UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

MEMBRE DE
USPC
Université Sorbonne Paris Cité

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Institut Cochin – Equipe Développement neuromusculaire, génétique et physiopathologie

Rôle des homéoprotéines SIX dans les progéniteurs myogéniques au cours du développement musculaire

Par Maud WURMSER

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Dr. Pascal MAIRE

Présentée et soutenue publiquement le 31 Octobre 2017

Devant un jury composé de :

Pr. Margaret BUCKINGHAM	Rapporteur
Pr. Frédéric RELAIX	Rapporteur
Dr. Jean-Loup DUBAND	Examinateur
Dr. Glenda COMAI	Examinateur
Dr. Pascal MAIRE	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Tell me and I forget, Teach me and I remember, Involve me and I learn.

Benjamin Franklin

Ma très chère Thèse,

Enfin, j'écris tes derniers mots, les premiers et surement les plus lus. Je vais enfin pouvoir te confier à d'autres paires d'yeux. Mais avant cela, il conviendrait de te présenter ceux qui te lieront, te feuillèteront, te dissèqueront, te humeront, et qui tous ont participé à modeler ce que tu es devenue aujourd'hui.

Bien sûr, tu connais déjà Pascal, qui t'a épluchée jusqu'à ta dernière syllabe, et ce depuis tes premières lignes, mais qui te prépare aussi depuis presque cinq ans. Pascal que je remercie de m'avoir confié ce projet et de m'avoir accompagnée sans relâche, de m'avoir tant appris, de m'avoir tenu tête quand, bornée je n'en faisais qu'à la mienne, et de m'avoir toujours laissée m'exprimer. C'est donc sans crainte que je te laisse entre les mains d'autres experts, qui j'espère t'apprécieront, autant que j'ai apprécié la complicité qui avec Pascal nous a liée tout au long de ton écriture.
En parlant d'experts, Margaret et Frédéric seront tes premiers lecteurs, et quels lecteurs ? Tu seras entre les mains de ceux qui ont participé à bâtir l'histoire des progéniteurs musculaires, et qui depuis des années scrutent ces petites cellules qu'ils connaissent sur le bout des doigts. Je les remercie donc pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de te relire et de te porter leur regard de connaisseurs.
Jean-Loup connaisseur de l'interaction des progéniteurs musculaires avec leur environnement et Glenda incollable en ce qui concerne les progéniteurs craniofaciaux te décrypteront ensuite, et je les remercie aussi d'avoir accepté de partager leur point de vu d'orfèvre en la matière afin d'évaluer mon travail.

Chère Thèse, le travail que tu rapportes aujourd'hui n'aurait pas été tel qu'il est sans tous ceux qui m'ont entourée ces dernières années. J'ai eu la chance d'être accueillie à l'institut Cochin, et je souhaiterai m'adresser directement à tous ceux que j'y ai croisé et qui ont contribué à faire de ces années un très bon souvenir.

Je remercie tout d'abord Nassia, Evelyne et Fabien, de leur accueil dans l'équipe et pour leur générosité à partager leur science et les discussions scientifiques qui m'ont tant appris. Je remercie aussi tous ceux qui étaient présents dans l'équipe quand j'y suis arrivée, qui m'ont accueillie, aidée, formée, guidée. Je pense particulièrement à Josiane, qui m'a accompagnée et avec qui nous avons fait un bout de chemin que je n'oublierai pas, les embryons, les coupes,

les anticorps, les heures au microscope et derrière la loupe à scruter, avec passion. Nathalie a ensuite pris le relai pour cette dernière année si intense, surtout ces derniers mois, où elle a su me suivre et me supporter jusqu'au bout. Merci à toutes les deux pour votre soutien, pour nos discussions autour d'un café et tous ces moments qui nous ont rapprochées et tenu chaud. Merci aussi à Julien de m'avoir suivie à mes débuts, et pour ces heures passées au facs à attendre que nos cellules se trient. Je remercie aussi Iori, many thanks for all the advices you gave me during the time we shared in Cochin, I am glad I got the opportunity to work with you on the soleus project and prod of the paper we finally published. Laura et Alice, merci pour votre complicité, vos argumentations, vos discussions dans le bureau, votre patience et votre aide à mes débuts, votre sens de l'équipe et de l'organisation que nous avons essayé de maintenir après votre départ ! Tof, merci pour toutes les fois où tu m'as sauvée, donné un conseil par-ci, des protéines par-là, quelle organisation ! On tient le coup sans toi mais ce n'est pas facile, et on attend toujours notre petite glace maison !

Une pensée particulière aux co-thésards de l'équipe avec qui j'ai pu partager les joies, les angoisses, les défis que nous préparent la thèse, merci Floriane pour les moments partagés, et Aude, pour les courts instants que nous avons passés ensembles dans l'équipe. Katerina, merci pour ta présence tes conseils, merci d'être Toi, peu importe les autres, je n'oublierai jamais les moments passés aux Etats-Unis et à Montpellier où j'ai pu apprécier de t'avoir (presque) pour moi toute seule et en Grèce où tu m'as présenté ton pays et ses richesses. Matthieu, merci pour ta franchise et pour nos riches discussions, scientifiques ou non, qui m'apportent toujours beaucoup. Chiara, merci pour ta bonne humeur, ton rire et ton bronzage Italien, merci pour les légumes bio et les conseils cuisine, bien que nous ayons eu du mal à manger à la même heure ! Enfin, Laura, oui je peux maintenant t'inclure dans le chapitre des « thésards », ouf ! Merci pour ton tempérament si positif, et pour le courage que tu as eu de partager le bureau à côté du mien ! Merci pour tes conseils en toutes matières, pour les gouters et les trajets en RER !

Je remercie aussi tous ceux qui sont passé au labo et que j'ai ensuite à regret vue quitter l'équipe. Momo, merci pour tout. Nous sommes arrivées ensemble au labo, tu m'as appris à me méfier des cellules qui se font contaminer à tous bouts de champs, et à savoir boire une petite bière quand vraiment on en a besoin ! Gaëlle, merci pour tout. Les heures partagées dans le bureau, en culture, dans le bureau, dans le labo, en culture, dans le bureau, mince j'ai oublié mon milieu en culture, dans le bureau, oups j'ai oublié mes anticorps, dans le labo, tiens tu as lu ce papier ?, dans le bureau, dans le labo, va et viens ponctués par nos timers incessant et quelques kilos de chouquettes ! Elsa, merci pour tout. Ta bonne humeur, ton

énergie, ton point de vue d'ingénieure et ta fougue dans ton engagement dans le milieu associatif qui m'ont tant donné envie et qu'un jour j'espère nous partagerons ! Cesc, merci pour tout. Toutes tes expressions fran-catalane, ta bonne humeur (le barca a gagné), ta mauvaise humeur, tu fais la gueule ? (le barca a perdu), les vidéos de pigeons ou de marmottes, tin tin tin tin tin tin, tin tin tin tin tin tin, tin tin tin tin tin tin, tin tin tin tin tin tin et le broccoli ! Merci aussi à ta Laura, et à votre présence à tous les deux, toujours. Ludo et Anissa, j'ai apprécié votre présence trop courte dans l'équipe et suis heureuse d'avoir gardé le contact par thésarde (hein Ludo) ou souris (hein Anissa) interposées !

