'organites et une chromatine condensée en interphase (Mauro, 1961). Cette

dernière caractéristique est à mettre en relation avec le fait que dans le muscle sain non stressé, les cellules satellites à l'âge adulte sont quiescentes (phase G₀) (Schultz *et al.*, 1978).

La quasi-totalité des cellules satellites expriment différentes protéines « marqueurs » facilitant leur identification par microscopie à fluorescence. Dans le muscle squelettique adulte, elles expriment notamment les facteurs de transcription Pax3, Pax7 et Myf5 (Cornelison et Wold, 1997, Seale *et al.*, 2000), ainsi que la protéine d'adhésion cellulaire M-cadhérine et la protéine de surface CD34 (Irintchev *et al.*, 1994, Beauchamp *et al.*, 2000). De tous, Pax7 est le marqueur canonique des cellules satellites puisqu'il est aussi bien exprimé dans ces cellules en quiescence qu'en prolifération et ce chez un grand nombre d'espèces incluant l'homme, la souris, le poulet ou le poisson zèbre (Yin *et al.*, 2013). L'immunomarquage de Pax7, couplé à celui de la laminine révélant la lame basale, permet de détecter avec assurance les cellules satellites *in situ* par microscopie à fluorescence (**Figure 12 b, c**).

Plus récemment, de nouvelles stratégies basées notamment sur le système Cre-lox ont permis une avancée importante dans la détection et l'analyse fonctionnelle des cellules satellites (**Encart 1**) (Relaix et Zammit, 2012). Ainsi, l'intégration d'un gène rapporteur par modification d'un allèle grâce à un tel système ou par d'autres méthodes comme l'électroporation, a permis de préciser de façon spatio-temporelle le lignage des cellules satellites au cours du développement myogénique (Gros *et al.*, 2005, Schienda *et al.*, 2006).

Au cours de la délamination du dermomyotome, une population de cellules progénitrices Pax3⁺ se détache du dermomyotome hypaxial pour migrer vers les bourgeons des membres. Suite à cet évènement, certaines de ces cellules commencent à exprimer Pax7, entraînant leur spécification vers le lignage myogénique. La majorité de ces cellules Pax3⁺/Pax7⁺ prolifèrent et se différencient pour générer les muscles des membres alors qu'une partie d'entre elles entrera en quiescence pour former le pool de cellules satellites (Kuang *et al.*, 2006, Hutcheson *et al.*, 2009). Ainsi, l'ensemble de ces informations suggère que les cellules progénitrices embryonnaires Pax3⁺/Pax7⁺/MRF représentent la source principale des cellules satellites adultes des muscles.

Encart 1. Etude fonctionnelle des cellules satellites chez la souris

La souris est un modèle d'étude idéal pour l'analyse fonctionnelle des gènes. Les lignées murines sont pures, les croisements sont aisés et leur temps de génération est relativement court (environ 21 jours). De plus, leur physiologie est assez proche de celle de l'homme et nous disposons d'une connaissance complète de leur génome qui a permis, grâce à la création de différents outils génétiques, la génération de modèles murins dédiés à l'étude fonctionnelle d'un gène ou au lignage de population cellulaire. Ainsi, ces outils génétiques allant du système Cre-lox jusqu'à la transgénèse additive ont permis la création de modèles murins dédiés à l'identification et l'étude fonctionnelle des cellules satellites (Relaix et Zammit, 2012).

Le système Cre-lox repose sur l'activité de l'enzyme recombinase Cre (Cyclic Recombinase) capable de cibler une séquence préalablement flanquée de deux sites loxP, dite séquence floxée. L'intégration de la séquence de la Cre dans un locus particulier permet une expression tissu-spécifique de cette enzyme et un ciblage de son action. Dans le modèle murin Pax7^{iCre}, l'utilisation d'un Site d'Entrée Spécifique des Ribosomes (IRES) en amont de la Cre a permis son intégration dans la région 3'UTR du gène Pax7. Ainsi, l'expression de la Cre est dépendante de l'expression de Pax7 dont l'intégrité fonctionnelle est préservée (Keller et al., 2004).

En plus de l'expression spécifique au sein des cellules Pax7⁺, l'amélioration de cet outil génétique a permis un contrôle temporel de l'activité de la Cre en fusionnant cette enzyme à la forme tronquée du récepteur des œstrogènes humain, ne comportant que le domaine de liaison à son ligand (Cre-ERT, Cre-ERT2) (Metzger et Chambon, 2001). La capacité de recombinaison de la Cre dépend alors de l'administration d'agonistes aux œstrogènes comme le tamoxifène qui, en se liant au domaine ERT, entraîne la translocation de la Cre-ERT dans le noyau et permet à la Cre de recombiner les sites loxP et d'exciser les séquences floxées (Metzger et Chambon, 2001). C'est ainsi que le modèle Pax7^{iCreERT2} a été créé, grâce à l'insertion d'une cassette IRES-CreERT2 dans la région 3'UTR de Pax7 permettant une expression unique dans les cellules Pax7⁺ et contrôlée en fonction de l'administration du tamoxifène au cours du développement (Murphy et al., 2011).

Isolé en 1991 et grâce à son expression ubiquitaire à tous les stades de développement, le locus ROSA26 est depuis largement utilisé pour l'établissement de lignées murines, puisqu'il a permis l'obtention de plus de 130 lignées knock-in exprimant bon nombre de transgènes allant de simples gènes rapporteurs jusqu'à des séquences d'ARNs non codants (Soriano, 1999, Casola, 2010). Le locus ROSA26 a par exemple été modifié par l'intégration de la séquence codant la toxine diphtérique (DTA) dont l'expression n'est possible qu'après l'excision d'une séquence STOP floxée en amont (R26R^{DTA}). Le croisement des lignées murines R26R^{DTA} et Pax7^{iCreERT2} permet, après induction par le tamoxifène, l'ablation de la quasi-totalité des cellules satellites (Lepper et al., 2011).

Ce même principe a été utilisé pour modifier le locus ROSA26 par l'intégration de gènes rapporteurs (R26R^{LacZ}, R26R^{YFP}) (Soriano, 1999, Murphy et al., 2011). Ainsi, le croisement des lignées R26R^{YFP} et Pax7^{iCreERT2} permet de générer des souris dont l'ensemble des cellules satellites exprime la protéine fluorescente YFP (yellow fluorescent protein) après administration systémique de tamoxifène (Murphy et al., 2011). Dans ce même objectif, l'utilisation de la transgénèse additive a permis de générer des souris transgéniques exprimant la protéine GFP (green fluorescent protein) sous la dépendance du promoteur Pax7 (Tg:Pax7-nGFP) (Sambasivan et al., 2009).

Le marquage des cellules satellites en quiescence ou en prolifération par expression d'un gène rapporteur sous la dépendance de *Pax7* présente aussi l'avantage de permettre leur isolement par FACS (fluorescent-activated cell sorting) à partir des cellules musculaires squelettiques de ces différents modèles murins.

D'autres protocoles ont été développés pour isoler les cellules satellites indépendamment d'un marquage spécifique et pour permettre leur étude *ex vivo* (Danoviz et Yablonka-Reuveni, 2012). L'une de ces méthodes consiste à cultiver les myofibres isolées sur lesquelles les cellules satellites demeurent dans leur position native sous la lame basale (Pasut *et al.*, 2013). Cette technique permet l'étude des cellules satellites et de leur descendance *in situ* et après qu'elles aient migré hors de la myofibre parentale. Une seconde approche permet d'obtenir une population de cellules mononucléées en vrac à partir d'un muscle entier. L'obtention de ces cultures myoblastiques primaires, ou myoblastes dérivés des cellules satellites, est basée sur leurs caractéristiques d'adhésion et de prolifération selon les conditions de culture, mais implique que les cellules satellites quittent leur niche (Rando et Blau, 1994). De ce fait, ces cellules cultivées diffèrent d'un point de vue moléculaire et fonctionnel des cellules satellites juste isolées du muscle squelettique. Le profil d'expression génique des cultures primaires diffèrent aussi des cellules satellites activées *in vivo* (Pallafacchina *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces données témoigne de nouveau de l'importance de la niche des cellules satellites et de leur environnement, nécessaires à leur bon fonctionnement.

La régénération du muscle squelettique

Le muscle squelettique adulte présente une capacité régénérative fascinante qui repose sur les cellules satellites. A la suite d'un exercice prolongé ou d'une blessure, la régénération musculaire se déroule en différentes étapes qui débutent tout d'abord par le recrutement des cellules satellites en réponse aux signaux inflammatoires émis par la fibre endommagée puis par la reconstruction de cette dernière (Wang et Rudnicki, 2012).

La dégénérescence du muscle commence par la nécrose et la perte d'intégrité des fibres musculaires qui induisent la réponse inflammatoire. L'efficacité de la réponse dépend de deux paramètres, la gravité du dommage physique et le degré de vascularisation musculaire au moment de la blessure (Smith *et al.*, 2008). Suite à la réponse inflammatoire, des leucocytes pro-inflammatoires sont recrutés sur le site du dommage permettant la phagocytose des débris cellulaires. Par la suite, les leucocytes évoluent d'un phénotype pro- à anti-inflammatoire dans le muscle en régénération, protégeant les cellules musculaires de l'apoptose, et permettant la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance pour promouvoir l'activation des cellules satellites et faciliter la restauration du muscle et de son réseau vasculaire (Figure 13) (Smith *et al.*, 2008).

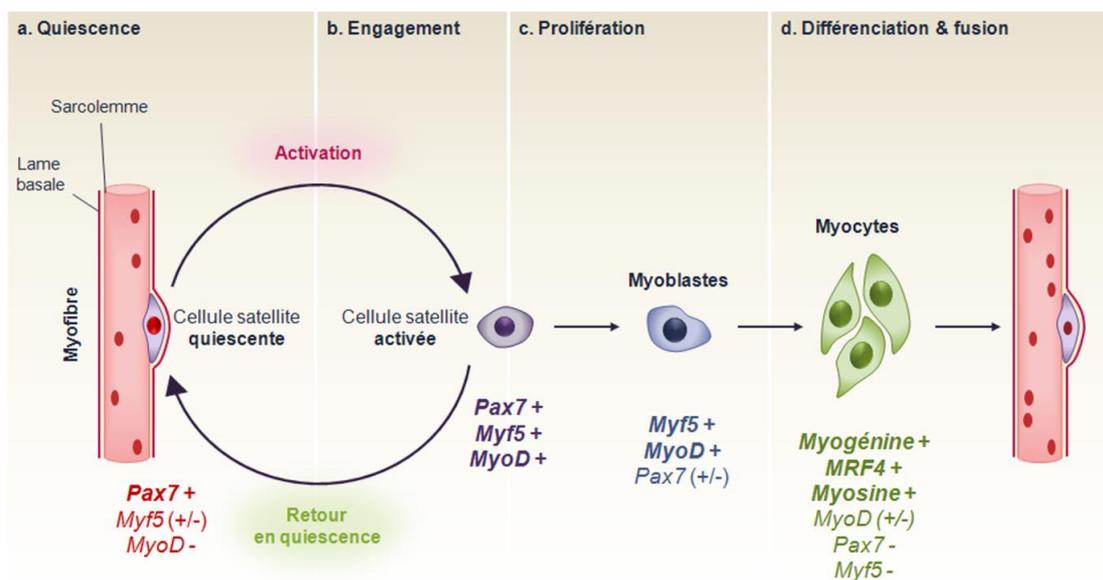


FIGURE 13. DESTIN DES CELLULES SATELLITES AU COURS DE LA REGENERATION MUSCULAIRE. (a) Suite à une blessure, les cellules satellites sont activées et migrent jusqu'au site endommagé. Elles induisent l'expression des gènes *Myf5* et *MyoD* et entrent de nouveau dans le cycle cellulaire. Quelques-unes d'entre elles peuvent cependant maintenir l'expression de *Pax7* et inhiber celle de *MyoD* pour retourner en quiescence et permettre le maintien du pool de cellules satellites. (b) L'expression des facteurs *MyoD* et *Myf5* conduit à l'engagement des cellules satellites dans la voie myogénique. (c) Les myoblastes ainsi activés vont proliférer, perdre l'expression de *Pax7*, (d) et se différencier en myocytes en augmentant l'expression des facteurs myogénine, *MRF4* et *Myosine*. La régénération de la fibre nécessite la fusion des myocytes en myotubes ou des myocytes directement avec la fibre endommagée. *MRF4*, *myogenic regulatory factor 4*; *Myf5*, *myogenic factor 5*; *MyoD*, *myoblast determination protein 1*; *Pax7*, *paired box protein 7*.

Suite à l'exposition des cellules satellites à ces divers signaux inflammatoires, ces dernières s'activent : elles quittent leur état quiescent et prolifèrent intensément (**Figure 13**) (Zammit *et al.*, 2002). Cette activation s'accompagne d'une migration de l'ensemble des cellules satellites d'une myofibre vers le site endommagé (Hughes et Blau, 1990). Cette mobilité est à mettre en relation avec la forte diminution d'expression de la protéine antiadhésive de surface CD34 lors de l'activation des cellules satellites, facilitant leur migration et leur prolifération au cours des premières étapes de la régénération (Alfaro *et al.*, 2011). Cette migration des cellules n'est pas aléatoire mais dépend d'une régulation dynamique des éphrines et de leurs récepteurs entre les cellules satellites et les myofibres en régénération (Stark *et al.*, 2011).

Contrairement aux cellules satellites quiescentes, les cellules satellites activées se caractérisent par l'expression rapide de *MyoD* induite en partie par le facteur de transcription Six1, ceci confirmant leur engagement dans la voie myogénique (**Figure 13**) (Cornelison et Wold, 1997). *MyoD* est nécessaire au bon fonctionnement de ces cellules au cours de la régénération. En effet, les souris *MyoD*^{-/-} présentant d'importants défauts de régénération du fait de l'incapacité des cellules satellites à se différencier et à former de nouveaux myotubes (Megency *et al.*, 1996, Cornelison *et al.*, 2000, Le Grand *et al.*, 2012). L'inactivation conditionnelle de *Six1* dans les cellules satellites entraîne des anomalies de régénération similaire (Le Grand *et al.*, 2012). Suite à leur prolifération, les cellules satellites activées sortent du cycle cellulaire, se différencient parallèlement à la sous-expression de *Pax7* et à l'augmentation d'expression de la myogénine et de la myosine, pour fusionner avec la myofibre en régénération (**Figure 13**) (Cornelison et Wold, 1997, Halevy *et al.*, 2004). Bien que la majorité des cellules satellites se différencient pour réparer la fibre, une petite portion d'entre elles maintient l'expression de *Pax7* et inhibe l'expression de *MyoD* pour permettre l'auto-renouvellement du pool de cellules satellites adultes (Olguin et Olwin, 2004).

Les cellules satellites représentent donc une population cellulaire hétérogène dans le muscle, population composée de cellules souches et de cellules engagées qui se distinguent par l'expression de *Pax7* et *Myf5* (Beauchamp *et al.*, 2000, Kuang *et al.*, 2007). L'utilisation du modèle murin *Tg:Pax7-nGFP* a permis de mettre en évidence que les niveaux de *Pax7* sont variables au sein même du pool de cellules satellites (Sambasivan *et al.*, 2009, Rocheteau *et al.*, 2012). Les cellules satellites présentant une forte expression de *Pax7* ont une activité métabolique et un taux de division très réduits, alors que celles dont l'expression de *Pax7* est faible se différencient très facilement *in vitro* (Rocheteau *et al.*, 2012). Grâce au modèle murin *Myf5*^{Cre:R26R} ^{YFP}, les études de lignage cellulaire ont révélé que, si la majorité des cellules satellites expriment *Myf5* et *Pax7* et participent activement à la restauration des fibres après leur greffe dans un muscle endommagé, seulement 10 % des cellules satellites sont *Pax7*⁺/*Myf5*⁻ et sont capables de contribuer efficacement au renouvellement du pool

de cellules satellites (**Figure 14**) (Kuang *et al.*, 2007). Elles sont donc considérées comme les véritables cellules souches du muscle squelettique adulte.

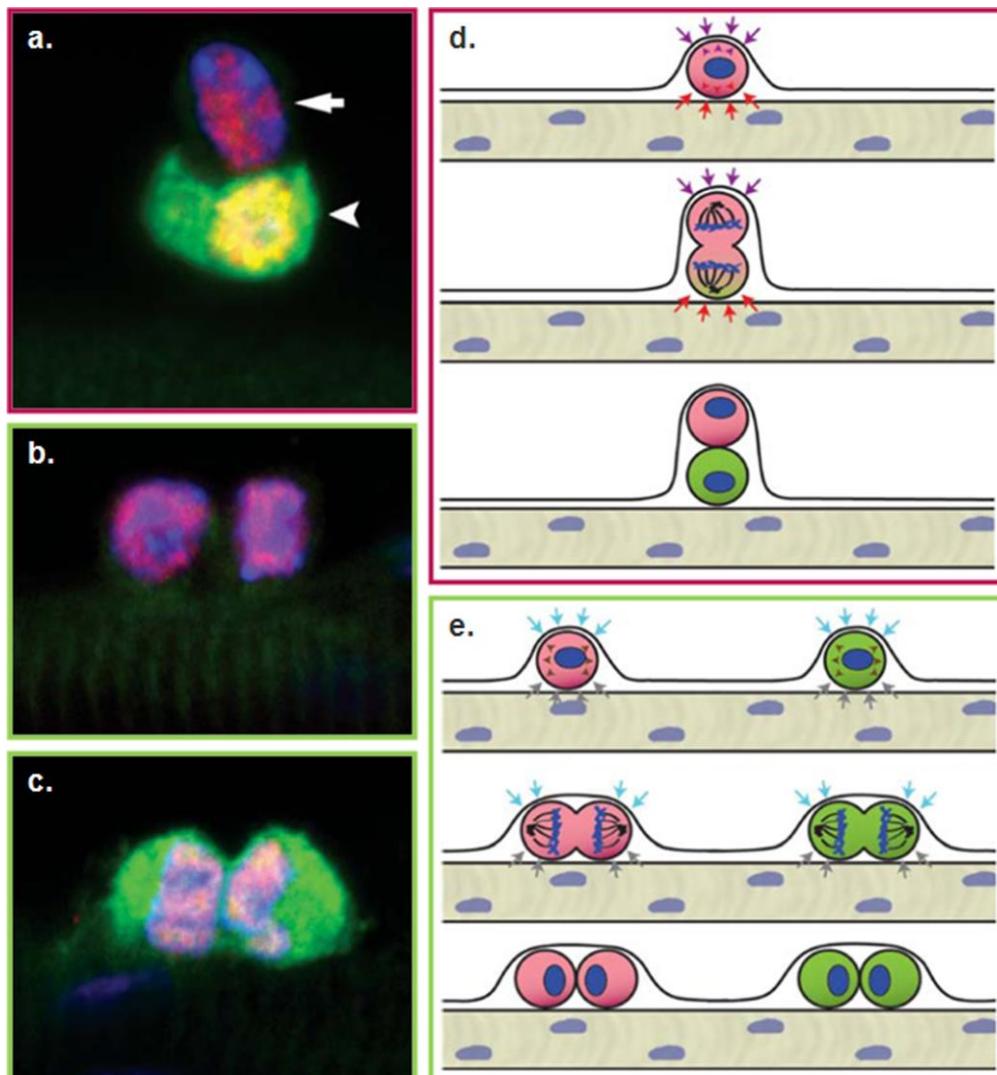


FIGURE 14. DIVISIONS ASYMETRIQUE ET ALEATOIRE DES CELLULES SATELLITES. Les études de lignage cellulaire ont permis de déterminer que 10 % des cellules satellites adultes n'ont jamais exprimé Myf5 et sont considérées comme des « cellules souches satellites ». (a) Les cellules souches satellites (flèche) subissent une division asymétrique dans une orientation perpendiculaire à l'axe de la fibre, ou apico-basale, ce qui conduit à l'obtention d'une cellule fille détachée de la lame basale exprimant Myf5 (vert, observé grâce au marqueur fluorescent YFP), et d'une cellule fille dans laquelle l'expression de Pax7 (rouge) est maintenue. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). (b, c) Dans le mode de division stochastique, la cellule satellite se divise dans le plan parallèle à la fibre pour donner naissance à deux cellules filles identiques. (d) Modèle schématique de division apico-basale ou asymétrique. Les signaux opposés de la lame basale et de la myofibre contrôlent l'orientation du fuseau mitotique et la co-ségrégation asymétrique des protéines et de l'ADN. Après la cytotéierèse, les cellules filles continueront à être soumises à des signaux environnementaux différents maintenant le destin asymétrique de ces cellules. (e) Modèle schématique de la division symétrique planaire. Les signaux émis par la lame basale et la myofibre permettent une orientation du fuseau mitotique et une division cellulaire planaire. De ce fait, les cellules filles restent liées à la fibre et à la lame basale de la même façon. Elles reçoivent donc les mêmes signaux environnementaux permettant le maintien de leur destin cellulaire. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phénylindole ; Myf5, myogenic factor 5 ; Pax7, paired box protein 7. (D'après Bentzinger *et al.* (2012))

Le renouvellement et le maintien du pool de cellules satellites lors de la régénération sont dépendants de la division asymétrique des cellules satellites Pax7⁺/Myf5⁻ qui permet de générer une cellule satellite souche (Pax7⁺/Myf5⁻) et une cellule satellite engagée (Pax7⁺/Myf5⁺) (**Figure 14 a, d**) (Kuang *et al.*, 2007, Tajbakhsh *et al.*, 2009). La division asymétrique est majoritairement observée lorsque le fuseau mitotique est perpendiculaire à l'axe de la myofibre (division apico-basale), là où la future cellule satellite souche (Pax7⁺/Myf5⁻) est en contact direct avec la lame basale et où la future cellule myogénique (Pax7⁺/Myf5⁺) est en contact direct avec la fibre (**Figure 14 a, d**) (Kuang *et al.*, 2007). La division symétrique est, quant à elle, observée lorsque le fuseau mitotique est parallèle à l'axe de la myofibre si bien que les deux cellules filles reçoivent les mêmes signaux de la membrane basale et de la myofibre (**Figure 14 b, c, e**) (Kuang *et al.*, 2007). Ces deux modes de divisions des cellules Pax7⁺/Myf5⁻ participent à l'auto-renouvellement de la population des cellules souches satellites dans le muscle adulte.

Au cours des 15 dernières années, d'autres populations de cellules souches qui possèdent un potentiel myogénique et participent à la régénération ont été identifiées au sein du tissu musculaire squelettique. Il s'agit notamment des péricytes et des mésoangioblastes associés aux vaisseaux sanguins, ou des cellules PICs (PW1⁺ interstitial cells) (Pannerec *et al.*, 2012). Leur spécification myogénique nécessite leur activation, soit à la suite d'une blessure *in vivo*, soit en les co-cultivant avec des myoblastes *in vitro*. Quoi qu'il en soit, et même dans de telles conditions, seulement une petite partie de ces cellules s'engagent dans la voie myogénique (Pannerec *et al.*, 2013). De plus, les cellules satellites semblent indispensables à la régénération musculaire. La création des modèles murins, Pax7^{DTR/+} ou Pax7^{CreERT2/+}:R26R^{DTA/+}, permettant la déplétion quasi-totale des cellules satellites par injection de la toxine diphtérique ou du tamoxifène respectivement, a révélé que l'absence des cellules satellites au sein d'un tissu musculaire endommagé ne permet pas sa régénération (Lepper *et al.*, 2011, Sambasivan *et al.*, 2011b).

Leurs capacités d'auto-renouvellement et de régénération du tissu musculaire ont fait des cellules satellites un excellent candidat pour les thérapies cellulaires. La souris *mdx* (Muscular Dystrophy X-linked) est le modèle le plus couramment employé dans l'étude de la myopathie de Duchenne. L'isolement et la greffe de cellules satellites fonctionnelles directement dans le muscle squelettique de souris athymiques *nu/nu mdx* (dépourvues de système immunitaire) ont permis de restaurer la fibre musculaire et le pool de cellules satellites (Montarras *et al.*, 2005). Cependant, ce type de traitement nécessite l'utilisation d'une population de cellules satellites « pures » (Montarras *et al.*, 2005). La mise en culture de ces dernières ou l'extraction d'une population myogénique brute pour l'obtention d'un plus grand nombre de cellules réduisent considérablement l'efficacité de la greffe (Montarras *et al.*, 2005).

Ainsi, si les cellules satellites ne sont pas à l'heure actuelle les meilleurs candidats pour les thérapies cellulaires contre les pathologies musculaires du fait de la difficulté à les isoler, de leur hétérogénéité et de la perte de leur compétence suite à leur amplification *ex vivo*, elles demeurent cependant un excellent modèle d'étude des cellules souches adultes et de la régénération des tissus. Par ailleurs, les protocoles d'isolement des cellules satellites ont permis l'obtention de cultures myoblastiques primaires, qui s'avèrent être de puissants outils de plus en plus utilisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires intrinsèques et extrinsèques qui régulent le développement musculaire, quel que soit le modèle étudié (Figure 15).

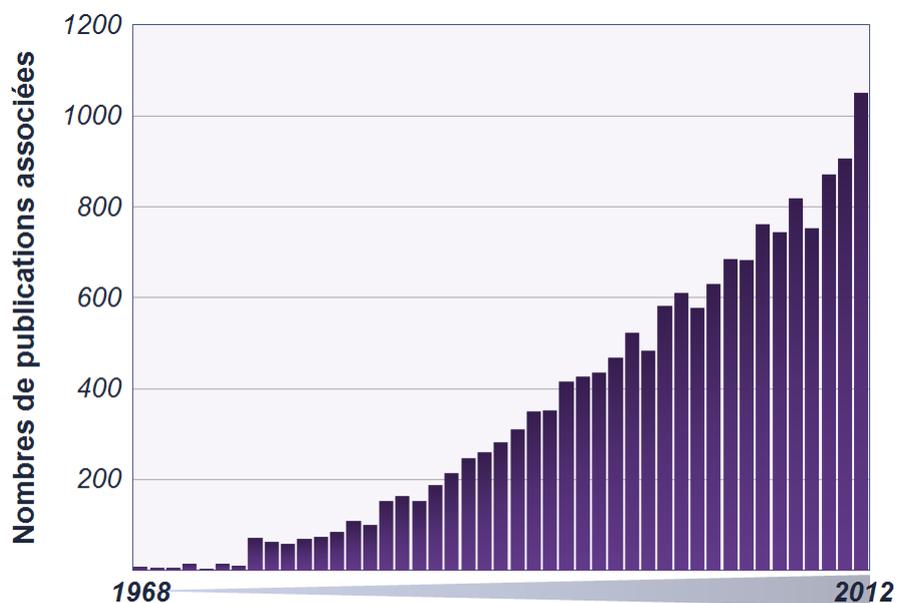


FIGURE 15. CHRONOLOGIE DU NOMBRE DE PUBLICATIONS REPERTORIEES DANS PUBMED ET RELATIVES AUX TERMES « PRIMARY MYOBLAST » ET « PRIMARY MUSCLE CELL » EN FONCTION DE L'ANNEE DE PARUTION. Depuis 1968, le nombre de publications associées à la culture primaire myoblastique ne cesse d'augmenter. (Données obtenues dans PubMed)

A l'avenir, la thérapie cellulaire bénéficiera probablement des futures études sur l'interaction des cellules satellites avec leur environnement (niche, cellules myogéniques atypiques, etc.) et de la meilleure compréhension des mécanismes qui régissent leur engagement dans la voie myogénique.

Mécanismes moléculaires régulant la masse musculaire

A l'âge adulte, le muscle squelettique est un organe doué d'une grande plasticité. Le volume musculaire squelettique et le nombre de fibres sont entretenus par de multiples hormones et facteurs de croissance qui régulent, *via* les différentes cascades de signalisation qu'elles activent, la croissance ou l'atrophie musculaire (Glass, 2005, Bonaldo et Sandri, 2013, Schiaffino *et al.*, 2013). Les connaissances acquises sur ces voies de signalisation permettent aujourd'hui d'établir des traitements plus efficaces pour prévenir ou empêcher l'atrophie musculaire observée dans de nombreuses pathologies.

Hypertrophie / Atrophie

Augmentation physiologique de la masse musculaire

Au cours des phases de développement post-natal et adulte, l'hypertrophie physiologique du muscle squelettique correspond à un élargissement de chacune des myofibrilles. Cet élargissement résulte d'une accumulation massive du nombre de noyaux originaires des cellules satellites qui fusionnent au sein des fibres néoformées au cours des trois premières semaines de vie post-natale (Moss et Leblond, 1971, Pallafacchina *et al.*, 2012). Le volume des myofibrilles est alors multiplié par 5 (White *et al.*, 2010). Durant cette période, la prolifération intensive des cellules satellites et leur différenciation est principalement activée par le facteur IGF-1 (Shavlakadze *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2012). Au stade adulte, les cellules satellites ne sont plus impliquées dans l'hypertrophie qui devient alors intimement liée à l'augmentation de la synthèse protéique des fibres entraînant une augmentation de leur taille (Sartorelli et Fulco, 2004). Elle n'est pas spontanée mais intervient essentiellement suite à un exercice physique ou à la prise d'hormones stéroïdiennes ou d'agonistes β -adrénergiques par exemple (Schiaffino *et al.*, 2013). Le muscle squelettique possède donc la capacité d'augmenter sa masse selon deux modes, avec ou sans l'implication des cellules satellites, qui sont clairement liés aux stades de développement postnatal précoce et adulte.

Perte de la masse musculaire

La perte de masse musculaire ou atrophie musculaire est observée dans bon nombre de conditions pathologiques comme la cachexie cancéreuse, le diabète et les traitements immunosuppresseurs (glucocorticoïdes), le jeûne, mais aussi plus simplement le vieillissement. L'atrophie musculaire implique le rétrécissement des myofibrilles provoqué par une dégradation

protéique accrue, ainsi qu'une perte des organites et du volume cytoplasmique (Bonaldo et Sandri, 2013). Ces processus sont liés à l'activation du système protéasome et de l'autophagie. La protéolyse est associée à la surexpression de deux ubiquitine-ligases E3, MAFbx (Muscle Atrophy F-box), aussi appelée atrogène-1, et MuRF1 (Muscle Ring Finger 1) (Bodine *et al.*, 2001a, Gomes *et al.*, 2001).

Ces gènes qui régulent la perte des constituants cellulaires et la dégradation protéique au sein du tissu musculaire sont appelés les « atrogènes » ou gènes associés à l'atrophie (Sandri, 2008). La protéine MAFbx favorise la dégradation des facteurs MyoD et eIF3f (eukaryotic translation initiation factor 3f), un activateur important de la synthèse protéique (Tintignac *et al.*, 2005, Csibi *et al.*, 2010). La sous-expression du gène chez la souris prévient la perte de masse musculaire induite par le jeûne (Cong *et al.*, 2011). La protéine MuRF1 ubiquitinye directement les protéines du sarcomère telles que la troponine, l'actine et la myosine pour les adresser au protéasome et les dégrader (Kedar *et al.*, 2004, Clarke *et al.*, 2007, Polge *et al.*, 2011). Les souris *MuRF1*^{-/-} sont résistantes à l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone (Baehr *et al.*, 2011).

L'expression des atrogènes *MuRF1* et *MAFbx* est dépendante des facteurs de transcription de la famille FoxO, FoxO1 et FoxO3, considérés comme les régulateurs majeurs de l'atrophie musculaire (Sandri *et al.*, 2004, Stitt *et al.*, 2004). La transfection *in vivo* de *FoxO3* dans le muscle induit la surexpression de MAFbx et une atrophie musculaire (Sandri *et al.*, 2004). En favorisant l'expression des gènes associés à l'autophagie tels que *LC3* (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), FoxO3 active également la dégradation protéique dépendante du lysosome (Mammucari *et al.*, 2007). Les souris transgéniques *FoxO1* présentent une diminution marquée de la masse musculaire, une atrophie de l'ensemble des myofibres et une diminution du nombre de fibres de type I (Kamei *et al.*, 2004). De plus, FoxO1 favorise l'expression de la *myostatine*, véritable inhibiteur du développement musculaire (Allen et Unterman, 2007). L'augmentation de l'expression de la myostatine est également observée chez des patients atteints du SIDA présentant une atrophie musculaire (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998).

Dans certains cas d'atrophie musculaire, les taux de glucocorticoïdes sont augmentés. Les glucocorticoïdes induisent l'expression des atrogènes *MAFbx* et *MuRF1* entraînant la perte de masse musculaire (Schakman *et al.*, 2008). Ils favoriseraient également l'expression de la *myostatine* (Ma *et al.*, 2003). A l'inverse, l'adrénalectomie ou le traitement par un antagoniste des glucocorticoïdes atténuent le processus d'atrophie de certaines pathologies (Menconi *et al.*, 2007, Schakman *et al.*, 2008).

Différentes conditions physiopathologiques se caractérisent aussi par une activation de la voie de signalisation NFκB (nuclear factor NF-kappa-B). Les facteurs de transcription NFκB, considérés comme des médiateurs de l'immunité et de l'inflammation, sont exprimés dans le tissu musculaire pour moduler les effets des cytokines inflammatoires comme le TNF-α (tumor necrosis factor-α), au cours de l'atrophie ou de la cachexie musculaire (Peterson *et al.*, 2011). Chez la souris, l'activation de cette voie entraîne une atrophie musculaire sévère conséquence d'une surexpression de MuRF1 (Cai *et al.*, 2004). A l'inverse, les souris invalidées pour *NFκB* présentent une résistance accrue à l'atrophie musculaire (Hunter et Kandarian, 2004).

Comme les études menées sur l'atrophie et l'hypertrophie le suggèrent, deux facteurs protéiques majeurs régulent le renouvellement cellulaire et la synthèse protéique et participent à l'homéostasie du muscle squelettique : IGF-1 jouant le rôle du régulateur positif et la myostatine jouant le rôle du régulateur négatif.

Régulation de la masse musculaire : le dialogue entre la myostatine et IGF-1

Les approches génétiques *in vivo* ont permis une large compréhension des mécanismes de régulation de la masse musculaire induits par le facteur IGF-1 et la myostatine (**Tableau 3**) (Schiaffino et Mammucari, 2011, Bonaldo et Sandri, 2013).

TABLEAU 3. PHENOTYPES DES MODELES MURINS MODIFIES POUR LES GENES *Mstn* ET *Igf-1*.

Modèles		Viabilité	Phénotypes	Références
Surexpression de <i>Mstn</i>				
Modèles transgéniques	α -MHC-Mstn	Viable	Atrophie musculaire et réduction de la taille du cœur	(Heineke <i>et al.</i> , 2010)
	MCK-Mstn	Viable	Atrophie musculaire et réduction de la taille du cœur	(Reisz-Porszasz <i>et al.</i> , 2003)
Transfection <i>in vivo</i>	CMV-Mstn	Viable	Atrophie musculaire (TA)	(Durieux <i>et al.</i> , 2007)
Inactivation de <i>Mstn</i>				
(totale)	<i>Mstn</i> ^{-/-}	Viable	Hyperplasie et hypertrophie des fibres musculaires	(McPherron <i>et al.</i> , 1997)
(stade adulte)	<i>Mstn</i> ^{loxP-E3-loxP} x Cre-ER	Viable	Hypertrophie des fibres musculaires	(Welle <i>et al.</i> , 2007)
(stade post-natal, muscle spécifique)	<i>Mstn</i> ^{loxP-E3-loxP} x MCK ^{Cre-ER}	Viable	Hypertrophie des fibres musculaires	(Grobet <i>et al.</i> , 2003)
(muscle spécifique)	<i>Mstn</i> ^{loxP-E3-loxP} x MLC1 ^{Cre}	Viable	Hyperplasie et hypertrophie des fibres musculaires	(Heineke <i>et al.</i> , 2010)
(cœur spécifique)	<i>Mstn</i> ^{loxP-E3-loxP} x Nkx2.5 ^{Cre}	Viable	Hyperplasie et hypertrophie des fibres musculaires	(Heineke <i>et al.</i> , 2010)
Surexpression de <i>Igf-1</i>				
Modèles transgéniques	ASA-Igf-1	Viable	Hypertrophie musculaire	(Coleman <i>et al.</i> , 1995)
	MLC1-Igf-1	Viable	Hypertrophie musculaire	(Musaro <i>et al.</i> , 2001)
Transfection <i>in vivo</i>	CMV-Igf-1	Viable	Prévention de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes (TA)	(Schakman <i>et al.</i> , 2005)
	Igf-1 (via AAV)	Viable	Hypertrophie musculaire et régénération musculaire	(Barton <i>et al.</i> , 2010)
Inactivation de <i>Igf-1</i>				
(totale)	<i>Igf-1</i> ^{fl/fl}	Létalité néonatale	Retard de croissance sévère	(Liu <i>et al.</i> , 1993)
(muscle spécifique)	<i>Igf-1r</i> ^{fl/fl} , Mef2c ^{Cre}	Viable	Réduction du nombre et de l'aire des myofibres	(Mavalli <i>et al.</i> , 2010)

Mstn^{loxP-E3-loxP} : le troisième exon de la myostatine est floxé et sera excisé par la Cre recombinase

AAV; adénovirus associé ; ASA, avian skeletal alpha-actine ; CMV, cytomegalovirus ; fl, floxé ; MCK, muscle creatine kinase ; MHC, myosin heavy chain ; MLC, myosin light chain ; TA, Tibialis anterior

L'exercice physique ou les facteurs favorisant l'hypertrophie tels que la protéine IGF-1 induisent une augmentation de la masse musculaire par l'activation de la voie de signalisation Akt et de ses cibles, nécessaires à la synthèse protéique (Bodine *et al.*, 2001b). Certains exercices musculaires conduisent d'ailleurs directement à une surexpression d'IGF-1 dans le muscle, phénomène suffisant pour induire l'hypertrophie musculaire *via* la voie Akt (Vandenberg *et al.*, 1991). Chez la souris, la surexpression muscle-spécifique d'*Igf-1* conduit à une hypertrophie musculaire importante (**Tableau 3**) (Musaro *et al.*, 2001). A l'inverse, l'inactivation spécifique du récepteur d'IGF-1, *Igf-1r*, nuit à la croissance musculaire en entraînant une diminution du nombre de fibres, de leur taille et du nombre des fibres de type I (Mavalli *et al.*, 2010).

En se fixant à son récepteur, la protéine IGF-1 active la cascade de signalisation Akt et contrôle ainsi la croissance musculaire *via* l'activation des voies de la synthèse protéique (Schiaffino et Mammucari, 2011). D'une part, la protéine Akt stimule la synthèse protéique en activant la signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin) et en inhibant la protéine GSK3- β (glycogen synthase kinase 3 β) et d'autre part, elle inhibe la dégradation protéique induite par les protéines FoxO (**Figure 16**) (Manning et Cantley, 2007).

L'activité de la protéine GSK3- β est inhibée lorsqu'elle est phosphorylée par la protéine Akt (Cross *et al.*, 1995). GSK3- β inhibe la traduction protéique initiée par le facteur eIF2B (Hardt et Sadoshima, 2002). Ainsi, la perte de fonction de GSK3- β conduit à une hypertrophie importante des myotubes en culture, phénotype comparable à celui obtenu par traitements des myotubes par la protéine Wnt1 qui entraîne également la phosphorylation de la protéine GSK3- β (Rommel *et al.*, 2001, Rochat *et al.*, 2004).

La protéine mTOR interagit avec différentes protéines pour former deux complexes distincts, mTORC1 (mTOR signaling complex 1) contenant notamment la protéine RAPTOR (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin) et mTORC2 contenant la protéine RICTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) (Laplante et Sabatini, 2012). Afin de définir les fonctions de ces deux complexes dans le muscle squelettique, des souris invalidées pour les gènes *Raptor* et *Rictor* ont été générées (Bentzinger *et al.*, 2008). Seule l'invalidation de *Raptor* et donc de mTORC1, engendre un phénotype dystrophique chez la souris (Bentzinger *et al.*, 2008). Ainsi, l'effet de mTOR sur la machinerie traductionnelle et la synthèse protéique est dépendante de mTORC1 qui phosphoryle la protéine S6K1 (ribosomal protein S6 kinase 1) et le répresseur de eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E), 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) (**Figure 16**) (Sandri, 2008). La kinase S6K1 activée phosphoryle à son tour la protéine ribosomale S6 ainsi que d'autres facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction et l'élongation, stimulant ainsi

la synthèse protéique (Hara *et al.*, 1998). La phosphorylation du facteur 4E-BP1 entraîne sa dissociation du facteur eIF4E et sa libération, qui participe également à l'initiation de la traduction (Hara *et al.*, 1997).

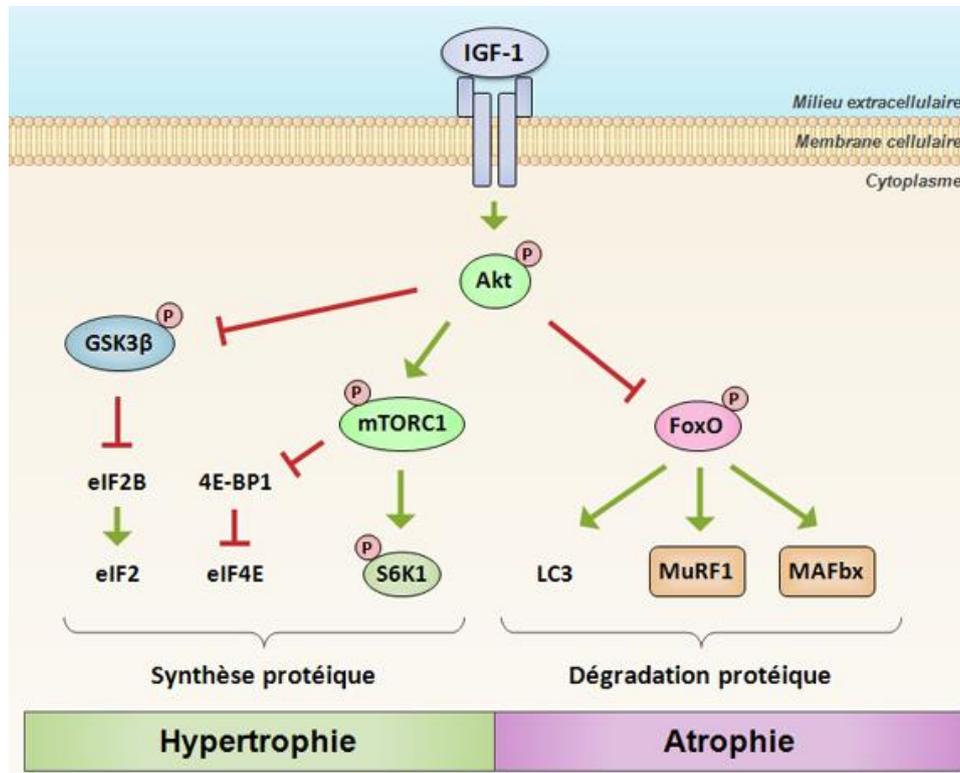


FIGURE 16. VOIE DE SIGNALISATION D'IGF-1. En se fixant à son récepteur IGF-R, IGF-1 active une cascade de phosphorylation intracellulaire aboutissant à l'activation d'Akt. La protéine Akt phosphorylée inhibe la dégradation protéique en réprimant l'activation des facteurs de transcription de la famille FoxO. En revanche, elle active la synthèse protéique par l'activation de la protéine mTOR et l'inhibition de la protéine GSK3- β . FoxO est nécessaire à la régulation des ubiquitine-ligases MuRF1 et MAFbx capables d'induire la dégradation de protéines musculaires comme la myosine via le protéasome. LC3 participe au processus d'autophagie par le lysosome. La protéine mTORC1 phosphoryle la kinase S6K1 qui activera à son tour bon nombre de facteurs impliqués dans l'initiation et l'élongation de la traduction. Elle active aussi eIF4E par phosphorylation de son inhibiteur 4E-BP1. Enfin, l'inhibition de GSK3- β conduit à une activation des facteurs eIF2B et eIF2. Akt, *protein kinase B* ; eIF, *translation initiation factor* ; FoxO, *forkhead box protein O* ; GSK3- β , *glycogen synthase kinase 3 β* ; IGF-1, *insulin-like growth factor 1* ; IGF-R, *insulin-like growth factor receptor* ; LC3, *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*, MAFbx, *muscle atrophy F-box* ; mTOR, *mammalian target of rapamycin* ; MuRF1, *muscle RING-finger protein 1* ; S6K1, *ribosomal protein S6 kinase 1*.