Il y a ceux qui partent, mais il y a aussi ceux qui restent ! Philippe, Phillipe, Phillippe, Philipe (il doit bien y en avoir un de bon?) merci pour tes visites dans notre bureau, tes photos de chats et conseils de maitre des chats, tes anecdotes, tes histoires, et toute cette vie dont tu es plein et que tu partages allègrement. Stéphanie, merci pour tes « à la rescousse » au cryostat, que je ne compte plus, et tes papotages dans le bureau, ya pas un truc à manger ? Voanghy, merci pour ton accueil dans l'équipe et tous les conseils en matière de culture, de tri, d'ARN et j'en passe. Camille, on ne se connaît pas depuis longtemps, mais on a déjà partagé beaucoup de choses ! Merci pour ce mois d'aout en tête à tête, et cette petite brise Anglaise que tu as apportée à cochin, et qui s'est engouffrée jusqu'entre les lignes.

En dehors de l'équipe, j'ai eu aussi la chance de côtoyer, croiser tous les jours ou seulement par e-mail un grand nombre de personnes qui m'ont rendu la vie tellement facile !

Merci donc à tous ceux du bâtiment Fac, pour les conseils, les échanges, les bonjours, les temps de ménage, les midis, les pots, les bières. Une attention particulière aux conseils shopping et trajets de RER de Sabine, au doux roulement des cafés de Mariangela, aux calins de Rozen et aux instants-Aya rares mais qui font toujours les journées plus belles. Merci aussi à MarieAngeles qui sait si bien s'occuper des doctorants, et à Laurence, qui a repris le flambeau en plus de veiller avec brio à ce que la médiation scientifique qui m'est si chère se porte bien. Enfin merci à l'équipe gestion de choc du bâtiment Fac, et tout particulièrement, Maryse, merci pour tout !

Enfin, l'institut cochin regorge de plateformes technologiques qui ont eu affaire à moi, et que je me dois donc de remercier. Merci à Karine et Emmanuelle de la plateforme de cytométrie, pour toutes ces heures passées au facs et tous leurs conseils. Merci à Frank, Sébastien et Florent de la plateforme de génomique d'avoir toujours pris le temps de discuter, d'analyser et de trouver des solutions. Merci à Maryline et Rachel, de la plateforme d'histologie pour votre disponibilité et votre dévouement aux colorations de tissus. Merci à Pierre, Béatrice, Thomas et Valérie de la plateforme de microscopie, pour tous leurs conseils, dépannages, et

heures passées derrière les microscopes de l'institut. Enfin, merci à Otilia, Yoann, Jean-Baptiste, Claire, Sébastien et Christophe de l'animalerie d'avoir dorloté nos animaux.
Merci aux apprentis chercheurs avec qui j'ai passé des moments incroyables et toujours intéressants et amusants, Lynda, Yacine, Henri et Alexandre.
Merci à Juliette, pour sa patience et son talent, je suis très fière de la BD que nous avons créée ensemble et que nous soyons allées jusqu'au bout de ce projet.

Très chère Thèse, tu as pu te rendre compte que je n'étais pas seulement soutenue par mes collègues et amis biologistes, mais que ma famille et mes amis étaient aussi toujours derrière moi. J'aimerai maintenant m'adresser à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à bâtir ce que je suis devenue, qui m'ont suivie depuis peu ou depuis toujours et m'ont accompagnée sur le chemin que j'ai choisi.

Maman et Papa, merci de m'avoir toujours laissée choisir ma route, et de m'y avoir accompagnée avec ferveur ! Même si ce n'était pas gagné d'avance, même s'il a fallu se battre pour apprendre les autodictées, même si j'avais faux à toutes mes divisions euclidiennes, même si j'avais -42/20 en dictée, même si les profs disaient qu'il ne fallait pas que j'aille à la fac, même si la fac de médecine en a décidé autrement… Merci pour votre soutien, et merci de m'avoir construite ainsi !
Théo et Basile, le rôle de grande sœur n'est pas facile à jouer, il fallait bien montrer l'exemple ! Je suis fière de notre trio, des voies que nous avons choisies et de tout ce que nous avons partagé et partageons encore, qui m'ont aidé et m'aident toujours à me rendre plus forte, merci donc pour notre fraternité !
Très attentionnée, ma grande famille a suivi de près l'évolution de chacun, je vous remercie donc tous pour votre présence, vos questions, vos rires, votre soutien. Manou, Papili, Mamoune et Papydou, les tatas et tontons Nathalie, Philippe, Geneviève, Brigitte, Jean-Michel, Catherine, Dominique, Françoise, Véronique, Pascal, Claire et Michel et les cousins, Maxence, Faustine, Lyse, Cécile, Robert, Clara, Anne-Sophie, Xavier, Martin, Elise, Cathy, Christophe, Thomas, Titouan, Benjamin, Louis, Céline, Madeleine, Marion, Alexandre, Romy, James, Sylvestre, Nicolas, Lucille, Camille, Akram, Martin, Héloise, Paul et Lucie.
Famille qui s'est agrandie plus récemment, Isabelle, Margaux, Diego, Marianne, Hervé, Danielle, Christophe, Manon, Christian, Fanny, Gérard, Hoa, Alex et Maxime merci de m'avoir acceptée parmi vous et soutenue ces derniers mois.
Et les amis aussi !

Sonya et Mylène, j'ai adoré que nos thèses se croisent, que nous passions du temps à écrire ensemble, à échanger des papiers et des adresses de ptits bars sympas ! Merci les filles d'être toujours là.
Mathieu, tu es si loin, mais même de là-bas on reçoit ton soutient ! Merci pour tous les verres de vins et morceaux de fromages partagés après une longue journée de labo, et merci pour tes coups de gueules tes rires tes amours qui changent les idées !
Léo, merci d'être passé par là avant moi et d'avoir déblayé le terrain afin de me rendre la vie plus facile ! Une petite partie de zombicide ? Ça aide aussi !
Antoine, Laura, Thomas, Elise, Yves, merci pour tous les moments partagés qui m'ont sortie un peu du labo, les nouvels ans, les apéros, les concerts ! Merci à vous tous pour votre soutien !
Marie-Lou, loin des yeux mais pas du cœur ! Heureusement qu'il y a Whatsapp et le TGV ! Merci pour ton soutien sans faille (« Magistère ! »), et les weekends à Bordeaux ! Une pensé à tous les copains de la bande, toutes générations confondues, qui ont eux aussi participé à forger ce que je suis, merci pour votre soutien.
Julien, merci pour ta présence des fois de très près, des fois de très très loin, mais constante ! Merci de toujours être là et de me soutenir coûte que coûte !
Anne, Adrien, Blanche et Damien, merci pour votre soutien ces derniers temps, les soirées jeux, les escape (*échappements* pour parler un français correct ?), les soirées thèses (c'est nouveau, mais je ne suis pas sure d'avoir envie de continuer), les soirées. Anne, je te dois ma mise en page et je n'ai qu'un mot, Merci.
Sans oublier Caroline, Sylvie, Valérie et Anna, avec qui danser a pu libérer mon corps de la tension qui s'y accumulait cette dernière année particulièrement chargée ! Merci !

Enfin, il y en a Un qui m'a supportée plus que les autres ces derniers temps, et depuis un bon moment d'ailleurs. Thibaut, je crois que cette thèse et aussi un peu la tienne. Merci de m'avoir soutenue chaque jour et jusqu'au bout à coup de massages, de petits plats, de The Witness, de plâtrées de pattes, de fromages, de studios Gibli. Merci d'être fière de moi, de t'intéresser à ce travail auquel je consacre beaucoup de mon temps, et de comprendre à quel point j'en ai besoin. Merci.

Ma très chère thèse, tu l'auras compris, tu es plutôt Notre très chère Thèse, je te partage avec tous, et suis fière que tu représentes le travail accompli ces cinq dernières années.

Table des Matières

Résumé 16
Abstract 17
Abréviations 18

Introduction 21

I. Les muscles squelettiques 23

A. Caractéristiques des muscles squelettiques 23

1. Les différents types de muscles 23

2. La contraction musculaire 25

B. Le développement des muscles squelettiques 25

1. Somitogenèse et formation du myotome 25

2. Myogenèse primaire ou embryonnaire et secondaire ou fœtale 27

3. Régulation génique de la myogenèse 30

a. Histoire de la découverte des facteurs régulateurs de la myogenèse : les MRF .. 30

b. Inactivation des MRF in vivo 31

c. Histoire de la découverte des facteurs génétiques qui régulent l'expression des MRF 34

4. Les progéniteurs musculaires 36

a. Genèse des progéniteurs myogéniques 36

b. Diversité des progéniteurs myogéniques 37

5. Innervation des muscles axiaux fœtaux 40

6. Myogenèse cranio-faciale 41

a. Développement des muscles de la tête 41

b. Contrôle génétique de la myogenèse cranio-faciale 42

c. Les progéniteurs musculaires cranio-faciaux 43

C. Myogenèses Post-natales et homéostasie 44

1. Croissance post-natale 44

a. Etablissement du typage de fibres 45

b. Maturation des JNM 45

c. Charges mécanique et hormonale 46

2. Homéostasie des Cellules Satellites 47

a. Origine des Cellules Satellites 47

b. Maintien de la quiescence des cellules satellites 48
3. Régénération 50
a. Activation des cellules satellites 51
b. Différentiation et Auto-renouvellement des Cellules Satellites 54
c. Ré-établissement du typage de fibre et ré-innervation après blessure 58
d. Populations non myogéniques 59
II. Les Progéniteurs Myogéniques et leur environnement 63
A. La niche des cellules satellites adultes : homéostasie et régénération 64
1. Interactions avec la fibre musculaire 64
2. Interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire 67
a. Laminin 67
b. Collagène 69
c. Fibronectine 70
3. Interaction avec les cellules résidentes du muscle 70
a. Fibroblastes 70
b. Cellules endothéliales 71
c. Motoneurones 71
B. Environnement des progéniteurs myogéniques au cours du développement prénatal 72
1. Facteurs sécrétés par les tissus adjacents 72
a. Facteurs affectant la myogenèse épaxiale 73
b. Facteurs affectant la myogenèse hypaxiale 73
c. Facteurs influençant la myogenèse craniofaciale 74
2. Rôle des cellules résidentes du muscle squelettique au cours de développement prénatal 75
a. Cellules des crêtes neurales 75
b. Fibroblastes 76
c. Cellules endothéliales 76
d. Motoneurones 77
3. MEC et myogenèses prénatales 77
a. Mise en place du Myotome 78
b. Myogenèses primaire et secondaire 81
c. Différences entre progéniteurs fœtaux et adultes 82

III. Les gènes à homéo-domaine *Sine Oculis* 83

A. Les gènes Six : Identification et fonctions 83

1. Découverte et évolution des gènes *Six* 83

2. Les protéines SIX 84

a. L'homéo-domaine des protéines SIX 84

b. Le domaine SIX des protéines SIX 86

B. Rôle des homéo-protéines SIX au cours du développement et chez l'adulte 88

1. Le réseau de gènes de détermination rétinienne (RDGN) 88

a. Rôle des gènes du RDGN chez la drosophile 88

b. Le RDGN chez les vertébrés 89

2. Patrons d'expression et knock-out murins 92

a. Six1 92

b. Six4 94

c. Six2 95

d. Six5 97

e. Six3 98

f. Six6 99

3. Les gènes *SIX* chez l'Homme 101

a. Mutations perte de fonction 101

b. Mutations gain de fonction 101

4. Rôle des gènes *Six* dans le muscle squelettique 102

a. Les gènes Six au cours de la myogenèse prénatale 103

b. Les gènes Six dans les cellules progénitrices du muscle adulte 105

c. Régulation de la transcription des gènes cibles de SIX dans les cellules progénitrices 107

d. Régulation de l'expression des gènes cibles de SIX dans les fibres musculaires 109

Objectifs 113

Résultats 117

Overlapping functions of SIX homeoproteins during embryonic myogenesis 121

SIX1 and SIX4 homeoproteins regulate PAX7+ cells progenitor properties during fetal epaxial myogenesis 133

Eya3 n'est pas requis pour la régénération musculaire squelettique adulte 169

Discussion **175**

Myogenèses hypaxiale, épaxiale et craniofaciale chez les KO composites des gènes *Six* 177

Comportement des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale chez les KO Six1Six4 182

La protéine EYA3 n'est pas requise pour le bon déroulement de la régénération musculaire squelettique 196

Conclusion **199**

Annexes **203**

Publications 205

Posters 207

Médiation scientifique 209

Bibliographie **211**

Table des figures

Figure 1 : Structure du muscle strié squelettique 24
Figure 2 : Myogenèse prénatale 27
Figure 3 : Myogenèses embryonnaire, fœtale et postnatale 29
Figure 4 : Innervation des muscles axiaux 40
Figure 5 : Myogenèse crniofaciale 42
Figure 6 : La cellule Satellite Quiescente dans sa niche 49
Figure 7 : Régénération musculaire squelettique 51
Figure 8 : Première image d'une cellules satellite par Alexander Mauro (1961) 63
Figure 9 : Interactions de la Cellule Stellite avec son environnement 64
Figure 10 : Identification et structure de la Membrane Basale des fibres musculaires squelettiques 66
Figure 11 : Signaux extracellulaires régulant la myogenèse 75
Figure 12 : Intégrines et mise en place du myotome 80
Figure 13 : Sine oculis homeobox related genes 85
Figure 14 : Le complexe SIX / EYA / DAC 88
Figure 15 : RDGN et développement de l'œil de drosophile 90
Figure 16 : Redéploiement du RDGN chez les vertébrés 92
Figure 17 : Patron d'expresion des gènes Six chez la souris 100
Figure 18 : Les gènes Six et les myogenèses 112
Figure 19 : Les gènes Six et les myogenèses - Actualisation- 202