A l'inverse d'IGF-1, la myostatine, autre facteur sécrété, régule négativement les processus du développement musculaire squelettique (McPherron *et al.*, 1997). La régulation de la masse musculaire est donc essentiellement régie par deux voies de signalisation majeures : la voie IGF-1/Akt/mTOR et la voie de la myostatine (Glass, 2010, Schiaffino *et al.*, 2013).

La myostatine, un régulateur négatif de la masse musculaire

Découverte lors de la recherche de nouveaux membres de la superfamille des TGF- β (transforming growth factor- β), la myostatine, aussi appelée GDF-8 (growth and differentiation factor 8), reste à ce jour le plus puissant inhibiteur du développement musculaire (McPherron *et al.*, 1997). Chez les mammifères, la superfamille des TGF- β comprend une cinquantaine de protéines : les BMPs (bone morphogenetic proteins), les GDFs (growth and differentiation factors), les activines, et d'autres protéines telles que le MIS (Müllerian inhibiting substance) (Hinck, 2012). Toutes sont impliquées dans la régulation du développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte.

Comme les autres membres des TGF- β , la myostatine est un facteur sécrété sous la forme d'un précurseur (**Figure 17**) (Kingsley, 1994). Suite à la libération du peptide signal de sécrétion de 24 acides aminés, la furine, une protéase à sérine, clive la pro-myostatine au niveau de la séquence RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) de l'acide aminé en position 267 et génère deux fragments N-terminal et C-terminal (**Figure 17 a, b**) (Lee et McPherron, 2001). Le dimère formé par la liaison de deux extrémités C-terminales grâce à un pont disulfure correspond à la forme active de la myostatine. Cependant, le fragment N-terminal ou propeptide (aussi appelé LAP pour latency associated peptide) reste lié au dimère actif de façon non covalente empêchant la fixation de ce dernier à son récepteur (Thies *et al.*, 2001). Ce complexe inactif est dit latent (**Figure 17**). Du fait de son appartenance à la superfamille des TGF- β , le mécanisme d'activation de la myostatine pourrait donc être dépendant d'un clivage protéolytique induit par les membres de la famille des métalloprotéinases BMP-1/tolloid (Wolfman *et al.*, 2003) (**Figure 17 c**). Néanmoins, la majorité de la myostatine circulante dans le sérum est retrouvée sous forme latente donc inactive (Hill *et al.*, 2002, Zimmers *et al.*, 2002).

En effet, les TGF- β sont majoritairement sécrétés sous forme latente. Deux types de complexes latents ont été décrits : le complexe classique (SLC, small latent complex) où la forme active du TGF- β est complexée avec son propeptide de façon non covalente, et le complexe large (LLC, large latent complex) qui interagit avec la matrice extracellulaire et se compose du TGF- β non clivé par la furine, lié par son LAP à une protéine LTBP de façon covalente (Saharinen *et al.*, 1999). Les LTBPs (latent TGF- β -binding protein) sont des glycoprotéines sécrétées à multidomaines, interagissant avec les matrices extracellulaires, et dont 3 d'entre elles, LTBP-1, LTBP-3 et LTBP-4, jouent un rôle central dans la régulation des TGF- β (Rifkin, 2005). Enfin, il a été montré qu'à l'inverse du sérum où la myostatine est principalement retrouvée sous sa forme clivée et complexée à son propeptide, elle serait majoritairement retrouvée sous sa forme pro-myostatine liée à LTBP-3 dans le muscle squelettique (Anderson *et al.*, 2008).

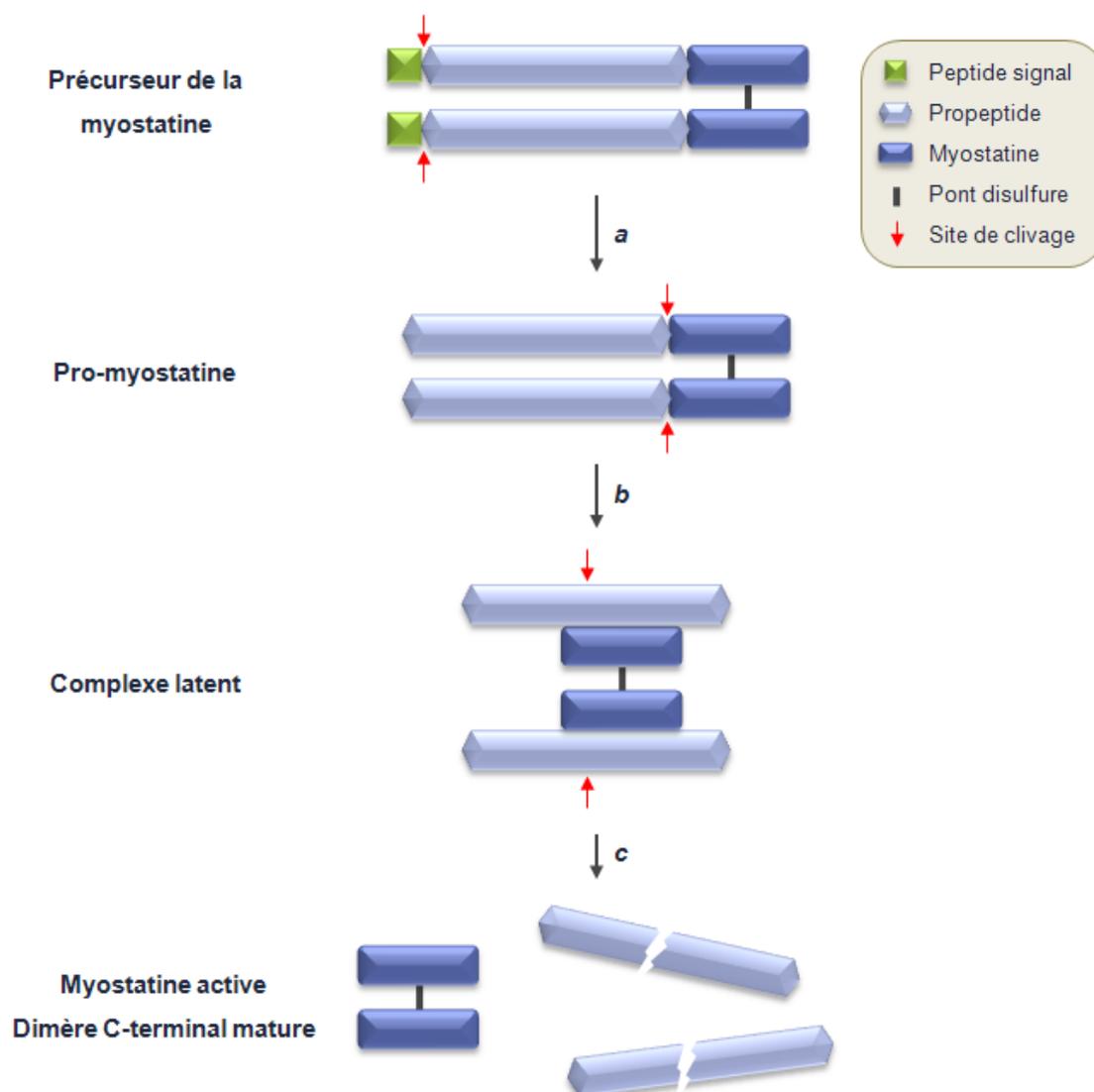


FIGURE 17. BIOSYNTHESE DE LA MYOSTATINE. (a) La myostatine est synthétisée sous forme d'un précurseur qui nécessite deux clivages protéolytiques pour générer la forme active : le premier permet l'élimination du peptide signal de sécrétion (vert), le second sépare le propeptide (bleu clair) de la forme active de la myostatine (bleu foncé) qui possède l'activité de liaison au récepteur. (b) Cependant, le propeptide reste lié au dimère actif de façon non covalente formant un complexe inactif dit latent (LAP). (c) L'activation de la myostatine a lieu suite à un dernier clivage protéolytique par des membres de la famille des métalloprotéinases BMP-1/tolloid, permettant la dissociation du complexe latent. *BMP, bone morphogenetic protein ; LAP, latency associated peptide.*

LTBP-3 se lie de façon non covalente à la pro-myostatine et empêche ainsi sa maturation en la séquestrant (Anderson *et al.*, 2008). En revanche, LTBP-3 ne peut se lier stablement au propeptide ou au dimère C-terminal seuls, ce qui suggère que l'action de la furine peut être suffisante pour libérer le dimère actif de LTBP-3 au sein de l'appareil de Golgi où le complexe LTBP-3/pro-myostatine est principalement retrouvé. Cependant, une fraction de ce complexe est aussi piégée dans la matrice extracellulaire, ce qui nécessite une action extracellulaire de la furine (Anderson *et al.*, 2008). Ainsi, un clivage extracellulaire de la pro-myostatine par des protéases de type furine représente un nouveau point de contrôle de la signalisation de la myostatine dans le muscle squelettique.

Le gène de la *myostatine* est localisé sur le chromosome 1 murin et comporte trois exons (**Figure 18**). L'expression de la *myostatine* est détectée au stade embryonnaire dès le jour 9,5 *post-coitum* dans les somites et se restreint à l'âge adulte aux muscles squelettiques et au muscle cardiaque essentiellement, bien qu'une expression très faible peut être détectée dans le tissu adipeux, l'épiderme et le derme, la glande mammaire et les cellules neuronales des bulbe et cortex olfactifs (McPherron *et al.*, 1997, Ji *et al.*, 1998, Sharma *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2012, Iwasaki *et al.*, 2013).

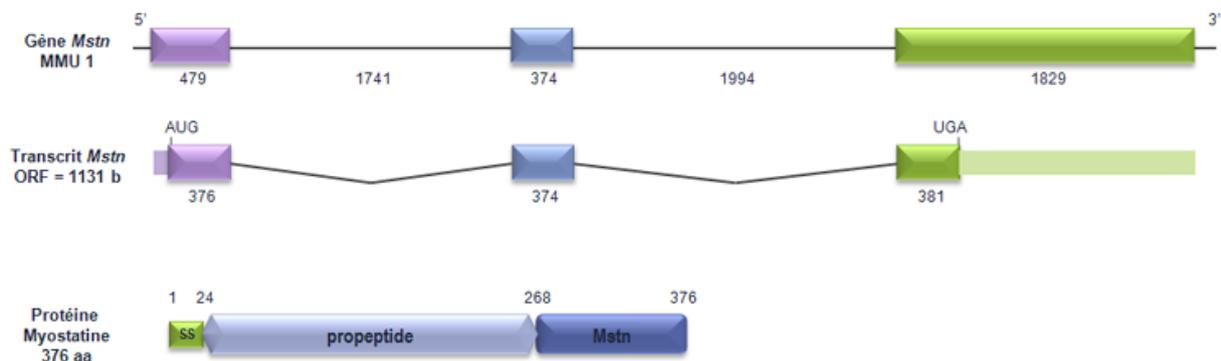


FIGURE 18. STRUCTURES GÈNE/PROTEINE DE LA MYOSTATINE CHEZ LA SOURIS. Le gène *myostatine* possède trois exons. Le transcrit mature code une protéine de 42,9 kDa correspondant à une chaîne polypeptidique de 376 acides aminés. Comme les autres membres de la superfamille des TGF- β , la protéine myostatine comprend une séquence signal de sécrétion en N-terminal, un propeptide et un fragment C-terminal capable de se lier au récepteur. *aa*, acides aminés ; *b*, bases ; *Mstn*, myostatine ; *ORF*, open reading frame ; *SS*, peptide signal de sécrétion.

Dès 1997, le rôle inhibiteur de la myostatine sur le développement musculaire a été élucidé par l'équipe de Se-Jin Lee grâce à la réalisation du knock-out de ce gène chez la souris (McPherron *et al.*, 1997). Les souris *Mstn*^{-/-} présentent une augmentation spectaculaire de la masse musculaire squelettique 2 à 3 fois plus importante que les sauvages, résultant aussi bien d'une augmentation du nombre de fibres (hyperplasie) que de leur taille (hypertrophie) (**Figure 19 a**). Cette découverte a immédiatement fait émerger l'idée que les phénotypes d'« hypermuscularité » observés chez d'autres espèces pouvaient être liés à un défaut dans l'expression de la myostatine. Ainsi, des études ultérieures ont permis la même année de préciser les génotypes de races bovines sélectionnées depuis des années pour ce caractère (**Figure 19 b**) (Grobet *et al.*, 1997, Kambadur *et al.*, 1997, McPherron et Lee, 1997). Des mutations « perte de fonction » allant de la production d'une protéine non fonctionnelle à la création d'un site illégitime pour un microARN responsable d'une instabilité des transcrits du gène *Mstn* ont ensuite été décrites chez d'autres espèces comme le mouton, le chien ou même l'homme, confirmant un rôle extrêmement conservé chez les espèces étudiées (**Figure 19**) (Lee et McPherron, 2001, Schuelke *et al.*, 2004, Shelton et Engvall, 2007).

Les fibres musculaires du muscle adulte sont formées et leur nombre déterminé au cours des deux phases prénatales des myogenèses primaire (E11 à E14) et secondaire (E14 à E17) (Tajbakhsh, 2003). De ce fait, l'hyperplasie liée à l'inactivation du gène *Mstn* a principalement lieu au cours du développement embryonnaire. La comparaison entre les souris sauvages *Mstn*^{+/+} et les souris *Mstn*^{-/-} a révélé un nombre de myofibres plus important chez les souris mutantes dès le 14^{ème} jour de développement embryonnaire et qui ne cesse d'augmenter jusqu'au 18^{ème} jour *post-coitum*, les souris hétérozygotes *Mstn*^{+/-} présentant un phénotype intermédiaire (**Figure 20**) (Matsakas *et al.*, 2010). En parallèle, le phénotypage musculaire des modèles murins *Mstn*^{loxP-E3-loxP:Cre-ERT} et *Mstn*^{loxP-E3-loxP:MCK^{Cre-ERT}} permettant d'inactiver directement la myostatine à l'âge adulte a révélé une absence d'hyperplasie des muscles squelettiques ce qui confirme que la myostatine régule le nombre de fibres au stade prénatal seulement (Grobet *et al.*, 2003, Welle *et al.*, 2007). L'absence de myostatine conduit donc à une hyperplasie dose-dépendante des myofibres primaires et secondaires.

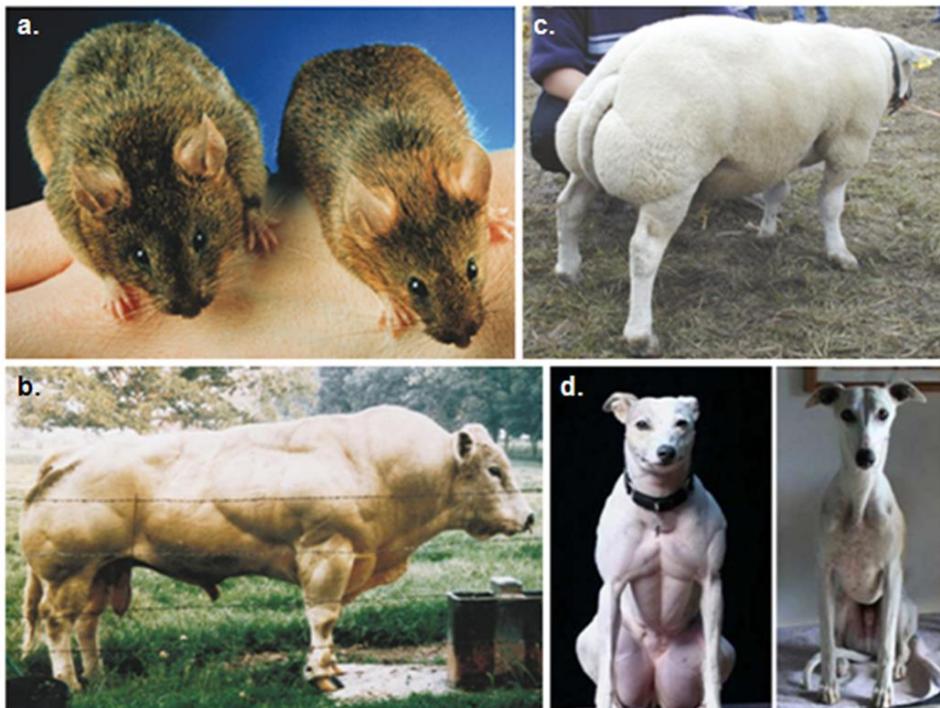


FIGURE 19. PHENOTYPE HYPERMUSCLE RESULTANT DE L'INACTIVATION DU GENE DE LA MYOSTATINE. (a) Souris *Mstn*^{-/-} (gauche) comparée à une souris sauvage (droite) (Lee et McPherron (1999)). (b) Taureau Blanc Bleu Belge (McPherron et Lee (1997)). (c) Mouton Texel (Lee (2007b)). (d) Lévrier whippet homozygote pour une mutation de la myostatine (gauche) et lévrier whippet hétérozygote pour cette même mutation (droite) (Shelton et Engvall (2007)).

Ce phénomène est corrélé à l'augmentation du nombre de précurseurs myogéniques Pax7⁺ chez les souris *Mstn*^{-/-} (Manceau *et al.*, 2008, Matsakas *et al.*, 2010) En effet, la myostatine est aussi bien capable d'activer l'expression de *p21*, ce qui favorise la sortie du cycle cellulaire des précurseurs

myogéniques, que d'inhiber celle de *MyoD*, facteur indispensable à la différenciation terminale de ces précurseurs (Halevy *et al.*, 1995, Zacksenhaus *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 2000). Ainsi, elle module *in vivo* la balance entre la prolifération et la différenciation terminale des progéniteurs embryonnaires du muscle. Son absence conduit à une augmentation du pool de progéniteurs qui sont donc plus nombreux à s'engager dans la voie myogénique (Manceau *et al.*, 2008).

En plus de l'hyperplasie observée dès le stade E14 chez les souris *Mstn*^{-/-}, la taille des fibres est augmentée de 19 % pour les fibres primaires et de 14 % pour les fibres secondaires (Matsakas *et al.*, 2010). Cependant, cette hypertrophie embryonnaire n'explique pas à elle seule celle observée au stade adulte (**Figure 20**). Deux modèles conceptuels de l'hypertrophie des myofibres au stade adulte sont classiquement décrits : dans le premier, le rapport nucléoplasmique (volume des noyaux/volume du cytoplasme des myofibres) diminue alors que le taux de synthèse protéique augmente et entraîne un accroissement de la myofibre (Edgerton et Roy, 1991) ; dans le second, le rapport nucléoplasmique est constant, l'augmentation de la taille des myofibres dépend donc de l'addition de nouveaux noyaux issus de la fusion des cellules satellites (Cheek, 1985). Les deux modèles ne s'excluent pas l'un l'autre et une dernière théorie propose que l'hypertrophie adulte résulte d'une combinaison de l'augmentation de la synthèse protéique et du nombre de noyau (O'Connor et Pavlath, 2007). Dans ce cas, l'augmentation de la synthèse protéique induirait la croissance de la myofibre jusqu'à un certain diamètre « seuil » où l'activation des cellules satellites serait nécessaire pour ajouter de nouveaux noyaux à la fibre musculaire. La myostatine inhibant la synthèse protéique, il a donc été largement accepté que son absence entraîne une augmentation des signaux anaboliques responsables de l'hypertrophie des myofibres au stade adulte.

En revanche, les résultats des différentes études concernant l'implication potentielle des cellules satellites dans l'hypertrophie observée chez les souris *Mstn*^{-/-}, sont longtemps restés contradictoires. Il a d'abord été suggéré que la myostatine régule la quiescence des cellules satellites et que son absence conduit à une augmentation du nombre de cellules satellites activées. Dans ce sens, une étude a révélé que les souris *Mstn*^{-/-} présentent un nombre supérieur de cellules satellites activées dont le taux de prolifération est augmenté *in vitro* (McCroskery *et al.*, 2003, Wagner *et al.*, 2005). D'autre part, l'hypertrophie induite par l'inhibition de la myostatine est moins importante chez les souris ayant subi une irradiation aux rayons γ qui permet l'inhibition de la prolifération cellulaire, donc des cellules satellites, ceci suggérant que ces dernières sont indispensables à une réponse hypertrophique totale (Gilson *et al.*, 2009). A l'inverse, d'autres travaux ont montré que l'inactivation du gène de la *myostatine* chez la souris entraîne une diminution du nombre de cellules satellites activées par rapport aux souris sauvages, mais qu'elle n'a pas d'incidence sur leur capacité proliférative *in vitro* (Amthor *et al.*, 2009). L'inhibition de la myostatine par surexpression de son

propeptide conduit à une hypertrophie musculaire sans affecter le nombre de cellules satellites ni le nombre de noyaux par fibres (Amthor *et al.*, 2009, Foster *et al.*, 2009, Matsakas *et al.*, 2009).

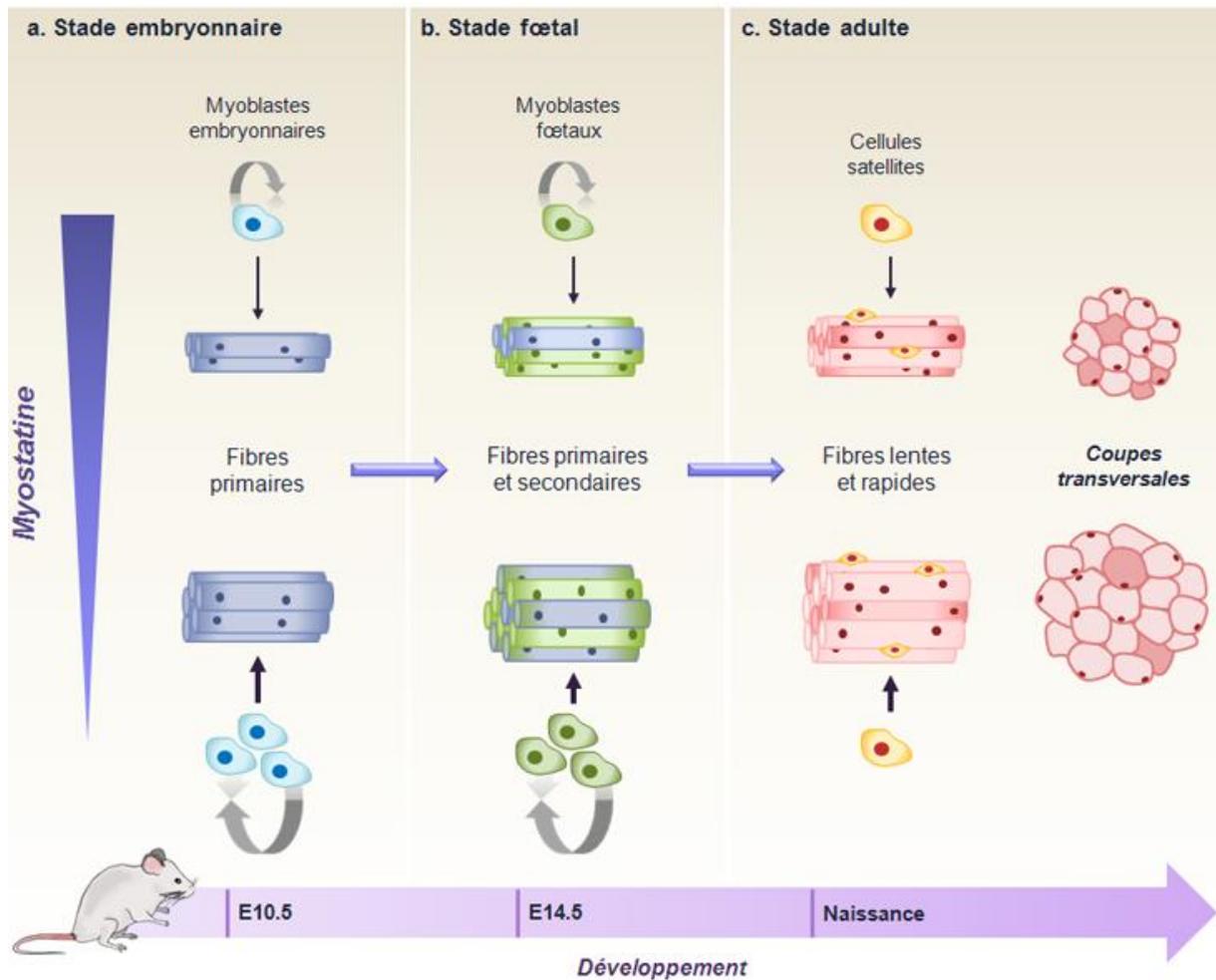


FIGURE 20. CONSÉQUENCES DE L'INVALIDATION DE LA MYOSTATINE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT MUSCULAIRE SQUELETTIQUE. (a-b) La myostatine régule la balance entre prolifération et différenciation terminale des progéniteurs embryonnaires et fœtaux. Son absence conduit donc à une augmentation du nombre de progéniteurs qui engendre une augmentation du nombre de fibres primaires et secondaires dont les tailles sont légèrement augmentées. (b) Au cours de la myogenèse secondaire au stade fœtal, la myostatine régule le métabolisme et la conversion glycolytique des fibres primaires si bien qu'en son absence, plus de 50 % des fibres primaires initialement oxydatives deviennent glycolytiques. (c) Au stade adulte, la myostatine régule la synthèse protéique des fibres musculaires. Son invalidation entraîne une hypertrophie de l'ensemble des fibres indépendante des cellules satellites.

Les travaux dirigés par Alexandra C. McPherron en 2012 ont réconcilié l'ensemble de ces résultats contradictoires (Wang et McPherron, 2012). La comparaison des souris sauvages et *Mstn*^{-/-} ne révèle aucune différence dans le nombre de cellules satellites et ce, quel que soit l'âge (Figure 20). La neutralisation de la myostatine par l'utilisation de l'inhibiteur artificiel sActRIIB-Fc, entraîne une hypertrophie des myofibres par augmentation du taux de synthèse protéique, suivie d'une faible

activation des cellules satellites, cependant trop faible pour participer à cette hypertrophie (Lee *et al.*, 2012, Wang et McPherron, 2012). Ainsi, les cellules satellites n'interviendraient pas dans l'hypertrophie adulte.

En parallèle du phénotype musculaire, les souris *Mstn*^{-/-} présentent une diminution de la masse totale graisseuse de 70 % par rapport aux sauvages en corrélation avec une diminution des taux sériques de leptine, triglycérides et cholestérol (McPherron et Lee, 2002). Globalement, les processus adipogéniques sont diminués chez les souris *Mstn*^{-/-} par rapport aux sauvages (Lin *et al.*, 2002). Les souris *Mstn*^{-/-} présentent également une diminution de la taille de leurs organes internes, notamment celles du foie et des reins (Lin *et al.*, 2002). Ces caractéristiques phénotypiques sont aussi retrouvées chez les races bovines Bleu Blanc Belge et Piémontaise, confirmant la grande conservation du rôle fonctionnel de la myostatine (Kambadur *et al.*, 1997).

Les souris *Mstn*^{-/-} présentent aussi une densité osseuse plus importante que les souris sauvages, ceci suggérant un rôle de la myostatine dans la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéogéniques (Elkasrawy et Hamrick, 2010). Un autre gène de la superfamille des TGF- β , *Gdf-11*, possède lui aussi un rôle crucial dans le développement du squelette axial. Exprimé dans le mésoderme pré-somitique, le bourgeon de la queue et la ligne primitive, il intervient dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur au cours de l'embryogenèse (McPherron *et al.*, 1999). Au stade adulte, le gène *Gdf-11* s'exprime dans le muscle squelettique et le cerveau. Bien qu'il présente une expression dans le muscle squelettique, l'inactivation du gène chez la souris (*Gdf-11*^{-/-}) n'entraîne aucune conséquence sur ce tissu (McPherron *et al.*, 1999). Pourtant, lors de l'identification de nouveaux facteurs régulant la croissance musculaire autres que la myostatine, une étude a montré que la protéine GDF-11 est capable d'inhiber la différenciation des myoblastes C2C12 en myotubes, agissant ainsi comme un régulateur négatif de la myogenèse *in vitro* (Souza *et al.*, 2008). Une analyse de la relation entre expression et fonction de *Gdf-11* chez le poulet a suggéré que GDF-11 peut jouer un rôle sur le développement musculaire (Gamer *et al.*, 2001). En effet, GDF-11 est capable d'induire l'expression de son antagoniste, la follistatine, aussi décrit comme un inhibiteur de la myostatine. La dérégulation de *Gdf-11* pourrait donc indirectement jouer sur la signalisation de la myostatine (Gamer *et al.*, 2001). Ainsi, l'ensemble de ces travaux ne permet pas d'établir des rôles distincts pour les gènes *Mstn* et *Gdf-11*, tous deux ayant des fonctions clés dans la régulation du développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes. La création du double KO *Mstn*^{-/-}:*Gdf-11*^{-/-} a apporté un nouvel éclairage sur la redondance des fonctions de ces deux facteurs (McPherron *et al.*, 2009). En effet, ces mutants présentent des transformations homéotiques du squelette axial plus importantes que les souris *Gdf-11*^{-/-}, sans aggravation du phénotype musculaire. Parallèlement, la délétion conditionnelle de *Gdf-11* au sein du muscle squelettique sur des souris *Mstn*^{+/-} ou *Mstn*^{-/-}

n'affecte ni la taille des muscles, ni le nombre ou le type de fibres (McPherron *et al.*, 2009). Ainsi, la myostatine et GDF-11 auraient des fonctions redondantes dans le développement et la mise en place du squelette, mais seule la myostatine interviendrait dans la myogenèse du muscle squelettique.

Chez le bovin et la souris, la perte d'une myostatine fonctionnelle conduit à une augmentation des fibres glycolytiques de type II au détriment des fibres oxydatives de type I (**Figure 20**) (Stavaux *et al.*, 1994, Girgenrath *et al.*, 2005). Dès la naissance, les muscles de ces animaux présentent un métabolisme majoritairement glycolytique corrélé à une diminution de la force musculaire. Ce phénotype s'établit donc au cours du développement embryonnaire. Au cours de la myogenèse primaire, les souris *Mstn*^{-/-} et les sauvages *Mstn*^{+/+} développent toutes des fibres primaires exprimant des chaînes de myosine associées au métabolisme oxydatif (Matsakas *et al.*, 2010). A partir du 14^{ème} jour de développement embryonnaire (E14) coïncidant avec l'initiation de la myogenèse secondaire, les fibres oxydatives des souris *Mstn*^{-/-} subissent une conversion importante en fibres glycolytiques si bien que ces souris perdront 50 % de leur fibres oxydatives jusqu'à la naissance (Matsakas *et al.*, 2010). Ainsi, la myostatine n'intervient pas dans la régulation du métabolisme des fibres au cours de la myogenèse primaire mais elle est indispensable à la régulation de la conversion glycolytique des fibres au cours de la myogenèse secondaire. Il n'est donc pas étonnant que dans les conditions physiologiques normales du muscle adulte, l'expression de la myostatine soit plus importante dans les fibres de type II (Carlson *et al.*, 1999). La myostatine régule cette conversion glycolytique à deux niveaux : elle inhibe l'expression de MyoD, facteur qui favorise l'expression de chaînes de myosine des fibres de type II et elle favorise celle de Mef2 permettant ainsi l'expression de chaînes de myosine des fibres de type I (Hughes *et al.*, 1993, Potthoff *et al.*, 2007, Hennebry *et al.*, 2009).

L'invalidation de la *myostatine* chez la souris conduit à une surexpression significative des microARNs « MyomiRs », miR-1/miR-206 et miR-133a/miR-133b, surexpression qui participe à l'augmentation massive de la masse musculaire en favorisant la prolifération et la différenciation myoblastique (Chen *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2006, Rachagani *et al.*, 2010). Ces données suggèrent aussi que la myostatine peut réguler par sa voie de signalisation les MyomiRs. Cette hypothèse est confortée par une étude récente révélant que les protéines SMADs (sma mothers against decapentaplegic homolog) activées par les facteurs TGF- β et BMP-4 peuvent s'associer au complexe Drosha/DGCR8 (Di George critical region 8) (Davis *et al.*, 2008).

Au contraire de l'invalidation de la *myostatine* qui entraîne systématiquement une hypertrophie, son activation ne conduit pas forcément à un phénotype d'atrophie manifeste. Les modèles transgéniques murins surexprimant la *myostatine* sous la dépendance d'un promoteur

muscle-spécifique présentent une diminution de la taille des fibres et du nombre de noyaux par fibre chez les mâles uniquement, diminution responsable d'un phénotype d'atrophie musculaire modérée (diminution d'environ 20 % de la masse musculaire par rapport aux sauvages) (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003, Heineke *et al.*, 2010). Ce même phénotype modéré est observé lorsque la *myostatine* est surexprimée par électroporation dans le muscle à l'âge adulte (Durieux *et al.*, 2007).

A l'inverse, Se-Jin Lee et ses collaborateurs ont montré en 2002 que la sécrétion de myostatine induite par l'injection de cellules CHO sécrétrices de myostatine dans une patte de souris « nude » (dépourvues de thymus) conduit à un phénotype de cachexie musculaire très sévère (Zimmers *et al.*, 2002), suggérant donc que la myostatine, indépendamment de la présence d'une tumeur, est suffisante pour induire une cachexie musculaire. Plus récemment, la myostatine a de nouveau attiré l'attention de nombreux chercheurs autour de son rôle potentiel dans la cachexie cancéreuse (Fearon *et al.*, 2012). Des études ont montré une dérégulation de la signalisation de la myostatine dans cette cachexie (Costelli *et al.*, 2008). De plus, différentes lignées tumorales présentent une surexpression de la myostatine, notamment les cellules C26 issues de carcinome du colon (Lokireddy *et al.*, 2012). Cette expression anormale de la myostatine par ces lignées tumorales pourrait être responsable du phénomène de cachexie cancéreuse. Des études récentes ont été consacrées à l'analyse du blocage de la myostatine et de sa voie de signalisation en utilisant un inhibiteur artificiel, sActRIIB-Fc. Celui-ci correspond à la partie C-terminale du récepteur ActRIIB de la myostatine couplé à un domaine Fc d'immunoglobuline permettant à ce récepteur d'être soluble (Lee *et al.*, 2005). L'administration systémique de la molécule sActRIIB-Fc à quatre modèles distincts de souris présentant une cachexie cancéreuse a permis de traiter la cachexie mais n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale (Benny Klimek *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2010). Néanmoins, le simple fait de restaurer la masse musculaire a permis d'augmenter de 30 % le taux de survie des souris traitées, suggérant la possibilité d'utiliser cette approche chez l'homme (Zhou *et al.*, 2010).

Les phénotypes liés à l'invalidation ou à la surexpression de la *myostatine* témoignent de sa fonction essentielle dans le contrôle de l'homéostasie musculaire. Afin d'appréhender plus finement son rôle en caractérisant les voies moléculaires qu'elle dérégule, un grand nombre d'études *in vitro* sur la lignée myoblastique murine C2C12 ou sur des cultures primaires myoblastiques bovines et murines ont été réalisées au cours des 15 dernières années.

Voies de signalisation et régulation intracellulaire de la myostatine

Voie de signalisation canonique des SMADs

Comme les autres membres de la superfamille des TGF- β , la myostatine agit sur la voie canonique des SMADs par liaison aux récepteurs à activité sérine/thréonine kinase de type IIA ou IIB (ActRIIA ou ActRIIB), avec une liaison préférentielle au récepteur ActRIIB (Lee et McPherron, 2001). L'interaction de la myostatine avec ce récepteur de type II conduit au recrutement du récepteur correspondant de type I (Alk4/5, activin-like kinase 4/5) ce qui entraîne une phosphorylation des R-SMADs (receptor-regulated SMADs) correspondants SMAD2 et SMAD3 (Tableau 4) (Figure 21) (Langley *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2004). Les SMAD2/3 se complexent ensuite avec le co-SMAD (common mediator-SMAD), SMAD4, pour permettre leur translocation dans le noyau et contrôler l'expression des gènes cibles (Zhu *et al.*, 2004, Sartori *et al.*, 2009). Cette voie de signalisation intracellulaire peut être inhibée par SMAD7 qui empêche la phosphorylation des R-SMADs par les récepteurs des TGF- β (Massague, 1998).

TABLEAU 4. MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES TGF- β ET LEURS RECEPTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIES. (Adapté de Hinck (2012))

Protéines	Récepteurs de type I ^a	Récepteurs de type II	R-SMADs
TGF- β s	T β R-I (Alk5)	T β R-II	SMAD2, 3
Activine	ActRIB (Alk4) T β R-I (Alk5)	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2, 3
Myostatine (GDF-8)	ActRIB (Alk4) T β R-I (Alk5)	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2, 3
Nodal	ActRIB (Alk4) T β R-I (Alk5)	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2, 3
BMPs, GDFs	Alk1 Act-RI (Alk2) BMPR-IA (Alk3) BMPR-IB (Alk6)	ActRIIA ActRIIB BMPR-II	SMAD 1, 5, 8
MIS	BMPR-IA (Alk3) BMPR-IB (Alk6)	MISR-II	SMAD 1, 5, 8

^a Les récepteurs de type I de la superfamille des TGF- β ont été initialement appelés « activin-like kinases » (Alk), mais plusieurs ont été depuis renommés selon les protéines de signalisation qui les activent.

ActR, activin receptor ; Alk, activin-like receptor ; BMPR, bone morphogenetic protein receptor ; GDF-8, growth and differentiation factor-8 ; MISR, Müllerian inhibiting substance ; R-SMAD, receptor-regulated SMAD ; SMAD, *sma mothers against decapentaplegic homolog* ; T β R, TGF- β receptor

En empruntant la voie des SMADs, la myostatine est capable d'inhiber la prolifération et la différenciation de myoblastes en culture. En activant sa voie de signalisation, la myostatine augmente l'expression de l'inhibiteur des CDKs p21, et diminue l'expression de Cdk2, ceci conduisant

à une hypophosphorylation de la protéine Rb conjointement à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ (**Figure 21**) (Thomas *et al.*, 2000, Rios *et al.*, 2001, Taylor *et al.*, 2001, Joulia *et al.*, 2003). A l'inverse, au cours de l'entrée en différenciation des myoblastes, la myostatine diminue l'expression de p21, empêchant la sortie du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation des myoblastes en myotubes (Langley *et al.*, 2002). Elle induit parallèlement la dérégulation de MyoD, aussi bien par la diminution d'expression de ce dernier par fixation des phospho-SMAD3 à son promoteur, que par l'inhibition de son activité par l'interaction des SMAD3 avec son domaine bHLH (Liu *et al.*, 2001, Langley *et al.*, 2002, Rios *et al.*, 2002). Enfin, elle conduit à la diminution d'expression de la myogénine et de Myf5, faisant encore une fois obstacle à la progression des processus myogéniques (**Figure 21**) (Langley *et al.*, 2002, Rios *et al.*, 2002, Joulia *et al.*, 2003).

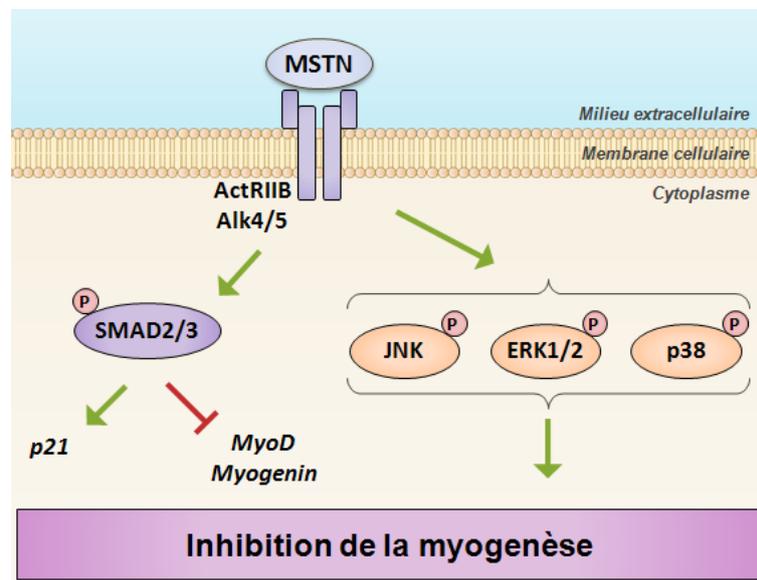


FIGURE 21. VOIES DE SIGNALISATION CANONIQUE ET NON CANONIQUES DE LA MYOSTATINE. Suite à sa fixation à son récepteur ActRIIB, la myostatine active la voie canonique des SMADs inhibant la progression des processus myogéniques. Elle est également capable de réguler négativement les processus myogéniques *via* l'activation des voies de signalisation des MAPKs (ERK1/2, JNK, p38). *ActRIIB*, activin receptor type-IIb ; *Alk4/5*, activin-like kinase ; *ERK1/2*, extracellular signal-regulated kinase 1/2 ; *JNK*, c-Jun N-terminal kinase ; *MSTN*, myostatine ; *MyoD*, myoblast determination protein 1 ; *SMAD*, *sm* mothers against decapentaplegic homolog.