Résumé

Les homéoprotéines SIX sont codées par les gènes *Sine oculis homeobox related genes Six1* à *Six6* chez les vertébrés parmi lesquels *Six1*, *Six2*, *Six4* et *Six5* sont exprimés dans le lignage myogénique. Bien que *Six1* et *Six4* soient requis pour la myogenèse hypaxiale, les animaux doubles KO pour ces deux gènes (s1s4KO) forment leurs muscles épaxiaux et craniofaciaux. Nous avons caractérisé le phénotype de mutants composites des gènes *Six* et avons montré que l'absence de *Six1* et *Six2* empêchait la formation des muscles craniofaciaux et empirait les défauts de formation des muscles des membres observés chez les fœtus mutants pour *Six1*. Nous avons aussi observé que les fœtus dépourvus d'activité de SIX1, SIX2, SIX4 et SIX5 étaient toujours capables de former leurs muscles épaxiaux, mais que l'expression de *Pax7* dans leurs progéniteurs myogéniques était fortement diminuée et mêlée à l'expression de *Myogénine*. Alors que les fœtus s1s4KO forment des muscles épaxiaux, leurs cellules PAX7+ ont un défaut de nichage entre la membrane plasmique des myofibres et la lame basale qui les entoure. Nos analyses transcriptomiques, nos expériences de transplantation et nos études *in vitro* nous ont permis de conclure que le nichage des cellules PAX7+ nécessitait un environnement adéquat combinant des propriétés des myofibres et des cellules PAX7+ ; environnement perturbé dans les muscles épaxiaux s1s4KO. Nos expériences de transplantation nous ont aussi permis de conclure que *Six1* et *Six4* étaient requis pour une bonne ré-innervation des myofibres après blessure et pour la mise en place du phénotype rapide de ces myofibres. De plus, les muscles transplantés avec des cellules PAX7+ fœtales s1s4KO après blessure se reforment d'un grand nombre de petites myofibres. Nous avons pu relier ce phénotype au comportement des cellules s1s4KO *in vitro* où elles montrent un défaut de fusion. Enfin, les homéoprotéines SIX ont besoin de co-facteurs pour induire l'expression de leurs gènes cibles, tels que les protéines EYA codées par les gènes *Eya1* à *Eya4* chez les vertébrés. *Eya3* et *Eya4* sont fortement exprimés dans les cellules satellite au cours de la régénération, cellules qui requièrent aussi *Six1* pour une réparation musculaire efficace. Nous avons étudié la régénération musculaire en absence d'expression d'*Eya3* et n'avons pas observé de défaut nous menant à la conclusion qu'*Eya3* n'est pas requis pour la régénération musculaire adulte, mais que sa perte d'expression était peut-être compensée par un autre gène *Eya* chez les animaux mutants. Pour conclure, *Six1* et *Six2* sont indispensables à la formation des muscles craniofaciaux, et *Six1* et *Six4* sont requis pour la myogenèse hypaxiale, et pour l'établissement d'un environnement propice à la maturation des myofibres fœtales et au nichage des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse épaxiale, et permettant la croissance des myofibres et leur ré-innervation après blessure. La collaboration des protéines SIX avec leurs co-facteurs EYA au cours de la myogenèse nécessite d'autres études pour mieux définir leurs fonctions.

Abstract

SIX homeoproteins are encoded by the Sine oculis homeobox related genes *Six1* to *Six6* in vertebrates among which *Six1*, *Six2*, *Six4* and *Six5* are expressed in the muscle lineage. Whereas *Six1* and *Six4* are required for hypaxial myogenesis, double KO for those two genes (s1s4KO) still form their epaxial and craniofacial muscles. We further characterized the phenotype of compound *Six* mutant embryos and showed that the absence of *Six1* and *Six2* completely impairs craniofacial myogenesis and worsen muscle limb development observed in single *Six1* mutants. We also showed that mouse fetuses devoid of SIX1, SIX2, SIX4 and SIX5 activity are still able to develop epaxial muscles, but that *Pax7* expression in myogenic progenitors of these mutants is reduced and intermingled with *Myogenin* expression. While s1s4KO fetuses still develop epaxial muscles, their PAX7+ cells show a perturbed homing process into their niche, between the plasma membrane of a myofibre and the basal lamina surrounding it. Transcriptomic analysis, transplantation experiments and *in vitro* studies allowed us to conclude that the homing of PAX7+ cells into their niche during fetal myogenesis requires an adequate environment combining properties of the myofibers and the PAX7+ cells; environment disturbed in s1s4KO epaxial muscles. Transplantation experiments also led us to conclude that *Six1* and *Six4* are required for proper myofiber re-inervation after injury and for the establishment of the fast phenotype of myofibers. Furthermore, muscles transplanted with s1s4KO fetal PAX7+ cells after injury are formed of numerous and tiny myofibers. We could link this phenotype to the behavior of s1s4KO cells *in vitro* where they showed perturbed fusion. Finally, SIX homeoproteins require co-factors to induce their target genes expression, as EYA proteins encoded by *Eya1* to *Eya4* in vertebrates. *Eya3* and *Eya4* are strongly expressed in satellite cells during regeneration, cells in which *Six1* is also required for proper muscle repair. We investigated muscle regeneration in absence of *Eya3* expression and observed no obvious phenotype. We concluded that *Eya3* is not required for muscle regeneration but that other *Eya* genes might compensate its function in KO mouse. To conclude, *Six1* and *Six2* are required for craniofacial myogenesis and *Six1* and *Six4* for hypaxial myogenesis and for the establishment of a proper environment allowing myofibre maturation and PAX7+ cells homing during fetal epaxial myogenesis and enabling myofibre growth and re-innervation after injury. The role of the collaboration between SIX and EYA proteins during myogenesis still needs more investigation.