En plus de sa voie canonique, la myostatine peut agir indépendamment des SMADs par l'intermédiaire d'autres voies de signalisation telles que les voies de signalisation des mitogen-activated protein kinase (MAPKs) ainsi que la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt (**Figure 22**) (Philip *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2007, Trendelenburg *et al.*, 2009).

Autres voies de signalisation

De nombreuses études *in vitro* ont révélé l'implication des voies de signalisation des MAPKs dans l'inhibition de la croissance musculaire induite par la myostatine (**Figure 22**). En effet, la myostatine est capable d'activer la protéine p38 MAPK par la cascade TAK1-MKK6 (TGF- β -activated kinase 1-Mitogen-activated protein kinase kinase 6) ce qui entraîne une inhibition de la prolifération des cellules C2C12 et participe au maintien d'un taux basal de p21 (Philip *et al.*, 2005). La myostatine est aussi capable d'activer la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase) par la cascade TAK1-MMK4 dans les cellules C2C12 en prolifération et en différenciation (Huang *et al.*, 2007). Il a d'ailleurs été montré que le récepteur ActRIIB est nécessaire à l'activation de cette voie, la sous-expression du récepteur par siRNA (small interfering RNA) conduisant à une forte diminution de la phosphorylation des JNK (Huang *et al.*, 2007). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des JNK diminue l'expression de p21 induite par la myostatine en prolifération, et augmente l'expression des marqueurs de la différenciation (**Figure 21**) (Huang *et al.*, 2007).

La voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) semble être elle aussi impliquée dans l'inhibition des processus myogéniques induite par la myostatine (**Figure 21**) (Yang *et al.*, 2006). En effet, sa fixation au récepteur ActRIIB active la voie de signalisation Ras/ERK1/2 qui entraîne une diminution des processus de prolifération et de fusion des myoblastes C2C12 (Yang *et al.*, 2006). Une autre étude a aussi mis en évidence le rôle essentiel de la voie ERK1/2 dans la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites (McFarlane *et al.*, 2008). En effet, alors que l'excès de myostatine *in vitro* conduit à une diminution de l'expression de Pax7 *via* l'activation de ERK1/2, l'inactivation du gène ou l'inhibition de la myostatine par l'utilisation d'un antagoniste entraîne une augmentation de l'expression de Pax7 au sein de cellules myoblastiques primaires (McFarlane *et al.*, 2008). Ainsi, la myostatine pourrait réguler Pax7 et l'auto-renouvellement des cellules satellites au cours des processus de régénération. Cependant, les auteurs ne précisent pas si dans ce contexte, la phosphorylation de ERK1/2 est directement ou indirectement dépendante de la fixation de la myostatine à son récepteur ActRIIB.

Enfin, la myostatine est capable d'inhiber la voie de signalisation Akt/mTOR activé par IGF-1, renforçant ainsi son pouvoir inhibiteur des processus myogéniques (**Figure 22**). *In vitro*, les traitements de myoblastes squelettiques humains (HuSkMC) par la myostatine à des concentrations physiologiques (0,1 à 300 ng/ml) inhibent la phosphorylation d'Akt par l'intermédiaire des SMAD2/3 activés au cours de la prolifération et de la différenciation des cellules (Amirouche *et al.*, 2009, Sartori *et al.*, 2009, Trendelenburg *et al.*, 2009). De même, la myostatine abroge la croissance hypertrophique des cardiomyocytes induite par la phényléphrine *via* l'inhibition de la voie Akt

(Morissette *et al.*, 2006). L'inhibition d'Akt entraîne celle des protéines mTOR et p70S6K, et une diminution de la synthèse protéique. De plus, l'inhibition de mTOR conduit à une augmentation de la phosphorylation de SMAD2 établissant une véritable boucle de rétroaction positive : la myostatine active SMAD2 qui inhibe Akt induisant l'inhibition de mTOR, qui potentialise ainsi la phosphorylation de SMAD2 induite par la myostatine (Glass, 2010).

En inhibant la phosphorylation d'Akt, la myostatine induit également l'activation de la protéine FoxO1 qui favorise l'expression des atrogènes *MuRF1* et *MAFbx*, indépendamment de la voie NFκB (Figure 22) (McFarlane *et al.*, 2006).

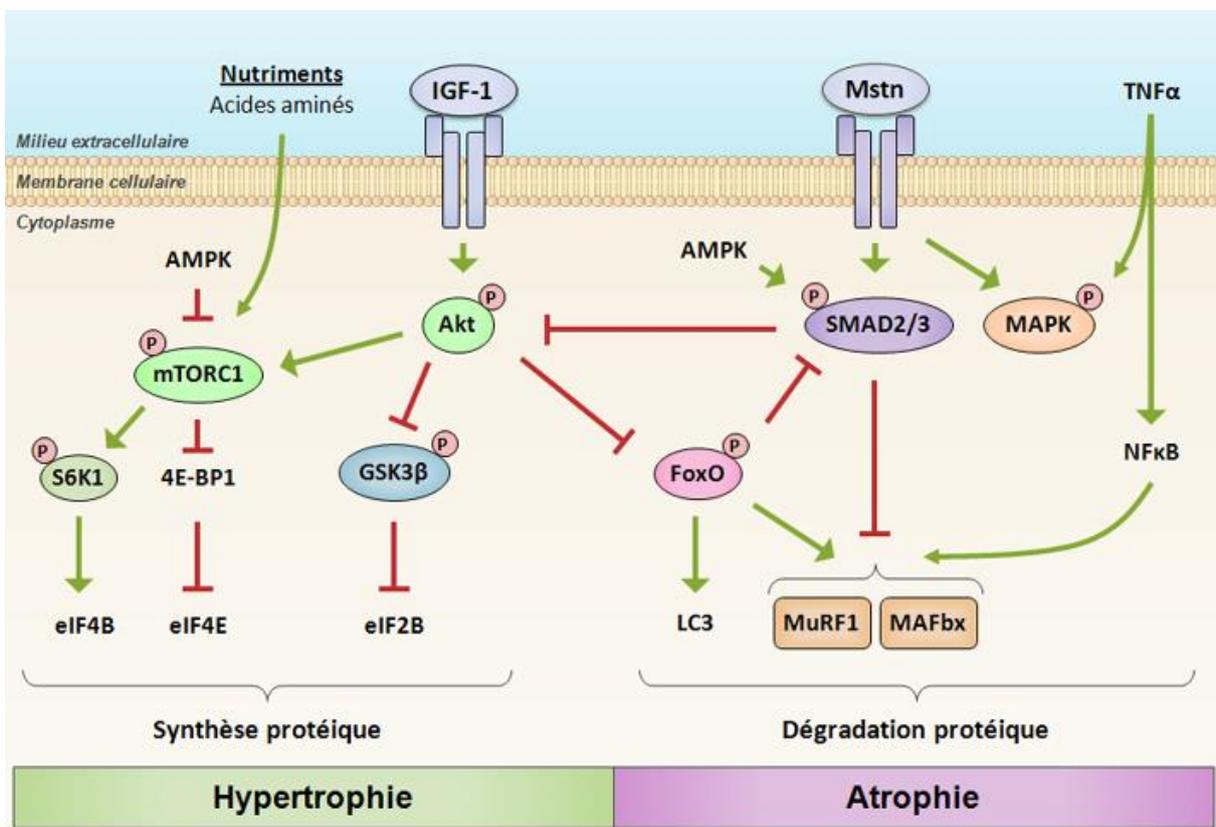


FIGURE 22. DIALOGUE ENTRE IGF-1 ET LA MYOSTATINE DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE. De la même manière que l'ingestion d'acides aminés, IGF-1 active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et favorise ainsi les processus d'hypertrophie. Elle permet l'augmentation de la synthèse protéique par l'activation des protéines mTOR et p70S6K (S6K1). Elle est donc le régulateur positif de la croissance musculaire et de la synthèse protéique. A l'inverse, la myostatine active sa voie de signalisation canonique des SMADs et les voies des MAPKs (ERK1/2, JNK, p38), l'ensemble aboutissant à l'inhibition des processus myogéniques. Les SMADs activées par la myostatine sont aussi capables d'inhiber les voies de la synthèse protéique orchestrées par Akt. *Akt*, *protein kinase B* ; *AMPK*, *AMP-activated protein kinase* ; *eIF*, *translation initiation factor* ; *FoxO*, *forkhead box protein O* ; *GSK3-β*, *glycogen synthase kinase 3 β* ; *IGF-1*, *insulin-like growth factor 1* ; *IGF-R*, *insulin-like growth factor receptor* ; *LC3*, *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*, *MAFbx*, *muscle atrophy F-box* ; *MAPK*, *mitogen-activated protein kinase* ; *MSTN*, *myostatin* ; *mTOR*, *mammalian target of rapamycin* ; *MuRF1*, *muscle RING-finger protein 1* ; *NFκB*, *nuclear factor-κ-B* ; *S6K1*, *ribosomal protein S6 kinase 1* ; *SMAD*, *sma mothers against decapentaplegic homolog* ; *TNFα*, *tumor necrosis factor α*.

Cependant, dans ce contexte, la signalisation d'Akt peut être rétablie par l'addition d'IGF-1 dans le milieu de culture des myoblastes ou des myotubes (Trendelenburg *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent l'effet dominant d'IGF-1 sur celui de la myostatine offrant ainsi la possibilité thérapeutique d'utiliser l'axe IGF-1/Akt dans les pathologies où la myostatine est active.

La régulation de la masse musculaire repose donc essentiellement sur les voies de signalisation activées par la myostatine et IGF-1 et le rôle crucial d'Akt et de ces effecteurs mTOR et FoxO qui régulent respectivement la synthèse et la dégradation protéique (**Figure 22**) (Schiaffino *et al.*, 2013). Ces deux gènes nécessitent donc une régulation fine, aussi bien au niveau de leur expression qu'au niveau de leur activité.

Régulation de l'expression de la myostatine

Bien que le rôle fonctionnel de la myostatine dans le développement musculaire ait été largement analysé ces vingt dernières années, la régulation de sa transcription n'a été que peu étudiée. Quelques études du promoteur de la *myostatine* chez différentes espèces ont malgré tout permis de mieux définir les mécanismes moléculaires qui régulent son expression.

Chez différentes espèces, l'analyse de la région promotrice a révélé la présence de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription notamment une dizaine de « E-box », permettant la fixation des MRFs grâce à leur domaine bHLH, mais également des sites de liaison pour Mef2, NFκB ou PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) (**Figure 23**) (Ma *et al.*, 2001, Spiller *et al.*, 2002, Du *et al.*, 2007). *In vitro*, la E-Box 6 (E6) de la séquence promotrice bovine permet la fixation de MyoD et s'avère être nécessaire à la transcription de la *myostatine*. En effet, leurs expressions corrélient au cours de la prolifération ou au cours de l'entrée en différenciation des cellules myoblastiques (Spiller *et al.*, 2002). *In vivo*, MyoD se lie aussi à la E-box 5 (E5) de la séquence promotrice murine dirigeant ainsi une activation spécifique du promoteur de la *myostatine* au sein des fibres de type II des muscles squelettiques (Salerno *et al.*, 2004). Ces résultats concordent avec les observations faites sur la caractérisation du rôle de la myostatine dans la spécification des fibres musculaires et de son expression (Artaza *et al.*, 2002, Hennebry *et al.*, 2009).

La séquence régulatrice de la *myostatine* comporte aussi des sites de liaison aux facteurs de transcription SMAD et FoxO (**Figure 23**) (Allen et Unterman, 2007). Lorsque des cellules C2C12 sont traitées par du TGF-β, l'expression de FoxO1 augmente ce qui induit une activation du promoteur de la *myostatine* (Allen et Unterman, 2007). Cette activation est aussi observée lorsque ces cellules surexpriment les principaux acteurs de la voie canonique de la myostatine, SMAD2 et SMAD4, suggérant ainsi l'hypothèse que la myostatine puisse s'auto-réguler (Allen et Unterman, 2007). Deux

études antérieures confirment cette hypothèse. En effet, il a été montré que l'activation des SMAD2/3 et SMAD4 leur permet de se lier au promoteur de leur répresseur SMAD7 et d'en activer sa transcription (**Figure 23**) (Zhu *et al.*, 2004). Par ailleurs, la surexpression de SMAD7 conduit à l'inhibition de l'activité du promoteur de la *myostatine* (Forbes *et al.*, 2006). De plus, l'inactivation du gène *Smad3* chez la souris conduit à une augmentation de l'expression de la *myostatine* (Ge *et al.*, 2011). Finalement, l'ensemble de ces données suggère que l'expression de la *myostatine* dépend du ratio total des R-SMADs (SMAD2 et SMAD3), co-SMADs (SMAD4) et I-SMADs (Inhibiroy-SMADs, SMAD7) à un moment donné, en considérant que ce ratio peut être aussi bien modulé par la *myostatine* que par d'autres TGF- β (Zhu *et al.*, 2004, Forbes *et al.*, 2006, Allen et Unterman, 2007).

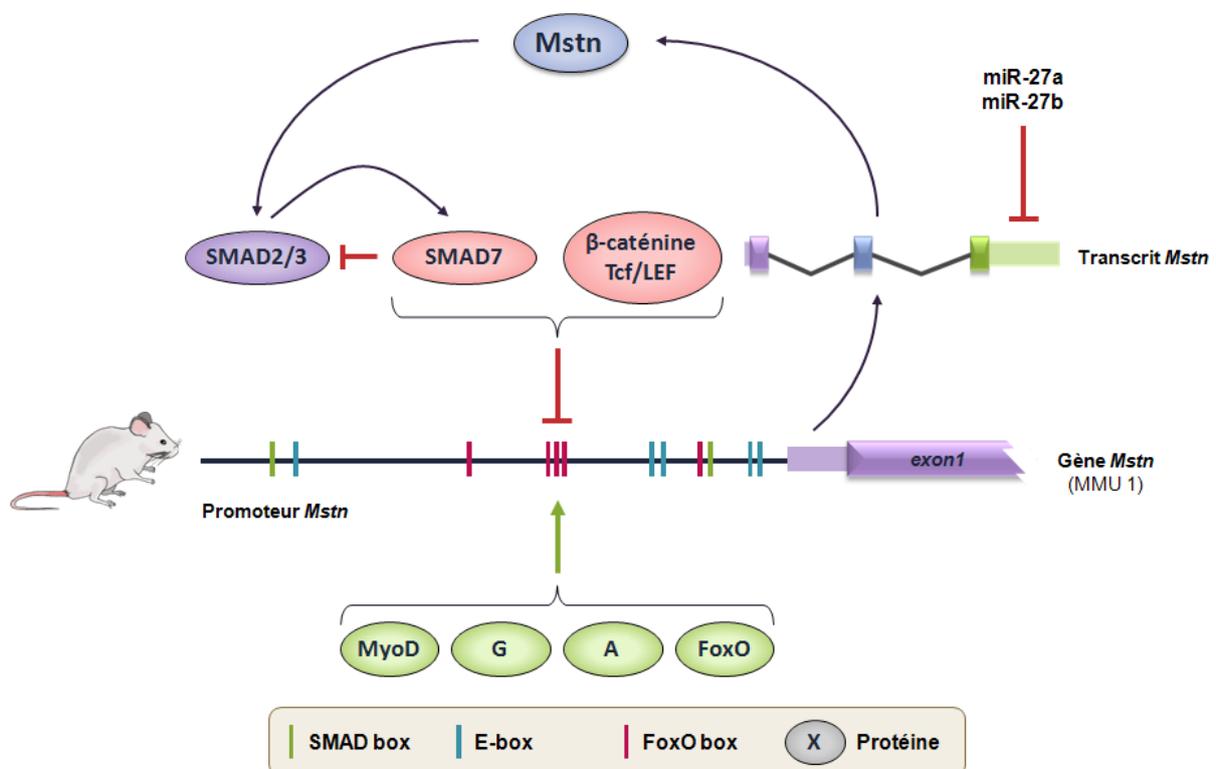


FIGURE 23. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA MYOSTATINE. Les SMAD2/3 activés par la myostatine peuvent réguler positivement l'expression de SMAD7. SMAD7 se fixe à son tour sur les SMAD box du promoteur de la *myostatine* pour inhiber sa transcription. La voie Wnt/ β -caténine semble elle aussi pouvoir inhiber la *myostatine*. A l'inverse, le promoteur de la *myostatine* comprend différents éléments de réponse permettant son activation, notamment des « E-box » pour les MRFs, des FoxO box ou des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (G) ou aux androgènes (A). Enfin, les microARNs miR-27a et miR-27b se fixent à la région 3'UTR du transcrite de la *myostatine* entraînant sa dégradation. A, androgène ; FoxO, forkhead box protein O ; G, glucocorticoïdes ; miR, microARN ; Mstn, myostatine ; MyoD, myoblast determination 1 ; SMAD, sma mothers against decapentaplegic homolog ; Tcf/LEF, T-cell factor/Lymphoid enhancer factor.

Le promoteur de la *myostatine* contient aussi des éléments de réponse à différentes hormones comme les glucocorticoïdes (GRE) ou les androgènes (ARE) (**Figure 23**) (Ma *et al.*, 2001, Du *et al.*, 2007). Il a d'ailleurs été montré que l'atrophie musculaire engendrée par un traitement à la

dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse, est liée à une surexpression de la *myostatine* (Ma *et al.*, 2003, Salehian *et al.*, 2006). Enfin, il a été montré que le traitement par la protéine Wnt4 de myoblastes murins entraîne une diminution de l'activation de la voie de la myostatine et de son expression. L'identification de 3 sites potentiels de fixation aux éléments Tcf/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) au sein du promoteur de la *myostatine* confirme l'hypothèse que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est directement impliquée dans la régulation de son expression (Bernardi *et al.*, 2011).

Plus récemment, il a été mis en évidence que l'expression de la *myostatine* est aussi régulée par des microARNs. Il a par exemple été montré que suite à l'ingestion d'acides aminés essentiels (EAA) enrichis en leucine, l'expression des miR-499, miR-208b et miR-23a augmente dans le muscle squelettique alors que l'expression de certains gènes, dont la *myostatine*, diminue (Fujita *et al.*, 2007, Drummond *et al.*, 2009). Cette diminution de la *myostatine* est cohérente avec l'augmentation de la synthèse protéique induite par la prise d'EAA. Deux autres microARNs, miR-27a et miR-27b, ont été identifiés comme clairement impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de la *myostatine* (**Figure 23**) (Allen et Loh, 2011). Majoritairement exprimés dans les muscles à contraction lente, ils participent aussi à la sous-expression de la *myostatine* dans les fibres musculaires de type I (Allen et Loh, 2011). *In vitro*, la surexpression du miR-27a dans des myoblastes C2C12 favorise leur prolifération *via* l'inactivation de la myostatine (Huang *et al.*, 2012). Cette surexpression peut être notamment induite par un enrichissement du milieu de culture en leucine (Chen *et al.*, 2013). Dernièrement, il a été montré que chez la race bovine Piémontaise, la diminution d'expression de la *myostatine* est corrélée à une surexpression de miR-27b (Miretti *et al.*, 2013). En plus de la mutation de la cystéine 313 en tyrosine entraînant la production d'une myostatine non fonctionnelle et le phénotype hypermusclé, la dérégulation de son expression aurait un effet additif à ce phénotype (Kambadur *et al.*, 1997, Berry *et al.*, 2002, Miretti *et al.*, 2013). Cependant, cette dernière étude est en contradiction avec les résultats précédemment obtenus sur l'expression de la *myostatine* chez la Piémontaise. En effet, la production d'une myostatine non fonctionnelle entraîne une augmentation de ses transcrits, ce phénomène étant lié à l'incapacité de la myostatine d'activer sa voie de signalisation et d'activer le rétrocontrôle négatif de son expression (Berry *et al.*, 2002, Forbes *et al.*, 2006). Néanmoins, le rôle de miR-27b dans la régulation de la *myostatine* présente un intérêt majeur dans la recherche de marqueurs de sélection favorisant l'hypertrophie musculaire.

Régulation extracellulaire de la myostatine

La myostatine est un régulateur négatif si puissant qu'elle nécessite, en plus de cette régulation intracellulaire complexe, une régulation extracellulaire très fine, majoritairement exercée par ses inhibiteurs. A l'instar du propeptide qui est capable d'interagir avec la forme active de la myostatine et d'inhiber ainsi son action (**Tableau 5**) (Lee et McPherron, 2001, Thies *et al.*, 2001), d'autres partenaires extracellulaires de la myostatine régulent son activité. La majorité de ces partenaires protéiques a été identifiée *in vitro* soit par l'utilisation du système double-hybride pour la protéine follistatine, soit par résonance plasmonique de surface pour la décorine et la laminine. Seules les protéines FLST3 (follistatin-like 3) et GASP-1 (Growth and differentiation factor-Associated Serum Protein-1) ont été identifiées *in vivo* par co-immunoprécipitation avec la myostatine dans des sérums humain et murin (**Tableau 5**).

TABLEAU 5. PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA MYOSTATINE.

Localisation	Inhibiteur	Forme de myostatine liée	Conséquences de la liaison	Références
Sérum	Mstn propeptide	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la forme mature de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Thies <i>et al.</i> , 2001)
	Follistatine	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la forme mature de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Lee et McPherron, 2001)
	FLST3	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la forme mature de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Hill <i>et al.</i> , 2002)
	GASPs	Dimère actif (Mstn mature) Mstn Propeptide	Inhibition de l'activation de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Hill <i>et al.</i> , 2003, Kondas <i>et al.</i> , 2008)
Cellulaire	hSGT	Peptide signal N-terminal de Mstn	Inhibition de la sécrétion et de la maturation de Mstn	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
	Téléthonine	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la sécrétion et de la formation du complexe latent	(Nicholas <i>et al.</i> , 2002)
Matrice extracellulaire	Décorine	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la forme mature de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Miura <i>et al.</i> , 2006)
	LTBP-3	Pro-myostatine	Inhibition du clivage de la pro-myostatine par la furine	(Anderson <i>et al.</i> , 2008)
	Laminine	Dimère actif (Mstn mature)	Inhibition de la forme mature de la Mstn et de sa fixation à son récepteur	(Yasaka <i>et al.</i> , 2013)

FLST3, follistatin-like 3 ; GASP, growth and differentiation factor-associated serum protein ; hSGT, human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein ; LTBP-3, latent TGF-β binding protein ; mstn, myostatin

L'inhibiteur le plus important de la myostatine est la follistatine, une glycoprotéine dont la dénomination originelle est liée à sa capacité d'inhiber la synthèse et la sécrétion de l'hormone FSH (follicle-stimulating hormone) (Ueno *et al.*, 1987, Lee et McPherron, 2001). Chez l'homme et la souris, l'épissage alternatif du gène *follistatine* permet la formation de deux protéines, FS 315 et FS 288, qui ne diffèrent que par la présence d'une queue C-terminale acide sur la protéine FS 315 (**Figure 24**) (Shimasaki *et al.*, 1988). Exprimées dans un grand nombre de tissus, les deux protéines présentent la même capacité d'interaction à différents membres de la superfamille des TGF- β , notamment l'activine, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-11 et la myostatine (Patel, 1998, Gamer *et al.*, 1999, Lee et McPherron, 2001). De ce fait, la follistatine (Fst) est associée à de nombreuses fonctions, si bien que l'inactivation du gène chez la souris (*Fst*^{-/-}) conduit à une létalité périnatale due à d'importants défauts de croissance et de développement des organes dont le muscle squelettique (Matzuk *et al.*, 1995).

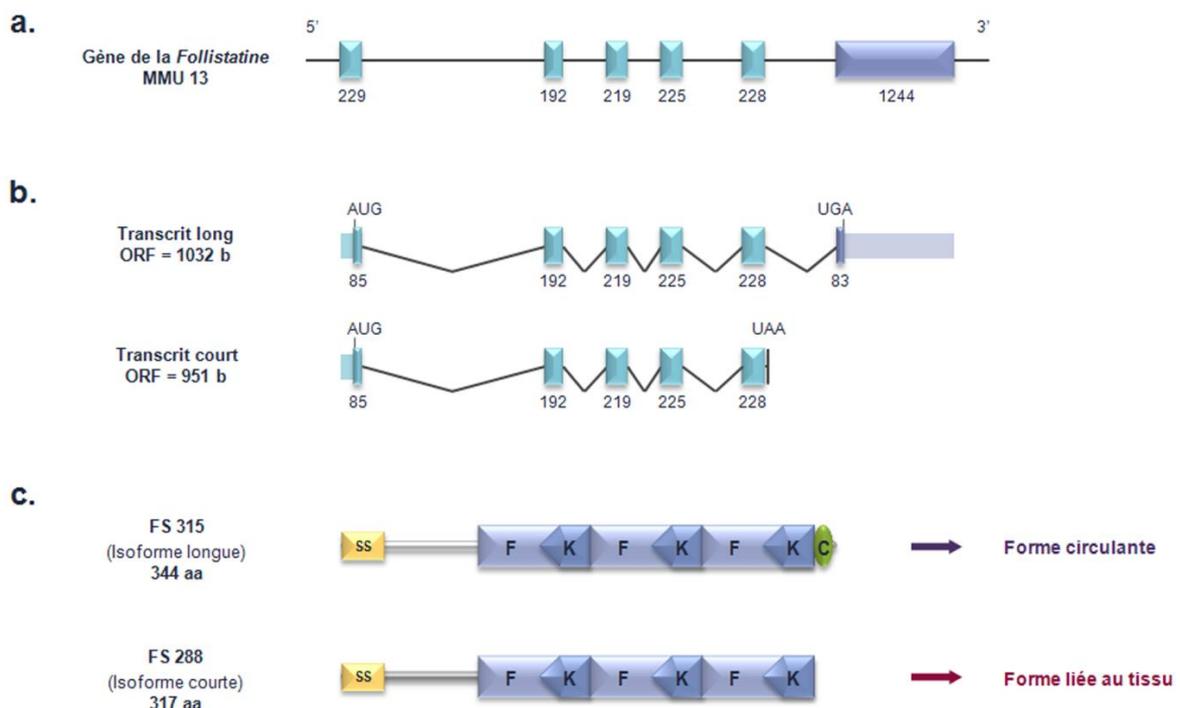


FIGURE 24. DEUX ISOFORMES PROTEIQUES DE LA FOLLISTATINE ISSUES D'UN EPISSAGE ALTERNATIF.

(a) Localisé sur le chromosome 13 murin, le gène de la *follistatine* comporte 6 exons. (b) La transcription de ce gène génère un premier transcrit long, mais également un second transcrit plus court issu d'un épissage alternatif de l'ARN pré-messager entre les exons 5 et 6. (c) Deux isoformes protéiques, longue et courte, sont alors traduites pour donner, suite au clivage du peptide signal de 29 acides aminés, les protéines FS 315 circulante et FS 288 liée au tissu. aa, acides aminés ; b, bases ; C, région carboxy-terminal ; F, domaine *follistatine* ; FS, *follistatine* ; K, domaine *Kazal* ; ORF, *open reading frame* ; SS, *peptide signal de sécrétion*. (D'après Rodino-Klapac *et al.* (2009))

A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant la *follistatine* spécifiquement dans le tissu musculaire (*MLC-Fst*) présentent une hyperplasie et une hypertrophie généralisée des myofibres responsables d'une augmentation double de la masse musculaire, similaire voire supérieure aux

souris *Mstn*^{-/-}, suggérant qu'une partie de l'effet de la follistatine est attribuable à un ligand autre que la myostatine (**Tableau 6**) (Lee et McPherron, 2001). En interagissant avec la myostatine, la follistatine empêche sa liaison à son récepteur ActRIIB inhibant ainsi son action (Amthor *et al.*, 2002b). Au cours de la myogenèse des muscles squelettiques des membres, la follistatine permet ainsi la levée d'inhibition de *Pax3*, *Myf5* et *MyoD* induite par la myostatine dans les progéniteurs musculaires favorisant leur prolifération (Amthor *et al.*, 2002b, Amthor *et al.*, 2004).

Au stade adulte, sa surexpression dans le muscle entraîne une hypertrophie importante des fibres musculaires, conséquence d'une inhibition de SMAD3 corrélée à une activation de la voie Akt/mTOR (Haidet *et al.*, 2008, Kota *et al.*, 2009, Winbanks *et al.*, 2012). La follistatine est aussi capable de réguler le développement musculaire indépendamment de la myostatine. En effet, le croisement des souris *Mstn*^{-/-} et des souris transgéniques *MLC-Fst* conduit à un phénotype musculaire quadruplé, reflet de l'effet additif de l'inactivation de la *myostatine* et la surexpression de la *follistatine* capable d'inhiber l'activine (**Tableau 6**) (Lee, 2007a). L'augmentation de la masse musculaire induite par la follistatine résulte donc de la double inhibition de l'activine et de la myostatine qui entraîne l'activation de la voie de signalisation Akt/mTOR (Gilson *et al.*, 2009, Kalista *et al.*, 2012, Winbanks *et al.*, 2012). En effet, l'action de la follistatine sur le muscle squelettique est supprimé par l'inhibition de l'axe IGF-1R/Akt/mTOR (Kalista *et al.*, 2012). L'effet attribuable à l'inhibition par la follistatine de la myostatine uniquement a pu être résolu grâce à la création d'un modèle murin transgénique surexprimant la protéine Fst I-I, forme tronquée de la follistatine qui n'interagit pas avec l'activine (Nakatani *et al.*, 2008). Ces souris présentent une augmentation massive de 80 % de la masse musculaire due à une hyperplasie et à une hypertrophie des fibres cependant moindre que celle des souris *MLC-Fst* (Lee et McPherron, 2001, Nakatani *et al.*, 2008). Ce phénotype démontre néanmoins que la follistatine reste le plus puissant inhibiteur de la myostatine à ce jour.

Parmi les inhibiteurs extracellulaires de la myostatine, la glycoprotéine FLST3 (follistatin-like 3) ou FLRG (follistatin-related gene) présente des homologies structurale et fonctionnelle importantes avec la follistatine (Tsuchida *et al.*, 2000, Schneyer *et al.*, 2001). Comme la follistatine, la protéine FLST3 peut se lier à certains TGF- β dont le facteur BMP-2, l'activine et la myostatine (Tsuchida *et al.*, 2000, Hill *et al.*, 2002). La *follistatine* est principalement exprimée dans les ovaires, les testicules, les reins et l'hypophyse alors que les domaines d'expression majoritaires de *Fst3* sont le placenta, le pancréas et le cœur, suggérant que ces deux gènes ont des fonctions distinctes selon les tissus (Schneyer *et al.*, 2001). Si la follistatine est en grande partie associée à l'activine dans les sérums humain et murin, la protéine FSTL3 a été isolée par co-immunoprécipitation avec la myostatine, indiquant que ces deux protéines sont de véritables régulateurs physiologiques de la myostatine et

de l'activine circulantes (Hill *et al.*, 2002, Schneyer *et al.*, 2004). Pourtant, l'inactivation du gène *Fst3* chez la souris n'entraîne pas de phénotype musculaire particulier (Mukherjee *et al.*, 2007). En revanche, la surexpression de *Fst3* dans le muscle (*MLC-Fst3*) conduit à une augmentation de 75 % de la masse musculaire, conséquence d'une hyperplasie et d'une hypertrophie généralisée des myofibrilles cependant moindres que celles observées chez les souris *Mstn*^{-/-} ou *MLC-Fst* (**Tableau 6**) (Lee, 2007a). Les souris *Mstn*^{-/-}:*MLC-Fst3* présentent un phénotype musculaire quasi-similaire aux souris *Mstn*^{-/-} (**Tableau 6**) (Lee, 2007a). Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus sur les différents modèles murins suggère que la protéine FLST3 inhibe préférentiellement l'activine plutôt que la myostatine.

TABLEAU 6. PHENOTYPES MUSCULAIRES OBTENUS PAR L'UTILISATION DE DIFFERENTS INHIBITEURS DE LA MYOSTATINE. Par comparaison, les souris *Mstn*^{-/-} présentent une augmentation de + 100 % de la masse musculaire résultant d'une hyperplasie et d'une hypertrophie généralisée des fibres musculaires.

Modèles	Pourcentages d'augmentation de la masse musculaire & phénotypes		Références
Modèles transgéniques			
MLC-Mstn propeptide	+ 50 %	Hypertrophie	(Lee et McPherron, 2001)
MLC-Fstl3	+ 75%	Hyperplasie et hypertrophie	(Lee, 2007a)
Fst I-I (inhibiteur de la myostatine dérivé de la follistatine)	+ 80 %	Hyperplasie et hypertrophie	(Nakatani <i>et al.</i> , 2008)
MLC-Fst	+ 100 %	Hyperplasie et hypertrophie	(Lee et McPherron, 2001)
MLC-Fstl3 x <i>Mstn</i> ^{-/-}	+ 100 %	Hyperplasie et hypertrophie	(Lee, 2007a)
MLC-Fst x <i>Mstn</i> ^{-/-}	+ 350 %	Hyperplasie et hypertrophie	(Lee, 2007a)
Transferts de gènes par adénovirus associés (AAV) / Transfections in vivo			
AAV8-Mstn propeptide	+ 15 %	Hypertrophie	(Qiao <i>et al.</i> , 2008)
AAV1-Fstl3	+ 20 %	Hypertrophie	(Haidet <i>et al.</i> , 2008)
CMV-LTPB-3 (<i>Tibialis anterior</i>)	+ 28 %	Hypertrophie	(Anderson <i>et al.</i> , 2008)
AAV1-Gasp-1	+ 35 %	Hypertrophie	(Haidet <i>et al.</i> , 2008)
AAV1-Fst	+ 100 %	Hypertrophie	(Haidet <i>et al.</i> , 2008)
Injections d'antagonistes de la MSTN			
Anticorps neutralisants anti-MSTN JA16	+ 15 %	Hypertrophie	(Whittemore <i>et al.</i> , 2003)
Propeptide	+ 30 %	Hypertrophie	(Bogdanovich <i>et al.</i> , 2005)
sActRIIB-Fc (forme soluble d'ActRIIB)	+ 60 %	Hypertrophie	(Lee <i>et al.</i> , 2005)

AAV, adénovirus associé ; *ActRIIB*, activin receptor type-IIb ; CMV, cytomégalovirus ; Fst, follistatine ; Fstl3, follistatin-related protein 3 ; *Gasp-1*, growth and differentiation factor-associated serum protein-1 ; LTPB-3, latent TGF-β binding protein ; MLC, myosin light chain ; *Mstn*, myostatine

Le croisement des souris *Mstn*^{-/-} avec les souris *mdx* permet d'atténuer la sévérité de la dystrophie musculaire. Les muscles des souris *Mstn*^{-/-}:*mdx* sont plus puissants et plus larges que ceux des souris *mdx* (Wagner *et al.*, 2002). Ainsi, le propeptide de la myostatine, les protéines follistatine et FLST3, sont très largement étudiés pour leur intérêt dans le développement des stratégies thérapeutiques favorisant la croissance musculaire par inhibition indirecte de la myostatine. Afin d'inhiber l'action de la myostatine directement dans le muscle, deux approches sont utilisées : la surexpression des gènes d'intérêt dans le tissu musculaire par injection d'adénovirus associés (AAV), ou l'injection directe d'une forme soluble de l'antagoniste (**Tableau 6**). L'utilisation du vecteur AAV8-MPRO76AFc permettant la surexpression d'une forme mutée du propeptide (acide aminé 76 : aspartate modifié en alanine) résistante aux métalloprotéinases entraîne une hypertrophie musculaire chez les souris *mdx* et les chiens GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), couplée à une amélioration significative de la force de préhension et de l'activité contractile (Qiao *et al.*, 2008, Qiao *et al.*, 2009). L'injection directe du propeptide recombinant conduit à des résultats similaires (Bogdanovich *et al.*, 2005). De la même façon, la surexpression de la *follistatine* (AAV1-Fst) ou de *Fstl3* (AAV1-Fstl3) dans le muscle de souris *mdx* ou de souris âgées permet une augmentation de la masse et de la force musculaire sur le long terme (Haidet *et al.*, 2008). Enfin, l'utilisation d'anticorps neutralisant la myostatine, notamment l'anticorps JA16, améliore également le phénotype musculaire des souris *mdx* (Bogdanovich *et al.*, 2002, Whittemore *et al.*, 2003). Dans tous les cas, l'hypertrophie engendrée ne dépend pas des cellules satellites. Ainsi, les approches thérapeutiques d'inhibition de la myostatine grâce à de tels outils s'avèrent être prometteuses pour augmenter la masse musculaire, même dans les situations pathologiques caractérisées par un dysfonctionnement des cellules satellites (Lee *et al.*, 2012).

Découverte plus récemment en tant qu'inhibiteur de la myostatine, la décorine est un petit protéoglycane riche en leucine qui compose la matrice extracellulaire (Iozzo, 1999, Miura *et al.*, 2006). La décorine inhibe la fixation de la myostatine à son récepteur ActRIIB et sa signalisation en se liant à la protéine mature. Elle favorise ainsi la prolifération des cellules C2C12 qui la surexpriment (Miura *et al.*, 2006, Kishioka *et al.*, 2008). Ces cellules présentent également une augmentation de l'expression de la follistatine, de p21 et de PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), autant de facteurs qui favorisent la différenciation des C2C12 (Li *et al.*, 2007). Enfin, la surexpression du gène directement dans le muscle par AAV permet une meilleure régénération et une diminution de la fibrose musculaire (Li *et al.*, 2007, Zhu *et al.*, 2007).

En plus de ce rôle d'inhibiteur de la myostatine, la décorine est capable d'interagir avec la protéine TGF- β 1 mais aussi avec le facteur IGF-1 et son récepteur IGF-1R pour favoriser leur action (Hildebrand *et al.*, 1994, Schonherr *et al.*, 2005, Schaefer *et al.*, 2007). En interagissant avec IGF-1R,

elle induit sa phosphorylation qui permet l'activation de la voie Akt/mTOR/p70S6K dans des fibroblastes rénaux (Schaefer *et al.*, 2007). Il est donc envisageable qu'elle puisse agir de la même manière dans les cellules musculaires même si cette fonction n'a jamais été analysée dans ce contexte, ce qui lui conférerait un double rôle positif au cours du développement musculaire.

Les souris invalidées pour la décorine (*Dcn*^{-/-}) présentent une fragilité importante des tendons, de la peau et de nombreux problèmes de cicatrisation dus à des défauts de structure du collagène, phénotype semblable à celui du syndrome d'Ehlers-Danlos de type dermato-sparaxique chez l'homme (Danielson *et al.*, 1997). Bien que ces souris ne présentent pas de défaut apparent du muscle squelettique, les myoblastes *Dcn*^{-/-} en culture présentent un retard de différenciation dû à une surexpression trop précoce de la myogénine et à la forte diminution des taux de TGF-β1 (Riquelme *et al.*, 2001). Une autre étude menée sur les souris *Mstn*^{-/-} a montré qu'à la suite d'une blessure, ces souris présentent un retard de cicatrisation de la peau important engendré par des défauts de réépithélialisation de l'épiderme et de la contraction cutanée, ces deux événements étant dus à une surexpression de la décorine qui séquestre les TGF-β1 et empêche leur signalisation (Zhang *et al.*, 2012). De plus, les souris *Mstn*^{-/-} possèdent des tendons plus fins et fragiles que les sauvages, phénotype probablement lié à la dérégulation de la décorine et du TGF-β1 (Mendias *et al.*, 2008). Finalement, l'ensemble de ces données suggère que la décorine est un véritable modulateur de la signalisation dépendante des TGF-β.

Très récemment, une autre protéine de la matrice extracellulaire, la laminine, a été mise en évidence par la technique de résonance plasmonique de surface comme un nouveau partenaire de la myostatine mature (Yasaka *et al.*, 2013). Elle est également capable d'interagir avec la même affinité avec le récepteur ActRIIB. *In vitro*, les cellules traitées par la myostatine et la laminine présentent une diminution de l'activation de la voie SMAD2/3 par rapport aux cellules traitées par la myostatine seulement. Ces résultats suggèrent que la laminine agit comme un potentiel régulateur de la signalisation de la myostatine, soit par interaction avec sa forme mature, soit par interaction avec son récepteur (Yasaka *et al.*, 2013).

Enfin, deux autres inhibiteurs particuliers de la myostatine, la Téléthonine et la protéine hSGT, ont été identifiés par système double-hybride (Nicholas *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2003). Leur mécanisme d'action sur la myostatine n'est pas clair, ces inhibiteurs étant des protéines cytoplasmiques et la myostatine une protéine sécrétée. C'est la raison pour laquelle chacune de ces protéines n'a fait l'objet que d'une étude associée à leur mise en évidence.

Exprimée dans les tissus musculaires cardiaque et squelettique, la protéine Téléthonine, aussi appelée Titin-cap, est une protéine sarcomérique nécessaire à l'assemblage des myofibrilles (Valle *et*

al., 1997, Mason *et al.*, 1999). En interagissant avec la myostatine, elle empêcherait sa sécrétion. Physiologiquement, le mécanisme d'interaction reste hypothétique, la Téléthonine étant une protéine cytoplasmique. Il a cependant été montré que, dans certaines conditions entraînant une atrophie (traitement à la dexaméthasone, immunodéficience), la myostatine peut être retrouvée au niveau cytoplasmique, suggérant une interaction possible des deux protéines dans ces conditions (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998, Artaza *et al.*, 2002). De plus, la surexpression de la Téléthonine dans des cellules C2C12 augmente leur taux de prolifération, suggérant qu'elle ait bien un rôle inhibiteur sur la myostatine (Nicholas *et al.*, 2002).

La protéine hSGT (human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) est quant à elle une protéine ubiquitaire tissulaire qui possède différentes fonctions dans l'apoptose, la division cellulaire ou encore, le trafic intracellulaire (Kordes *et al.*, 1998, Dutta *et al.*, 2008). Elle a été identifiée comme un partenaire de la myostatine par l'utilisation du système double-hybride (Wang *et al.*, 2003). Grâce à différentes constructions des protéines hSGT et myostatine, il a été établi que leur interaction s'effectue entre la partie N-terminale de la myostatine (peptide signal) et la partie C-terminale de la protéine hSGT. Il a été proposé que, comme pour LTBP-3, hSGT interagisse avec la myostatine au cours de sa maturation et participe à son repliement, sa maturation et sa sécrétion (Wang *et al.*, 2003).

Enfin, depuis leur découverte en 2003, deux autres inhibiteurs de la myostatine sont étudiés : les protéines GASP-1 et GASP-2 (**Tableau 6**).