Abréviations

A	ABL	Abelson
	AchR	Acetylcholin receptor
	ADN	Acide désoxyribonucléique
	ADNc	ADN complémentaire
	ARE	ATP1a1 Regulatory Element
	AREC3	Cell-type specific ARE binding factor
	ARN	Acide Ribonucléique
	ARN	ARN messager
	ARNi	ARN interférence
	Arx	Aristaless related homeobox
	ato/Atoh	Atonal
	ATP	Adénosine Tri Phosphate
B	β-GAL	β-Galactosidase
	bHLH	Basic Helix-loop-Helix (Hélice-boucle-hélice)
	BMP	Bone Morphogenetic Protein
	BN	Bord Neural
	BOR	Banchio-oto-renal
C	c-Met	Met proto-oncogene
	CalcR	Calcitonin Receptor
	Carm1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
	CDK	Cyclin Dependent Kinase
	Cdx2	Caudal-type homeobox protein 2
	CE	Enhancer central
	CN	Crêtes Neurales
	CNC	Crêtes Neurales Céphaliques
	ColVI	Collagène VI (6)
	CPM	Cellule Précurseur Myogénique
	Cre	Cre recombinase
	Cre-ERT2	Cre-Estrogen receptor 2
	CS	Cellule Satellite
	CSMD	Cellules souches musculaires dérivées
	CSQ	Cellules Satellite Quiescente
	CXCL12/14	chemokine (C-X-C motif) ligand 12/14
	CXCR4/7	chemokine (C-X-C motif) receptor 4/7
D	DACH/Dac	Dachshund
	DE	Domaine EYA
	Dlk1	delta-like 1 homolog
	DM	Dermomyotome
	DM	Dystrophie Myotonique
	Dmahp	Dystrophy myotonic locus-associated homeodomain protien
	Dmd	Duchenne Muscular Dystrophy
	Dmpk	Dystrophy myotonic protein kinase-encoding gene
	DNT	Domaine N-Terminal
	DRR	Région de Régulation Distale
	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
E	E18.5	Embryonic day 18.5
	ED	Ectoderme Dorsal
	EDL	Extensor Digitorium Longus
	EfnA3	ephrin A3 (ligand)
	EO	Epithélium olfactif
	EOM	Extra ocular muscles
	EphA3	Eph receptor A3
	EPP	Ectoderme Pré-placodal
	EPR	Epithélium pigmentaire rétinien
	ERK	extracellular regulated MAP kinase
	Ey	Eyeless
	Eya	Eyes absent

F	FGF	Fibroblast Growth Factor
	Foxc1/2	forkhead box C1/2
	Fzd7	frizzled class receptor 7
G	Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor
	GFP	Green fluorescent protein
	GnRH	gonadotropin releasing hormone
	Grc	Groucho
H	HD	Homeodomain
	HGF	Hepatocyte Growth Factor
	HSA	Human Skeletal Actin
I	Itga4/6/7	Intégrine-α4/6/7
	Itgb1	Intégrine-β1
J	JNM	Jonction neuromusculaire
K	KI	Knock-in
	KO	Knock-out
L	LB	Lame basale
	LC	Lèvre caudale
	LDM	Lèvre dorso-médiale
	Lhx2	Lim homeobox 2
	LR	Lèvre rostrale
	LR	Lame réticulée
	LVL	Lèvre ventro-latérale
M	M1	Macrophage de type 1
	M2	Macrophage de type 2
	Mapk	MAP kinase
	Mark2	microtubule affinity regulating kinase 2
	MB	Membrane basale
	Mcad	M-cadhérine
	MCI	Masse cellulaire interne
	MEC	Matrice extracellulaire
	MEF	Mous Embryonic Fibroblast
	Mef2c	Myocyte enhancer factor 2c
	Mesp1	Mesoderm posterior 1
	MIB1	mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
	miR	micro-ARN
	ML	Mésoderme latéral
	MMP	Métalloprotéase
	Motoneurones FF	Fast-twitch Fatiguable
	Motoneurones FR	Fast-twitch Fatigue resistant
	Motoneurones S	Slow-twitch
	MRF	Myogenic Regulatory Factor
	Mrf4	Myogenic regulatory factor 4
	MuSK	Muscle skeletal receptor tyrosin kinase
	Myd	Myogenic determination
	Myf5	Myogenic factor 5
	MYH	Myosin Heavy Chain
	MyHE	Myosine embryonnaire
	MyHF	Myosines rapides (Fast)
	MyhNeo	Myosine néonatale
	MyHS	Myosine Lente (Slow)
	MyoD	Myogenic determination gene 1
	MYOG	Protéine Myogénine
	MyoR	Myogenic Repressor
N	N-cad	N-cadhérine
	N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
	NC	Notochorde
	Nfatc4	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 4
	Nfix	Nuclear factor i X
	NICD	Notch Intracellular domain
	NO	Nitric Oxyde

	NR	Neurorétine
	NTX	Notexin
O	Oct4	Octamere-binding transcription factor 4
P	P0	Postnatal day 0
	Par3	pulmonary adenoma resistance 3
	Pard3	par-3 family cell polarity regulator
	Pax3/7	Paired-box 3/7
	PCP	Planar Cell polarity
	PCR	Polymerase Chain Reaction
	Pdgfrα	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
	Pitx2	Paired-like homeodomain factor 2
	PKCθ/λ	Protein kinase C θ/λ
R	Rbpj	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
	RDGN	Retinal Determination Gene Network
	RTqPCR	Real Time quantitative PCR
S	s1KO	*Six1* KO
	s1s2KO	*Six1*:*Six2* double KO
	s1s2s4KO	*Six1*:*Six2*:*Six4* triple KO
	s1s2s4s5KO	*Six1*:*Six2*:*Six4*:*Six5* quadruple KO
	s1s4KO	*Six1*:*Six4* double KO
	s1s4s5KO	*Six1*:*Six4*:*Six5* triple KO
	SD	Six Domain
	SDF1	Stromal cell-derived factor 1
	Sema3	Sémaphorine 3A
	Shh	Sonic hedghog
	Six	Sineoculis homeobox related
	SM	Sillon Morphogénétique
	So	Sine oculis
	Sox6	Sex determining region y (SRY) box 6
	SV2a	synaptic vesicle glycoprotein 2 a
T	TA	Tibialis Anterior
	Tbx1	T-box 1
	TCDI	Tissu Conjonctif Dense Irrégulier
	Tcf21	Transcription factor 21
	TE	Trophectoderme
	Tgfβ	Transforming growth factor β
	TN	Tube Neural
	toy	Twin of eyless
	Tw2	Twist-2
U	µm	micro-mètres
V	VangL2	Vang-like 2
	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
	Vla-4	Very late antigene 4
W	Wnt	Wingless family members
	WT	WildType

Introduction

Chez les métazoaires, clade rassemblant tous les animaux, la vie commence par la fécondation de deux gamètes parentaux qui forment alors la cellule œuf, ou zygote. Cette cellule est la cellule la plus souche que les animaux peuvent connaître, par divisions elle est à l'origine de toutes les cellules d'un organisme. Les premières divisions s'enchainant, la masse de cellules prend une forme de mure, appelée morula. Quand elle est constituée de 32 cellules (5 divisions depuis la cellule œuf) une cavité, le blastocœle, se forme à l'intérieur de la morula. Les cellules choisissent alors leur destin : la masse cellulaire interne (MCI), au-dessus du blastocœle, qui forme l'embryon en lui-même, ou le trophectoderme (TE), autour du blastocœle qui est à l'origine des tissus extra-embryonnaires essentiels au développement de l'embryon. Cette décision est dépendante de l'expression de deux gènes codant pour des facteurs de transcriptions : *Oct3/4* (octamere-binding transcription factor 3/4) exprimé par les cellules de la MCI et *Cdx2* (Caudal-type homeobox protein 2) exprimé dans le TE (Bertolessi et al., 2015; Niwa et al., 2005). C'est l'environnement des cellules qui leur dicte leur devenir : les cellules situées à l'intérieur de la morula forment la MCI et les cellules à l'extérieur le TE. Dès le début de l'embryogenèse, l'environnement cellulaire est donc primordial pour contrôler le comportement des cellules. Au cours du développement, qui conduit la cellule œuf aux quelques dizaines de milliards de cellules qui constituent un organisme, les cellules sont amenées à s'engager dans des voies de différentiation où elles sont de plus en plus spécialisées. Cet engagement est basé sur deux évènements : la détection d'un signal d'engagement et la différentiation en un type cellulaire donné par expression des gènes signatures de cette lignée.

I. Les muscles squelettiques

A. Caractéristiques des muscles squelettiques

1. Les différents types de muscles

Les muscles sont des organes constitués de cellules à capacité contractile. Les muscles squelettiques font partie de la catégorie des muscles striés, ils sont reliés aux os par les tendons et tapissent le squelette permettant ses mouvements. Le muscle cardiaque est lui aussi un muscle strié. Sa contraction permet de propulser le sang tout le long du système vasculaire. Il existe un autre type de muscle, appelé muscle lisse. Les muscles lisses tapissent les différentes cavités de l'organisme et permettent l'écoulement de fluides tels que le sang dans les vaisseaux ou de l'air dans les poumons. Ces derniers ainsi que le muscle cardiaque sont des muscles à contraction non volontaire, alors que les muscles striés squelettiques sont des muscles à contraction volontaire. Ils nous permettent d'effectuer tous nos mouvements, de

nous tenir debout, de manger, respirer, regarder (Figure1A). Les muscles squelettiques sont constitués de longues cellules contractiles appelées myofibres, ou fibres musculaires. Une myofibre s'étend d'un tendon à un autre, tendons qui la relient aux os. Ces longues cellules sont plurinuclées, et peuvent compter jusqu'à 500 noyaux. Elles résultent de la fusion de cellules progénitrices, aussi appelées myoblastes, qui rassemblent leurs noyaux pour former des myofibres matures, post-mitotiques (Figure1B). En plus des fibres musculaires, qui sont les cellules musculaires différenciées, le muscle squelettique est aussi composé de cellules non différenciées appelées cellules satellites. Ce sont les cellules souches adultes du muscle squelettique qui assurent la fonction de réparation du muscle adulte lors d'une blessure. Leur nom provient de leur localisation spéciale au sein du muscle. En effet, chaque cellule satellite se situe en contact étroit avec une myofibre. Une lame basale constituée de protéines de matrice extra-cellulaire entoure chaque myofibre avec ses cellules satellites (Mauro, 1961) (Figure1C). Il a été dénombré qu'en moyenne, entre 7 et 11 cellules satellites étaient associées à une myofibre d'un muscle des membres chez la souris (White et al., 2010).

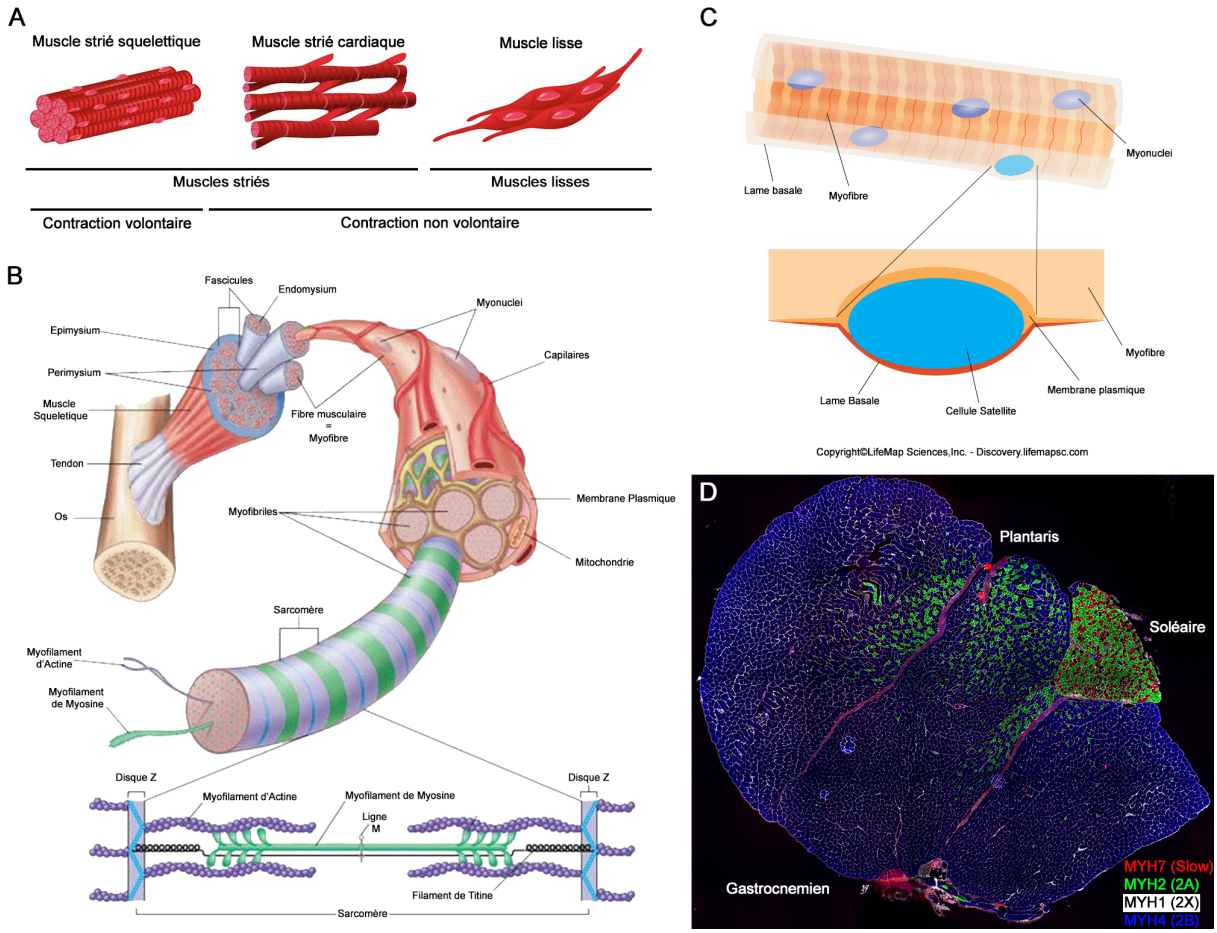


Figure 1 : Structure du muscle strié squelettique

Figure adaptée de sciencelearn.org (A), (B), lifemapsc.com (C), et Dos Santos et al, données non-publiées (D).