Les protéines GASPs

Au début des années 2000, l'équipe de Laszlo Patthy entreprend des analyses bio-informatiques de données de séquences génomiques et protéiques afin de prédire les structures et fonctions de nouvelles protéines chez l'homme. Ces analyses ont pour but d'affecter ces nouvelles protéines à des familles protéiques déjà identifiées en fonction des domaines qu'elles partagent et de prédire ainsi leur rôle, leur localisation subcellulaire ou leur structure les plus probables. A la suite de ces analyses, deux nouvelles protéines sont identifiées pour la première fois et sont appelées WFIKKN1 et WFIKKN2 (WAP, Follistatin, Kazal, Immunoglobulin, Kunitz, Kunitz, Netrin-containing protein), en raison des multidomains inhibiteurs de protéases qu'elles comportent (Trexler *et al.*, 2001, Trexler *et al.*, 2002). En effet, l'organisation des domaines est la même pour les deux protéines : un peptide signal de sécrétion, un domaine WAP (whey acidic protein), un domaine follistatine/Kazal, un domaine Immunoglobuline, deux domaines Kunitz et un domaine Nétrine (**Figure 25**). A l'exception du domaine immunoglobuline, tous ces domaines sont associés à des inhibiteurs de protéases. Cette caractéristique frappante conduit l'équipe de Laszlo Patthy à suggérer que cette protéine peut agir comme un inhibiteur multivalent de protéases pouvant contrôler de multiples protéases à sérine et métalloprotéinases. Cependant, en 2003, une recherche de nouveaux partenaires de la forme mature de la myostatine dans le sérum révèle que la protéine WFIKKN2 est capable de s'associer à celle-ci et d'inhiber son action (Hill *et al.*, 2003). Du fait de cette fonction, elle est alors renommée GDF-associated serum protein-1 (GASP-1) (Hill *et al.*, 2003).

Caractéristiques des protéines GASPs

Le gène *Gasp-1* murin est localisé sur le chromosome 11 et comporte deux exons (353 pb et 3163 pb) et un intron (3236 pb). Le transcrit de 3516 pb code une protéine de 571 acides aminés soit 63,3 kDa comportant les mêmes modules que chez l'homme (**Figure 25**). Son paralogue *Gasp-2* est situé sur le chromosome 17 murin et comporte deux exons (442 pb et 1539 pb) et un intron (695 pb) permettant d'aboutir à la formation d'un transcrit de 1981 pb codant une chaîne protéique de 552 acides aminés soit 59,8 kDa (**Figure 25**). L'expression tissulaire des deux gènes *Gasps* révèle des différences marquées. Aux stades fœtal et adulte, *Gasp-1* est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique, le cœur et le cerveau, alors que *Gasp-2* est principalement exprimé dans les poumons et le foie (Trexler *et al.*, 2001, Trexler *et al.*, 2002, Hill *et al.*, 2003). Malgré des domaines d'expression distincts, les deux gènes partagent une expression importante et commune dans le pancréas chez l'adulte (Trexler *et al.*, 2001, Trexler *et al.*, 2002). Il a également été montré que l'orthologue du gène *Gasp-2* chez le rat, appelé OC29, est exprimé au cours du développement de

l'oreille interne (Nishida *et al.*, 2004). Les deux protéines GASP-1 et GASP-2 issues de ces gènes présentent une identité de séquence de 57 % et de nombreux domaines conservés et potentiellement impliqués dans l'inhibition des protéases ce qui corrèlerait avec une expression commune et marquée dans le pancréas (Trexler *et al.*, 2001, Trexler *et al.*, 2002).

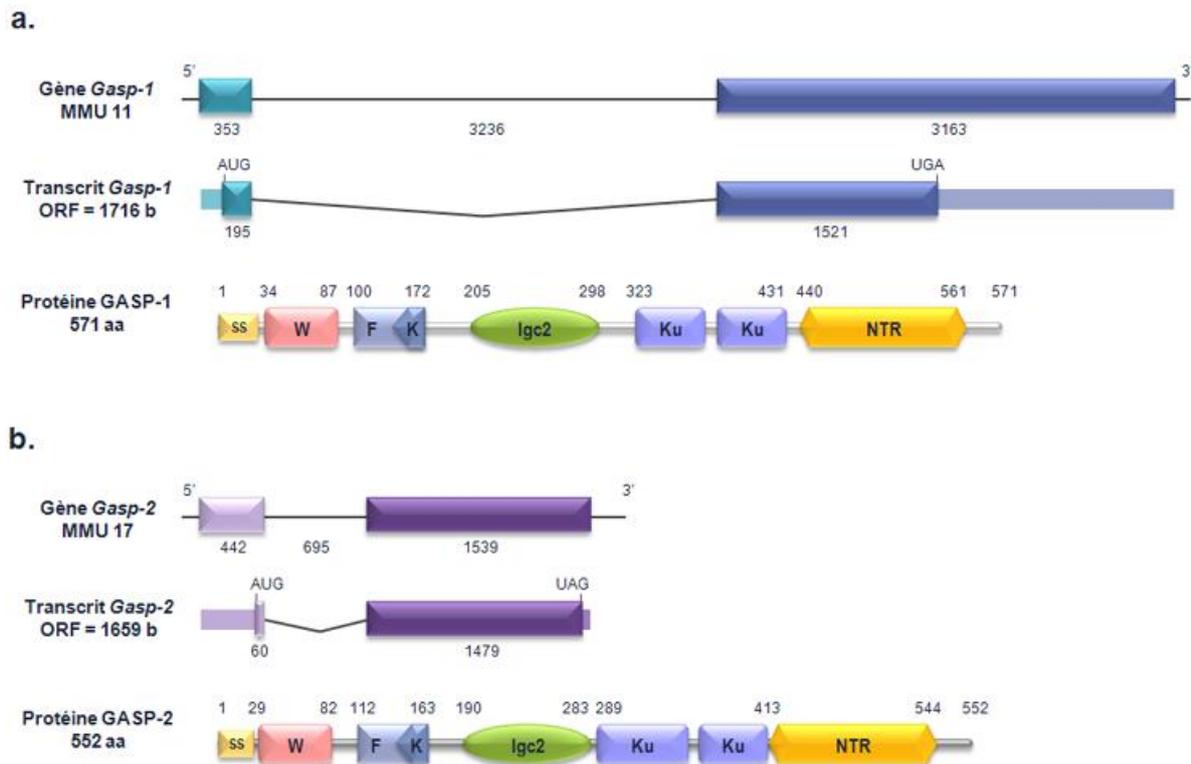


FIGURE 25. STRUCTURES DES GENES & PROTEINES GASPs CHEZ LA SOURIS. (a) Le gène *Gasp-1* a deux exons aboutissant à un transcrit de 1716 bases qui code une protéine de 63,3 kDa correspondant à une chaîne de 571 acides aminés. La protéine GASP-1 a une séquence signal de sécrétion (SS) de 29 acides aminés, et contient un domaine WAP, un domaine follistatine (F) incluant un motif Kazal (K), deux domaines Kunitz/BTPI (Ku), inhibiteurs de protéases à sérine, et un domaine Nétrine (NTR). (b) Le gène *Gasp-2* a deux exons aboutissant à un transcrit de 1659 bases et code une protéine de 59,8 kDa soit une chaîne de 552 acides aminés. La protéine GASP-2 a une séquence signal de sécrétion (SS) de 25 acides aminés, et présente la même architecture en domaines multiples que GASP-1. *aa*, acides aminés ; *b*, bases ; *ORF*, open reading frame.

En effet, les modules WAP, Kazal et Kunitz sont très souvent impliqués dans l'inhibition de protéases à sérine bien que le domaine WAP puisse aussi agir sur les protéases à cystéines (Chhikara *et al.*, 2012). Retrouvé dans des protéines aussi diverses que les TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) inhibant les MMPs (matrix metalloproteinases) ou les sFRPs (secreted frizzled-related proteins) impliquées dans la régulation de la voie Wnt, le domaine Nétrine est associé à l'inhibition des métalloprotéinases (Banyai et Patthy, 1999, Iyer *et al.*, 2012, von Maltzahn *et al.*, 2012). A ce jour, seul le second domaine Kunitz de la protéine GASP-2 humaine est décrit comme capable d'inhiber la trypsine (Nagy *et al.*, 2003, Liepinsh *et al.*, 2006). Bien que leur travail ne soit pas publié, l'équipe de Laszlo Patthy aurait montré que la protéine GASP-1 humaine présenterait cette

même capacité d'inhibition de la trypsine (données issues de la revue de Kondas *et al.* (2011)). Du fait de la diversité des modules inhibiteurs qu'elles portent, les protéines GASP-1 et GASP-2 font partie des rares inhibiteurs composés hétérotypiques (Rawlings *et al.*, 2004).

En plus de cette caractéristique structurale commune, les protéines GASPs présentent des capacités d'interaction similaires à différents TGF- β (Hill *et al.*, 2003, Kondas *et al.*, 2008, Szlama *et al.*, 2010). En effet, des tests d'interaction *in vitro* par la méthode de résonance des plasmons de surface ont montré que les deux protéines GASPs sont capables d'interagir avec les dimères actifs des TGF- β myostatine et GDF-11 par leur domaine follistatine, et avec leur propeptide par leur domaine Nétrine (Hill *et al.*, 2003, Kondas *et al.*, 2008). De ce fait, les protéines GASPs interagissent aussi bien avec la forme mature de ces TGF- β qu'avec le complexe latent, GASP-2 présentant une meilleure affinité avec le complexe latent que GASP-1 *in vitro* (Kondas *et al.*, 2008, Szlama *et al.*, 2013). Co-immunoprécipitée dans des sérums humain et murin avec la myostatine, la protéine GASP-1 est la seule capable d'inhiber la forme mature de la myostatine *in vivo* (Hill *et al.*, 2003). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'expression majoritaire de *Gasp-1* dans le muscle squelettique foetal est chevauchante avec l'expression quasi-exclusive de la *Mstn* dans ce tissu, ceci appuyant l'hypothèse proposée par Hill *et al.* (2003) d'une interaction entre les deux protéines participant à la régulation de la masse musculaire. Ainsi, GASP-1 pourrait non seulement inhiber la forme active de la myostatine, mais aussi intervenir dans la régulation de la maturation de la myostatine par son domaine Nétrine. En effet, sa liaison au propeptide pourrait altérer l'action des membres de la famille des métalloprotéinases BMP-1/tolloid responsable du clivage protéolytique du propeptide, et maintenir ainsi la myostatine sous forme de complexe latent (Hill *et al.*, 2003, Wolfman *et al.*, 2003, Kondas *et al.*, 2011).

Il a également été montré que les protéines GASPs présentent une affinité certaine pour les TGF- β BMP-2, BMP-4 et TGF- β 1 (Szlama *et al.*, 2010). Cependant, ces différentes capacités d'interaction avec les TGF- β cités ne conduisent pas nécessairement à l'inhibition de leur voie de signalisation. Effectivement, bien que les protéines GASPs interagissent avec ces TGF- β , seule la transduction du signal induit par la myostatine ou GDF-11 est inhibée par cette interaction (Hill *et al.*, 2003, Kondas *et al.*, 2008, Szlama *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que les protéines GASPs possèderaient un rôle supplémentaire de protéine « localisatrice » de certains TGF- β dans le sérum et faciliteraient ainsi leurs actions en fonction du contexte par la mise en place et le maintien de gradients. L'équipe de Laszlo Patthy a notamment proposé l'hypothèse que la protéine GASP-2 pourrait moduler et localiser l'action de BMP-4 au cours du développement de l'oreille interne, les deux protéines étant exprimées dans cet organe (Wu et Oh, 1996, Gerlach *et al.*, 2000, Szlama *et al.*, 2010).

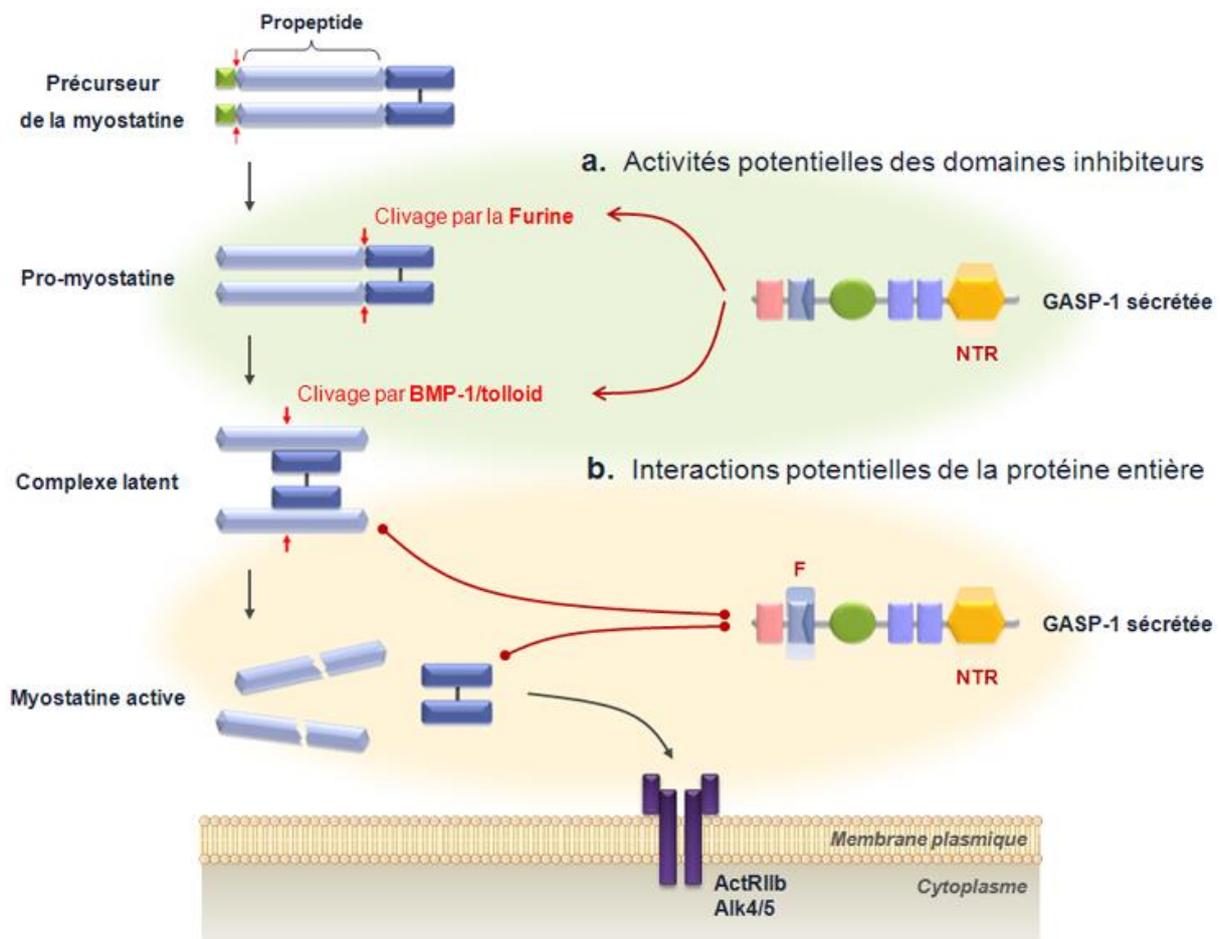


FIGURE 26. FONCTIONS POTENTIELLES DES PROTEINES GASPs DANS LA REGULATION DE LA MYOSTATINE. Grâce à ses différents domaines, GASP-1 peut réguler la maturation et l'activité de la myostatine à différents niveaux. (a) En se fixant au propeptide de la pro-myostatine, la protéine GASP-1 pourrait la protéger du clivage protéolytique par la furine. Le domaine Nétrine (NTR) pourrait inhiber les métalloprotéinases de la famille des BMP-1/tolloid responsable du clivage du propeptide et la dissociation du complexe latent. (b) La protéine GASP-1 peut aussi se lier au propeptide du complexe latent par son domaine NTR et au dimère actif de la myostatine par son domaine follistatine (F). L'interaction au complexe latent pourrait aussi entraîner le masquage des sites de clivage des BMP-1/tolloid. L'interaction au dimère actif ne permet plus à la myostatine de se fixer à son récepteur ActRIIB pour induire sa voie de signalisation.

En considérant l'ensemble des données présentées, les protéines GASPs pourraient réguler la myostatine à différents niveaux (Figure 26). Leur domaine follistatine interagirait avec la myostatine active, inhibant son interaction avec ActRIIB. Leur domaine Nétrine permettrait l'association avec son propeptide empêchant ainsi la maturation de la myostatine suite au masquage des sites de clivage des enzymes furine et BMP-1/tolloid. Ce domaine pourrait aussi inhiber directement les métalloprotéinases BMP-1/tolloid. Toutes ces fonctions éventuelles d'inhibition de la myostatine font de *Gasp-1* et *Gasp-2* des gènes candidats de choix dans les nouvelles stratégies thérapeutiques développées par ciblage indirect de cette protéine. Cependant, les recherches concernant les protéines GASPs se sont principalement concentrées sur GASP-1 puisque celle-ci est la seule dont l'interaction avec la myostatine a été démontrée *in vivo*.

GASP-1, un antagoniste de la myostatine

Lorsque le groupe du Pr Véronique Blanquet initie ses études sur la caractérisation fonctionnelle de *Gasp-1* en 2006 à Limoges, seule la publication de Hill *et al.* (2003) établit un lien entre ce gène et une fonction potentielle dans le développement du muscle squelettique. Les travaux de l'équipe se concentrent alors sur la mise en place d'outils et notamment la création de modèle murin pour élucider au mieux le rôle de *Gasp-1* dans le contexte musculaire.

Au cours des années qui suivent, les quelques données reliant les protéines GASP-1 et myostatine dans un contexte myogénique sont principalement issues de travaux où les expressions de la myostatine et de ses inhibiteurs ont été étudiées au moment de processus physiologiques particuliers. Ces analyses ont notamment été effectuées au cours de la croissance longitudinale du muscle squelettique soumis à un étirement continu chez le rat (Aoki *et al.*, 2009). Cette croissance du muscle correspond à l'addition rapide de sarcomères en série dans des myofibrilles préexistantes. Elle corrèle avec une diminution importante de l'expression de *Mstn* alors que l'expression de *Gasp-1* est augmentée, suggérant une inhibition de la signalisation entière de la myostatine au cours de la croissance longitudinale du muscle (Aoki *et al.*, 2009). Ce profil d'expression des deux gènes est similaire chez l'homme après la réalisation de tests d'effort d'intensité variable (Laurentino *et al.*, 2012). Enfin, le dosage des protéines sériques GASP-1 et myostatine chez des patients soumis à un test de résistance corréle avec ces données (Saremi *et al.*, 2010). En plus des travaux de Hill *et al.* (2003), ces observations témoignent du lien étroit qui existe entre les expressions de *Gasp-1* et de la *myostatine* et le développement musculaire.

Afin de déterminer quel inhibiteur de la myostatine serait le meilleur candidat dans le cadre des thérapies géniques, une étude a comparé l'incidence de la surexpression des gènes *folliculine*, *Fst3* et *Gasp-1* sous contrôle du promoteur fort CMV (Cytomégalo virus) suite à leur injection par AAV dans les muscles *quadriceps* et *tibialis anterior* chez la souris (Haidet *et al.*, 2008). La surexpression du gène *Gasp-1* entraîne une augmentation du poids global de la souris liée à une augmentation du poids des muscles. Les muscles ayant reçu *Gasp-1* présentent aussi une augmentation de leur force (Haidet *et al.*, 2008). Pour la première fois, cette étude met en évidence le rôle de *Gasp-1* dans la régulation positive des processus myogéniques. Cependant, elle ne précise pas les voies moléculaires mises en jeu lors de la surexpression de *Gasp-1* dans le tissu musculaire et les auteurs ne peuvent qu'émettre l'hypothèse que cette activation myogénique est bien liée à l'inhibition de la myostatine *in vivo*. De plus, l'objectif de cette étude est d'établir une stratégie à long terme pour développer et maintenir la masse musculaire dans le cadre des dystrophies ou de la sarcopénie. Les analyses ont

donc été effectuées sur des souris âgées ou des souris *mdx* dont le métabolisme et l'activité musculaire sont différents des conditions physiologiques des souris jeunes et sauvages.

En 2009, l'équipe de Véronique Blanquet établit différentes lignées transgéniques murines surexprimant *Gasp-1*. L'expression du transgène est sous la dépendance du promoteur fort et ubiquitaire CMV. Ainsi, ces lignées permettent une analyse complète de la fonction de *Gasp-1* au cours du développement, aussi bien dans le muscle squelettique que dans l'ensemble des organes. J'intègre le groupe en 2010 avec pour projet principal, la caractérisation fonctionnelle de *Gasp-1* au cours du développement musculaire.

Pour réaliser ce projet, j'ai participé au phénotypage des lignées transgéniques surGasp1 et j'ai réalisé l'étude des mécanismes moléculaires régulés par la surexpression de Gasp-1 grâce à l'obtention des cellules primaires myoblastiques issues de la lignée surGasp1-20. Ces travaux m'ont conduit à étudier la régulation de la transcription de la myostatine dans ce contexte. Enfin, j'ai réalisé une étude structure-fonction de la protéine GASP-1 afin de déterminer l'influence de ces modifications post-traductionnelles. L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans la partie suivante de mon manuscrit.

RESULTATS

RESULTATS

Analyse fonctionnelle de la protéine GASP-1 au cours du développement musculaire

Six lignées de souris transgéniques surexprimant de façon ubiquitaire le gène *Gasp-1*, appelées surGasp1, ont été établies. Deux de ces lignées, les lignées surGasp1-20 et surGasp1-06, ont été sélectionnées pour réaliser les analyses génotypiques et phénotypiques, puisqu'elles présentaient les plus forts taux d'expression de *Gasp-1* dans le cerveau et le muscle. J'ai ainsi participé à l'ensemble des analyses phénotypiques de ces souris surGasp1.

Caractérisation *in vivo* du rôle de GASP-1

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer que la surexpression de *Gasp-1* entraîne une augmentation du poids global des souris, conséquence d'une augmentation du poids de chacun des muscles squelettiques. Les analyses histologiques réalisées sur les fibres du muscle *rectus femoris* ont révélé que l'aire des fibres musculaires est plus importante chez les souris surGasp1-20 que chez les souris sauvages, mais nous n'avons relevé aucune différence dans le nombre total de fibres. Le phénotype « hypermusclé » n'est donc pas attribuable à un processus d'hyperplasie, mais seulement d'hypertrophie. De plus, les proportions de chaque type de fibres, glycolytiques ou oxydatives, sont invariantes. Ces résultats ont été confirmés par l'étude des activités des enzymes dédiées à l'un ou l'autre des deux métabolismes. Enfin, les souris surGasp1-20 ne présentent pas de variation de la masse grasseuse par rapport aux sauvages.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante :

Ubiquitous *Gasp1* overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype.

Olivier Monestier, Caroline Brun, Katy Heu, Bruno Passet, Mélanie Malhouroux, Laetitia Magnol,
Jean-Luc Vilotte and Véronique Blanquet

BMC Genomics, 2012, 10;13:541

[Les données supplémentaires de l'article sont données en **Annexes 1 et 2.**]

Les résultats obtenus sur la lignée surGasp1-20 sont bien différents des résultats décrits sur les souris *Mstn*^{-/-} (Figure 27). L'absence d'hyperplasie, de conversion métabolique des fibres ou de variation de la masse grasseuse nous laisse supposer que la surexpression de *Gasp-1* dans nos lignées transgéniques n'a pas d'effet sur la myostatine au cours du développement musculaire prénatal. L'augmentation du poids global des souris surGasp1-20 est visible dès la troisième semaine de vie post-natale et la différence de poids entre les souris sauvages et les souris transgéniques semble rester stable au cours du développement adulte des animaux. La surexpression de *Gasp-1* conduirait à l'hypertrophie des fibres musculaires principalement au cours des 21 premiers jours de vie post-natale et participerait au maintien de la masse musculaire squelettique par la suite.

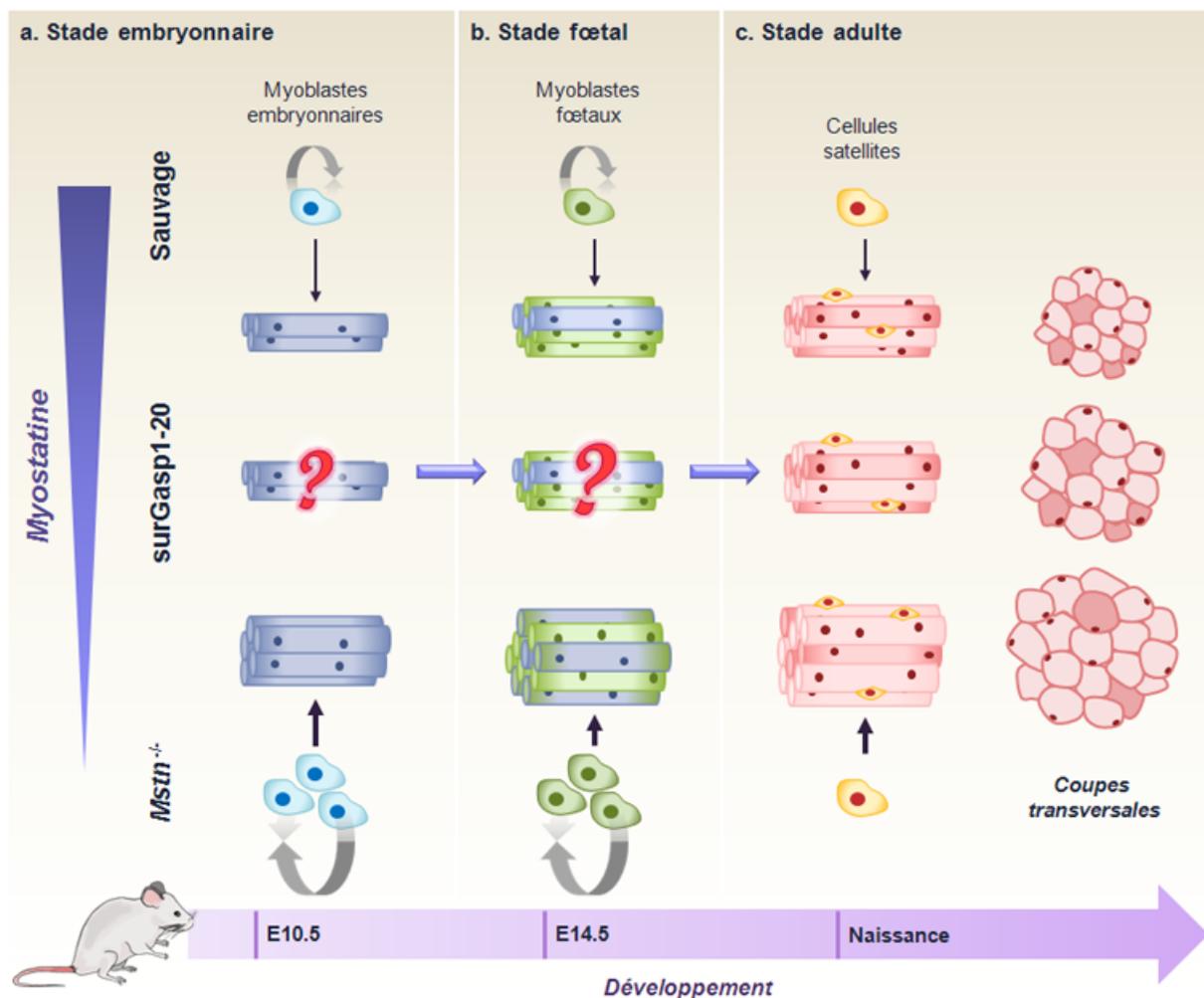


FIGURE 27. CONCLUSION SCHEMATIQUE DES OBSERVATIONS PHENOTYPIQUES RELEVÉES SUR LE MODELE surGasp1.

Ainsi, nous proposons deux hypothèses afin d'expliquer l'augmentation de la taille des fibres au cours de cette période post-natale précoce : (i) l'hypertrophie observée est liée à l'activité des cellules satellites, (ii) elle est liée à une augmentation de la synthèse protéique dépendante des voies de signalisation Akt/FoxO.

Caractérisation des cultures primaires surGasp1-20

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons initié une étude *in vitro* des cellules myoblastiques dérivées des cellules satellites des lignées murines surGasp1-20 (S20) et *Mstn*^{-/-} partageant le même fond génétique que notre lignée sauvage FVB. La première partie de notre étude a consisté à comparer la prolifération et la différenciation des cellules myoblastiques FVB et S20. L'analyse phénotypique a révélé une légère augmentation de la prolifération et une différenciation plus importante des cellules S20 par rapport aux sauvages.

Grâce aux analyses moléculaires, nous avons mis en évidence une inhibition de la voie SMAD2/3 et une activation de la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K1 associée à la synthèse protéique et à l'hypertrophie dans les cellules S20. De façon surprenante, nous avons observé une surexpression de la myostatine dans les cellules S20 et une activation de la voie de signalisation ERK1/2, normalement inhibée dans les cellules sauvages et *Mstn*^{-/-}. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation de la voie ERK1/2 était due à la surexpression de la myostatine dans les cellules S20. La myostatine agissant *via* la voie ERK1/2 pour déréguler l'expression de Pax7, cette expression a été analysée dans les différentes populations de cellules myoblastiques sauvages, S20 et *Mstn*^{-/-}. Les résultats et conclusions obtenus ont été décrits dans la publication suivante :

Myostatin acts independently of its canonical pathway to regulate embryonic muscle development.

**Caroline Brun, Luce Périé, Fabienne Baraige, Barbara Vernus, Anne Bonnieu
and Véronique Blanquet**

Soumis dans Skeletal Muscle Journal

Grâce aux analyses moléculaires réalisées sur les cellules myoblastiques dérivées des cellules satellites des souris surGasp1-20, nous avons pu confirmer que la surexpression de *Gasp-1* permettait l'activation des processus d'hypertrophie liés à la synthèse protéique (**Figure 28**). L'absence d'hyperplasie et la dérégulation des gènes *Pax3* et *Pax7* dans les myoblastes primaires S20 nous laisse supposer que la surexpression de *Gasp-1* n'altère pas les étapes de myogenèse embryonnaire et fœtale, soit parce que la surexpression de la myostatine contrebalance l'effet de *Gasp-1*, soit parce que le gène *Gasp-1* n'a pas d'effet sur ces stades du développement musculaire.

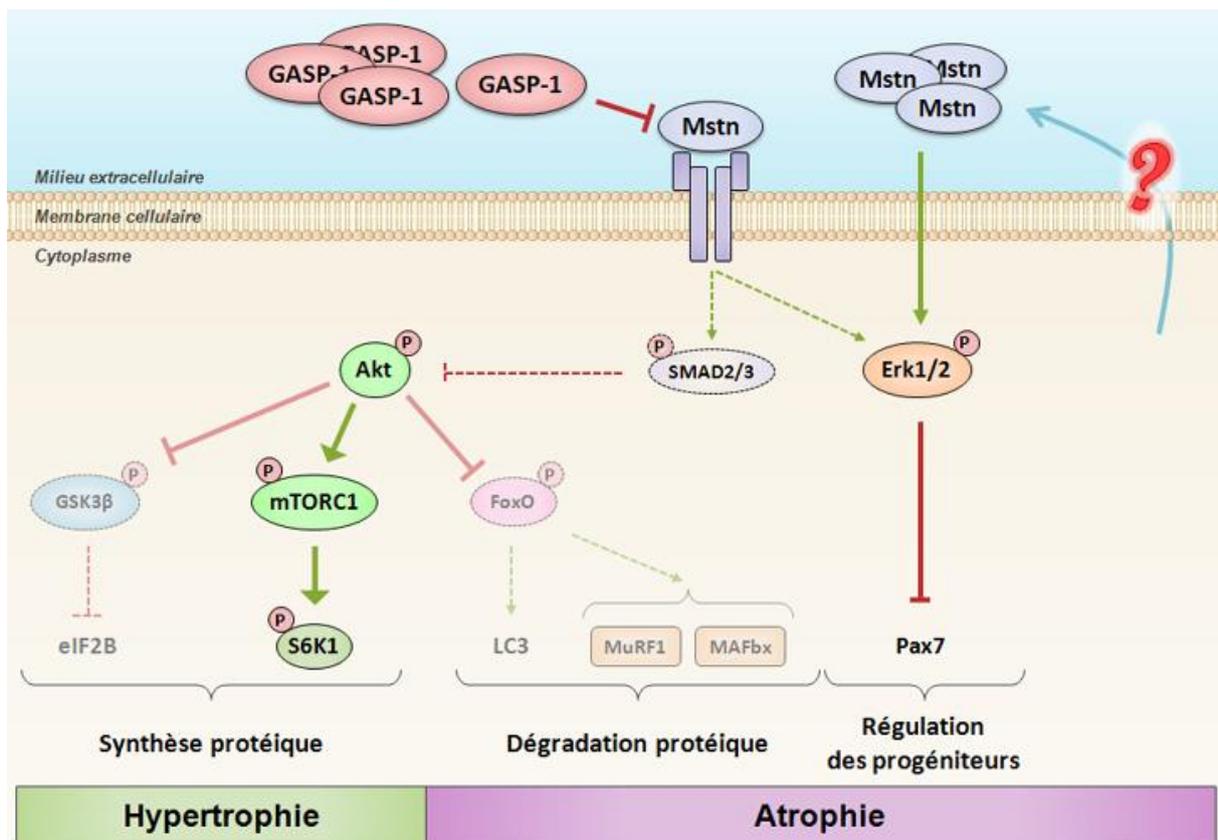


FIGURE 28. CONCLUSION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES AU SEIN DES CELLULES MYOBLASTIQUES surGasp1-20. Akt, protein kinase B ; eIF, translation initiation factor ; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2 ; FoxO, forkhead box protein O ; GASP-1, growth and differentiation factor-associated serum protein-1 ; GSK3- β , glycogen synthase kinase 3 β ; LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, MAFbx, muscle atrophy F-box ; Mstn, myostatin ; mTORC1, mTOR signaling complex 1 ; MuRF1, muscle RING-finger protein 1 ; Pax7, paired box protein 7 ; S6K1, ribosomal protein S6 kinase 1 ; SMAD, sma mothers against decapentaplegic homolog.

A la suite de ces travaux, nous avons choisi d'initier une étude sur les mécanismes de régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la *myostatine* au sein de la lignée myoblastiques surGasp1-20. Les études du promoteur de la *myostatine* ont révélé la présence de sites de liaison aux facteurs MyoD, SMADs et FoxOs contenus dans la région de 2 kb en amont du site d'initiation de la

traduction, région nécessaire et suffisante à la transcription de la *myostatine* (Spiller *et al.*, 2002, Allen et Unterman, 2007, Bernardi *et al.*, 2011). Ces facteurs sont dérégulés au sein des cellules myoblastiques S20 dérivées des cellules satellites des lignées murines surGasp1-20. Notre première hypothèse consiste donc à penser que leur dérégulation conduit à une augmentation de l'activité du promoteur de la *myostatine*, donc de son expression. Cette hypothèse est appuyée par les études concernant l'autorégulation de la myostatine dépendante des facteurs SMADs (Zhu *et al.*, 2004, Forbes *et al.*, 2006). En effet, l'activation des SMAD2/3 et SMAD4 entraîne l'expression de leur répresseur SMAD7 qui se fixe au promoteur de la *myostatine* pour en inhiber son activité. Les myoblastes S20 présentent une diminution des phospho-SMAD3 et le facteur SMAD7 est sous-exprimé (Brun *et al.*, soumis dans Skeletal Muscle Journal). Ces observations pourraient donc expliquer l'augmentation de l'expression de la *myostatine* dans les cellules S20.

Ainsi, pour étudier l'activité du promoteur de la myostatine dans ces myoblastes, la région promotrice de la *myostatine* a été clonée suite à l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) des régions d'ADN génomique murin de 2,1 kb à 0,6 kb en amont du site d'initiation de la traduction. Les produits PCR obtenus ont été ligaturés dans le vecteur pGL4.10[*luc2*] (**Annexe 3**). Une fois transfectés dans les myoblastes sauvages ou S20, l'expression de la luciférase *Firefly* dépendra de l'activité de la séquence promotrice clonée. La co-transfection des cellules avec un second vecteur, le vecteur pGL4.75[*hRluc*/CMV] dont l'expression de la luciférase *Renilla* est constitutive (**Annexe 3**), permettra de normaliser l'expression de la luciférase *Firefly* induite par le promoteur de la myostatine.

En parallèle de cette analyse de la séquence promotrice de la *myostatine*, nous avons initié un crible des miARNs potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de la *myostatine*. En effet, les miARNs s'avèrent être des régulateurs majeurs de nombreux processus biologiques grâce à leur action modulatrice de l'expression post-transcriptionnelle des gènes (**Encart 2**). Récemment, l'analyse moléculaire des cellules myoblastiques dérivées des cellules satellites de la lignée murine invalidée pour *Smad3* (*Smad3*^{-/-}) a révélé une augmentation de l'expression de la *myostatine* semblable à celle que nous observons dans les myoblastes S20 (Ge *et al.*, 2011). Ces cellules présentent une diminution des miARNs, miR-27a et miR-27b, dont la *myostatine* a été identifiée comme gène cible (Allen et Loh, 2011, Ge *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2012). Ainsi, l'augmentation de l'expression de la *myostatine* dans les myoblastes primaires *Smad3*^{-/-} est probablement liée à deux phénomènes : l'augmentation de l'activité de son promoteur d'une part et la diminution de l'expression des miARNs, miR-27a et miR-27b, d'autre part. Au regard de l'ensemble de ces données, il nous a donc paru indispensable d'étudier l'expression des miARNs au sein des myoblastes S20.

Afin de discriminer les miARNs dérégulés dans les myoblastes S20, nous avons conçu une puce TLDA dédiée à l'analyse d'expression des miARNs impliqués dans le développement musculaire. La plus grande difficulté fut de sélectionner les miARNs sachant que la majorité de leurs cibles reste encore inconnues à ce jour. Leur choix a donc été réalisé suite à un crible bibliographique qui m'a permis d'établir une liste de 67 miARNs dont les expressions au cours des différentes étapes de la myogenèse présentent la même variation dans au moins deux études indépendantes (**Tableau 7**).

TABLEAU 7. LISTE DES miARNs SELECTIONNES ET DE CERTAINS DE LEURS GENES CIBLES. Ces miARNs ont tous été montrés comme variant au cours des processus myogéniques.

miARN	Distribution tissulaire	Gènes cibles
Let-7	Ubiquitaire	<i>Cdc34, Fst</i>
miR-1	Muscle-spécifique	<i>Hdac4, Cx43, Pax7, Pax3, c-Met, YY1, Dll1, Mef2</i>
miR-103	Ubiquitaire	<i>Wnt3a</i>
miR-106	Ubiquitaire	?
miR-107	Ubiquitaire	?
miR-122	Tissu adipeux-spécifique	?
miR-125	Ubiquitaire	<i>Igf-2</i>
miR-128	Ubiquitaire	<i>Pax3, PPARγ</i>
miR-130	Ubiquitaire	<i>PPARγ</i>
miR-133	Muscle-spécifique	<i>Srf, Igf-1r, cyclin D2</i>
miR-135	Ubiquitaire	<i>Mef2c</i>
miR-138	Ubiquitaire	?
miR-141	Ubiquitaire	?
miR-143	Ubiquitaire	<i>Mapk7</i>
miR-144	Ubiquitaire	<i>IRS1</i>
miR-146	Ubiquitaire	<i>Numb</i>
miR-147	Ubiquitaire	?
miR-150	Ubiquitaire	?
miR-15	Ubiquitaire	<i>Dlk1</i>
miR-155	Ubiquitaire	<i>Mef2a</i>
miR-17	Ubiquitaire	<i>Rb2, p130</i>
miR-181	Ubiquitaire	<i>Hox-A11</i>
miR-182	Ubiquitaire	?
miR-192	Ubiquitaire	?
miR-195	Ubiquitaire	<i>Mo25</i>
miR-199	Ubiquitaire	?
miR-20	Ubiquitaire	?
miR-200	Ubiquitaire	?
miR-203	Ubiquitaire	<i>MyoD</i>

miR-204	Ubiquitaire	<i>Smad4</i>
miR-206	Muscle squelettique-spécifique	<i>Cx43, Pax7, Pax3, c-Met, Timp3, Hdac4, Fstl3, Igf-1</i>
miR-208	Muscle-spécifique	<i>Sox6, Purβ, Sp3</i>
miR-21	Ubiquitaire	<i>Tgfb2</i>
miR-210	Ubiquitaire	?
miR-214	Ubiquitaire	?
miR-22	Ubiquitaire	?
miR-221	Ubiquitaire	<i>p27</i>
miR-222	Ubiquitaire	<i>p27, p57</i>
miR-23	Ubiquitaire	<i>MAFbx, MuRF1</i>
miR-24	Ubiquitaire	?
miR-26	Ubiquitaire	<i>Smad1, Smad4</i>
miR-27	Ubiquitaire	<i>Pax3, Mstn, PPARγ</i>
miR-29	Ubiquitaire	<i>YY1</i>
miR-30	Ubiquitaire	<i>Alk2</i>
miR-31	Ubiquitaire	<i>Cebpa</i>
miR-320	Ubiquitaire	<i>Muscle-type PFK</i>
miR-322	Ubiquitaire	<i>Cdc25A</i>
miR-326	Ubiquitaire	?
miR-351	Ubiquitaire	<i>E2f3</i>
miR-378	Ubiquitaire	<i>MyoR</i>
miR-410	Ubiquitaire	<i>sFRP</i>
miR-424	Ubiquitaire	<i>Cdc25A</i>
miR-433	Ubiquitaire	<i>sFRP</i>
miR-448	Ubiquitaire	?
miR-451	Ubiquitaire	<i>Mo25</i>
miR-455	Ubiquitaire	?
miR-483	Ubiquitaire	<i>Gdf3</i>
miR-486	Enrichi dans le muscle	<i>FoxO1, Pax7</i>
miR-489	Ubiquitaire	?
miR-494	Ubiquitaire	<i>Foxj3</i>
miR-499	Ubiquitaire	<i>Sox6</i>
miR-503	Ubiquitaire	<i>Cdc25A, Fgf2, Fgfr</i>
miR-546	Ubiquitaire	?
miR-669	Ubiquitaire	<i>MyoD</i>
miR-696	Ubiquitaire	<i>Pgc-1α</i>
miR-92	Ubiquitaire	<i>Mef2, Rb2, p130</i>
miR-93	Ubiquitaire	<i>Glut4</i>

En fonction de leur disponibilité chez Applied Biosystems®, Life Technologies, 187 sondes spécifiques des 67 miARNs décrits et 5 sondes « références » ont été sélectionnées pour construire la carte TLDA (**Annexe 3**). L'expression des miARNs sera analysée au cours de la prolifération et au temps 72 h après l'induction de la différenciation. Les résultats obtenus permettront d'envisager une analyse fonctionnelle ciblée des miARNs dérégulés.

L'ensemble des outils nécessaires à l'étude sur les mécanismes de régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la *myostatine* est actuellement mis en place. Par la suite, ces travaux feront l'objet d'un article en préparation :

***myostatin* inhibition by GASP-1 overexpression leads to an up-regulation of its expression.**

Caroline Brun, Luce Périé, Lionel Forestier and Véronique Blanquet

(Article en préparation)

Encart 2. Régulation post-transcriptionnelle des processus myogéniques

Au cours du développement embryonnaire du muscle, l'inactivation spécifique de Dicer, enzyme indispensable à la maturation des microARNs (miARNs ou miR), conduit à une létalité périnatale, une réduction de la masse musculaire et une morphologie anormale des myofibres (O'Rourke et al., 2007). Ce phénotype souligne l'importance des miARNs dans la régulation des processus myogéniques, miARNs qui font aujourd'hui l'objet d'un très grand nombre d'études (Chen et al., 2009, Ge et Chen, 2011, Luo et al., 2013).

Chez les mammifères, les miARNs sont codés au sein de régions intergéniques ou intragéniques du génome (Kim et al., 2009). Leur biogenèse débute par la transcription d'un long transcrit primaire appelé pri-miARN. Ce premier transcrit est alors clivé par le complexe enzymatique Drosha/DGCR8 (Di George Critical Region 8) pour générer un pré-miARN qui est ensuite exporté vers le cytoplasme. Ensuite, le pré-miARN est de nouveau clivé par l'enzyme Dicer et pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) pour permettre la formation du miARN mature (Bartel, 2004, Kim et al., 2009). Les miARNs sont des petits ARNs simples brins de 21 à 25 nucléotides qui régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes en se liant de façon complémentaire et spécifique aux régions 3' UTR (untranslated regions, régions non traduites) de leurs gènes cibles, cette fixation conduisant à la dégradation de l'ARN messager (ARNm) ou à l'inhibition de la traduction. Ainsi, un miARN est capable de réguler plusieurs ARNm au même instant (Bartel, 2004, Kim et al., 2009). Bien que leurs cibles géniques ne soient pas toutes identifiées, de nombreux miARNs ont été associés à la régulation de processus cellulaires ou tissulaires particuliers.

Certains miARNs fonctionnent de façon tissu-spécifique comme les miR-1/miR-206 et miR-133a/miR-133b qui constituent les « MyomiRs » ou miARNs muscle-spécifique. Ces miARNs sont organisés en clusters sur trois loci chromosomiques et ils sont spécifiquement exprimés dans le muscle sous le contrôle des facteurs de transcription myogénique tels que MyoD, Mef2 et SRF (serum response factor) (Chen et al., 2006, Rao et al., 2006). Leur expression est fortement augmentée au cours de la différenciation et de la régénération musculaire, confirmant leur rôle indispensable dans la régulation de ces processus (Chen et al., 2006, Jeng et al., 2009, Lu et al., 2012). Trois autres miARNs, miR-208a/miR-208b et miR-499, possèdent une expression muscle-spécifique en raison de leur localisation au sein des séquences introniques des gènes de myosine (Chen et al., 2009). L'expression et les cibles de certains miARNs, qu'ils soient exprimés spécifiquement ou non dans le muscle, corréleront avec la régulation des différentes étapes de la myogenèse, depuis la détermination des précurseurs jusqu'à la maturation des fibres musculaires.

Au cours de l'embryogenèse du muscle squelettique, l'expression de miR-206 augmente et inhibe spécifiquement Pax3 et Pax7, autorisant ainsi la différenciation terminale des précurseurs myogéniques (Chen et al., 2010). En se fixant à sa région 3'UTR, miR-27b est aussi capable d'inhiber Pax3 conduisant à sa sous-expression et engageant ainsi les cellules précurseurs dans la voie myogénique (Crist et al., 2009). miR-133a favorise la prolifération myoblastique via la répression de SRF, alors que miR-1 facilite la différenciation myogénique en inhibant l'expression de l'histone déacétylase 4 de classe II (HDAC4), un répresseur transcriptionnel de l'expression des gènes musculaires (Chen et al., 2006). miR-206 influence aussi la différenciation en dérégulant les protéines Id, répresseurs de MyoD (Kim et al., 2006).

Alors que les miARNs cités présentent tous une surexpression au cours de la transition prolifération/différenciation des cellules myogéniques, les miR-221, miR-222 et miR-669a/miR-669q sont sous-exprimés (Cardinali et al., 2009, Crippa et al., 2011). La diminution des miR-221 et miR-222 est associée à l'augmentation d'expression de la protéine p27, inhibiteur du cycle cellulaire qui permet la sortie du cycle cellulaire des myoblastes et leur entrée en différenciation (Cardinali et al., 2009). Les miR-669a/669q ciblent et inhibent directement MyoD (Crippa et al., 2011). Enfin, l'expression des miR-135 et miR-155 diminue au cours de la différenciation permettant la levée d'inhibition de leur gène cible, Mef2c et Mef2a respectivement (Cesana et al., 2011, Seok et al., 2011). Il existe donc une inter-régulation complexe entre les miARNs et les gènes des MRFs et MEFs au cours de la différenciation du muscle squelettique. En plus de leur fonction classique, ces facteurs de transcription peuvent réguler indirectement la myogenèse via les MyomiRs.

La différenciation est indissociable de la fusion myoblastique au cours de laquelle un grand nombre de remaniements cellulaires s'opèrent, et notamment la sous-expression de la protéine Connexin43 (Cx43) des jonctions communicantes (« gap junctions »). Cette sous-expression est régulée par les miR-1 et miR-206 (Anderson et al., 2006). Finalement, la régulation entre les facteurs myogéniques et les différents miARNs au cours de la détermination et la différenciation myoblastique semble être étroitement liées au cycle cellulaire et à la fusion.

En raison de leur localisation génomique, les miR-208b et miR-499 participent à la détermination du typage des fibres chez l'adulte (van Rooij et al., 2009). En effet, les deux gènes Myh7 et Myh7b codent des chaînes de myosine associées aux muscles squelettiques de type I (fibres lentes). L'expression des miR-208a/208b et miR-499 dans ces fibres conduit à l'inhibition de gènes répresseurs transcriptionnels des chaînes de myosine de type I tels que Sox6, Pur6 et Sp3 (McCarthy et al., 2009, van Rooij et al., 2009).

Enfin, quelques études ont souligné le rôle des miARNs dans la régénération du muscle squelettique adulte et dans la régulation du pool de cellules satellites quiescentes. Au sein du muscle en régénération, l'expression de miR-27b augmente, entraînant la sous-expression de Pax3 pour favoriser la différenciation terminale des cellules satellites (Crist et al., 2009). L'une des caractéristiques qui distingue les cellules satellites quiescentes des cellules satellites activées est l'expression de la protéine Myf5 (Kuang et al., 2007). Dans les cellules quiescentes, miR-31 interagit avec la région 3'UTR de Myf5, empêchant ainsi la traduction de ce dernier (Crist et al., 2012). De plus, l'ARNm de Myf5 et les miARNs sont séquestrés dans des granules mRNP (messenger ribonucleoprotein). Ce n'est qu'au moment de l'activation des cellules satellites que les ARNm de Myf5 sont libérés, conduisant à leur traduction rapide. Un tel mécanisme permet donc aux cellules de conserver leur identité tissulaire tout en restant quiescentes, et de répondre très rapidement en cas de dommages (Crist et al., 2012).

A l'avenir, l'affinement des connaissances sur les réseaux géniques et la caractérisation fonctionnelle des miARNs devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent les différentes étapes de la myogenèse et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre certaines pathologies musculaires.

Relations structure/fonction de la protéine murine GASP-1

Enfin, la dernière partie de mon travail porte sur l'étude des modifications post-traductionnelles portées par la protéine GASP-1. Les modifications post-traductionnelles des protéines augmentent considérablement la taille du protéome ainsi que sa diversité fonctionnelle. Plus de 300 types différents de modifications post-traductionnelles ont été identifiés et de nouvelles modifications sont découvertes régulièrement (Jensen, 2004). Parmi elles, les glycosylations sont connues comme le groupe le plus hétérogène des modifications des protéines et elles sont fréquemment retrouvées sur les protéines sécrétées (**Figure 29**) (**Encart 3**).

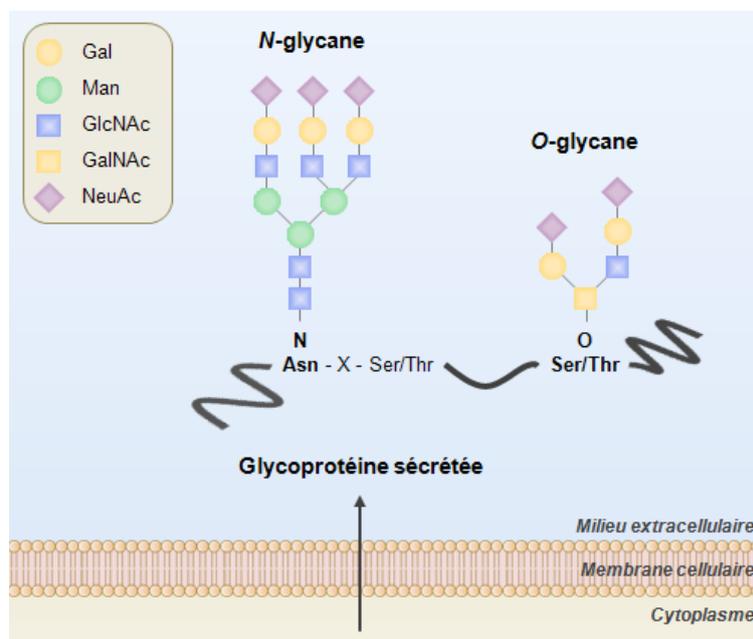


FIGURE 29. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE GLYCOPROTEINE SECRETEE. Les *N*-glycane sont liés au groupe amine du résidu asparagyl au sein de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, X correspondant à n'importe quel résidu excepté la proline. Les *O*-glycane sont liés au groupement hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine particulière. *Asn*, asparagine ; *Gal*, galactose ; *GalNAc*, *N*-acétylgalactosamine ; *GlcNAc*, *N*-acétylglucosamine ; *Man*, mannose ; *NeuAc*, acide *N*-acétylneuraminique ; *Ser*, sérine ; *Thr*, thréonine.

La protéine GASP-1 étant une protéine sécrétée, notre intérêt s'est tout naturellement porté sur la glycosylation de GASP-1 et son influence sur l'activité de la protéine. Le premier objectif de notre étude a été de déterminer l'occupation des glycanes sur la protéine GASP-1. Une étude bio-informatique nous a permis de mettre en évidence la présence potentielle de *N*-glycane et de *O*-glycane de type mucine, présence vérifiée grâce à la production de la protéine recombinante murine et à son traitement par différentes enzymes de la déglycosylation. Sur trois sites putatifs de

N-glycosylation, nous avons montré que seuls deux étaient réellement occupés par des *N*-glycanes dont nous avons ensuite testé l'influence sur l'activité de la protéine.

Grâce à la mise en place d'un test ELISA, nous avons démontré que l'absence de *N*-glycanes perturbe la sécrétion de la protéine murine. Nous avons ensuite choisi d'étudier l'incidence de ces glycanes sur l'activité de la protéine GASP-1 vis-à-vis de la myostatine. Des cellules myoblastiques C2C12 ont été traitées par la protéine recombinante murine GASP-1 produite en cellules eucaryotes COS-7 afin de tester son activité. Nous avons confirmé que GASP-1 active la prolifération et la différenciation myogénique par inhibition de la myostatine et de sa voie de signalisation. Les cellules C2C12 ont ensuite été traitées par les différentes formes mutées sur les sites de *N*-glycosylation et les résultats obtenus ont montré que la présence des *N*-glycanes n'influe pas sur le potentiel inhibiteur de GASP-1 sur la myostatine. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a donné lieu à la publication suivante :

Murine GASP-1 *N*-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion.

Brun C., Monestier O., Legardinier S., Maftah A., and Blanquet V.

Cell Physiol Biochem, 2012, 30(3):791-804

*[La liste des séquences Gasp-1 utilisées dans l'article est donnée en **Annexes 4.**]*

Les principaux résultats obtenus sont schématisés sur la **figure 30**. Finalement, la *N*-glycosylation de la protéine GASP-1 ne jouerait un rôle que dans sa sécrétion.

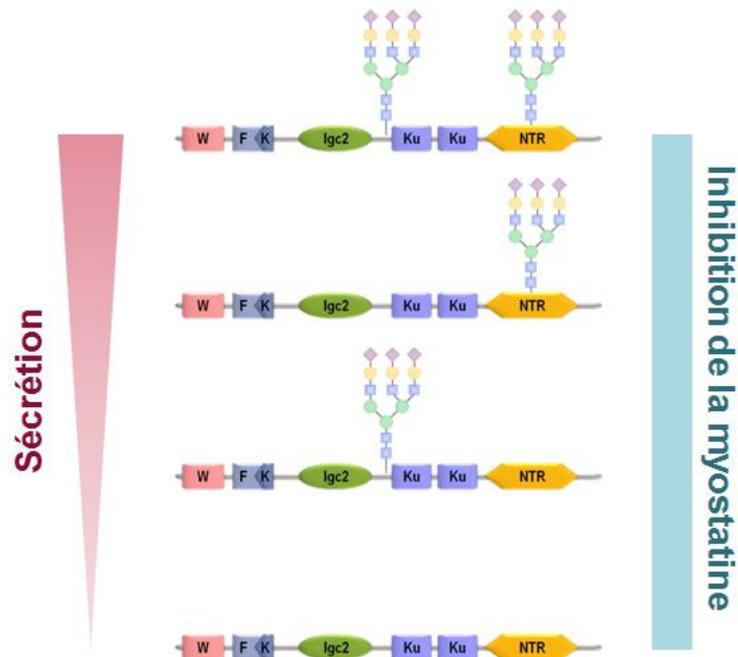


FIGURE 30. CONCLUSION SCHEMATIQUE DE L'INCIDENCE DES *N*-GLYCANES SUR LA PROTEINE GASP-1. L'absence sélective des *N*-glycanes influence la sécrétion de la protéine GASP-1 mais elle n'altère pas son action inhibitrice vis-à-vis de la myostatine.

Si la présence de *O*-glycanes de type mucine sur la protéine GASP-1 a été confirmée par traitement enzymatique, leur nombre exact et leur position restent à ce jour indéterminé. De plus, suite à la mise à jour du serveur NetOGlyc, ces données ont changé. La protéine GASP-1 murine posséderait toujours 9 *O*-glycanes de type mucine potentiels mais leurs positions potentielles ont changé (**Figure 31**).

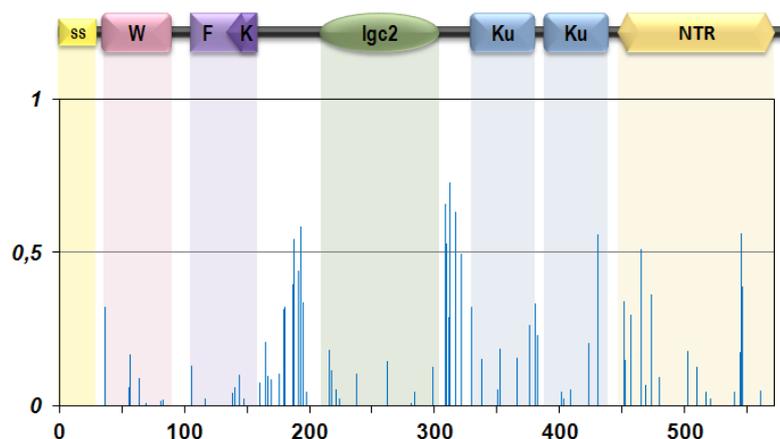


FIGURE 31. PREDICTION DES SITES DE *O*-GLYCOSYLATION DE TYPE MUCINE SUR LA PROTEINE GASP-1 MURINE PAR L'ANALYSE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE SUR LE SERVER 4.0 NetOGlyc. Les sérines (S) ou thréonines (T) potentiellement *O*-glycosylées sont les suivantes : T187, T192, T308, S309, S312, T316, S430, S465 et S545.

Encart 3. La glycosylation, une modification post-traductionnelle majeure des protéines

Qu'elles soient sécrétées, cellulaires ou membranaires, plus de 50 % des protéines eucaryotes sont glycosylées (Apweiler et al., 1999). La glycosylation correspond à l'apport de glycanes sous forme monosaccharidique ou polysaccharidique sur une chaîne peptidique. Selon la nature de la liaison formée entre le sucre et le domaine peptidique concerné, deux types majeurs de glycosylation sont définis : la N- et la O-glycosylation. Il existe également une C-mannosylation, plus rare, ayant lieu sur le C2 du groupement indole d'un résidu tryptophane (Hofsteenge et al., 1994).

La N-glycosylation correspond à la fixation d'un glycanes sur l'azote du groupement amine d'un résidu asparagyl inclus dans un motif consensus **Asn-X-Ser/Thr**, X correspondant à n'importe quel résidu excepté la proline (Gavel et von Heijne, 1990). La recherche de ces séquences consensus est facilitée par des outils bio-informatiques tels que le serveur NetNglyc qui prédit les sites de N-glycosylation sur une protéine donnée en utilisant des réseaux « neuronaux » artificiels qui examinent le contexte de la séquence consensus **Asn-X-Ser/Thr** et évaluent sa probabilité d'être glycosylée (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). La synthèse du N-glycane débute sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) puis, il est transloqué sur la face luminale du RE pour aboutir à la formation d'un oligosaccharide de 14 résidus (Kornfeld et Kornfeld, 1985), qui sera transféré en bloc sur l'asparagine de la protéine en cours de synthèse (Silberstein et Gilmore, 1996). Cet oligosaccharide sera ensuite modifié et mûré tout au long de son passage dans le RE et l'appareil de Golgi. Quelles que soient les modifications qu'ils subissent, les N-glycanes sont tous caractérisés par un noyau commun, le cœur pentasaccharidique **Man3GlcNAc2** (Figure 32). Selon le type de branches saccharidiques greffées, trois types de N-glycanes sont alors définis : le type oligomannosidique, le type complexe et le type hybride (Figure 32).

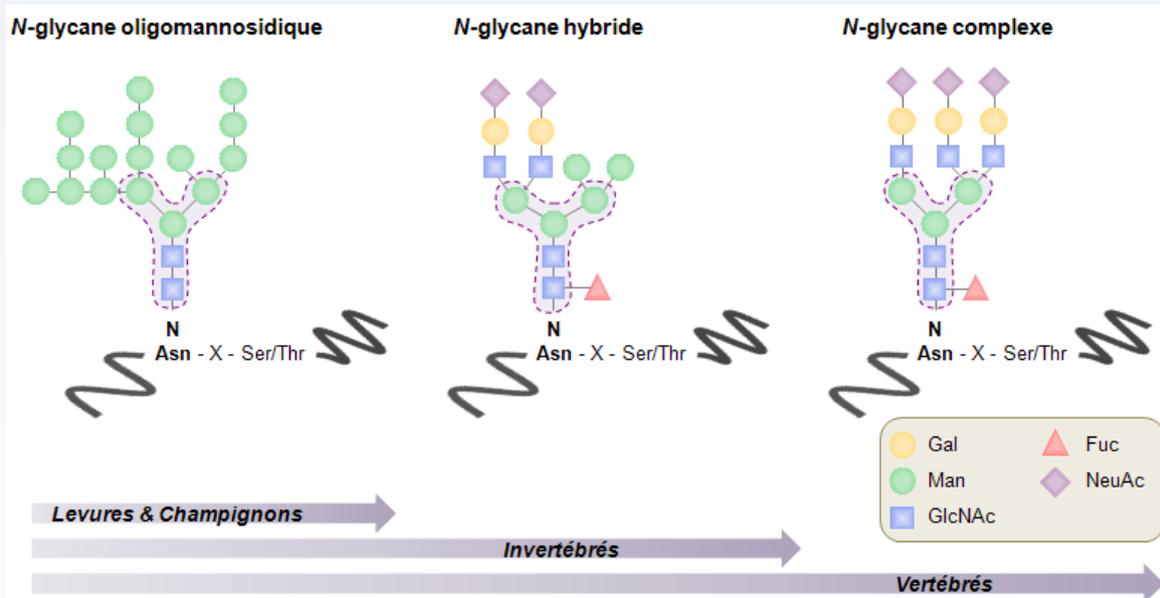


FIGURE 32. DIVERSITE DES N-GLYCANS ET EVOLUTION. Les N-glycans se répartissent en trois classes : oligomannosidique, complexe et hybride. Ils présentent le même cœur pentasaccharidique **Man3GlcNAc2** (entouré en pointillés violet). La complexité croissante des N-glycans à travers la phylogénie est principalement liée à la diminution des liaisons mannosidiques au profit de nouvelles liaisons osidiques portant différents monosaccharides. Ceci est évident lors de la comparaison des structures N-glycaniques entre les eucaryotes inférieurs (levures et champignons), les invertébrés et les vertébrés. Asn, asparagine ; Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglycosamine ; Man, mannose ; NeuAc, acide N-acétylneuraminique ; Ser, sérine ; Thr, thréonine. (Adaptée de Marth et Grewal (2008))

Les N-glycanes influencent de nombreuses propriétés biochimiques des glycoprotéines, notamment leur stabilité, leur solubilité, leur demi-vie ou leur activité *in vivo* (Helenius et Aebi, 2004, Skropeta, 2009). Ils participent au repliement correct et au trafic intracellulaire de certaines protéines, et s'avèrent être essentiels à leur sécrétion (Trombetta et Parodi, 2003, Helenius et Aebi, 2004).

La présence de N-glycanes sur les glycoprotéines peut être déterminée grâce à l'utilisation d'une enzyme bactérienne, la PNGase F (peptide-N-glycosidase F) (Tableau 8) (Tarentino et Plummer, 1994). Cette enzyme est une amidase qui libère les N-glycanes liés à l'atome d'azote de l'asparagine, de manière à convertir l'asparagine en aspartate. Par conséquent, la présence de sites de N-glycosylation est déduite par analyse de la séquence peptidique avant et après traitement à la PNGase F. Une approche alternative pour confirmer la présence et la localisation de N-glycanes sur une séquence peptidique, est de produire une forme non glycosylée de cette séquence par conversion de l'acide aminé asparagine en acide aminé glutamine grâce à des techniques de mutagenèse dirigée (Weiner et al., 1994). Cette méthode est également utilisée pour tester l'incidence des N-glycanes sur les propriétés fonctionnelles d'une glycoprotéine, telles que la synthèse, la sécrétion et l'activité.

Contrairement à la N-glycosylation qui consiste en l'apport d'une même structure glycanique en bloc sur un résidu asparagine, la O-glycosylation comprend différentes étapes de synthèse suivant les types de structures oligosaccharidiques. Cette modification intervient sur des acides aminés hydroxylés sérine ou thréonine, mais aussi sur certains plus inhabituels tels que l'hydroxylysine (Spiro, 1969) ou la tyrosine (Halim et al., 2011). Chez les mammifères, il existe différents types de O-glycosylation classés en fonction de la structure du glycanes O-lié et de la nature du premier sucre greffé sur la chaîne peptidique (Figure 33) (Schjoldager et Clausen, 2012).

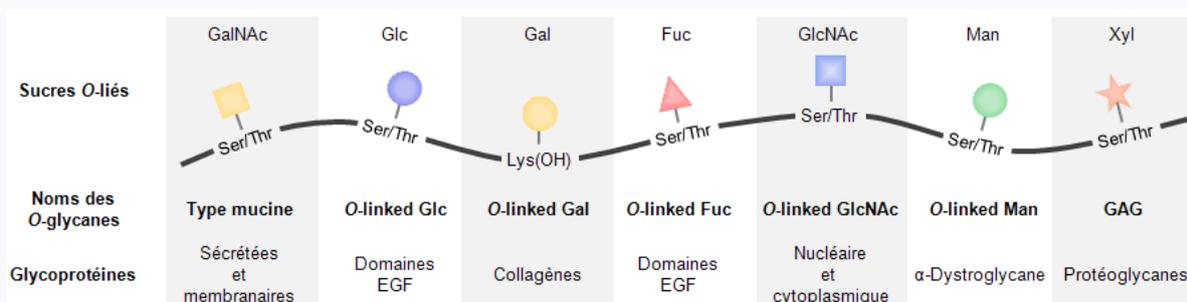


FIGURE 33. VUE D'ENSEMBLE DES DIFFERENTS MONOSACCHARIDES O-LIES AUX ACIDES AMINES HYDROXYLES D'UNE SEQUENCE PEPTIDIQUE. EGF, epidermal growth factor; Fuc, fucose; GAG, glycosaminoglycane; Gal, galactose; GalNAc, N-acétylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, N-acétylglucosamine; Man, mannose; Xyl, xyllose.

La O-glycosylation de type mucine (aussi appelée O-glycosylation de type GalNAc) est la plus fréquente des O-glycosylations retrouvée sur des protéines membranaires ou sécrétées. Cette O-glycosylation se déroule dans l'appareil de Golgi, et implique toujours deux étapes fondamentales : 1) une étape d'initiation, où une N-acétylgalactosaminyltransférase (GalNAc-Ts) reconnaît un motif accepteur sur la protéine et transfère le premier sucre GalNAc; et 2) une étape d'extension, où un grand nombre de glycosyltransférases agissent de façon séquentielle pour construire les diverses structures glycaniques (Figure 34). A l'inverse des N-glycanes, aucune séquence consensus n'a été identifiée pour la greffe des O-glycanes de type mucine sur la protéine. Cependant, il semble que les motifs accepteurs soient très dépendants des acides aminés flanquant les sérines ou thréonines O-glycosylées.

Ces régions sont riches en sérine, thréonine, valine, proline, alanine et glycine, et ne présentent que quelques résidus chargés notamment à la position -1 relative au résidu glycosylé (Nishimori et al., 1994, Hansen et al., 1995). De plus, la O-glycosylation a lieu dans l'appareil de Golgi après repliement et oligomérisation de la protéine, suggérant que les motifs accepteurs sont exposés à la surface de la glycoprotéine pour être accessibles à la GalNAc-Ts. L'algorithme NetOGlyc utilise ces deux caractéristiques pour prédire les sites de O-glycosylation de type mucine à partir d'une séquence protéique (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Steenfot et al., 2013).

La O-glycosylation de type mucine module un grand nombre de fonctions biologiques des glycoprotéines, incluant la solubilité, la demi-vie et la résistance à la protéolyse (Jentoft, 1990, Semenov et al., 2009). Elle influence également les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire (Tian et Ten Hagen, 2009).

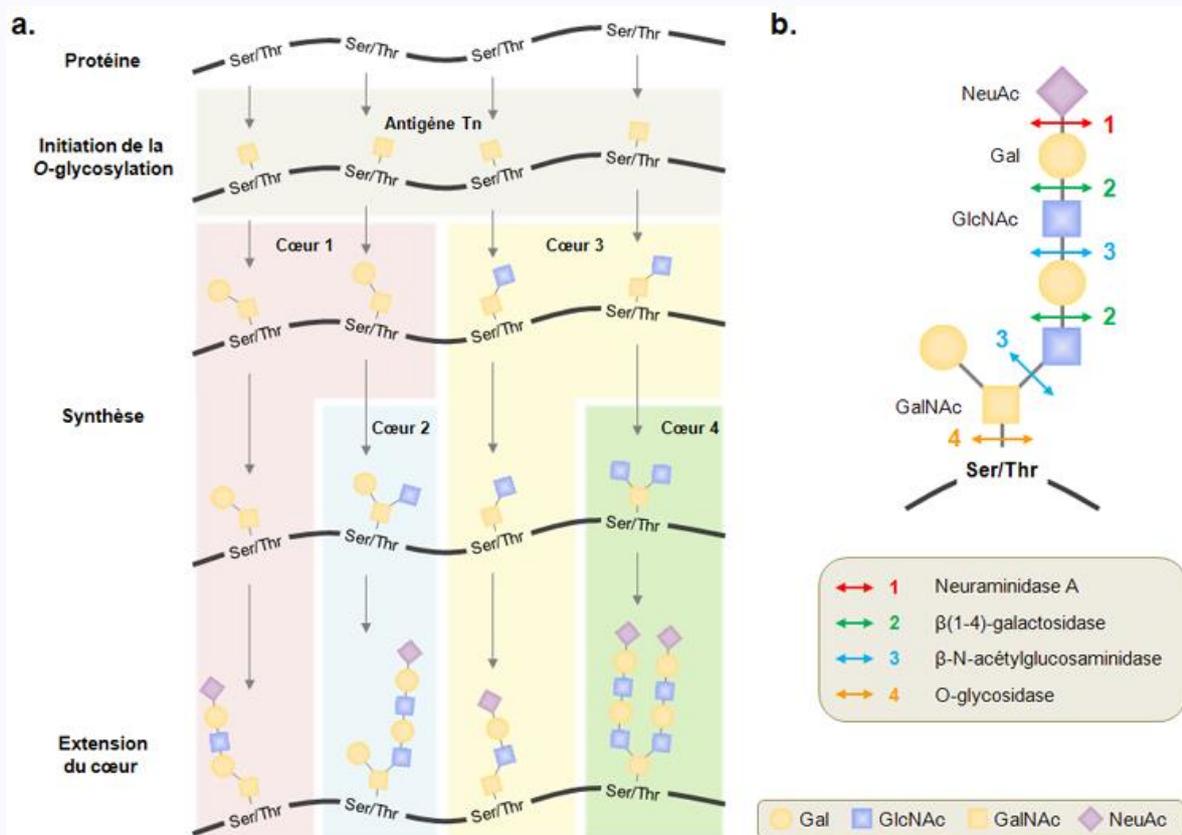
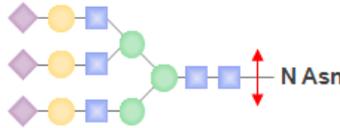
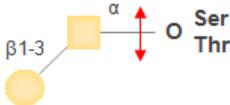
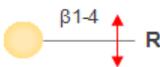
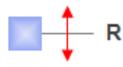
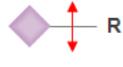


FIGURE 34. BIOSYNTHESE ET DEGLYCOSYLATION DES O-GLYCANS DE TYPE MUCINE. (a) (Initiation de la O-glycosylation) La synthèse des O-glycans de type mucine est initiée dans l'appareil de Golgi par le transfert d'un premier monosaccharide GalNAc sur le groupe hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine contenu dans un motif peptidique accepteur. (Synthèse) Cette structure, appelée antigène Tn, peut être soit sialylée, soit allongée par la greffe de différents monosaccharides pour former les quatre cœurs principaux des O-glycans type mucine. (Extension du cœur) Ces cœurs subiront potentiellement une nouvelle extension. (b) Représentation schématique de l'action des différentes glycosidases nécessaires pour déglycosyler les 4 cœurs O-glycaniques de type mucine. Gal, galactose ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; NeuAc, acide N-acétylneuraminique ; Ser, sérine ; Thr, thréonine.

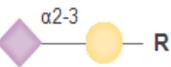
Il n'existe aucune enzyme semblable à la PNGase F permettant la déglycosylation totale des O-glycans. L'utilisation de quatre glycosidases, la O-glycosidase, la $\beta(1-4)$ -Galactosidase, la β -N-Acetylglucosaminidase et la Neuraminidase A, est donc nécessaire pour déglycosyler de façon séquentielle les quatre principaux cœurs des O-glycans de type mucine (Figure 34) (Tableau 8) (Glasgow et al., 1977, Uchida et al., 1977, Iwase et Hotta, 1993).

TABLEAU 8. GLYCOSIDASES UTILISEES POUR LA N-DEGLYCOSYLATION ET LA O-DEGLYCOSYLATION DE TYPE MUCINE.

Glycosidases	Sources	Liaisons clivées	Références
PNGase F (Peptide N-glycosidase F)	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Tous les N-glycanes oligomannosidiques, hybrids et complexes (sauf si le cœur GalNAc est fucosylé) 	(Tarentino et Plummer, 1994)
O-glycosidase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gal - β (1-3) - GalNAc - α - Ser/Thr 	(Glasgow <i>et al.</i> , 1977, Iwase et Hotta, 1993)
β(1-4)-Galactosidase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gal - β (1-4) - R 	(Glasgow <i>et al.</i> , 1977)
β-N-Acetylglucosaminidase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GlcNAc - β - R 	(Glasgow <i>et al.</i> , 1977)
Neuraminidase A (α (2-3,6,8,9)-neuraminidase)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Sia - α (2-3,6,8,9) - R 	(Uchida <i>et al.</i> , 1977)

Enfin, l'utilisation des lectines s'avère être une bonne alternative dans la mise en évidence de protéines glycosylées. Ces protéines sont capables de se lier spécifiquement à des séquences saccharidiques des glycanes, quel que soit leur type. Couplées à la digoxigénine (DIG) ou à la biotine, les lectines MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) ou SNA (*Sambucus nigra*) permettent la détection de l'ensemble des glycoprotéines dont les N-glycanes et/ou les O-glycanes portent des acides sialiques en position terminale (Tableau 9) (Shibuya *et al.*, 1987, Wang et Cummings, 1988).

TABLEAU 9. DEUX LECTINES LIANT SPECIFIQUEMENT LES ACIDES N-ACETYLNEURAMINIQUES.

Lectines	Noms	Spécificités de liaison	Références
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	Sia α (2-3) Gal 	(Wang et Cummings, 1988)
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α (2-6) Gal 	(Shibuya <i>et al.</i> , 1987)

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Tout au long de ma thèse, je me suis attachée à comprendre et analyser les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la myostatine par la protéine GASP-1 au cours du développement musculaire. Lors de sa découverte en 2003, une étude avait montré que la protéine GASP-1 était capable d'interagir avec la myostatine et son propeptide et d'inhiber ainsi son activité *in vitro* (Hill *et al.*, 2003). Bien qu'il ait été suggéré que GASP-1 puisse avoir un rôle *in vivo* dans la régulation de la myostatine du fait de leur identification en complexe dans le sérum (Hill *et al.*, 2003), la fonction précise de cette protéine restait inconnue. Ainsi, nous avons généré différentes lignées murines transgéniques, surexprimant la séquence codante de *Gasp-1* de façon ubiquitaire et appelées surGaps1, afin d'étudier les conséquences de cette surexpression au sein du muscle squelettique mais aussi dans l'ensemble des autres tissus tout au long du développement. Notre attention s'est portée plus particulièrement sur deux d'entre elles, les lignées surGasp1-06 et surGasp1-20, qui présentent la surexpression du transgène la plus forte dans le muscle squelettique et le cerveau. Trois semaines après la naissance, le poids corporel global de ces souris est augmenté d'environ 4 g par rapport aux sauvages. Cette observation est à mettre en relation avec l'augmentation de la masse musculaire de chacun des muscles squelettiques. L'analyse histomorphométrique comparative de différents muscles squelettiques des sauvages et des surGasp1 a révélé une hypertrophie de l'ensemble des myofibres, sans modification significative de leur nombre c'est-à-dire sans hyperplasie. Le nombre de myofibres chez la souris étant établi juste après la naissance (Ontell et Kozeka, 1984), l'absence d'hyperplasie chez les souris surGasp1 suggèrerait que la surexpression du gène *Gasp-1* au stade embryonnaire ne suffirait pas à induire un effet sur le développement myogénique. Pour comprendre un tel résultat, nous avons développé une stratégie *in vitro* reposant sur la caractérisation des voies de signalisation activées au sein des myoblastes primaires dérivés des cellules satellites des souris surGasp1-20 (S20).

Gasp-1 possède-t-il un rôle au cours du développement embryonnaire du muscle ?

Au cours de l'étude moléculaire des myoblastes, l'analyse par TLDA d'un panel de 96 gènes a montré une légère diminution de l'expression des gènes *Pax3* et *Pax7* dans les cellules S20, deux acteurs de la détermination des cellules myogéniques au cours des phases de développement embryonnaire et adulte (Buckingham et Relaix, 2007). *In vitro*, l'invalidation ou l'inhibition de la myostatine entraînent une expression importante de *Pax7* dans les myoblastes primaires (McFarlane *et al.*, 2008). *In vivo*, la prolifération des cellules progénitrices du muscle *Pax7*⁺ est beaucoup plus

intense chez les souris *Mstn*^{-/-} au cours des phases de myogenèse embryonnaire et foetale et serait responsable de l'hyperplasie observée au stade adulte, soulignant ainsi l'importance du rôle de la myostatine dans la régulation de Pax7 (Manceau *et al.*, 2008, Matsakas *et al.*, 2010). Nous nous attendions donc à observer une augmentation des taux protéiques de Pax7 dans les cellules myoblastiques S20 semblable à ceux des cellules *Mstn*^{-/-}. Or les analyses par western blot et immunocytochimie ont révélé des résultats inverses : les myoblastes S20 présentent des taux de Pax7 proches des cellules sauvages et bien inférieurs aux cellules *Mstn*^{-/-}. Ceci suggérerait que la surexpression de *Gasp-1* n'entraîne pas d'effet sur les cellules satellites et par extension, sur les cellules progénitrices du muscle, ce qui pourrait corrélérer avec l'absence d'hyperplasie dans les muscles des souris surGasp1-20. Cette absence d'effet au cours du développement embryonnaire du muscle peut également être mise en relation avec une surexpression plus faible de *Gasp-1* à ce stade. En effet, si *Gasp-1* est surexprimé 800 fois dans le tissu musculaire adulte, il n'est surexprimé qu'aux alentours de 50 fois au stade embryonnaire. Ce taux de surexpression pourrait ne pas être suffisant pour induire un effet.

Les résultats TLDA ont également révélé une surexpression de la *myostatine* dans les myoblastes S20, surexpression confirmée au niveau protéique par test ELISA dans les cellules et les sérums des souris surGasp1-20. Il a été montré que la myostatine est capable d'autoréguler son expression (Zhu *et al.*, 2004, Allen et Unterman, 2007). Ainsi, cette autorégulation conduit à la surexpression de la *myostatine* lorsque celle-ci ou sa voie de signalisation sont inhibées (Ge *et al.*, 2011). Il n'est donc pas surprenant que l'inhibition de la myostatine par GASP-1 induise une augmentation de son expression dans la lignée surGasp1-20. Comme l'ont décrit Zhu *et al.* (2004) et Forbes *et al.* (2006), cette autorégulation est liée à l'expression de SMAD7. En effet, les SMAD2/3 et SMAD4 activés par la myostatine permettent l'expression de SMAD7 qui se fixe sur le promoteur de la *myostatine* pour le réprimer (Zhu *et al.*, 2004). La diminution de l'expression de *Smad7* dans les cellules S20 semble confirmer que la surexpression de la myostatine dans les lignées S20 est le résultat de son autorégulation.

Nous nous sommes donc interrogés sur les conséquences d'une telle surexpression et nous avons choisi d'analyser l'ensemble des voies de signalisation régulées par la myostatine dans les cellules sauvages, S20 et *Mstn*^{-/-}. La voie de signalisation des MAPK ERK1/2 a particulièrement attiré notre attention puisqu'il avait été montré précédemment que la myostatine agissait par son intermédiaire pour inhiber l'expression de Pax7 (McFarlane *et al.*, 2008). Il était donc envisageable que cette voie puisse être au cœur de la dérégulation de Pax7 dans les cellules S20, hypothèse qui fut confirmée par l'analyse de la phosphorylation de ERK1/2 entre les trois lignées cellulaires (**Figure 35 a**). Les cellules S20 présentent des taux de ERK1/2 phosphorylés supérieurs à ceux des

cellules sauvages ou *Mstn*^{-/-}. Ces taux reflètent une activation plus importante de cette voie dans les myoblastes S20. Le traitement des cellules par des doses croissantes d'inhibiteur de la voie ERK a permis d'augmenter l'expression de Pax7 de façon dose-dépendante, confirmant l'implication de cette voie dans la régulation de Pax7 au sein des myoblastes S20 (Figure 35 c). Aux concentrations les plus fortes, l'expression de Pax7 dans les cellules S20 rejoint celle des cellules *Mstn*^{-/-}. Par ailleurs, l'inhibition de la voie ERK1/2 dans les cellules *Mstn*^{-/-} ne semble pas affecter l'expression de Pax7, ce qui suggérerait que seule la myostatine inhibe l'expression de Pax7 via ERK1/2. La neutralisation de la myostatine sécrétée des cellules S20 conduit également à une augmentation de l'expression de Pax7 (Figure 35 b). L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de la myostatine pourrait contrebalancer l'effet de *Gasp-1* au cours du développement embryonnaire du muscle dans la lignée murine surGasp1-20.

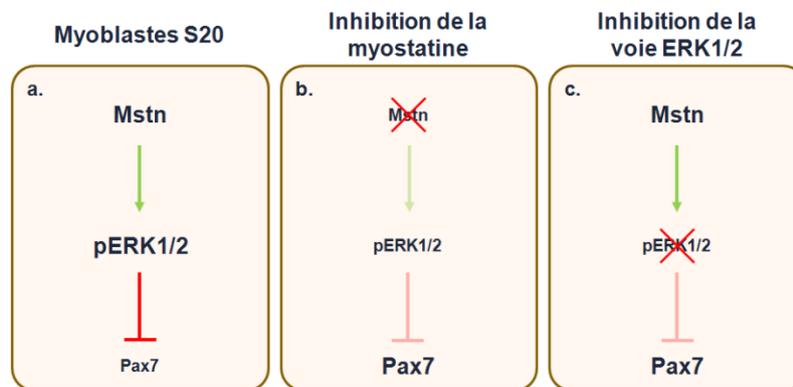


FIGURE 35. MODELE DE REGULATION DE PAX7 PAR LA MYOSTATINE DANS LES MYOBLASTES S20. (a) La myostatine active la voie de signalisation ERK1/2 qui inhibe l'expression de Pax7. (b) L'inhibition de la myostatine par neutralisation avec un anticorps anti-myostatine empêche l'activation de la voie ERK1/2 et lève l'inhibition de l'expression de Pax7. (c) L'inhibition de la voie ERK1/2 ne permet plus à la myostatine d'inhiber l'expression de Pax7.