2. La contraction musculaire

La capacité de contraction des fibres musculaires est due à leur unité contractile cytoplasmique appelée le sarcomère (Figure1B). Cette structure est constituée de filaments d'actine et de myosine disposés de façon très régulière. C'est l'interaction entre l'actine et la myosine qui provoque un glissement du filament d'actine le long de la myosine, induisant ainsi un raccourcissement des sarcomères et une contraction de la myofibre. Ce processus est dépendant de l'ATP, et nécessite son clivage par l'activité ATPase de la myosine, portée par la tête de ses chaines lourdes. Il existe plusieurs types de fibres musculaires qui diffèrent par leur vitesse de contraction (fibres lentes ou rapides) et par le métabolisme qu'elles utilisent pour produire l'ATP cellulaire (métabolisme oxidatif ou glycolytique). La diversité du type de fibres est associée à une diversité des gènes qui codent pour les chaînes lourdes de la myosine. En effet, chez une souris adulte, cinq gènes codent pour des chaines lourdes de myosine : MYH7 (dans les fibres lentes oxydatives de type 1), MYH2 (dans les fibres rapides oxydatives de type 2A), MYH1 (dans les fibres rapides glycolytiques de type 2X), MYH4 (dans les fibres rapides glycolytiques de type 2B) et MYH13 (exclusivement réservée aux muscles extra-occulaires). Les protéines codées par ces gènes se distinguent par l'efficacité de leur activité ATPase : plus l'activité ATPase est importante, plus vite l'ATP est clivé et plus la contraction peut se faire rapidement (Barany, 1967; Schiaffino and Reggiani, 2011) (Physiologie Humaine, Lauralee Sherwood, ed. De Boeck). Un muscle squelettique est généralement composé de myofibres de différents types dont le pourcentage détermine si le muscle est plutôt lent ou rapide (Figure1D).

B. Le développement des muscles squelettiques

Pendant plusieurs décennies, des équipes de chercheurs ont été persuadées que les muscles squelettiques axiaux provenaient des somites, ces structures épithéliales mésodermiques. Il a fallu attendre 1977 pour que B. Christ, H.J. Jacob et M. Jacob démontrent par des expériences de transplantation de somites de cailles dans des embryons de poulet que les muscles des ailes avaient bien une origine somitique (Christ et al., 1977). Depuis, un grand nombre d'études ont été publiées afin d'essayer de comprendre comment les cellules somitiques sont capables de former les muscles.

1. Somitogenèse et formation du myotome

En 1855, Robert Remak décrit la présence de trois feuillets à l'origine du développement de l'embryon : L'ectoderme, qui forme les tissus externes, l'endoderme, qui forme les tissus internes

et le mésoderme, qui forme les tissus intermédiaires. Après une suite d'évènements de réorganisation cellulaire, ces trois feuillets formeront tous les tissus constituants un organisme. Les cellules du mésoderme s'organisent en structures épithéliales compactes et symétriques de part et d'autre de la notochorde appelées somites. Elles se forment de manière périodique et directionnelle, de la partie rostrale vers la partie caudale de l'embryon. Ce processus appelé somitogenèse est due à l'expression périodique de facteurs de transcription depuis le mésoderme pré-somitique caudal vers la partie rostrale de l'embryon (Aulehla and Pourquié, 2006). Les somites se forment donc progressivement le long de l'axe rostro-caudal de l'embryon. Les somites subissent ensuite un changement de structure différenciant leurs parties dorsales et ventrales. Les cellules situées dans la partie ventrale du somite perdent leur organisation épithéliale pour former le mésenchyme à l'origine des os, de la colonne vertébrale et des côtes : le sclérotome ; la partie la plus dorsale du sclérotome est appelée syndétome et est à l'origine du tissu conjonctif qui formera les tendons axiaux reliant les muscles axiaux au squelette du tronc (Brent et al., 2003). La partie dorsale du somite, toujours organisée en épithélium est alors appelée dermomyotome, et est à l'origine du derme dorsal, du tissu adipeux brun, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des muscles squelettiques dorsaux et ventraux du tronc, des pattes et de la langue. Le premier muscle squelettique formé est le myotome et résulte de la migration, entre le dermomyotome et le sclérotome, de progéniteurs myogéniques à E8,75 chez la souris (Biressi et al., 2007a). Ces cellules délaminent d'abord depuis la partie médiale du dermomyotome puis depuis les lèvres dorso-médiale (LDM) ou épaxiale, rostrale (LR) et caudale (LC) puis ventro-latérale (LVL) ou hypaxiale du dermomyotome (Kahane et al., 1998; Denetclaw and Ordahl, 2000; Gros et al., 2004) (résumé dans (Buckingham, 2001) et (Kalcheim et al., 1999)). Les cellules de cette première vague de migration sont post-mitotiques et s'engagent dans la voie de différentiation myogénique dès qu'elles ont atteint le myotome. Elles s'allongent ensuite dans le sens rostro-caudal et forment ainsi les premiers myocytes constituant le myotome. Une deuxième vague de progéniteurs délamine ensuite de la partie centrale du dermomyotome vers le myotome, et constitue un pool de cellules prolifératives à l'origine de la croissance du myotome. Ce myotome, ainsi que d'autres cellules provenant du dermomyotome épaxial sont à l'origine des muscles du dos. Dans la partie ventrolatérale des somites, des cellules progénitrices délaminent du dermomyotome hypaxial et migrent dans les bourgeons de membres pour former les muscles des membres, ou en direction médiale pour les somites les plus rostraux, pour former le diaphragme et la langue. Les muscles intercostaux et abdominaux proviennent eux de l'extension latérale de la partie ventrale du myotome hypaxial (Figure 2) (Ordahl and Le Douarin, 1992; Cinnamon et al., 1999; Wilson-Rawls et al., 1999).