Comme pour les souris *Mstn*^{-/-}, les modèles transgéniques surexprimant la *follistatine* ou *Fstl3* présentent une augmentation de la masse musculaire due à une hyperplasie et une hypertrophie des myofibres (Lee et McPherron, 2001, Lee, 2007a). Les protéines follistatine et FSTL3 interagissent aussi bien avec la myostatine qu'avec l'activine. A l'inverse, le propeptide et GASP-1 ne sont pas capables d'inhiber cette dernière. Or, comme pour les souris surGasp1, l'augmentation de la masse musculaire des modèles transgéniques murins surexprimant le propeptide n'est associée qu'à une hypertrophie des myofibres (Zhu *et al.*, 2000, Lee et McPherron, 2001, Yang *et al.*, 2001). Bien que cette analyse n'ait jamais été réalisée, il est envisageable que l'absence d'hyperplasie soit liée à une augmentation des niveaux d'expression de la *myostatine*, contrebalançant l'effet du propeptide. Finalement, seules l'invalidation totale de la *myostatine* et l'inhibition conjointe de la myostatine et de l'activine entraîneraient une hyperplasie et une hypertrophie des myofibres.

La publication récente du modèle murin invalidé pour *Gasp-1* semble cependant confirmer l'hypothèse d'une absence de rôle pour ce gène au stade prénatal (Lee et Lee, 2013). En effet, les souris *Gasp-1*^{-/-} ne présentent pas de phénotype musculaire particulier après la naissance. Une diminution légère mais significative du poids des muscles et une augmentation des fibres oxydatives au détriment des fibres glycolytiques ne sont observables qu'à partir de 8 mois. Ceci corrèlerait avec une levée d'inhibition de la myostatine, les souris *Mstn*^{-/-} présentant un phénotype opposé (Hennebry *et al.*, 2009, Lee et Lee, 2013). L'analyse des domaines d'expression de *Gasp-1* et de la *myostatine* par hybridation *in situ* semble appuyer l'hypothèse d'une absence de rôle pour *Gasp-1* au stade prénatal, tant ces domaines diffèrent. L'expression de la *myostatine* est détectée à partir du stade 9.5 j.p.c. et elle est restreinte aux somites en formation alors que l'expression du gène *Gasp-1* est indétectable (McPherron *et al.*, 1997, Lee et Lee, 2013). Au stade 10.5 j.p.c., la *myostatine* est également détectée dans le myotome proche puis dans les membres en formation à partir de 14.5 j.p.c. (McPherron *et al.*, 1997). Au sein de l'équipe, les hybridations *in situ* réalisées aux stades 11.5 et 12.5 j.p.c. montrent une expression de *Gasp-1* dans les bourgeons des membres, le tube neural et la partie caudale de l'embryon (Monestier *et al.*, 2012a) (**Annexe 5**). Les domaines d'expression des gènes *Gasp-1* et *myostatine* ne se chevaucheraient finalement qu'à partir du stade 14.5 j.p.c. De ce fait, l'inactivation de *Gasp-1* n'engendrerait pas de conséquence majeure sur la myogenèse embryonnaire.

D'autre part, il a été montré *in vitro* que GASP-1 est capable d'agir avec GDF-11 et d'inhiber ainsi sa signalisation. GDF-11 est un régulateur essentiel du développement du squelette axial et sa dérégulation au cours de l'embryogenèse entraîne des transformations homéotiques du squelette (McPherron *et al.*, 1999). Pourtant, l'analyse des squelettes des souris surGasp1-20 ou des souris *Gasp-1*^{-/-} n'a révélé aucune transformation homéotique, suggérant ainsi que la protéine GASP-1 inhibe préférentiellement la myostatine et n'agit pas sur GDF-11 *in vivo* (Lee et Lee, 2013).

Quelle(s) fonction(s) attribuer à *Gasp-1* au stade adulte ?

L'inactivation de la *myostatine* conduit à une hypertrophie généralisée des myofibres (McPherron *et al.*, 1997). A 12 semaines, les coupes transversales ont révélé une hypertrophie de l'ensemble des types de fibres musculaires (I, IIa et IIb) quel que soit le type de muscle squelettique analysé. Ces résultats corrèlent avec le phénotype observé suite à la surexpression du gène *Gasp-1* par administration d'un AAV dans les muscles adultes *quadriceps* et *tibialis anterior* (Haidet *et al.*, 2008). Aux stades adulte et post-natal, l'inhibition de la myostatine entraîne également une hypertrophie indépendante de l'activation des cellules satellites, reposant sur l'augmentation de la

synthèse protéique (Lee *et al.*, 2012, Wang et McPherron, 2012). La taille des myofibres est en effet déterminée par la balance entre synthèse protéique et dégradation (Bonaldo et Sandri, 2013). A ce jour, l'augmentation de la synthèse protéique responsable de l'hypertrophie des lignées *Mstn*^{-/-} est associée à l'inhibition de la signalisation SMAD2/3 qui permet l'activation de la protéine Akt (Trendelenburg *et al.*, 2009). Finalement, l'absence de myostatine induirait indirectement l'activation de la voie Akt entraînant une réponse hypertrophique. Les analyses moléculaires des voies de signalisation réalisées sur les myoblastes S20 confirment une activation de la signalisation pro-hypertrophique Akt/mTOR/S6K1 liée à une inhibition des protéines SMAD2/3 phosphorylées.

Très récemment, une étude a bouleversé l'ensemble des connaissances acquises sur le contrôle de la masse musculaire par la superfamille des TGF- β (Sartori *et al.*, 2013). Suite à la fixation sur leur récepteur, les facteurs sécrétés de cette superfamille agissent selon deux axes de signalisation : l'axe TGF- β , comme pour la myostatine, TGF- β 1 et GDF-11, qui entraîne la phosphorylation des SMAD2/3 ; et l'axe BMP comme pour BMP2 ou BMP4, qui conduit à la phosphorylation des SMAD1/5/8 (von Bubnoff et Cho, 2001). Les complexes SMAD2/3 et SMAD1/5/8 recrutent alors SMAD4 pour former le complexe transcriptionnel actif et pour réguler la transcription des gènes cibles. SMAD4 est donc au cœur de la signalisation de ces TGF- β (Figure 36) (Sartori *et al.*, 2013).

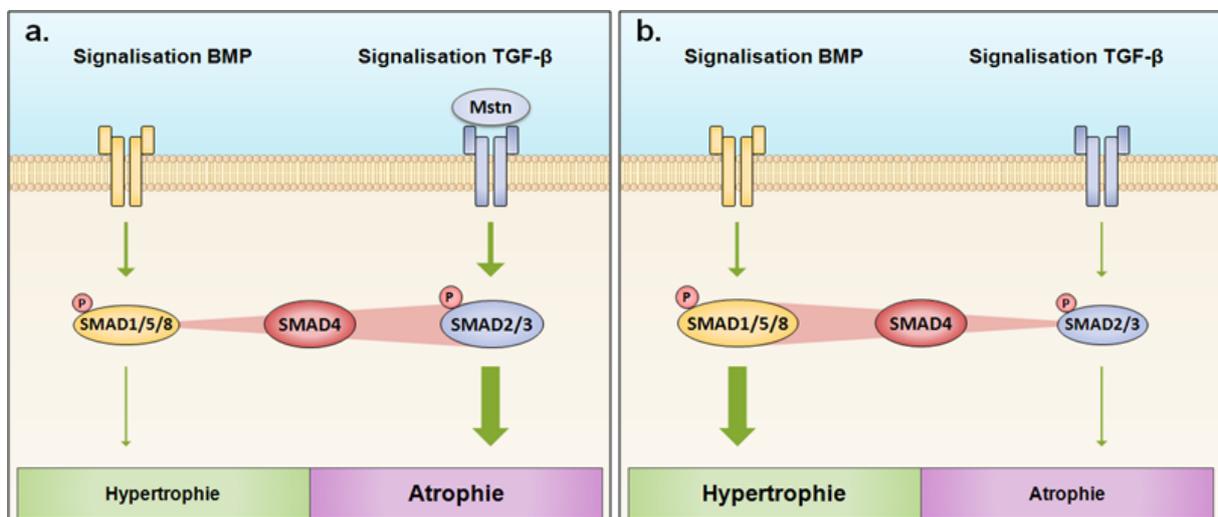


FIGURE 36. LA SIGNALISATION BMP CONTROLE LE MAINTIEN, LA CROISSANCE ET L'ATROPHIE DU MUSCLE ADULTE. La protéine SMAD4 est au cœur des voies de signalisations induites par les BMPs et les autres TGF- β . (a) Suite à la fixation à son récepteur, la myostatine active la phosphorylation des SMAD2/3 qui se complexent avec SMAD4 pour activer une réponse atrophique. (b) L'absence de myostatine diminue les niveaux de SMAD2/3 phosphorylés. Cette diminution libère SMAD4 qui est alors recruté par les SMAD1/5/8 pour initier une réponse hypertrophique.

En effet, la diminution des SMAD2/3 phosphorylés conduit à la libération des SMAD4 qui sont alors recrutés par les SMAD1/5/8 pour activer la signalisation BMP et une réponse

hypertrophique. A l'inverse, lorsque la signalisation BMP est inhibée ou lorsque l'expression de la myostatine est augmentée, les SMAD2/3 phosphorylés recrutent SMAD4 entraînant une réponse atrophique (**Figure 36**). Cette étude a ainsi révélé que l'hypertrophie induite par la myostatine est en réalité principalement liée à l'activation de la signalisation BMP au détriment de la signalisation TGF- β (Sartori *et al.*, 2013). Elle démontre également que l'axe BMP-SMAD1/5/8 est dominant dans le contrôle de la masse musculaire sur l'axe myostatine-SMAD2/3 (Sartori *et al.*, 2013). Compte tenu des nouvelles données sur le contrôle de la masse musculaire, il serait intéressant d'analyser la signalisation BMP-SMAD1/5/8 dans nos myoblastes S20, les analyses d'expression génique par TLDA ayant révélé une diminution de *Bmp2* et *Bmp4*.

Les résultats TLDA indiquent également une sous-expression de deux inhibiteurs de la myostatine, *Fst* (follistatine) et *Fstl3* (Lee, 2010), dans les myoblastes qui surexpriment *Gasp-1*. De plus, les résultats TLDA indiquent une sous-expression du facteur *Tgf- β 1*, facteur agoniste de la myostatine (Allen et Boxhorn, 1987) qui est justement surexprimée dans nos cellules S20. Ces résultats ont attiré notre attention sur l'existence d'un réseau de régulation des membres de la superfamille des TGF- β , réseau probablement associé à leurs voies de signalisation. Il nous est donc apparu nécessaire de poursuivre des études dans la compréhension des mécanismes de régulation des TGF- β . Ainsi, nous avons initié une étude plus large par puce Affymetrix pour comparer l'intégralité du transcriptome des cellules S20 par rapport aux sauvages au cours des phases de prolifération et de différenciation. Nous espérons beaucoup de l'analyse des résultats actuellement en cours qui complètera les données obtenues par TLDA pour permettre la résolution des mécanismes qui régulent les membres des TGF- β . Par ailleurs, l'analyse des microARNs variants au cours de ces mêmes processus devrait également apporter un nouvel éclairage sur ces réseaux de régulation d'expression géniques.

GASP-1 peut-il agir indépendamment de la myostatine ?

Bien que la surexpression de *Gasp-1* soit ubiquitaire, nous n'avons pas relevé de phénotype visible particulier sur les autres tissus à 12 semaines des souris surGasp1-20. L'hypertrophie observée corrèle avec une inhibition de la myostatine. Les souris surGasp1-20 ne présentent pas de variation du nombre total de cellules satellites par rapport aux sauvages, suggérant que GASP-1 ne peut pas réguler le pool de cellules satellites indépendamment de la myostatine. La dérégulation des voies de signalisation des myoblastes S20 semble également être liée à une inhibition de la myostatine. L'ensemble de nos travaux suggère que la protéine GASP-1 n'a qu'une fonction inhibitrice de la myostatine dans le contexte musculaire, mais nous ne pouvons exclure la possibilité d'un rôle

indépendant. Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'*in vitro*, la protéine GASP-1 est capable de se lier aux TGF- β BMP2, BMP4 et TGF- β 1 sans pour autant inhiber leur activité (Szlama *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que les protéines GASPs contrôleraient certains TGF- β dans le sérum en localisant leur fonction par la mise en place et le maintien de gradients selon le contexte physiologique (Szlama *et al.*, 2010). De façon étonnante, ces trois gènes, *Bmp2*, *Bmp4* et *Tgf- β 1*, sont sous-exprimés dans les myoblastes S20. Ces résultats confortent un peu plus l'idée que la signalisation des TGF- β et leur expression sont intimement liées.

Afin de rechercher de nouveaux partenaires protéiques de GASP-1, différentes stratégies ont été initiées au sein de l'équipe. Au cours de ces trois années, la mise en place d'un système double-hybride chez la levure a été entreprise afin de cribler prochainement une banque d'ADNc embryonnaire et d'identifier de nouveaux partenaires. Il est cependant indispensable de garder à l'esprit que ce type d'outil n'est pas toujours idéal tant les interactions protéine-protéine peuvent différer de la levure au contexte physiologique. A titre d'exemple, il est difficile d'établir un mécanisme d'inhibition de la protéine sarcomérique téléthonine sur la forme mature sécrétée de la myostatine, bien que ces deux protéines interagissent *in vitro* (Nicholas *et al.*, 2002). C'est la raison pour laquelle nous développons actuellement deux autres stratégies : la co-immunoprécipitation et l'histidine pull down.

Enfin, la complexité structurale de la protéine GASP-1 reste à analyser. En effet, il est envisageable que certains domaines anti-protéasiques de la protéine murine puissent être fonctionnels et intervenir dans divers processus physiologiques. Ainsi, bien qu'il n'ait pas été largement adopté par la communauté des chercheurs spécialisés dans l'étude des protéases, le système double-hybride peut être un excellent outil pour identifier des protéases susceptibles d'être reconnues par les domaines de la protéine GASP-1 (Turk, 2006).

D'autre part, un projet en cours révèle que les souris surGasp1-20 âgées de plus de 15 mois développent un syndrome métabolique. Ces souris présentent en effet une augmentation des taux de glucose sérique, une accumulation de lipides intramusculaires importante, une stéatose du foie ainsi qu'une augmentation de la masse du tissu adipeux. Ce phénotype est clairement différent de celui des souris *Mstn*^{-/-} qui présentent une diminution significative de leur masse grasseuse et un taux de glucose sérique équivalent à celui des souris sauvages (McPherron *et al.*, 1997, McPherron et Lee, 2002). Des études aux résultats souvent contradictoires se sont concentrées sur la régulation du tissu adipeux par la myostatine (McPherron, 2010). Elles suggèrent cependant que la myostatine peut avoir un rôle sur le tissu adipeux sur le long terme (McPherron, 2010). Grâce aux résultats obtenus au cours de la caractérisation des myoblastes S20, nous pouvons ainsi supposer que le

phénotype des souris surGasp1-20 « âgées » est entraîné soit par la surexpression de la myostatine, soit par la surexpression de GASP-1 indépendamment de la myostatine. Finalement, les souris issues du croisement des lignées surGasp1-20 et *Mstn*^{-/-} permettront de répondre sans aucun doute à la question d'un rôle indépendant de la myostatine pour la protéine GASP-1.

Si le rôle de la protéine GASP-1 au cours de la myogenèse embryonnaire reste incertain, il est désormais clairement établi qu'elle participe à l'homéostasie du muscle squelettique adulte en régulant l'activité de la myostatine. Dans notre contexte, sa surexpression entraîne une hypertrophie des myofibres sans altérer ni leur nombre, ni leur métabolisme. De plus, l'hypertrophie engendrée est indépendante de l'activation des cellules satellites. Il reste cependant à établir quelles doses de GASP-1 seraient suffisantes pour lui conférer cet effet pro-hypertrophique, sans qu'elles induisent une dérégulation de la myostatine. L'absence de modifications post-traductionnelles ne semble pas affecter la fonction de GASP-1 vis-à-vis de la myostatine, ce qui permet d'envisager une production de la protéine recombinante en système procaryote afin de s'affranchir de l'immunogénicité apportée par la glycosylation. L'ensemble de ces résultats confirme le potentiel de GASP-1 comme cible thérapeutique de choix dans les pathologies associées à une atrophie musculaire, notamment celles caractérisées par un dysfonctionnement des cellules satellites.

REFERENCES

RÉFÉRENCES

- Abmayr, SM and Pavlath, GK. **Myoblast fusion: lessons from flies and mice.** *Development* 2012, **139**(4): 641-656.
- Alfaro, LA, Dick, SA, Siegel, AL, Anonuevo, AS, McNagny, KM, Megeney, LA, Cornelison, DD and Rossi, FM. **CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration.** *Stem Cells* 2011, **29**(12): 2030-2041.
- Allen, DL and Loh, AS. **Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, **300**(1): C124-137.
- Allen, DL and Unterman, TG. **Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**(1): C188-199.
- Allen, RE and Boxhorn, LK. **Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta.** *J Cell Physiol* 1987, **133**(3): 567-572.
- Amirouche, A, Durieux, AC, Banzet, S, Koulmann, N, Bonnefoy, R, Mouret, C, Bigard, X, Peinnequin, A and Freyssenet, D. **Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle.** *Endocrinology* 2009, **150**(1): 286-294.
- Amthor, H, Christ, B, Rashid-Doubell, F, Kemp, CF, Lang, E and Patel, K. **Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth.** *Dev Biol* 2002a, **243**(1): 115-127.
- Amthor, H, Huang, R, McKinnell, I, Christ, B, Kambadur, R, Sharma, M and Patel, K. **The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis.** *Dev Biol* 2002b, **251**(2): 241-257.
- Amthor, H, Nicholas, G, McKinnell, I, Kemp, CF, Sharma, M, Kambadur, R and Patel, K. **Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis.** *Dev Biol* 2004, **270**(1): 19-30.
- Amthor, H, Otto, A, Vulin, A, Rochat, A, Dumonceaux, J, Garcia, L, Mouisel, E, Hourde, C, Macharia, R, Friedrichs, M, Relaix, F, Zammit, PS, Matsakas, A, Patel, K and Partridge, T. **Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(18): 7479-7484.
- Anderson, C, Catoe, H and Werner, R. **MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(20): 5863-5871.
- Anderson, C, Williams, VC, Moyon, B, Daubas, P, Tajbakhsh, S, Buckingham, ME, Shiroishi, T, Hughes, SM and Borycki, AG. **Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity.** *Genes Dev* 2012, **26**(18): 2103-2117.
- Anderson, SB, Goldberg, AL and Whitman, M. **Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle.** *J Biol Chem* 2008, **283**(11): 7027-7035.
- Aoki, MS, Soares, AG, Miyabara, EH, Baptista, IL and Moriscot, AS. **Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth.** *Muscle Nerve* 2009, **40**(6): 992-999.
- Apweiler, R, Hermjakob, H and Sharon, N. **On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1473**(1): 4-8.
- Artaza, JN, Bhasin, S, Mallidis, C, Taylor, W, Ma, K and Gonzalez-Cadavid, NF. **Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells.** *J Cell Physiol* 2002, **190**(2): 170-179.
- Aulehla, A and Pourquie, O. **On periodicity and directionality of somitogenesis.** *Anat Embryol (Berl)* 2006, **211 Suppl 1**: 3-8.
- Aulehla, A and Pourquie, O. **Oscillating signaling pathways during embryonic development.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**(6): 632-637.
- Aulehla, A and Pourquie, O. **Signaling gradients during paraxial mesoderm development.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(2): a000869.

- Baehr, LM, Furlow, JD and Bodine, SC. **Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids.** *J Physiol* 2011, **589**(Pt 19): 4759-4776.
- Banyai, L and Patthy, L. **The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases.** *Protein Sci* 1999, **8**(8): 1636-1642.
- Bartel, DP. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2): 281-297.
- Barton, ER, DeMeo, J and Lei, H. **The insulin-like growth factor (IGF)-I E-peptides are required for isoform-specific gene expression and muscle hypertrophy after local IGF-I production.** *J Appl Physiol* 2010, **108**(5): 1069-1076.
- Beauchamp, JR, Heslop, L, Yu, DS, Tajbakhsh, S, Kelly, RG, Wernig, A, Buckingham, ME, Partridge, TA and Zammit, PS. **Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells.** *J Cell Biol* 2000, **151**(6): 1221-1234.
- Benny Klimek, ME, Aydogdu, T, Link, MJ, Pons, M, Koniaris, LG and Zimmers, TA. **Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **391**(3): 1548-1554.
- Bentzinger, CF, Romanino, K, Cloetta, D, Lin, S, Mascarenhas, JB, Oliveri, F, Xia, J, Casanova, E, Costa, CF, Brink, M, Zorzato, F, Hall, MN and Ruegg, MA. **Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy.** *Cell Metab* 2008, **8**(5): 411-424.
- Bentzinger, CF, Wang, YX and Rudnicki, MA. **Building muscle: molecular regulation of myogenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, **4**(2).
- Bernardi, H, Gay, S, Fedon, Y, Vernus, B, Bonnieu, A and Bacou, F. **Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, **300**(5): C1122-1138.
- Berry, C, Thomas, M, Langley, B, Sharma, M and Kambadur, R. **Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**(1): C135-141.
- Biressi, S, Molinaro, M and Cossu, G. **Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development.** *Dev Biol* 2007a, **308**(2): 281-293.
- Biressi, S, Tagliafico, E, Lamorte, G, Monteverde, S, Tenedini, E, Roncaglia, E, Ferrari, S, Ferrari, S, Cusella-De Angelis, MG, Tajbakhsh, S and Cossu, G. **Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells.** *Dev Biol* 2007b, **304**(2): 633-651.
- Blaauw, B, Canato, M, Agatea, L, Toniolo, L, Mammucari, C, Masiero, E, Abraham, R, Sandri, M, Schiaffino, S and Reggiani, C. **Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation.** *FASEB J* 2009, **23**(11): 3896-3905.
- Bladt, F, Riethmacher, D, Isenmann, S, Aguzzi, A and Birchmeier, C. **Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud.** *Nature* 1995, **376**(6543): 768-771.
- Bober, E, Franz, T, Arnold, HH, Gruss, P and Tremblay, P. **Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells.** *Development* 1994, **120**(3): 603-612.
- Bober, E, Lyons, GE, Braun, T, Cossu, G, Buckingham, M and Arnold, HH. **The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development.** *J Cell Biol* 1991, **113**(6): 1255-1265.
- Bodine, SC, Latres, E, Baumhueter, S, Lai, VK, Nunez, L, Clarke, BA, Poueymirou, WT, Panaro, FJ, Na, E, Dharmarajan, K, Pan, ZQ, Valenzuela, DM, DeChiara, TM, Stitt, TN, Yancopoulos, GD and Glass, DJ. **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** *Science* 2001a, **294**(5547): 1704-1708.
- Bodine, SC, Stitt, TN, Gonzalez, M, Kline, WO, Stover, GL, Bauerlein, R, Zlotchenko, E, Scrimgeour, A, Lawrence, JC, Glass, DJ and Yancopoulos, GD. **Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.** *Nat Cell Biol* 2001b, **3**(11): 1014-1019.
- Bogdanovich, S, Krag, TO, Barton, ER, Morris, LD, Whittemore, LA, Ahima, RS and Khurana, TS. **Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade.** *Nature* 2002, **420**(6914): 418-421.

- Bogdanovich, S, Perkins, KJ, Krag, TO, Whittemore, LA and Khurana, TS. **Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology.** *FASEB J* 2005, **19**(6): 543-549.
- Bonaldo, P and Sandri, M. **Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.** *Dis Model Mech* 2013, **6**(1): 25-39.
- Brand-Saberi, B and Christ, B. **Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates.** *Cell Tissue Res* 1999, **296**(1): 199-212.
- Brand-Saberi, B, Gamel, AJ, Krenn, V, Muller, TS, Wilting, J and Christ, B. **N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud.** *Dev Biol* 1996a, **178**(1): 160-173.
- Brand-Saberi, B, Krenn, V, Grim, M and Christ, B. **Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations.** *Anat Embryol (Berl)* 1993, **187**(1): 17-26.
- Brand-Saberi, B, Muller, TS, Wilting, J, Christ, B and Birchmeier, C. **Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo.** *Dev Biol* 1996b, **179**(1): 303-308.
- Braun, T, Bober, E, Buschhausen-Denker, G, Kohtz, S, Grzeschik, KH and Arnold, HH. **Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products.** *EMBO J* 1989a, **8**(12): 3617-3625.
- Braun, T, Buschhausen-Denker, G, Bober, E, Tannich, E and Arnold, HH. **A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.** *EMBO J* 1989b, **8**(3): 701-709.
- Braun, T and Gautel, M. **Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(6): 349-361.
- Braun, T, Rudnicki, MA, Arnold, HH and Jaenisch, R. **Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death.** *Cell* 1992, **71**(3): 369-382.
- Brohmann, H, Jagla, K and Birchmeier, C. **The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells.** *Development* 2000, **127**(2): 437-445.
- Brun, C, Monestier, O, Legardinier, S, Maftah, A and Blanquet, V. **Murine GASP-1 N-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion.** *Cell Physiol Biochem* 2012, **30**(3): 791-804.
- Bryson-Richardson, RJ and Currie, PD. **The genetics of vertebrate myogenesis.** *Nat Rev Genet* 2008, **9**(8): 632-646.
- Buckingham, M. **Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates.** *Curr Opin Genet Dev* 2006, **16**(5): 525-532.
- Buckingham, M, Bajard, L, Chang, T, Daubas, P, Hadchouel, J, Meilhac, S, Montarras, D, Rocancourt, D and Relaix, F. **The formation of skeletal muscle: from somite to limb.** *J Anat* 2003, **202**(1): 59-68.
- Buckingham, M and Montarras, D. **Skeletal muscle stem cells.** *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**(4): 330-336.
- Buckingham, M and Relaix, F. **The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007, **23**: 645-673.
- Cai, D, Frantz, JD, Tawa, NE, Jr., Melendez, PA, Oh, BC, Lidov, HG, Hasselgren, PO, Frontera, WR, Lee, J, Glass, DJ and Shoelson, SE. **IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice.** *Cell* 2004, **119**(2): 285-298.
- Cardinali, B, Castellani, L, Fasanaro, P, Basso, A, Alema, S, Martelli, F and Falcone, G. **Microrna-221 and microrna-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells.** *PLoS One* 2009, **4**(10): e7607.
- Carlson, CJ, Booth, FW and Gordon, SE. **Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading.** *Am J Physiol* 1999, **277**(2 Pt 2): R601-606.
- Casola, S. **Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus.** *Methods Mol Biol* 2010, **667**: 145-163.
- Cesana, M, Cacchiarelli, D, Legnini, I, Santini, T, Sthandier, O, Chinappi, M, Tramontano, A and Bozzoni, I. **A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA.** *Cell* 2011, **147**(2): 358-369.
- Cheek, DB. **The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study.** *Early Hum Dev* 1985, **12**(3): 211-239.

- Chen, JF, Callis, TE and Wang, DZ. **microRNAs and muscle disorders.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 1): 13-20.
- Chen, JF, Mandel, EM, Thomson, JM, Wu, Q, Callis, TE, Hammond, SM, Conlon, FL and Wang, DZ. **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** *Nat Genet* 2006, **38**(2): 228-233.
- Chen, JF, Tao, Y, Li, J, Deng, Z, Yan, Z, Xiao, X and Wang, DZ. **microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7.** *J Cell Biol* 2010, **190**(5): 867-879.
- Chen, X, Huang, Z, Chen, D, Yang, T and Liu, G. **MicroRNA-27a Is Induced by Leucine and Contributes to Leucine-Induced Proliferation Promotion in C2C12 Cells.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(7): 14076-14084.
- Chhikara, N, Saraswat, M, Tomar, AK, Dey, S, Singh, S and Yadav, S. **Human epididymis protein-4 (HE-4): a novel cross-class protease inhibitor.** *PLoS One* 2012, **7**(11): e47672.
- Choi, J, Costa, ML, Mermelstein, CS, Chagas, C, Holtzer, S and Holtzer, H. **MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(20): 7988-7992.
- Christov, C, Chretien, F, Abou-Khalil, R, Bassez, G, Vallet, G, Authier, FJ, Bassaglia, Y, Shinin, V, Tajbakhsh, S, Chazaud, B and Gherardi, RK. **Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(4): 1397-1409.
- Cinnamon, Y, Kahane, N, Bachelet, I and Kalcheim, C. **The sub-lip domain--a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration.** *Development* 2001, **128**(3): 341-351.
- Clarke, BA, Drujan, D, Willis, MS, Murphy, LO, Corpina, RA, Burova, E, Rakhilin, SV, Stitt, TN, Patterson, C, Latres, E and Glass, DJ. **The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle.** *Cell Metab* 2007, **6**(5): 376-385.
- Coleman, ME, DeMayo, F, Yin, KC, Lee, HM, Geske, R, Montgomery, C and Schwartz, RJ. **Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice.** *J Biol Chem* 1995, **270**(20): 12109-12116.
- Cong, H, Sun, L, Liu, C and Tien, P. **Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice.** *Hum Gene Ther* 2011, **22**(3): 313-324.
- Cooke, J and Zeeman, EC. **A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis.** *J Theor Biol* 1976, **58**(2): 455-476.
- Cornelison, DD, Olwin, BB, Rudnicki, MA and Wold, BJ. **MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient.** *Dev Biol* 2000, **224**(2): 122-137.
- Cornelison, DD and Wold, BJ. **Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells.** *Dev Biol* 1997, **191**(2): 270-283.
- Costelli, P, Muscaritoli, M, Bonetto, A, Penna, F, Reffo, P, Bossola, M, Bonelli, G, Doglietto, GB, Baccino, FM and Rossi Fanelli, F. **Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia.** *Eur J Clin Invest* 2008, **38**(7): 531-538.
- Crippa, S, Cassano, M, Messina, G, Galli, D, Galvez, BG, Curk, T, Altomare, C, Ronzoni, F, Toelen, J, Gijssbers, R, Debyser, Z, Janssens, S, Zupan, B, Zaza, A, Cossu, G and Sampaolesi, M. **miR669a and miR669q prevent skeletal muscle differentiation in postnatal cardiac progenitors.** *J Cell Biol* 2011, **193**(7): 1197-1212.
- Crist, CG, Montarras, D and Buckingham, M. **Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules.** *Cell Stem Cell* 2012, **11**(1): 118-126.
- Crist, CG, Montarras, D, Pallafacchina, G, Rocancourt, D, Cumano, A, Conway, SJ and Buckingham, M. **Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(32): 13383-13387.
- Cross, DA, Alessi, DR, Cohen, P, Andjelkovich, M and Hemmings, BA. **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.** *Nature* 1995, **378**(6559): 785-789.

- Csibi, A, Cornille, K, Leibovitch, MP, Poupon, A, Tintignac, LA, Sanchez, AM and Leibovitch, SA. **The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse.** *PLoS One* 2010, **5**(2): e8994.
- Danielson, KG, Baribault, H, Holmes, DF, Graham, H, Kadler, KE and Iozzo, RV. **Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.** *J Cell Biol* 1997, **136**(3): 729-743.
- Danoviz, ME and Yablonka-Reuveni, Z. **Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system.** *Methods Mol Biol* 2012, **798**: 21-52.
- Daubas, P and Buckingham, ME. **Direct molecular regulation of the myogenic determination gene Myf5 by Pax3, with modulation by Six1/4 factors, is exemplified by the -111kb-Myf5 enhancer.** *Dev Biol* 2013.
- Davis, BN, Hilyard, AC, Lagna, G and Hata, A. **SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation.** *Nature* 2008, **454**(7200): 56-61.
- Davis, RL, Weintraub, H and Lassar, AB. **Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.** *Cell* 1987, **51**(6): 987-1000.
- Dequeant, ML, Glynn, E, Gaudenz, K, Wahl, M, Chen, J, Mushegian, A and Pourquie, O. **A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock.** *Science* 2006, **314**(5805): 1595-1598.
- Dequeant, ML and Pourquie, O. **Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis.** *Nat Rev Genet* 2008, **9**(5): 370-382.
- Drummond, MJ, Glynn, EL, Fry, CS, Dhanani, S, Volpi, E and Rasmussen, BB. **Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle.** *J Nutr* 2009, **139**(12): 2279-2284.
- Du, R, An, XR, Chen, YF and Qin, J. **Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (*Ovis aries*).** *J Biochem Mol Biol* 2007, **40**(4): 547-553.
- Durieux, AC, Amirouche, A, Banzet, S, Koulmann, N, Bonnefoy, R, Pasdeloup, M, Mouret, C, Bigard, X, Peinnequin, A and Freyssenet, D. **Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression.** *Endocrinology* 2007, **148**(7): 3140-3147.
- Dutta, S, Kotaka, M and Tan, YJ. **Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of recombinant human small glutamine-rich tetratricopeptide-repeat protein.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2008, **64**(Pt 7): 602-604.
- Duxson, MJ, Usson, Y and Harris, AJ. **The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies.** *Development* 1989, **107**(4): 743-750.
- Edgerton, VR and Roy, RR. **Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function.** *J Biomech* 1991, **24** Suppl 1: 123-133.
- Edom-Vovard, F, Bonnin, MA and Duprez, D. **Misexpression of Fgf-4 in the chick limb inhibits myogenesis by down-regulating Frk expression.** *Dev Biol* 2001, **233**(1): 56-71.
- Elkasrawy, MN and Hamrick, MW. **Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure.** *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010, **10**(1): 56-63.
- Epstein, JA, Shapiro, DN, Cheng, J, Lam, PY and Maas, RL. **Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(9): 4213-4218.
- Fearon, KC, Glass, DJ and Guttridge, DC. **Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways.** *Cell Metab* 2012, **16**(2): 153-166.
- Forbes, D, Jackman, M, Bishop, A, Thomas, M, Kambadur, R and Sharma, M. **Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism.** *J Cell Physiol* 2006, **206**(1): 264-272.
- Foster, K, Graham, IR, Otto, A, Foster, H, Trollet, C, Yaworsky, PJ, Walsh, FS, Bickham, D, Curtin, NA, Kavar, SL, Patel, K and Dickson, G. **Adeno-associated virus-8-mediated intravenous transfer of myostatin propeptide leads to systemic functional improvements of slow but not fast muscle.** *Rejuvenation Res* 2009, **12**(2): 85-94.

- Fujita, S, Dreyer, HC, Drummond, MJ, Glynn, EL, Cadenas, JG, Yoshizawa, F, Volpi, E and Rasmussen, BB. **Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis.** *J Physiol* 2007, **582**(Pt 2): 813-823.
- Fukada, S, Yamaguchi, M, Kokubo, H, Ogawa, R, Uezumi, A, Yoneda, T, Matev, MM, Motohashi, N, Ito, T, Zolkiewska, A, Johnson, RL, Saga, Y, Miyagoe-Suzuki, Y, Tsujikawa, K, Takeda, S and Yamamoto, H. **Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers.** *Development* 2011, **138**(21): 4609-4619.
- Gamer, LW, Cox, KA, Small, C and Rosen, V. **Gdf11 is a negative regulator of chondrogenesis and myogenesis in the developing chick limb.** *Dev Biol* 2001, **229**(2): 407-420.
- Gamer, LW, Wolfman, NM, Celeste, AJ, Hattersley, G, Hewick, R and Rosen, V. **A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in Xenopus embryos.** *Dev Biol* 1999, **208**(1): 222-232.
- Gavel, Y and von Heijne, G. **Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering.** *Protein Eng* 1990, **3**(5): 433-442.
- Ge, X, McFarlane, C, Vajjala, A, Lokireddy, S, Ng, ZH, Tan, CK, Tan, NS, Wahli, W, Sharma, M and Kambadur, R. **Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts.** *Cell Res* 2011, **21**(11): 1591-1604.
- Ge, X, Vajjala, A, McFarlane, C, Wahli, W, Sharma, M and Kambadur, R. **Lack of Smad3 signaling leads to impaired skeletal muscle regeneration.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012, **303**(1): E90-102.
- Ge, Y and Chen, J. **MicrRNAs in skeletal myogenesis.** *Cell Cycle* 2011, **10**(3): 441-448.
- Gerlach, LM, Hutson, MR, Germiller, JA, Nguyen-Luu, D, Victor, JC and Barald, KF. **Addition of the BMP4 antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development.** *Development* 2000, **127**(1): 45-54.
- Gibson, MC and Schultz, E. **The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles.** *Anat Rec* 1982, **202**(3): 329-337.
- Gilson, H, Schakman, O, Kalista, S, Lause, P, Tsuchida, K and Thissen, JP. **Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **297**(1): E157-164.
- Giordani, J, Bajard, L, Demignon, J, Daubas, P, Buckingham, M and Maire, P. **Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(27): 11310-11315.
- Girgenrath, S, Song, K and Whittemore, LA. **Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle.** *Muscle Nerve* 2005, **31**(1): 34-40.
- Glasgow, LR, Paulson, JC and Hill, RL. **Systematic purification of five glycosidases from Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae.** *J Biol Chem* 1977, **252**(23): 8615-8623.
- Glass, DJ. **Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**(10): 1974-1984.
- Glass, DJ. **PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2010, **346**: 267-278.
- Gomes, MD, Lecker, SH, Jagoe, RT, Navon, A and Goldberg, AL. **Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(25): 14440-14445.
- Gonzalez-Cadavid, NF, Taylor, WE, Yarasheski, K, Sinha-Hikim, I, Ma, K, Ezzat, S, Shen, R, Lalani, R, Asa, S, Mamita, M, Nair, G, Arver, S and Bhasin, S. **Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(25): 14938-14943.
- Goulding, M, Lumsden, A and Paquette, AJ. **Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development.** *Development* 1994, **120**(4): 957-971.
- Goulding, MD, Chalepakis, G, Deutsch, U, Erselius, JR and Gruss, P. **Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis.** *EMBO J* 1991, **10**(5): 1135-1147.

- Grifone, R, Demignon, J, Houbron, C, Souil, E, Niro, C, Seller, MJ, Hamard, G and Maire, P. **Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo.** *Development* 2005, **132**(9): 2235-2249.
- Grobet, L, Martin, LJ, Poncelet, D, Pirottin, D, Brouwers, B, Riquet, J, Schoeberlein, A, Dunner, S, Menissier, F, Massabanda, J, Fries, R, Hanset, R and Georges, M. **A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle.** *Nat Genet* 1997, **17**(1): 71-74.
- Grobet, L, Pirottin, D, Farnir, F, Poncelet, D, Royo, LJ, Brouwers, B, Christians, E, Desmecht, D, Coignoul, F, Kahn, R and Georges, M. **Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene.** *Genesis* 2003, **35**(4): 227-238.
- Gros, J, Manceau, M, Thome, V and Marcelle, C. **A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells.** *Nature* 2005, **435**(7044): 954-958.
- Gross, MK, Moran-Rivard, L, Velasquez, T, Nakatsu, MN, Jagla, K and Goulding, M. **Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb.** *Development* 2000, **127**(2): 413-424.
- Guo, K and Walsh, K. **Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F.** *J Biol Chem* 1997, **272**(2): 791-797.
- Haidet, AM, Rizo, L, Handy, C, Umapathi, P, Eagle, A, Shilling, C, Boue, D, Martin, PT, Sahenk, Z, Mendell, JR and Kaspar, BK. **Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(11): 4318-4322.
- Halevy, O, Novitsch, BG, Spicer, DB, Skapek, SX, Rhee, J, Hannon, GJ, Beach, D and Lassar, AB. **Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD.** *Science* 1995, **267**(5200): 1018-1021.
- Halevy, O, Piestun, Y, Allouh, MZ, Rosser, BW, Rinkevich, Y, Reshef, R, Rozenboim, I, Wleklinski-Lee, M and Yablonka-Reuveni, Z. **Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal.** *Dev Dyn* 2004, **231**(3): 489-502.
- Halim, A, Brinkmalm, G, Ruetschi, U, Westman-Brinkmalm, A, Portelius, E, Zetterberg, H, Blennow, K, Larson, G and Nilsson, J. **Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(29): 11848-11853.
- Hansen, JE, Lund, O, Engelbrecht, J, Bohr, H, Nielsen, JO and Hansen, JE. **Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase.** *Biochem J* 1995, **308** (Pt 3): 801-813.
- Hara, K, Yonezawa, K, Kozlowski, MT, Sugimoto, T, Andrabi, K, Weng, QP, Kasuga, M, Nishimoto, I and Avruch, J. **Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR.** *J Biol Chem* 1997, **272**(42): 26457-26463.
- Hara, K, Yonezawa, K, Weng, QP, Kozlowski, MT, Belham, C and Avruch, J. **Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism.** *J Biol Chem* 1998, **273**(23): 14484-14494.
- Hardt, SE and Sadoshima, J. **Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development.** *Circ Res* 2002, **90**(10): 1055-1063.
- Hasty, P, Bradley, A, Morris, JH, Edmondson, DG, Venuti, JM, Olson, EN and Klein, WH. **Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene.** *Nature* 1993, **364**(6437): 501-506.
- Heineke, J, Auger-Messier, M, Xu, J, Sargent, M, York, A, Welle, S and Molkentin, JD. **Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure.** *Circulation* 2010, **121**(3): 419-425.
- Helenius, A and Aebi, M. **Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum.** *Annu Rev Biochem* 2004, **73**: 1019-1049.
- Hellmuth, AE and Allbrook, DB. **Muscle satellite cell numbers during the postnatal period.** *J Anat* 1971, **110**(Pt 3): 503.
- Hennebry, A, Berry, C, Siriott, V, O'Callaghan, P, Chau, L, Watson, T, Sharma, M and Kambadur, R. **Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**(3): C525-534.

- Hildebrand, A, Romaris, M, Rasmussen, LM, Heinegard, D, Twardzik, DR, Border, WA and Ruoslahti, E. **Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.** *Biochem J* 1994, **302 (Pt 2)**: 527-534.
- Hill, JJ, Davies, MV, Pearson, AA, Wang, JH, Hewick, RM, Wolfman, NM and Qiu, Y. **The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum.** *J Biol Chem* 2002, **277(43)**: 40735-40741.
- Hill, JJ, Qiu, Y, Hewick, RM and Wolfman, NM. **Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains.** *Mol Endocrinol* 2003, **17(6)**: 1144-1154.
- Hinck, AP. **Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily.** *FEBS Lett* 2012, **586(14)**: 1860-1870.
- Hirsch, NP. **Neuromuscular junction in health and disease.** *Br J Anaesth* 2007, **99(1)**: 132-138.
- Hirsinger, E, Duprez, D, Jouve, C, Malapert, P, Cooke, J and Pourquie, O. **Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning.** *Development* 1997, **124(22)**: 4605-4614.
- Hirsinger, E, Malapert, P, Dubrulle, J, Delfini, MC, Duprez, D, Henrique, D, Ish-Horowicz, D and Pourquie, O. **Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation.** *Development* 2001, **128(1)**: 107-116.
- Hofmann, M, Schuster-Gossler, K, Watabe-Rudolph, M, Aulehla, A, Herrmann, BG and Gossler, A. **WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos.** *Genes Dev* 2004, **18(22)**: 2712-2717.
- Hofsteenge, J, Muller, DR, de Beer, T, Loffler, A, Richter, WJ and Vliegenthart, JF. **New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us.** *Biochemistry* 1994, **33(46)**: 13524-13530.
- Hoogaars, WM, Mouisel, E, Pasternack, A, Hulmi, JJ, Relizani, K, Schuelke, M, Schirwis, E, Garcia, L, Ritvos, O, Ferry, A, t Hoen, PA and Amthor, H. **Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin Type IIB receptor in mdx mice.** *Hum Gene Ther* 2012, **23(12)**: 1269-1279.
- Huang, Z, Chen, D, Zhang, K, Yu, B, Chen, X and Meng, J. **Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells.** *Cell Signal* 2007, **19(11)**: 2286-2295.
- Huang, Z, Chen, X, Yu, B, He, J and Chen, D. **MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **423(2)**: 265-269.
- Hughes, SM and Blau, HM. **Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development.** *Nature* 1990, **345(6273)**: 350-353.
- Hughes, SM, Taylor, JM, Tapscott, SJ, Gurley, CM, Carter, WJ and Peterson, CA. **Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones.** *Development* 1993, **118(4)**: 1137-1147.
- Hunter, RB and Kandarian, SC. **Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy.** *J Clin Invest* 2004, **114(10)**: 1504-1511.
- Hutcheson, DA, Zhao, J, Merrell, A, Haldar, M and Kardon, G. **Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin.** *Genes Dev* 2009, **23(8)**: 997-1013.
- Huxley, HE. **The mechanism of muscular contraction.** *Science* 1969, **164(3886)**: 1356-1365.
- Huxley, HE. **The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications.** *J Exp Biol* 1985, **115**: 17-30.
- Iozzo, RV. **The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins.** *J Biol Chem* 1999, **274(27)**: 18843-18846.
- Irintchev, A, Zeschnigk, M, Starzinski-Powitz, A and Wernig, A. **Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles.** *Dev Dyn* 1994, **199(4)**: 326-337.

- Iwasaki, S, Miyake, M, Watanabe, H, Kitagawa, E, Watanabe, K, Ohwada, S, Kitazawa, H, Rose, MT and Aso, H. **Expression of myostatin in neural cells of the olfactory system.** *Mol Neurobiol* 2013, **47**(1): 1-8.
- Iwase, H and Hotta, K. **Release of O-linked glycoprotein glycans by endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase.** *Methods Mol Biol* 1993, **14**: 151-159.
- Iyer, RP, Patterson, NL, Fields, GB and Lindsey, ML. **The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, **303**(8): H919-930.
- Jagla, K, Dolle, P, Mattei, MG, Jagla, T, Schuhbaur, B, Dretzen, G, Bellard, F and Bellard, M. **Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes.** *Mech Dev* 1995, **53**(3): 345-356.
- Jeng, SF, Rau, CS, Liliang, PC, Wu, CJ, Lu, TH, Chen, YC, Lin, CJ and Hsieh, CH. **Profiling muscle-specific microRNA expression after peripheral denervation and reinnervation in a rat model.** *J Neurotrauma* 2009, **26**(12): 2345-2353.
- Jensen, ON. **Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry.** *Curr Opin Chem Biol* 2004, **8**(1): 33-41.
- Jentoft, N. **Why are proteins O-glycosylated?** *Trends Biochem Sci* 1990, **15**(8): 291-294.
- Ji, S, Losinski, RL, Cornelius, SG, Frank, GR, Willis, GM, Gerrard, DE, Depreux, FF and Spurlock, ME. **Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation.** *Am J Physiol* 1998, **275**(4 Pt 2): R1265-1273.
- Jostes, B, Walther, C and Gruss, P. **The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system.** *Mech Dev* 1990, **33**(1): 27-37.
- Jouliia, D, Bernardi, H, Garandel, V, Rabenoelina, F, Vernus, B and Cabello, G. **Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin.** *Exp Cell Res* 2003, **286**(2): 263-275.
- Kalista, S, Schakman, O, Gilson, H, Lause, P, Demeulder, B, Bertrand, L, Pende, M and Thissen, JP. **The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy.** *Endocrinology* 2012, **153**(1): 241-253.
- Kambadur, R, Sharma, M, Smith, TP and Bass, JJ. **Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle.** *Genome Res* 1997, **7**(9): 910-916.
- Kamei, Y, Miura, S, Suzuki, M, Kai, Y, Mizukami, J, Taniguchi, T, Mochida, K, Hata, T, Matsuda, J, Aburatani, H, Nishino, I and Ezaki, O. **Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control.** *J Biol Chem* 2004, **279**(39): 41114-41123.
- Kassar-Duchossoy, L, Gayraud-Morel, B, Gomes, D, Rocancourt, D, Buckingham, M, Shinin, V and Tajbakhsh, S. **Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice.** *Nature* 2004, **431**(7007): 466-471.
- Kedar, V, McDonough, H, Arya, R, Li, HH, Rockman, HA and Patterson, C. **Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(52): 18135-18140.
- Keller, C, Hansen, MS, Coffin, CM and Capocchi, MR. **Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin.** *Genes Dev* 2004, **18**(21): 2608-2613.
- Kelly, AM. **Perisynaptic satellite cells in the developing and mature rat soleus muscle.** *Anat Rec* 1978, **190**(4): 891-903.
- Kelly, AM and Rubinstein, NA. **Why are fetal muscles slow?** *Nature* 1980, **288**(5788): 266-269.
- Kiefer, JC and Hauschka, SD. **Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV.** *Dev Biol* 2001, **232**(1): 77-90.
- Kim, HK, Lee, YS, Sivaprasad, U, Malhotra, A and Dutta, A. **Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation.** *J Cell Biol* 2006, **174**(5): 677-687.
- Kim, VN, Han, J and Siomi, MC. **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(2): 126-139.
- Kingsley, DM. **The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.** *Genes Dev* 1994, **8**(2): 133-146.

- Kishioka, Y, Thomas, M, Wakamatsu, J, Hattori, A, Sharma, M, Kambadur, R and Nishimura, T. **Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity.** *J Cell Physiol* 2008, **215**(3): 856-867.
- Kitamura, T, Kitamura, YI, Funahashi, Y, Shawber, CJ, Castrillon, DH, Kollipara, R, DePinho, RA, Kitajewski, J and Accili, D. **A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification.** *J Clin Invest* 2007, **117**(9): 2477-2485.
- Kondas, K, Szlama, G, Nagy, A, Trexler, M and Patthy, L. **Biological functions of the WAP domain-containing multidomain proteins WFIKKN1 and WFIKKN2.** *Biochem Soc Trans* 2011, **39**(5): 1416-1420.
- Kondas, K, Szlama, G, Trexler, M and Patthy, L. **Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11.** *J Biol Chem* 2008, **283**(35): 23677-23684.
- Kordes, E, Savelyeva, L, Schwab, M, Rommelaere, J, Jauniaux, JC and Cziepluch, C. **Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*.** *Genomics* 1998, **52**(1): 90-94.
- Kornfeld, R and Kornfeld, S. **Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.** *Annu Rev Biochem* 1985, **54**: 631-664.
- Kota, J, Handy, CR, Haidet, AM, Montgomery, CL, Eagle, A, Rodino-Klapac, LR, Tucker, D, Shilling, CJ, Therlfall, WR, Walker, CM, Weisbrode, SE, Janssen, PM, Clark, KR, Sahenk, Z, Mendell, JR and Kaspar, BK. **Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates.** *Sci Transl Med* 2009, **1**(6): 6ra15.
- Krauss, RS, Cole, F, Gaio, U, Takaesu, G, Zhang, W and Kang, JS. **Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 11): 2355-2362.
- Krol, AJ, Roellig, D, Dequeant, ML, Tassy, O, Glynn, E, Hattem, G, Mushegian, A, Oates, AC and Pourquie, O. **Evolutionary plasticity of segmentation clock networks.** *Development* 2011, **138**(13): 2783-2792.
- Kuang, S, Charge, SB, Seale, P, Huh, M and Rudnicki, MA. **Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis.** *J Cell Biol* 2006, **172**(1): 103-113.
- Kuang, S, Kuroda, K, Le Grand, F and Rudnicki, MA. **Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle.** *Cell* 2007, **129**(5): 999-1010.
- Kuratani, S. **Is the vertebrate head segmented?-evolutionary and developmental considerations.** *Integr Comp Biol* 2008, **48**(5): 647-657.
- Langley, B, Thomas, M, Bishop, A, Sharma, M, Gilmour, S and Kambadur, R. **Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression.** *J Biol Chem* 2002, **277**(51): 49831-49840.
- Laplante, M and Sabatini, DM. **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell* 2012, **149**(2): 274-293.
- Lassar, AB, Buskin, JN, Lockshon, D, Davis, RL, Apone, S, Hauschka, SD and Weintraub, H. **MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer.** *Cell* 1989, **58**(5): 823-831.
- Laurentino, GC, Ugrinowitsch, C, Roschel, H, Aoki, MS, Soares, AG, Neves, M, Jr., Aihara, AY, Fernandes Ada, R and Tricoli, V. **Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression.** *Med Sci Sports Exerc* 2012, **44**(3): 406-412.
- Lazaro, JB, Bailey, PJ and Lassar, AB. **Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation.** *Genes Dev* 2002, **16**(14): 1792-1805.
- Le Grand, F, Grifone, R, Mourikis, P, Houbron, C, Gigaud, C, Pujol, J, Maillet, M, Pages, G, Rudnicki, M, Tajbakhsh, S and Maire, P. **Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration.** *J Cell Biol* 2012, **198**(5): 815-832.
- Lee, SJ. **Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways.** *PLoS One* 2007a, **2**(8): e789.
- Lee, SJ. **Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess.** *Trends Genet* 2007b, **23**(10): 475-477.
- Lee, SJ. **Extracellular Regulation of Myostatin: A Molecular Rheostat for Muscle Mass.** *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2010, **10**: 183-194.

- Lee, SJ, Huynh, TV, Lee, YS, Sebald, SM, Wilcox-Adelman, SA, Iwamori, N, Lepper, C, Matzuk, MM and Fan, CM. **Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(35): E2353-2360.
- Lee, SJ and McPherron, AC. **Myostatin and the control of skeletal muscle mass.** *Curr Opin Genet Dev* 1999, **9**(5): 604-607.
- Lee, SJ and McPherron, AC. **Regulation of myostatin activity and muscle growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(16): 9306-9311.
- Lee, SJ, Reed, LA, Davies, MV, Girgenrath, S, Goad, ME, Tomkinson, KN, Wright, JF, Barker, C, Ehrmantraut, G, Holmstrom, J, Trowell, B, Gertz, B, Jiang, MS, Sebald, SM, Matzuk, M, Li, E, Liang, LF, Quattlebaum, E, Stotish, RL and Wolfman, NM. **Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(50): 18117-18122.
- Lee, YS and Lee, SJ. **Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013.
- Lepper, C, Conway, SJ and Fan, CM. **Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements.** *Nature* 2009, **460**(7255): 627-631.
- Lepper, C, Partridge, TA and Fan, CM. **An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration.** *Development* 2011, **138**(17): 3639-3646.
- Li, Y, Li, J, Zhu, J, Sun, B, Branca, M, Tang, Y, Foster, W, Xiao, X and Huard, J. **Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration.** *Mol Ther* 2007, **15**(9): 1616-1622.
- Liepinsh, E, Nagy, A, Trexler, M, Patthy, L and Otting, G. **Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein.** *J Biomol NMR* 2006, **35**(1): 73-78.
- Lin, J, Arnold, HB, Della-Fera, MA, Azain, MJ, Hartzell, DL and Baile, CA. **Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **291**(3): 701-706.
- Liu, D, Black, BL and Derynck, R. **TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3.** *Genes Dev* 2001, **15**(22): 2950-2966.
- Liu, HH, Wang, JW, Zhang, RP, Chen, X, Yu, HY, Jin, HB, Li, L, Han, CC, Xu, F, Kang, B, He, H and Xu, HY. **In ovo feeding of IGF-1 to ducks influences neonatal skeletal muscle hypertrophy and muscle mass growth upon satellite cell activation.** *J Cell Physiol* 2012, **227**(4): 1465-1475.
- Liu, JP, Baker, J, Perkins, AS, Robertson, EJ and Efstratiadis, A. **Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r).** *Cell* 1993, **75**(1): 59-72.
- Lokireddy, S, Wijesoma, IW, Bonala, S, Wei, M, Sze, SK, McFarlane, C, Kambadur, R and Sharma, M. **Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia.** *Biochem J* 2012, **446**(1): 23-36.
- Lu, L, Zhou, L, Chen, EZ, Sun, K, Jiang, P, Wang, L, Su, X, Sun, H and Wang, H. **A Novel YY1-miR-1 regulatory circuit in skeletal myogenesis revealed by genome-wide prediction of YY1-miRNA network.** *PLoS One* 2012, **7**(2): e27596.
- Luo, W, Nie, Q and Zhang, X. **MicroRNAs Involved in Skeletal Muscle Differentiation.** *J Genet Genomics* 2013, **40**(3): 107-116.
- Ma, K, Mallidis, C, Artaza, J, Taylor, W, Gonzalez-Cadavid, N and Bhasin, S. **Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **281**(6): E1128-1136.
- Ma, K, Mallidis, C, Bhasin, S, Mahabadi, V, Artaza, J, Gonzalez-Cadavid, N, Arias, J and Salehian, B. **Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **285**(2): E363-371.
- Mammucari, C, Milan, G, Romanello, V, Masiero, E, Rudolf, R, Del Piccolo, P, Burden, SJ, Di Lisi, R, Sandri, C, Zhao, J, Goldberg, AL, Schiaffino, S and Sandri, M. **FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo.** *Cell Metab* 2007, **6**(6): 458-471.
- Manceau, M, Gros, J, Savage, K, Thome, V, McPherron, A, Paterson, B and Marcelle, C. **Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors.** *Genes Dev* 2008, **22**(5): 668-681.

- Manning, BD and Cantley, LC. **AKT/PKB signaling: navigating downstream.** *Cell* 2007, **129**(7): 1261-1274.
- Marcelle, C, Stark, MR and Bronner-Fraser, M. **Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite.** *Development* 1997, **124**(20): 3955-3963.
- Marth, JD and Grewal, PK. **Mammalian glycosylation in immunity.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**(11): 874-887.
- Mason, P, Bayol, S and Loughna, PT. **The novel sarcomeric protein telethonin exhibits developmental and functional regulation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **257**(3): 699-703.
- Massague, J. **TGF-beta signal transduction.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**: 753-791.
- Matsakas, A, Foster, K, Otto, A, Macharia, R, Elashry, MI, Feist, S, Graham, I, Foster, H, Yaworsky, P, Walsh, F, Dickson, G and Patel, K. **Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice.** *Neuromuscul Disord* 2009, **19**(7): 489-499.
- Matsakas, A, Otto, A, Elashry, MI, Brown, SC and Patel, K. **Altered primary and secondary myogenesis in the myostatin-null mouse.** *Rejuvenation Res* 2010, **13**(6): 717-727.
- Matzuk, MM, Lu, N, Vogel, H, Sellheyer, K, Roop, DR and Bradley, A. **Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin.** *Nature* 1995, **374**(6520): 360-363.
- Mauro, A. **Satellite cell of skeletal muscle fibers.** *J Biophys Biochem Cytol* 1961, **9**: 493-495.
- Mavalli, MD, DiGirolamo, DJ, Fan, Y, Riddle, RC, Campbell, KS, van Groen, T, Frank, SJ, Sperling, MA, Esser, KA, Bamman, MM and Clemens, TL. **Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice.** *J Clin Invest* 2010, **120**(11): 4007-4020.
- McCarthy, JJ, Esser, KA, Peterson, CA and Dupont-Versteegden, EE. **Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy.** *Physiol Genomics* 2009, **39**(3): 219-226.
- McCroskery, S, Thomas, M, Maxwell, L, Sharma, M and Kambadur, R. **Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal.** *J Cell Biol* 2003, **162**(6): 1135-1147.
- McCullagh, KJ, Calabria, E, Pallafacchina, G, Ciciliot, S, Serrano, AL, Argentini, C, Kalhovde, JM, Lomo, T and Schiaffino, S. **NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(29): 10590-10595.
- McFarlane, C, Hennebry, A, Thomas, M, Plummer, E, Ling, N, Sharma, M and Kambadur, R. **Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal.** *Exp Cell Res* 2008, **314**(2): 317-329.
- McFarlane, C, Plummer, E, Thomas, M, Hennebry, A, Ashby, M, Ling, N, Smith, H, Sharma, M and Kambadur, R. **Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism.** *J Cell Physiol* 2006, **209**(2): 501-514.
- McPherron, AC. **Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11.** *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2010, **10**(4): 217-231.
- McPherron, AC, Huynh, TV and Lee, SJ. **Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function.** *BMC Dev Biol* 2009, **9**: 24.
- McPherron, AC, Lawler, AM and Lee, SJ. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.** *Nature* 1997, **387**(6628): 83-90.
- McPherron, AC, Lawler, AM and Lee, SJ. **Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11.** *Nat Genet* 1999, **22**(3): 260-264.
- McPherron, AC and Lee, SJ. **Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(23): 12457-12461.
- McPherron, AC and Lee, SJ. **Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice.** *J Clin Invest* 2002, **109**(5): 595-601.
- Megeney, LA, Kablar, B, Garrett, K, Anderson, JE and Rudnicki, MA. **MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle.** *Genes Dev* 1996, **10**(10): 1173-1183.

- Menconi, M, Fareed, M, O'Neal, P, Poylin, V, Wei, W and Hasselgren, PO. **Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting.** *Crit Care Med* 2007, **35**(9 Suppl): S602-608.
- Mendias, CL, Bakhurin, KI and Faulkner, JA. **Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(1): 388-393.
- Metzger, D and Chambon, P. **Site- and time-specific gene targeting in the mouse.** *Methods* 2001, **24**(1): 71-80.
- Miretti, S, Martignani, E, Accornero, P and Baratta, M. **Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in piedmontese cattle with double-muscléd phenotype.** *BMC Genomics* 2013, **14**: 194.
- Mitchell, PJ, Johnson, SE and Hannon, K. **Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb.** *Dev Dyn* 2002, **223**(1): 12-23.
- Miura, T, Kishioka, Y, Wakamatsu, J, Hattori, A, Hennebry, A, Berry, CJ, Sharma, M, Kambadur, R and Nishimura, T. **Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **340**(2): 675-680.
- Molkentin, JD, Black, BL, Martin, JF and Olson, EN. **Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins.** *Cell* 1995, **83**(7): 1125-1136.
- Monestier, O, Brun, C, Cocquempot, O, Petit, D and Blanquet, V. **GASP/WFIKKN proteins: evolutionary aspects of their functions.** *PLoS One* 2012a, **7**(8): e43710.
- Monestier, O, Brun, C, Heu, K, Passet, B, Malhouroux, M, Magnol, L, Vilotte, JL and Blanquet, V. **Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype.** *BMC Genomics* 2012b, **13**(1): 541.
- Montarras, D, Chelly, J, Bober, E, Arnold, H, Ott, MO, Gros, F and Pinset, C. **Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis.** *New Biol* 1991, **3**(6): 592-600.
- Montarras, D, L'Honore, A and Buckingham, M. **Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell.** *FEBS J* 2013.
- Montarras, D, Morgan, J, Collins, C, Relaix, F, Zaffran, S, Cumano, A, Partridge, T and Buckingham, M. **Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration.** *Science* 2005, **309**(5743): 2064-2067.
- Mootoosamy, RC and Dietrich, S. **Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis.** *Development* 2002, **129**(3): 573-583.
- Morissette, MR, Cook, SA, Foo, S, McKoy, G, Ashida, N, Novikov, M, Scherrer-Crosbie, M, Li, L, Matsui, T, Brooks, G and Rosenzweig, A. **Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling.** *Circ Res* 2006, **99**(1): 15-24.
- Moss, FP and Leblond, CP. **Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats.** *Anat Rec* 1971, **170**(4): 421-435.
- Mourikis, P, Sambasivan, R, Castel, D, Rocheteau, P, Bizzarro, V and Tajbakhsh, S. **A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state.** *Stem Cells* 2012, **30**(2): 243-252.
- Mukherjee, A, Sidis, Y, Mahan, A, Raheer, MJ, Xia, Y, Rosen, ED, Bloch, KD, Thomas, MK and Schneyer, AL. **FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(4): 1348-1353.
- Murphy, MM, Lawson, JA, Mathew, SJ, Hutcheson, DA and Kardon, G. **Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration.** *Development* 2011, **138**(17): 3625-3637.
- Murray, AW. **Recycling the cell cycle: cyclins revisited.** *Cell* 2004, **116**(2): 221-234.
- Musaro, A, McCullagh, K, Paul, A, Houghton, L, Dobrowolny, G, Molinaro, M, Barton, ER, Sweeney, HL and Rosenthal, N. **Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle.** *Nat Genet* 2001, **27**(2): 195-200.
- Nagy, A, Trexler, M and Patthy, L. **Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein.** *Eur J Biochem* 2003, **270**(9): 2101-2107.

- Nakatani, M, Takehara, Y, Sugino, H, Matsumoto, M, Hashimoto, O, Hasegawa, Y, Murakami, T, Uezumi, A, Takeda, S, Noji, S, Sunada, Y and Tsuchida, K. **Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice.** *FASEB J* 2008, **22**(2): 477-487.
- Nevins, JR. **E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins.** *Science* 1992, **258**(5081): 424-429.
- Nicholas, G, Thomas, M, Langley, B, Somers, W, Patel, K, Kemp, CF, Sharma, M and Kambadur, R. **Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin.** *J Cell Physiol* 2002, **193**(1): 120-131.
- Nishida, AT, Kobuke, K, Kojima, K, Ito, J, Honjo, T and Tashiro, K. **OC29 is preferentially expressed in the presumptive sensory organ region of the otocyst.** *Dev Dyn* 2004, **231**(4): 766-774.
- Nishimori, I, Johnson, NR, Sanderson, SD, Perini, F, Mountjoy, K, Cerny, RL, Gross, ML and Hollingsworth, MA. **Influence of acceptor substrate primary amino acid sequence on the activity of human UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Studies with the MUC1 tandem repeat.** *J Biol Chem* 1994, **269**(23): 16123-16130.
- Noden, DM and Francis-West, P. **The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles.** *Dev Dyn* 2006, **235**(5): 1194-1218.
- O'Connor, RS and Pavlath, GK. **Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy.** *J Appl Physiol* 2007, **103**(3): 1099-1100.
- O'Rourke, JR, Georges, SA, Seay, HR, Tapscott, SJ, McManus, MT, Goldhamer, DJ, Swanson, MS and Harfe, BD. **Essential role for Dicer during skeletal muscle development.** *Dev Biol* 2007, **311**(2): 359-368.
- Olguin, HC and Olwin, BB. **Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal.** *Dev Biol* 2004, **275**(2): 375-388.
- Olson, EN and Klein, WH. **bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out.** *Genes Dev* 1994, **8**(1): 1-8.
- Ontell, M and Kozeka, K. **The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study.** *Am J Anat* 1984, **171**(2): 133-148.
- Ordahl, CP, Berdougo, E, Venters, SJ and Denetclaw, WF, Jr. **The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium.** *Development* 2001, **128**(10): 1731-1744.
- Ott, MO, Bober, E, Lyons, G, Arnold, H and Buckingham, M. **Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo.** *Development* 1991, **111**(4): 1097-1107.
- Ottenheijm, CA, Heunks, LM and Dekhuijzen, RP. **Diaphragm adaptations in patients with COPD.** *Respir Res* 2008, **9**: 12.
- Otto, A, Schmidt, C and Patel, K. **Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo.** *Anat Embryol (Berl)* 2006, **211**(4): 293-310.
- Pallafacchina, G, Blaauw, B and Schiaffino, S. **Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012.
- Pallafacchina, G, Francois, S, Regnault, B, Czarny, B, Dive, V, Cumano, A, Montarras, D and Buckingham, M. **An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells.** *Stem Cell Res* 2010, **4**(2): 77-91.
- Palmeirim, I, Henrique, D, Ish-Horowicz, D and Pourquie, O. **Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis.** *Cell* 1997, **91**(5): 639-648.
- Pannerec, A, Formicola, L, Besson, V, Marazzi, G and Sassoon, DA. **Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials.** *Development* 2013, **140**(14): 2879-2891.
- Pannerec, A, Marazzi, G and Sassoon, D. **Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche.** *Trends Mol Med* 2012, **18**(10): 599-606.
- Pasut, A, Jones, AE and Rudnicki, MA. **Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle.** *J Vis Exp* 2013, (73): e50074.

- Patel, K. **Follistatin**. *Int J Biochem Cell Biol* 1998, **30**(10): 1087-1093.
- Pavlati, GK and Horsley, V. **Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size**. *Cell Cycle* 2003, **2**(5): 420-423.
- Peterson, JM, Bakkar, N and Guttridge, DC. **NF-kappaB signaling in skeletal muscle health and disease**. *Curr Top Dev Biol* 2011, **96**: 85-119.
- Pette, D and Staron, RS. **Transitions of muscle fiber phenotypic profiles**. *Histochem Cell Biol* 2001, **115**(5): 359-372.
- Philip, B, Lu, Z and Gao, Y. **Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK**. *Cell Signal* 2005, **17**(3): 365-375.
- Polge, C, Heng, AE, Jarzaguet, M, Ventadour, S, Claustre, A, Combaret, L, Bechet, D, Matondo, M, Uttenweiler-Joseph, S, Monsarrat, B, Attaix, D and Taillandier, D. **Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1**. *FASEB J* 2011, **25**(11): 3790-3802.
- Potthoff, MJ, Wu, H, Arnold, MA, Shelton, JM, Backs, J, McAnally, J, Richardson, JA, Bassel-Duby, R and Olson, EN. **Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers**. *J Clin Invest* 2007, **117**(9): 2459-2467.
- Pourquie, O. **Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis**. *Cell* 2011, **145**(5): 650-663.
- Pourquie, O, Coltey, M, Breant, C and Le Douarin, NM. **Control of somite patterning by signals from the lateral plate**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(8): 3219-3223.
- Qiao, C, Li, J, Jiang, J, Zhu, X, Wang, B, Li, J and Xiao, X. **Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice**. *Hum Gene Ther* 2008, **19**(3): 241-254.
- Qiao, C, Li, J, Zheng, H, Bogan, J, Li, J, Yuan, Z, Zhang, C, Bogan, D, Kornegay, J and Xiao, X. **Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth**. *Hum Gene Ther* 2009, **20**(1): 1-10.
- Rachagani, S, Cheng, Y and Reecy, JM. **Myostatin genotype regulates muscle-specific miRNA expression in mouse pectoralis muscle**. *BMC Res Notes* 2010, **3**: 297.
- Rando, TA and Blau, HM. **Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy**. *J Cell Biol* 1994, **125**(6): 1275-1287.
- Rao, PK, Kumar, RM, Farkhondeh, M, Baskerville, S and Lodish, HF. **Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(23): 8721-8726.
- Rawlings, ND, Tolle, DP and Barrett, AJ. **Evolutionary families of peptidase inhibitors**. *Biochem J* 2004, **378**(Pt 3): 705-716.
- Reisz-Porszasz, S, Bhasin, S, Artaza, JN, Shen, R, Sinha-Hikim, I, Hogue, A, Fielder, TJ and Gonzalez-Cadavid, NF. **Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **285**(4): E876-888.
- Relaix, F, Demignon, J, Laclef, C, Pujol, J, Santolini, M, Niro, C, Lagha, M, Rocancourt, D, Buckingham, M and Maire, P. **Six homeoproteins directly activate Myod expression in the gene regulatory networks that control early myogenesis**. *PLoS Genet* 2013, **9**(4): e1003425.
- Relaix, F and Zammit, PS. **Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage**. *Development* 2012, **139**(16): 2845-2856.
- Reynaud, EG, Leibovitch, MP, Tintignac, LA, Pospel, K, Guillier, M and Leibovitch, SA. **Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2)**. *J Biol Chem* 2000, **275**(25): 18767-18776.
- Rhodes, SJ and Konieczny, SF. **Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family**. *Genes Dev* 1989, **3**(12B): 2050-2061.
- Rifkin, DB. **Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability**. *J Biol Chem* 2005, **280**(9): 7409-7412.

- Rios, R, Carneiro, I, Arce, VM and Devesa, J. **Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **280**(2): 561-566.
- Rios, R, Carneiro, I, Arce, VM and Devesa, J. **Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **282**(5): C993-999.
- Riquelme, C, Larrain, J, Schonherr, E, Henriquez, JP, Kresse, H and Brandan, E. **Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation.** *J Biol Chem* 2001, **276**(5): 3589-3596.
- Rochat, A, Fernandez, A, Vandromme, M, Moles, JP, Bouchet, T, Carnac, G and Lamb, NJ. **Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**(10): 4544-4555.
- Rocheteau, P, Gayraud-Morel, B, Siegl-Cachedenier, I, Blasco, MA and Tajbakhsh, S. **A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division.** *Cell* 2012, **148**(1-2): 112-125.
- Rodino-Klapac, LR, Haidet, AM, Kota, J, Handy, C, Kaspar, BK and Mendell, JR. **Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease.** *Muscle Nerve* 2009, **39**(3): 283-296.
- Romanick, M, Thompson, LV and Brown-Borg, HM. **Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1832**(9): 1410-1420.
- Rommel, C, Bodine, SC, Clarke, BA, Rossmann, R, Nunez, L, Stitt, TN, Yancopoulos, GD and Glass, DJ. **Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(11): 1009-1013.
- Rudnicki, MA, Braun, T, Hinuma, S and Jaenisch, R. **Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development.** *Cell* 1992, **71**(3): 383-390.
- Rudnicki, MA and Jaenisch, R. **The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis.** *Bioessays* 1995, **17**(3): 203-209.
- Rudnicki, MA, Schnegelsberg, PN, Stead, RH, Braun, T, Arnold, HH and Jaenisch, R. **MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle.** *Cell* 1993, **75**(7): 1351-1359.
- Sabourin, LA and Rudnicki, MA. **The molecular regulation of myogenesis.** *Clin Genet* 2000, **57**(1): 16-25.
- Sachs, M, Brohmann, H, Zechner, D, Muller, T, Hulsken, J, Walther, I, Schaeper, U, Birchmeier, C and Birchmeier, W. **Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo.** *J Cell Biol* 2000, **150**(6): 1375-1384.
- Saharinen, J, Hyytiainen, M, Taipale, J and Keski-Oja, J. **Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1999, **10**(2): 99-117.
- Salehian, B, Mahabadi, V, Bilas, J, Taylor, WE and Ma, K. **The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression.** *Metabolism* 2006, **55**(9): 1239-1247.
- Salerno, MS, Thomas, M, Forbes, D, Watson, T, Kambadur, R and Sharma, M. **Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **287**(4): C1031-1040.
- Sambasivan, R, Gayraud-Morel, B, Dumas, G, Cimper, C, Paisant, S, Kelly, RG and Tajbakhsh, S. **Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates.** *Dev Cell* 2009, **16**(6): 810-821.
- Sambasivan, R, Kuratani, S and Tajbakhsh, S. **An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles.** *Development* 2011a, **138**(12): 2401-2415.
- Sambasivan, R, Yao, R, Kissenpfennig, A, Van Wittenberghe, L, Paldi, A, Gayraud-Morel, B, Guenou, H, Malissen, B, Tajbakhsh, S and Galy, A. **Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration.** *Development* 2011b, **138**(17): 3647-3656.
- Sandri, M. **Signaling in muscle atrophy and hypertrophy.** *Physiology (Bethesda)* 2008, **23**: 160-170.

- Sandri, M, Sandri, C, Gilbert, A, Skurk, C, Calabria, E, Picard, A, Walsh, K, Schiaffino, S, Lecker, SH and Goldberg, AL. **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** *Cell* 2004, **117**(3): 399-412.
- Sanger, JW, Wang, J, Fan, Y, White, J and Sanger, JM. **Assembly and dynamics of myofibrils.** *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**: 858606.
- Saremi, A, Gharakhanloo, R, Sharghi, S, Gharaati, MR, Larijani, B and Omidfar, K. **Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1.** *Mol Cell Endocrinol* 2010, **317**(1-2): 25-30.
- Sartorelli, V and Fulco, M. **Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy.** *Sci STKE* 2004, **2004**(244): re11.
- Sartori, R, Milan, G, Patron, M, Mammucari, C, Blaauw, B, Abraham, R and Sandri, M. **Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**(6): C1248-1257.
- Sartori, R, Schirwis, E, Blaauw, B, Bortolanza, S, Zhao, J, Enzo, E, Stantzou, A, Mouisel, E, Toniolo, L, Ferry, A, Stricker, S, Goldberg, AL, Dupont, S, Piccolo, S, Amthor, H and Sandri, M. **BMP signaling controls muscle mass.** *Nat Genet* 2013.
- Sassoon, D, Lyons, G, Wright, WE, Lin, V, Lassar, A, Weintraub, H and Buckingham, M. **Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis.** *Nature* 1989, **341**(6240): 303-307.
- Schaefer, L, Tsalasra, W, Babelova, A, Baliova, M, Minnerup, J, Sorokin, L, Grone, HJ, Reinhardt, DP, Pfeilschifter, J, Iozzo, RV and Schaefer, RM. **Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin.** *Am J Pathol* 2007, **170**(1): 301-315.
- Schafer, K and Braun, T. **Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h.** *Nat Genet* 1999, **23**(2): 213-216.
- Schakman, O, Gilson, H, de Coninck, V, Lause, P, Verniers, J, Havaux, X, Ketelslegers, JM and Thissen, JP. **Insulin-like growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats.** *Endocrinology* 2005, **146**(4): 1789-1797.
- Schakman, O, Gilson, H and Thissen, JP. **Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy.** *J Endocrinol* 2008, **197**(1): 1-10.
- Schiaffino, S, Dyar, KA, Ciciliot, S, Blaauw, B and Sandri, M. **Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy.** *FEBS J* 2013, **280**(17): 4294-4314.
- Schiaffino, S and Mammucari, C. **Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models.** *Skelet Muscle* 2011, **1**(1): 4.
- Schiaffino, S and Reggiani, C. **Fiber types in mammalian skeletal muscles.** *Physiol Rev* 2011, **91**(4): 1447-1531.
- Schienda, J, Engleka, KA, Jun, S, Hansen, MS, Epstein, JA, Tabin, CJ, Kunkel, LM and Kardon, G. **Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(4): 945-950.
- Schjoldager, KT and Clausen, H. **Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - Deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1820**(12): 2079-2094.
- Schneyer, A, Tortoriello, D, Sidis, Y, Keutmann, H, Matsuzaki, T and Holmes, W. **Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **180**(1-2): 33-38.
- Schneyer, AL, Wang, Q, Sidis, Y and Sluss, PM. **Differential distribution of follistatin isoforms: application of a new FS315-specific immunoassay.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(10): 5067-5075.
- Schonherr, E, Sunderkotter, C, Iozzo, RV and Schaefer, L. **Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system.** *J Biol Chem* 2005, **280**(16): 15767-15772.
- Schuelke, M, Wagner, KR, Stolz, LE, Hubner, C, Riebel, T, Komen, W, Braun, T, Tobin, JF and Lee, SJ. **Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.** *N Engl J Med* 2004, **350**(26): 2682-2688.
- Schultz, E. **Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration.** *Med Sci Sports Exerc* 1989, **21**(5 Suppl): S181-186.

- Schultz, E. **Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles.** *Dev Biol* 1996, **175**(1): 84-94.
- Schultz, E, Gibson, MC and Champion, T. **Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study.** *J Exp Zool* 1978, **206**(3): 451-456.
- Schuster-Gossler, K, Cordes, R and Gossler, A. **Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(2): 537-542.
- Seale, P, Sabourin, LA, Girgis-Gabardo, A, Mansouri, A, Gruss, P and Rudnicki, MA. **Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells.** *Cell* 2000, **102**(6): 777-786.
- Semenov, AG, Postnikov, AB, Tamm, NN, Seferian, KR, Karpova, NS, Bloschchitsyna, MN, Koshkina, EV, Krasnoselsky, MI, Serebryanaya, DV and Katrukha, AG. **Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site.** *Clin Chem* 2009, **55**(3): 489-498.
- Seok, HY, Tatsuguchi, M, Callis, TE, He, A, Pu, WT and Wang, DZ. **miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation.** *J Biol Chem* 2011, **286**(41): 35339-35346.
- Sharma, M, Kambadur, R, Matthews, KG, Somers, WG, Devlin, GP, Conaglen, JV, Fowke, PJ and Bass, JJ. **Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct.** *J Cell Physiol* 1999, **180**(1): 1-9.
- Shavlakadze, T, Chai, J, Maley, K, Cozens, G, Grounds, G, Winn, N, Rosenthal, N and Grounds, MD. **A growth stimulus is needed for IGF-1 to induce skeletal muscle hypertrophy in vivo.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 6): 960-971.
- Shelton, GD and Engvall, E. **Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene.** *Neuromuscul Disord* 2007, **17**(9-10): 721-722.
- Shibuya, N, Goldstein, IJ, Broekaert, WF, Nsimba-Lubaki, M, Peeters, B and Peumans, WJ. **The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence.** *J Biol Chem* 1987, **262**(4): 1596-1601.
- Shih, HP, Gross, MK and Kioussi, C. **Muscle development: forming the head and trunk muscles.** *Acta Histochem* 2008, **110**(2): 97-108.
- Shimasaki, S, Koga, M, Esch, F, Mercado, M, Cooksey, K, Koba, A and Ling, N. **Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing.** *Biochem Biophys Res Commun* 1988, **152**(2): 717-723.
- Silberstein, S and Gilmore, R. **Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase.** *FASEB J* 1996, **10**(8): 849-858.
- Skropeta, D. **The effect of individual N-glycans on enzyme activity.** *Bioorg Med Chem* 2009, **17**(7): 2645-2653.
- Smith, C, Kruger, MJ, Smith, RM and Myburgh, KH. **The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities.** *Sports Med* 2008, **38**(11): 947-969.
- Snow, MH. **A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse.** *Anat Rec* 1983, **207**(4): 593-604.
- Soriano, P. **Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.** *Nat Genet* 1999, **21**(1): 70-71.
- Souza, TA, Chen, X, Guo, Y, Sava, P, Zhang, J, Hill, JJ, Yaworsky, PJ and Qiu, Y. **Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators.** *Mol Endocrinol* 2008, **22**(12): 2689-2702.
- Spiller, MP, Kambadur, R, Jeanplong, F, Thomas, M, Martyn, JK, Bass, JJ and Sharma, M. **The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(20): 7066-7082.
- Spiro, RG. **Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens.** *J Biol Chem* 1969, **244**(4): 602-612.
- Stark, DA, Karvas, RM, Siegel, AL and Cornelison, DD. **Eph/ephrin interactions modulate muscle satellite cell motility and patterning.** *Development* 2011, **138**(24): 5279-5289.

- Stavaux, D, Art, T, McEntee, K, Reznick, M and Lekeux, P. **Muscle fibre type and size, and muscle capillary density in young double-muscled blue Belgian cattle.** *Zentralbl Veterinarmed A* 1994, **41**(3): 229-236.
- Steenoft, C, Vakhrushev, SY, Joshi, HJ, Kong, Y, Vester-Christensen, MB, Schjoldager, KT, Lavrsen, K, Dabelsteen, S, Pedersen, NB, Marcos-Silva, L, Gupta, R, Bennett, EP, Mandel, U, Brunak, S, Wandall, HH, Lavery, SB and Clausen, H. **Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology.** *EMBO J* 2013, **32**(10): 1478-1488.
- Stitt, TN, Drujan, D, Clarke, BA, Panaro, F, Timofeyeva, Y, Kline, WO, Gonzalez, M, Yancopoulos, GD and Glass, DJ. **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Mol Cell* 2004, **14**(3): 395-403.
- Szlama, G, Kondas, K, Trexler, M and Patthy, L. **WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFbeta1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity.** *FEBS J* 2010, **277**(24): 5040-5050.
- Szlama, G, Trexler, M and Patthy, L. **Latent myostatin has significant activity and this activity is controlled more efficiently by WFIKKN1 than by WFIKKN2.** *FEBS J* 2013.
- Tajbakhsh, S. **Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle.** *Curr Opin Genet Dev* 2003, **13**(4): 413-422.
- Tajbakhsh, S, Borello, U, Vivarelli, E, Kelly, R, Papkoff, J, Duprez, D, Buckingham, M and Cossu, G. **Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5.** *Development* 1998, **125**(21): 4155-4162.
- Tajbakhsh, S, Rocancourt, D, Cossu, G and Buckingham, M. **Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD.** *Cell* 1997, **89**(1): 127-138.
- Tajbakhsh, S, Rocheteau, P and Le Roux, I. **Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009, **25**: 671-699.
- Tapscott, SJ and Weintraub, H. **MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins.** *J Clin Invest* 1991, **87**(4): 1133-1138.
- Tarentino, AL and Plummer, TH, Jr. **Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum.** *Methods Enzymol* 1994, **230**: 44-57.
- Taylor, WE, Bhasin, S, Artaza, J, Byhower, F, Azam, M, Willard, DH, Jr., Kull, FC, Jr. and Gonzalez-Cadavid, N. **Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **280**(2): E221-228.
- Thies, RS, Chen, T, Davies, MV, Tomkinson, KN, Pearson, AA, Shakey, QA and Wolfman, NM. **GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding.** *Growth Factors* 2001, **18**(4): 251-259.
- Thomas, M, Langley, B, Berry, C, Sharma, M, Kirk, S, Bass, J and Kambadur, R. **Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation.** *J Biol Chem* 2000, **275**(51): 40235-40243.
- Tian, E and Ten Hagen, KG. **Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation.** *Glycoconj J* 2009, **26**(3): 325-334.
- Tintignac, LA, Lagirand, J, Batonnet, S, Sirri, V, Leibovitch, MP and Leibovitch, SA. **Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase.** *J Biol Chem* 2005, **280**(4): 2847-2856.
- Tintignac, LA, Leibovitch, MP, Kitzmann, M, Fernandez, A, Ducommun, B, Meijer, L and Leibovitch, SA. **Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells.** *Exp Cell Res* 2000, **259**(1): 300-307.
- Trendelenburg, AU, Meyer, A, Rohner, D, Boyle, J, Hatakeyama, S and Glass, DJ. **Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**(6): C1258-1270.
- Trexler, M, Banyai, L and Patthy, L. **A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(7): 3705-3709.
- Trexler, M, Banyai, L and Patthy, L. **Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules.** *Biol Chem* 2002, **383**(1): 223-228.

- Trombetta, ES and Parodi, AJ. **Quality control and protein folding in the secretory pathway.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003, **19**: 649-676.
- Tsuchida, K, Arai, KY, Kuramoto, Y, Yamakawa, N, Hasegawa, Y and Sugino, H. **Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family.** *J Biol Chem* 2000, **275**(52): 40788-40796.
- Turk, B. **Targeting proteases: successes, failures and future prospects.** *Nat Rev Drug Discov* 2006, **5**(9): 785-799.
- Uchida, Y, Tsukada, Y and Sugimori, T. **Distribution of neuraminidase in Arthrobacter and its purification by affinity chromatography.** *J Biochem* 1977, **82**(5): 1425-1433.
- Uchiyama, K, Ishikawa, A and Hanaoka, K. **Expression of Ibx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo.** *J Exp Zool* 2000, **286**(3): 270-279.
- Uehara, Y, Minowa, O, Mori, C, Shiota, K, Kuno, J, Noda, T and Kitamura, N. **Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor.** *Nature* 1995, **373**(6516): 702-705.
- Ueno, N, Ling, N, Ying, SY, Esch, F, Shimasaki, S and Guillemin, R. **Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(23): 8282-8286.
- Valle, G, Faulkner, G, De Antoni, A, Pacchioni, B, Pallavicini, A, Pandolfo, D, Tiso, N, Toppo, S, Trevisan, S and Lanfranchi, G. **Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle.** *FEBS Lett* 1997, **415**(2): 163-168.
- van Rooij, E, Quiat, D, Johnson, BA, Sutherland, LB, Qi, X, Richardson, JA, Kelm, RJ, Jr. and Olson, EN. **A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance.** *Dev Cell* 2009, **17**(5): 662-673.
- Vandenburgh, HH, Karlisch, P, Shansky, J and Feldstein, R. **Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture.** *Am J Physiol* 1991, **260**(3 Pt 1): C475-484.
- von Bubnoff, A and Cho, KW. **Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?** *Dev Biol* 2001, **239**(1): 1-14.
- von Maltzahn, J, Chang, NC, Bentzinger, CF and Rudnicki, MA. **Wnt signaling in myogenesis.** *Trends Cell Biol* 2012, **22**(11): 602-609.
- Wagner, KR, Liu, X, Chang, X and Allen, RE. **Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(7): 2519-2524.
- Wagner, KR, McPherron, AC, Winik, N and Lee, SJ. **Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice.** *Ann Neurol* 2002, **52**(6): 832-836.
- Wakelam, MJ. **The fusion of myoblasts.** *Biochem J* 1985, **228**(1): 1-12.
- Wang, H, Zhang, Q and Zhu, D. **hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**(4): 877-883.
- Wang, Q and McPherron, AC. **Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation.** *J Physiol* 2012, **590**(Pt 9): 2151-2165.
- Wang, WC and Cummings, RD. **The immobilized leucoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues.** *J Biol Chem* 1988, **263**(10): 4576-4585.
- Wang, YX and Rudnicki, MA. **Satellite cells, the engines of muscle repair.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**(2): 127-133.
- Weiner, MP, Costa, GL, Schoettlin, W, Cline, J, Mathur, E and Bauer, JC. **Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction.** *Gene* 1994, **151**(1-2): 119-123.
- Weintraub, H, Davis, R, Tapscott, S, Thayer, M, Krause, M, Benezra, R, Blackwell, TK, Turner, D, Rupp, R, Hollenberg, S and et al. **The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage.** *Science* 1991, **251**(4995): 761-766.
- Welle, S, Bhatt, K, Pinkert, CA, Tawil, R and Thornton, CA. **Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **292**(4): E985-991.

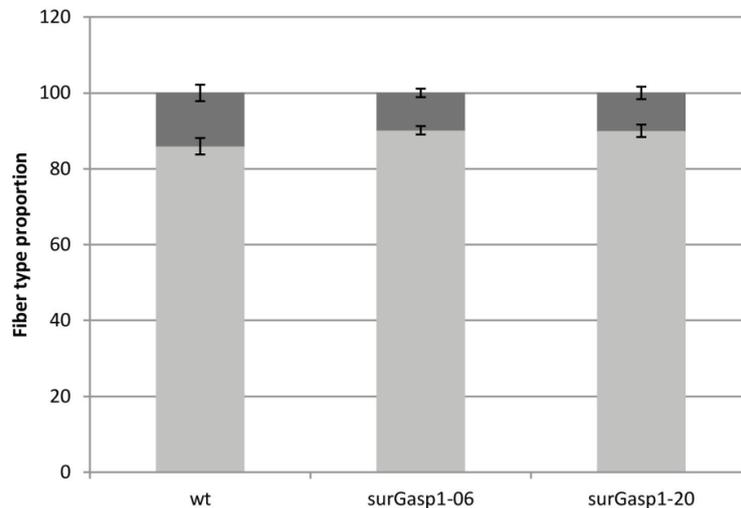
- Westerblad, H, Bruton, JD and Katz, A. **Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability.** *Exp Cell Res* 2010, **316**(18): 3093-3099.
- White, RB, Bierinx, AS, Gnocchi, VF and Zammit, PS. **Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development.** *BMC Dev Biol* 2010, **10**: 21.
- Whittemore, LA, Song, K, Li, X, Aghajanian, J, Davies, M, Girgenrath, S, Hill, JJ, Jalenak, M, Kelley, P, Knight, A, Maylor, R, O'Hara, D, Pearson, A, Quazi, A, Ryerson, S, Tan, XY, Tomkinson, KN, Veldman, GM, Widom, A, Wright, JF, Wudyka, S, Zhao, L and Wolfman, NM. **Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **300**(4): 965-971.
- Wigmore, PM and Evans, DJ. **Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis.** *Int Rev Cytol* 2002, **216**: 175-232.
- Winbanks, CE, Weeks, KL, Thomson, RE, Sepulveda, PV, Beyer, C, Qian, H, Chen, JL, Allen, JM, Lancaster, GI, Febbraio, MA, Harrison, CA, McMullen, JR, Chamberlain, JS and Gregorevic, P. **Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin.** *J Cell Biol* 2012, **197**(7): 997-1008.
- Wolfman, NM, McPherron, AC, Pappano, WN, Davies, MV, Song, K, Tomkinson, KN, Wright, JF, Zhao, L, Sebald, SM, Greenspan, DS and Lee, SJ. **Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(26): 15842-15846.
- Wright, WE, Sassoon, DA and Lin, VK. **Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD.** *Cell* 1989, **56**(4): 607-617.
- Wu, DK and Oh, SH. **Sensory organ generation in the chick inner ear.** *J Neurosci* 1996, **16**(20): 6454-6462.
- Wu, H, Naya, FJ, McKinsey, TA, Mercer, B, Shelton, JM, Chin, ER, Simard, AR, Michel, RN, Bassel-Duby, R, Olson, EN and Williams, RS. **MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type.** *EMBO J* 2000, **19**(9): 1963-1973.
- Wu, H, Rothermel, B, Kanatous, S, Rosenberg, P, Naya, FJ, Shelton, JM, Hutcheson, KA, DiMaio, JM, Olson, EN, Bassel-Duby, R and Williams, RS. **Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway.** *EMBO J* 2001, **20**(22): 6414-6423.
- Yang, J, Ratovitski, T, Brady, JP, Solomon, MB, Wells, KD and Wall, RJ. **Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice.** *Mol Reprod Dev* 2001, **60**(3): 351-361.
- Yang, W, Chen, Y, Zhang, Y, Wang, X, Yang, N and Zhu, D. **Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression.** *Cancer Res* 2006, **66**(3): 1320-1326.
- Yang, W, Zhang, Y, Li, Y, Wu, Z and Zhu, D. **Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1.** *J Biol Chem* 2007, **282**(6): 3799-3808.
- Yasaka, N, Suzuki, K, Kishioka, Y, Wakamatsu, J and Nishimura, T. **Laminin binds to myostatin and attenuates its signaling.** *Anim Sci J* 2013, **84**(9): 663-668.
- Yin, H, Price, F and Rudnicki, MA. **Satellite cells and the muscle stem cell niche.** *Physiol Rev* 2013, **93**(1): 23-67.
- Zacksenhaus, E, Jiang, Z, Chung, D, Marth, JD, Phillips, RA and Gallie, BL. **pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis.** *Genes Dev* 1996, **10**(23): 3051-3064.
- Zammit, PS, Heslop, L, Hudon, V, Rosenblatt, JD, Tajbakhsh, S, Buckingham, ME, Beauchamp, JR and Partridge, TA. **Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers.** *Exp Cell Res* 2002, **281**(1): 39-49.
- Zhang, C, Tan, CK, McFarlane, C, Sharma, M, Tan, NS and Kambadur, R. **Myostatin-null mice exhibit delayed skin wound healing through the blockade of transforming growth factor-beta signaling by decorin.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2012, **302**(8): C1213-1225.
- Zhang, M and McLennan, IS. **During secondary myotube formation, primary myotubes preferentially absorb new nuclei at their ends.** *Dev Dyn* 1995, **204**(2): 168-177.

- Zhang, P, Wong, C, Liu, D, Finegold, M, Harper, JW and Elledge, SJ. **p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step.** *Genes Dev* 1999, **13**(2): 213-224.
- Zhang, XM, Ramalho-Santos, M and McMahon, AP. **Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node.** *Cell* 2001, **105**(6): 781-792.
- Zhou, X, Wang, JL, Lu, J, Song, Y, Kwak, KS, Jiao, Q, Rosenfeld, R, Chen, Q, Boone, T, Simonet, WS, Lacey, DL, Goldberg, AL and Han, HQ. **Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival.** *Cell* 2010, **142**(4): 531-543.
- Zhu, J, Li, Y, Shen, W, Qiao, C, Ambrosio, F, Lavasani, M, Nozaki, M, Branca, MF and Huard, J. **Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis.** *J Biol Chem* 2007, **282**(35): 25852-25863.
- Zhu, X, Hadhazy, M, Wehling, M, Tidball, JG and McNally, EM. **Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle.** *FEBS Lett* 2000, **474**(1): 71-75.
- Zhu, X, Topouzis, S, Liang, LF and Stotish, RL. **Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism.** *Cytokine* 2004, **26**(6): 262-272.
- Zimmers, TA, Davies, MV, Koniaris, LG, Haynes, P, Esquela, AF, Tomkinson, KN, McPherron, AC, Wolfman, NM and Lee, SJ. **Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin.** *Science* 2002, **296**(5572): 1486-1488.

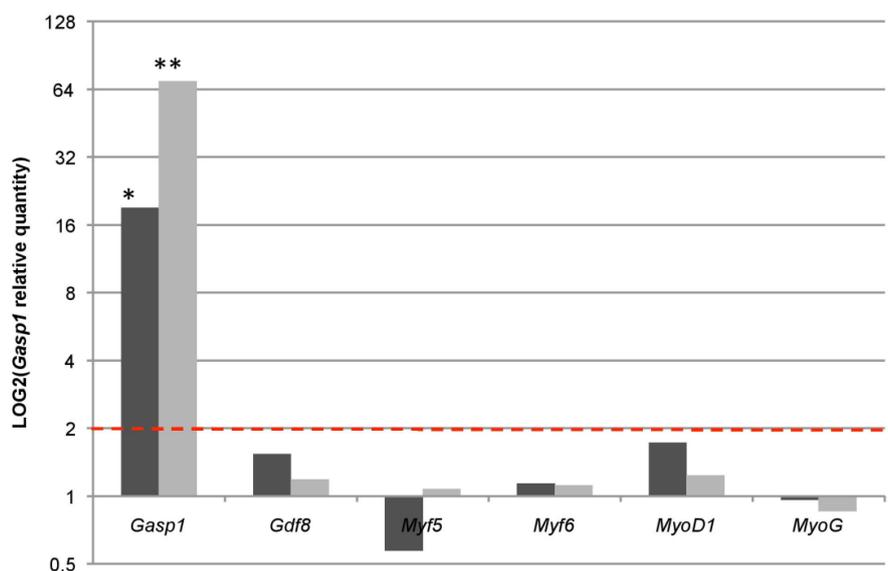
ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1. Données supplémentaires Publication 1



ADDITIONAL FILE 1: FIBER TYPE DISTRIBUTION IN QUADRICEPS OF SURGASP-1 MICE. No significant variation in proportion of type I (dark grey) or type II fibers (light grey) was observed in surGasp1-20, surGasp1-06 mice when compared to wild-type. Data are expressed +/-SEM.



ADDITIONAL FILE 2: NEONATAL EXPRESSION OF GASP-1 AND MYOGENIC REGULATORY FACTORS. mRNA expression levels were determined by qRT-PCR relative to the reference genes *Gapdh* and *TfIID* in extracts from head (dark grey, n = 3) or hindlimb (light grey, n = 3) of postnatal 3 days surGasp1-20 animals. The horizontal dashed line represents a twofold increase in expression level.

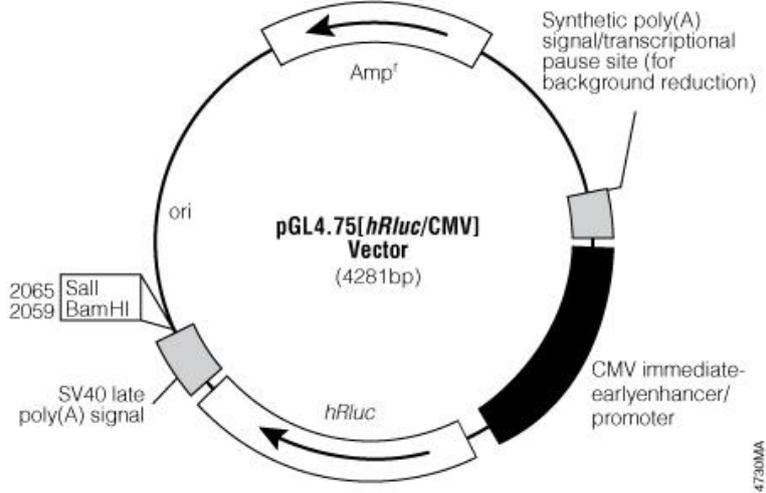
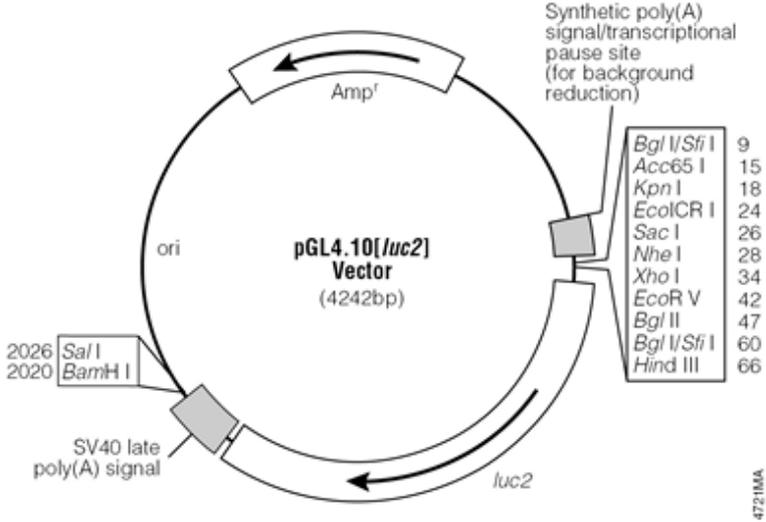
* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

ADDITIONAL FILE 3: TABLE 1: LIST OF THE 96 GENES THAT WERE MEASURED ON THE TAQMAN LOW DENSITY ARRAYS.

Assay	Type
2400001E08Rik-Mm01279964_g1	Target
Acvr1-Mm01331069_m1	Target
Acvr1b-Mm00475713_m1	Target
Acvr1c-Mm03023957_m1	Target
Acvr2a-Mm00431657_m1	Target
Acvr2b-Mm00431664_m1	Target
Aebp1-Mm00477402_m1	Target
Akt1-Mm01331626_m1	Target
Akt2-Mm02026778_g1	Target
Akt3-Mm00442194_m1	Target
Axin1-Mm01299063_m1	Target
Bmp2-Mm01340178_m1	Target
Bmp3-Mm00557790_m1	Target
Bmp4-Mm01321704_m1	Target
Casp9-Mm00516563_m1	Target
Ccnd1-Mm00432359_m1	Target
Ccne1-Mm00432367_m1	Target
Cdk2-Mm00443947_m1	Target
Cdk4-Mm00726334_s1	Target
Cdk6-Mm01311342_m1	Target
Ckm-Mm00432556_m1	Target
Ctnnb1-Mm00483033_m1	Target
Cyp2b10-Mm01972453_s1	Target
Dctn6-Mm00495994_m1	Target
Fbxo32-Mm00499523_m1	Target
Foxo1-Mm00490671_m1	Target
Foxo3-Mm01185722_m1	Target
Foxo4-Mm00840140_g1	Target
Fst-Mm00514982_m1	Target
Fstl3-Mm00473194_m1	Target
Gdf11-Mm01159973_m1	Target
Gsk3b-Mm00444911_m1	Target
Igf1-Mm01228180_m1	Target
Igf1r-Mm00802831_m1	Target
Igf2-Mm00580426_m1	Target
Inha-Mm00439683_m1	Target
Inhbb-Mm01286587_m1	Target
Map2k2-Mm00445688_m1	Target
Map2k3-Mm00435950_m1	Target
Map2k4-Mm00436508_m1	Target
Map2k5-Mm00488652_m1	Target
Map2k6-Mm00803694_m1	Target
Mapk1-Mm00442479_m1	Target
Mapk10-Mm00436518_m1	Target
Mapk3-Mm01973540_g1	Target
Mapk7-Mm00839961_g1	Target
Mapk8-Mm00489514_m1	Target
Mapk9-Mm00444239_m1	Target
Mdm2-Mm01233136_m1	Target

Mstn-Mm01254559_m1	Target
Mtor-Mm00444968_m1	Target
Myf5-Mm00435125_m1	Target
Myf6-Mm00435126_m1	Target
Myh1-Mm01332489_m1	Target
Myh13-Mm01329439_m1	Target
Myh2-Mm01332564_m1	Target
Myh3-Mm01332463_m1	Target
Myh4-Mm01332518_m1	Target
Myh6-Mm00440359_m1	Target
Myh7-Mm00600555_m1	Target
Myh7b-Mm01249941_m1	Target
Myh8-Mm01329494_m1	Target
Myod1-Mm00440387_m1	Target
Myog-Mm00446194_m1	Target
Nodal-Mm00443040_m1	Target
Pak2-Mm01170646_m1	Target
Pax3-Mm00435493_m1	Target
Pax7-Mm00834079_m1	Target
Pdpk1-Mm00440707_m1	Target
Pparg-Mm01184322_m1	Target
Rps6kb1-Mm01310033_m1	Target
Smad1-Mm00484721_m1	Target
Smad2-Mm00487530_m1	Target
Smad3-Mm01170760_m1	Target
Smad4-Mm03023996_m1	Target
Smad5-Mm03024001_g1	Target
Smad6-Mm00484738_m1	Target
Smad7-Mm00484742_m1	Target
Smad9-Mm00649885_m1	Target
Smurf1-Mm00547102_m1	Target
Smurf2-Mm03024086_m1	Target
Syp-Mm00436850_m1	Target
Tgfb1-Mm01178819_m1	Target
Tgfb2-Mm00436955_m1	Target
Tgibr1-Mm00436964_m1	Target
Tgibr2-Mm00436977_m1	Target
Tgibr3-Mm00803538_m1	Target
Tnf-Mm00443258_m1	Target
Trim63-Mm01185221_m1	Target
Wfikkn1-Mm01308311_m1	Target
Wfikkn2-Mm00725281_m1	Target
18S-Hs99999901_s1	Control
Dffa-Mm00438410_m1	Control
Fcgrt-Mm00438887_m1	Control
Gapdh-Mm99999915_g1	Control
Tbp-Mm00446973_m1	Control

Annexe 2. Carte des vecteurs pGL4.10[*luc2*] et pGL4.75[*hRluc*/CMV]



Annexe 3. Liste des 192 sondes Taqman® microRNAs sélectionnées

miRNA	Assay ID	Assay Name	miRBase ID	miRBase Accession Number
Let-7	000379	hsa-let-7c	mmu-let-7c-5p	MIMAT0000523
	002479	mmu-let-7c-1#	mmu-let-7c-1-3p	MIMAT0004622
	002282	hsa-let-7g	mmu-let-7g-5p	MIMAT0000121
	002492	mmu-let-7g#	mmu-let-7g-3p	MIMAT0004519
miR-1	002064	rno-miR-1	rno-miR-1-3p	MIMAT0003125
	002222	hsa-miR-1	mmu-miR-1a-3p	MIMAT0000123
	002882	mmu-miR-1-2-AS	mmu-miR-1b-5p	MIMAT0005835
	001351	rno-miR-1#	rno-miR-1-5p	MIMAT0003162
miR-103	000439	hsa-miR-103	mmu-miR-103-3p	MIMAT0000546
miR-106	000442	hsa-miR-106b	mmu-miR-106b-5p	MIMAT0000386
	002380	hsa-miR-106b#	mmu-miR-106b-3p	MIMAT0004582
	002459	mmu-miR-106a	mmu-miR-106a-5p	MIMAT0000385
	462576_mat	mmu-miR-106a#	mmu-miR-106a-3p	MIMAT0017009
miR-107	000443	hsa-miR-107	mmu-miR-107-3p	MIMAT0000647
	465082_mat	mmu-miR-107#	mmu-miR-107-5p	MIMAT0017048
miR-122	002245	hsa-miR-122	mmu-miR-122-5p	MIMAT0000246
	463618_mat	mmu-miR-122#	mmu-miR-122-3p	MIMAT0017005
miR-125	002199	hsa-miR-125a-3p	mmu-miR-125a-3p	MIMAT0004528
	002198	hsa-miR-125a-5p	mmu-miR-125a-5p	MIMAT0000135
	000449	hsa-miR-125b	mmu-miR-125b-5p	MIMAT0000136
	002378	hsa-miR-125b-1#	mmu-miR-125b-1-3p	MIMAT0004669
	002508	mmu-miR-125b#	mmu-miR-125b-2-3p	MIMAT0004529
miR-128	464067_mat	mmu-miR-128-1#	mmu-miR-128-1-5p	MIMAT0016982
	464055_mat	mmu-miR-128-2#	mmu-miR-128-2-5p	MIMAT0017069
	002216	hsa-miR-128a	mmu-miR-128-3p	MIMAT0000140
miR-130	462691_mat	mmu-miR-130a#	mmu-miR-130a-5p	MIMAT0016983
	002460	mmu-miR-130b#	mmu-miR-130b-5p	MIMAT0004583
	000454	hsa-miR-130a	mmu-miR-130a-3p	MIMAT0000141
	000456	hsa-miR-130b	mmu-miR-130b-3p	MIMAT0000387
miR-133	001637	mmu-miR-133a#	mmu-miR-133a-5p	MIMAT0003473
	002246	hsa-miR-133a	mmu-miR-133a-3p	MIMAT0000145
	002247	hsa-miR-133b	mmu-miR-133b-3p	MIMAT0000769
miR-135	462760_mat	mmu-miR-135a-2#	mmu-miR-135a-2-3p	MIMAT0017064
	000460	hsa-miR-135a	mmu-miR-135a-5p	MIMAT0000147
	002232	hsa-miR-135a#	mmu-miR-135a-1-3p	MIMAT0004531
	002261	hsa-miR-135b	mmu-miR-135b-5p	MIMAT0000612
	002159	hsa-miR-135b#	mmu-miR-135b-3p	MIMAT0017044
miR-138	002284	hsa-miR-138	mmu-miR-138-5p	MIMAT0000150
	002554	mmu-miR-138#	mmu-miR-138-1-3p	MIMAT0004668
	461986_mat	mmu-miR-138-2#	mmu-miR-138-2-3p	MIMAT0016987
miR-141	000463	hsa-miR-141	mmu-miR-141-3p	MIMAT0000153
	002513	mmu-miR-141#	mmu-miR-141-5p	MIMAT0004533
miR-143	002249	hsa-miR-143	mmu-miR-143-3p	MIMAT0000247
	463509_mat	mmu-miR-143#	mmu-miR-143-5p	MIMAT0017006
miR-144	002676	hsa-miR-144	mmu-miR-144-3p	MIMAT0000156
	464811_mat	mmu-miR-144#	mmu-miR-144-5p	MIMAT0016988

miR-146	000468	hsa-miR-146a	mmu-miR-146a-5p	MIMAT0000158
	001097	hsa-miR-146b	mmu-miR-146b-5p	MIMAT0003475
	463191_mat	mmu-miR-146a#	mmu-miR-146a-3p	MIMAT0016989
	002453	mmu-miR-146b#	mmu-miR-146b-3p	MIMAT0004826
miR-148	000470	hsa-miR-148a	mmu-miR-148a-3p	MIMAT0000516
	002134	hsa-miR-148a#	mmu-miR-148a-5p	MIMAT0004617
	000471	hsa-miR-148b	mmu-miR-148b-3p	MIMAT0000580
	462888_mat	mmu-miR-148b#	mmu-miR-148b-5p	MIMAT0017036
miR-150	000473	hsa-miR-150	mmu-miR-150-5p	MIMAT0000160
	002570	mmu-miR-150#	mmu-miR-150-3p	MIMAT0004535
miR-15	000389	hsa-miR-15a	mmu-miR-15a-5p	MIMAT0000526
	000390	hsa-miR-15b	mmu-miR-15b-5p	MIMAT0000124
	002173	hsa-miR-15b#	mmu-miR-15b-3p	MIMAT0004521
	002488	mmu-miR-15a#	mmu-miR-15a-3p	MIMAT0004624
miR-155	002571	mmu-miR-155	mmu-miR-155-5p	MIMAT0000165
	464539_mat	mmu-miR-155#	mmu-miR-155-3p	MIMAT0016993
miR-17	002308	hsa-miR-17	mmu-miR-17-5p	MIMAT0000649
	002543	mmu-miR-17#	mmu-miR-17-3p	MIMAT0000650
	002078	rno-miR-17-3p	rno-miR-17-1-3p	MIMAT0004710
miR-181	000480	hsa-miR-181a	mmu-miR-181a-5p	MIMAT0000210
	000482	hsa-miR-181c	mmu-miR-181c-5p	MIMAT0000674
	002687	mmu-miR-181A-2#	mmu-miR-181a-2-3p	MIMAT0005443
	465209_mat	mmu-miR-181b-1#	mmu-miR-181b-1-3p	MIMAT0017067
	464644_mat	mmu-miR-181c#	mmu-miR-181c-3p	MIMAT0017068
	464277_mat	mmu-miR-181d#	mmu-miR-181d-3p	MIMAT0017264
miR-182	002599	mmu-miR-182	mmu-miR-182-5p	MIMAT0000211
	463237_mat	mmu-miR-182#	mmu-miR-182-3p	MIMAT0016995
miR-192	000491	hsa-miR-192	mmu-miR-192-5p	MIMAT0000517
	002272	hsa-miR-192#	mmu-miR-192-3p	MIMAT0017012
miR-195	000494	hsa-miR-195	mmu-miR-195a-5p	MIMAT0000225
	002107	hsa-miR-195#	mmu-miR-195a-3p	MIMAT0017000
miR-199	000498	hsa-miR-199a	mmu-miR-199a-5p	MIMAT0000229
	002304	hsa-miR-199a-3p	mmu-miR-199a-3p mmu-miR-199b-3p	MIMAT0000230
miR-203	000507	hsa-miR-203	mmu-miR-203-3p	MIMAT0000236
	002580	mmu-miR-203#	mmu-miR-203-5p	MIMAT0004547
miR-204	000508	hsa-miR-204	mmu-miR-204-5p	MIMAT0000237
	463101_mat	mmu-miR-204#	mmu-miR-204-3p	MIMAT0017002
miR-20	000580	hsa-miR-20a	mmu-miR-20a-5p	MIMAT0000529
	001014	hsa-miR-20b	mmu-miR-20b-5p	MIMAT0003187
	002491	mmu-miR-20a#	mmu-miR-20a-3p	MIMAT0004627
	002524	mmu-miR-20b#	mmu-miR-20b-3p	MIMAT0004788
miR-200	000502	hsa-miR-200a	mmu-miR-200a-3p	MIMAT0000519
	001011	hsa-miR-200a#	mmu-miR-200a-5p	MIMAT0004619
	002251	hsa-miR-200b	mmu-miR-200b-3p	MIMAT0000233
	002274	hsa-miR-200b#	mmu-miR-200b-5p	MIMAT0004545
	002300	hsa-miR-200c	mmu-miR-200c-3p	MIMAT0000657
	002286	hsa-miR-200c#	mmu-miR-200c-5p	MIMAT0004663
miR-206	000510	hsa-miR-206	mmu-miR-206-3p	MIMAT0000239
	463660_mat	mmu-miR-206#	mmu-miR-206-5p	MIMAT0017004
miR-208	462036_mat	mmu-miR-208a-5p	mmu-miR-208a-5p	MIMAT0017014
	462460_mat	mmu-miR-208b#	mmu-miR-208b-5p	MIMAT0017280
	000511	hsa-miR-208	mmu-miR-208a-3p	MIMAT0000520
	002290	hsa-miR-208b	mmu-miR-208b-3p	MIMAT0004939

miR-21	000397	hsa-miR-21	mmu-miR-21a-5p	MIMAT0000530
	002493	mmu-miR-21#	mmu-miR-21a-3p	MIMAT0004628
miR-210	000512	hsa-miR-210	mmu-miR-210-3p	MIMAT0000658
	462444_mat	mmu-miR-210#	mmu-miR-210-5p	MIMAT0017052
miR-214	002306	hsa-miR-214	mmu-miR-214-3p	MIMAT0000661
	002293	hsa-miR-214#	mmu-miR-214-5p	MIMAT0004664
miR-22	000398	hsa-miR-22	mmu-miR-22-3p	MIMAT0000531
	002301	hsa-miR-22#	mmu-miR-22-5p	MIMAT0004629
miR-221	000524	hsa-miR-221	mmu-miR-221-3p	MIMAT0000669
	464489_mat	mmu-miR-221#	mmu-miR-221-5p	MIMAT0017060
miR-222	002276	hsa-miR-222	mmu-miR-222-3p	MIMAT0000670
	463390_mat	mmu-miR-222#	mmu-miR-222-5p	MIMAT0017061
miR-23	000399	hsa-miR-23a	mmu-miR-23a-3p	MIMAT0000532
	002439	hsa-miR-23a#	mmu-miR-23a-5p	MIMAT0017019
	000400	hsa-miR-23b	mmu-miR-23b-3p	MIMAT0000125
	243680_mat	mmu-miR-23b#	mmu-miR-23b-5p	MIMAT0016980
miR-24	000402	hsa-miR-24	mmu-miR-24-3p	MIMAT0000219
	002079	rno-miR-24-1#	rno-miR-24-1-5p	MIMAT0003153
	002494	mmu-miR-24-2#	mmu-miR-24-2-5p	MIMAT0005440
miR-26	000405	hsa-miR-26a	mmu-miR-26a-5p	MIMAT0000533
	002443	hsa-miR-26a-1#	mmu-miR-26a-1-3p	MIMAT0017020
	000407	hsa-miR-26b	mmu-miR-26b-5p	MIMAT0000534
	002444	hsa-miR-26b#	mmu-miR-26b-3p	MIMAT0004630
	463227_mat	mmu-miR-26a-2#	mmu-miR-26a-2-3p	MIMAT0017058
miR-27	000408	hsa-miR-27a	mmu-miR-27a-3p	MIMAT0000537
	002445	hsa-miR-27a#	mmu-miR-27a-5p	MIMAT0004633
	000409	hsa-miR-27b	mmu-miR-27b-3p	MIMAT0000126
	002174	hsa-miR-27b#	mmu-miR-27b-5p	MIMAT0004522
miR-29	002112	hsa-miR-29a	mmu-miR-29a-3p	MIMAT0000535
	002447	hsa-miR-29a#	mmu-miR-29a-5p	MIMAT0004631
	000413	hsa-miR-29b	mmu-miR-29b-3p	MIMAT0000127
	000587	hsa-miR-29c	mmu-miR-29c-3p	MIMAT0000536
	002497	mmu-miR-29b#	mmu-miR-29b-1-5p	MIMAT0004523
	465008_mat	mmu-miR-29b-2#	mmu-miR-29b-2-5p	MIMAT0017063
	001818	rno-miR-29c#	mmu-miR-29c-5p	MIMAT0004632
miR-30	000416	hsa-miR-30a-3p	mmu-miR-30a-3p	MIMAT0000129
	000417	hsa-miR-30a-5p	mmu-miR-30a-5p	MIMAT0000128
	000602	hsa-miR-30b	mmu-miR-30b-5p	MIMAT0000130
	000419	hsa-miR-30c	mmu-miR-30c-5p	MIMAT0000514
	002108	hsa-miR-30c-1#	mmu-miR-30c-1-3p	MIMAT0004616
	002110	hsa-miR-30c-2#	mmu-miR-30c-2-3p	MIMAT0005438
	000420	hsa-miR-30d	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515
	002305	hsa-miR-30d#	mmu-miR-30d-3p	MIMAT0017011
	002223	hsa-miR-30e	mmu-miR-30e-5p	MIMAT0000248
	000422	hsa-miR-30e-3p	mmu-miR-30e-3p	MIMAT0000249
002498	mmu-miR-30b#	mmu-miR-30b-3p	MIMAT0004524	
miR-31	000185	mmu-miR-31	mmu-miR-31-5p	MIMAT0000538
	002495	mmu-miR-31#	mmu-miR-31-3p	MIMAT0004634
miR-320	002277	hsa-miR-320	mmu-miR-320-3p	MIMAT0000666
	463292_mat	mmu-miR-320#	mmu-miR-320-5p	MIMAT0017057
miR-322	002506	mmu-miR-322#	mmu-miR-322-3p	MIMAT0000549
miR-326	001061	mmu-miR-326	mmu-miR-326-3p	MIMAT0000559
	462050_mat	mmu-miR-326#	mmu-miR-326-5p	MIMAT0017027

miR-351	001067	mmu-miR-351	mmu-miR-351-5p	MIMAT0000609
	464446_mat	mmu-miR-351#	mmu-miR-351-3p	MIMAT0017042
miR-378	002243	hsa-miR-378	mmu-miR-378a-3p	MIMAT0003151
	000567	hsa-miR-378	mmu-miR-378a-5p	MIMAT0000742
miR-410	001274	hsa-miR-410	mmu-miR-410-3p	MIMAT0001091
	464693_mat	mmu-miR-410#	mmu-miR-410-5p	MIMAT0017172
miR-424	001076	mmu-miR-424	mmu-miR-322-5p	MIMAT0000548
miR-433	001028	hsa-miR-433	mmu-miR-433-3p	MIMAT0001420
	001078	mmu-miR-433-5p	mmu-miR-433-5p	MIMAT0001419
miR-448	001029	hsa-miR-448	mmu-miR-448-3p	MIMAT0001533
	464921_mat	mmu-miR-448-5p	mmu-miR-448-5p	MIMAT0017176
miR-451	001141	mmu-miR-451	mmu-miR-451a	MIMAT0001632
miR-455	001280	hsa-miR-455	mmu-miR-455-5p	MIMAT0003485
	002455	mmu-miR-455	mmu-miR-455-3p	MIMAT0003742
miR-483	002560	mmu-miR-483#	mmu-miR-483-3p	MIMAT0003120
miR-486	001278	hsa-miR-486	mmu-miR-3107-5p	MIMAT0014943
	002093	hsa-miR-486-3p	mmu-miR-486-3p	MIMAT0017206
miR-489	001302	mmu-miR-489	mmu-miR-489-3p	MIMAT0003112
	001353	rno-miR-489		
miR-494	463045_mat	mmu-miR-494#	mmu-miR-494-5p	MIMAT0017215
	002365	hsa-miR-494	mmu-miR-494-3p	MIMAT0003182
miR-499	001352	mmu-miR-499	mmu-miR-499-5p	MIMAT0003482
	464040_mat	mmu-miR-499#	mmu-miR-499-3p	MIMAT0017254
miR-503	002456	mmu-miR-503	mmu-miR-503-5p	MIMAT0003188
	002536	mmu-miR-503#	mmu-miR-503-3p	MIMAT0004790
miR-546	001312	mmu-miR-546	mmu-miR-546	MIMAT0003166
miR-669	001683	mmu-miR-669a		
	462148_mat	mmu-miR-669a-3-3p	mmu-miR-669a-3-3p	MIMAT0017251
miR-696	001628	mmu-miR-696	mmu-miR-696	MIMAT0003483
miR-92	000430	hsa-miR-92	mmu-miR-92a-3p	MIMAT0000539
	002496	mmu-miR-92a#	mmu-miR-92a-2-5p	MIMAT0004635
	464504_mat	mmu-miR-92a-1#	mmu-miR-92a-1-5p	MIMAT0017066
	463521_mat	mmu-miR-92b#	mmu-miR-92b-5p	MIMAT0017278
miR-93	001090	mmu-miR-93	mmu-miR-93-5p	MIMAT0000540
	002139	hsa-miR-93#	mmu-miR-93-3p	MIMAT0004636
Control	001230	snoRNA135	snoRNA135	AF357323
	001232	snoRNA202	snoRNA202	AF357327
	001973	U6 snRNA	U6 snRNA	NR_004394
	001712	U87	U87	AF272707
	001727	Y1	Y1	U84683

Annexe 4. Donnée supplémentaire Publication 1

TABLE. GASP-1 PROTEIN ACCESS NUMBERS.

Species	GASP-1 protein access numbers
<i>Anolis carolinensis</i>	XP_003217358.1
<i>Bos taurus</i>	DAA18604.1
<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002748468.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_548206.2
<i>Cavia porcellus</i>	ENSCPOP00000019147
<i>Danio rerio</i>	XP_699239.1
<i>Felis catus</i>	ENSFCAP00000011455
<i>Gallus gallus</i>	XP_420100.2
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	ENSGACP00000007790
<i>Gorilla gorilla</i>	ENSGGOP00000019008
<i>Homo sapiens</i>	NP_783165.1
<i>Loxodonta africana</i>	ENSLAFP00000029291
<i>Macaca mulatta</i>	XP_001100200.1
<i>Macropus eugenii</i>	ENSMEUP00000013612
<i>Meleagris gallopavo</i>	XP_003211629.1
<i>Monodelphis domestica</i>	ENSMODP00000015857
<i>Mus musculus</i>	NP_861540.2
<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003272312.1
<i>Ochotona princeps</i>	ENSOPRP00000012362
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_002719150.1
<i>Oryzias latipes</i>	ENSORLP00000013299
<i>Pan troglodytes</i>	XP_003315702.1
<i>Pongo abelii</i>	ENSPPYT00000009671
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_220855.1
<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_002198135.1
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUP00000021730
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAG04115.1
<i>Tursiops truncatus</i>	ENSTTRP00000002564
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	XP_002935995.1
<i>Xenopus laevis</i>	AAH94175.1

Annexe 5. Etude phylogénétique des protéines GASPs

GASP/WFIKKN proteins: evolutionary aspects of their functions

Olivier Monestier, Caroline Brun, Olivier Cocquempot, Daniel Petit and Véronique Blanquet

PLoS One, 2012, 7(8):e43710

RESUME

Le muscle squelettique est un organe possédant une grande plasticité et dont la masse est maintenue par différentes voies de signalisation régulant le turnover protéique et cellulaire. Parmi elles, la voie de signalisation de la myostatine agit comme un régulateur négatif de la croissance musculaire. Elle nécessite une régulation complexe, majoritairement exercée par ses inhibiteurs tels que la follistatine, le propeptide et GASP-1 (Growth and differentiation factor-associated serum protein-1). Bien que de nombreuses analyses aient été menées sur l'inhibition de la myostatine induite par son propeptide ou par la follistatine, les études concernant la protéine GASP-1 se sont jusqu'à présent principalement concentrées sur la caractérisation fonctionnelle de ses domaines. Nous avons généré des lignées murines transgéniques surexprimant *Gasp-1*, appelées surGasp1. Deux de ces lignées, surGasp1-20 et surGasp1-06, ont été sélectionnées pour leurs niveaux élevés d'expression de *Gasp-1* dans le muscle et le cerveau. Ces lignées présentent une augmentation de la masse musculaire due à une hypertrophie des myofibres sans hyperplasie. Pour comprendre les mécanismes moléculaires régulant la masse musculaire des souris surGasp1, nous avons analysé les myoblastes dérivés des cellules satellites des souris sauvages, surGasp1-20 (S20) et *Mstn*^{-/-}. L'analyse de leurs expressions géniques a révélé une augmentation de la *myostatine* dans les myoblastes S20. Nous avons également mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 et une diminution de Pax7 dans ces cellules par rapport aux cellules *Mstn*^{-/-}. Nous avons proposé que la dérégulation de Pax7 dans les myoblastes S20 pourrait être induite par la surexpression de la myostatine et corrèlerait avec l'absence d'hyperplasie chez les souris surGasp1. En parallèle, nous avons montré que les myoblastes S20 présentent une augmentation de la signalisation pro-hypertrophique Akt/mTORC/p70S6K, favorisant la différenciation des myotubes et l'augmentation de leur taille, confirmant que la surexpression de *Gasp-1* conduit à une hypertrophie des myofibres.

Mots clés : GASP-1, myostatine, voies de signalisation, muscle squelettique, hypertrophie

ABSTRACT

Skeletal muscle is a plastic organ that is maintained by multiple factors regulating cell and protein turnover. Among them, myostatin functions as a negative regulator of muscle growth. The regulation of myostatin is mostly carried out by its physiological inhibitors such as its propeptide, follistatin or GASP-1 (Growth and differentiation factor-associated serum protein-1). Although many analyzes were conducted on the inhibition of myostatin induced by its propeptide or follistatin, studies on GASP-1 mainly focused on the functional characterization of its domains. To highlight the *Gasp-1* function *in vivo*, transgenic mouse lines that overexpress *Gasp-1* were generated and called surGasp1 mice. Two lines, namely surGasp1-20 and surGasp1-06, were selected for their highest *Gasp-1* overexpression in muscle and brain. These mouse lines showed an increased muscle mass due to myofibre hypertrophy rather than hyperplasia. To investigate the molecular mechanisms regulating muscle mass in surGasp1 mice, we studied the myoblasts derived from wild-type, surGasp1-20 (S20) and *Mstn*^{-/-} satellite cells. Expression array analysis revealed an up-regulation of *myostatin* expression in S20 myoblasts. We also found an increased ERK1/2 phosphorylation and a decrease of Pax7 in S20 cells compared to the *Mstn*^{-/-}. We propose that the deregulation of Pax7 in overexpressing *Gasp-1* myoblasts is related with an up-regulation of myostatin and it could be responsible for the absence of hyperplasia in surGasp1-20 mice. In addition, we showed that S20 myoblasts increase the pro-hypertrophic Akt/mTORC/p70S6K signaling, enhancing myoblast differentiation and myotube size. This confirms that *Gasp-1* overexpression leads to myofibre hypertrophy.

Keywords: GASP-1, myostatin, signaling pathways, skeletal muscle, hypertrophy