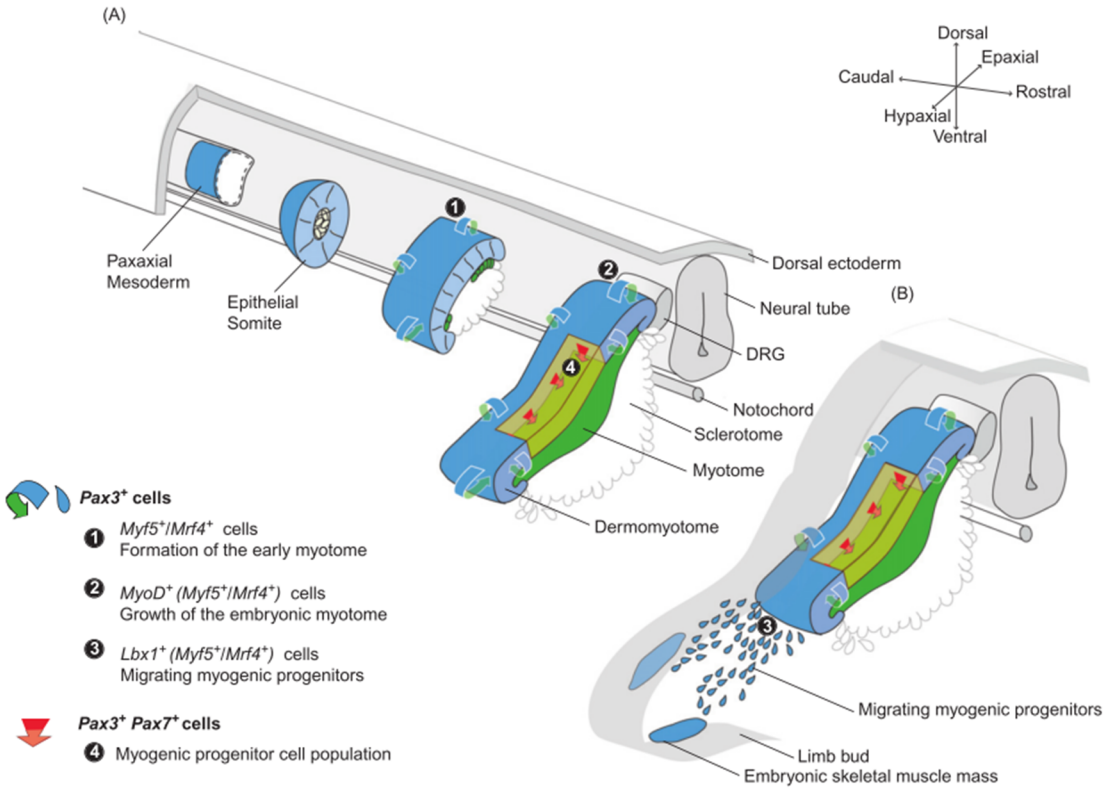


Figure 2 : Myogenèse prénatale

Figure adapatée de Mayeuf-Louchard and Buckingham, 2014.

2. Myogenèse primaire ou embryonnaire et secondaire ou fœtale

Une fois que les progéniteurs myogéniques ont atteint leur destination finale, ils s'engagent dans la voie de la différentiation musculaire et fusionnent pour former des myofibres. La myogenèse a alors lieu en deux phases successives (chez les petits mammifères, trois phases chez l'Homme (Draeger et al., 1987)), la myogenèse primaire ou embryonnaire entre E10,5 et E14,5 et la myogenèse secondaire ou fœtale entre E14,5 et la naissance chez la souris (Figure 3C) (Kelly and Zacks, 1969; Ontell and Kozeka, 1984a). Les premières myofibres à être formées sont appelées myofibres primaires. Elles résultent de la fusion entre les cellules progénitrices ayant atteint le site de formation du muscle, aussi appelées myoblastes primaires. Les myofibres primaires constituent l'échafaudage des futurs muscles adultes. Elles s'allongent progressivement jusqu'à atteindre le tissu conjonctif qui formera les tendons (Duxson and Usson, 1989). Ces myofibres expriment alors la chaine lourde de myosine de type lent (codée par le gène MYH7) et la myosine de type embryonnaire (codée par le gène MYH3), et sont organisées en rosettes de myofibres où chaque rosette est entourée d'une lame basale regroupant plusieurs myofibres. Les myoblastes qui ne se sont pas encore

différenciés et qui se situent pour certains au sein des rosettes et pour d'autres dans le milieu interstitiel entre les rosettes formeront ensuite les myofibres secondaires. Celles-ci se forment en contact avec les myofibres primaires, sous la lame basale qui entourent les rosettes maintenant constituées de myofibres primaires et secondaires (Figure 3A et 3B) (Duxson et al., 1989). Contrairement aux myofibres primaires, dont la formation est synchrone au sein d'une même rosette, les myofibres secondaires se forment progressivement et ne sont pas directement reliées aux tendons (Duxson and Usson, 1989). Elles forment plutôt des interdigitations qui s'invaginent dans les myofibres primaires (Kelly and Zacks, 1969; Harris et al., 1989). Il a été proposé que la formation des myofibres secondaires en contact serré avec les myofibres primaires était permise par l'interaction entre deux protéines d'adhésion, VLA-4 (aussi connue sous le nom d'intégrine-α4) exprimée à la surface des myofibres primaires et VCAM1 exprimée à la surface des myoblastes secondaires (Rosen et al., 1992). La formation des myofibres secondaires a lieu préférentiellement aux alentours des plaques motrices des myofibres primaires, témoignant d'un début d'innervation de celles-ci bien que la répartition spaciale des myoblastes secondaires soit complètement aléatoire tout le long des myofibres primaires (Duxson et al., 1989). Les myofibres secondaires sont facilement reconnaissables dans les muscles foetaux, elles sont plus petites que les fibres primaires, n'expriment pas la myosine de type lent et on trouve généralement plusieurs petites fibres secondaires autour d'une large fibre primaire (Figure 3B) (Kelly and Zacks, 1969). A la naissance, le muscle a atteint le nombre de myofibres trouvé chez l'adulte, et les fibres primaires et secondaires deviennent indistinguables (Ontell and Kozeka, 1984a). Les myofibres sont en effet indépendantes les unes des autres, toutes reliées aux tendons, chacune entourée de sa propre lame basale et les myoblastes résiduels se trouvent localisés en contact avec une myofibre, sous sa lame basale, en position de cellule satellite (Kelly and Zacks, 1969; Ontell and Kozeka, 1984b). Une équipe a comparé les myogenèses primaires et secondaires entre un muscle rapide l'EDL (le muscle extenseur des orteils, muscle localisé dorsalement par rapport au tibia) et un muscle lent, le soléaire (muscle localisé ventralement par rapport au tibia). Ils ont observé que la myogenèse secondaire était retardée de deux jours dans le soléaire et répertorié dans les myofibres de ce dernier un nombre important d'événements de mort cellulaire de myofibres avant la naissance. Il n'a pas été plus précisément étudié si ces différences étaient vraiment liées à la différence de composition en fibres lentes et rapides (Ontell et al., 1988). La spécification terminale du typage de fibres a lieu en période post-natale et sera donc abordée plus tard. Des équipes se sont intéressées aux propriétés des muscles embryonnaires et fœtaux, afin de mieux comprendre la différence entre ces deux

phases de myogenèse. Dans ce but, l'équipe de Giulio Cossu proposait en 1994 un modèle de culture *in vitro* permettant de simuler la formation des myofibres primaires et secondaires. Ce système leur a permis de mettre en évidence le rôle du facteur TGFβ empêchant les myoblastes secondaires de s'engager dans la voie de différentiation mais n'ayant aucun effet sur les myoblastes primaires. En effet, le TGFβ agit sur la myogenèse via la protéine kinase PKCθ, exprimée spécifiquement dans les myoblastes secondaires, les rendant sensibles au TGFβ. Les myoblastes primaires n'exprimant pas la PKCθ ne sont pas sensibles au TGFβ (Cusella De Angelis et al., 1994; Zappelli et al., 1996). En 2008, la même équipe démontrait

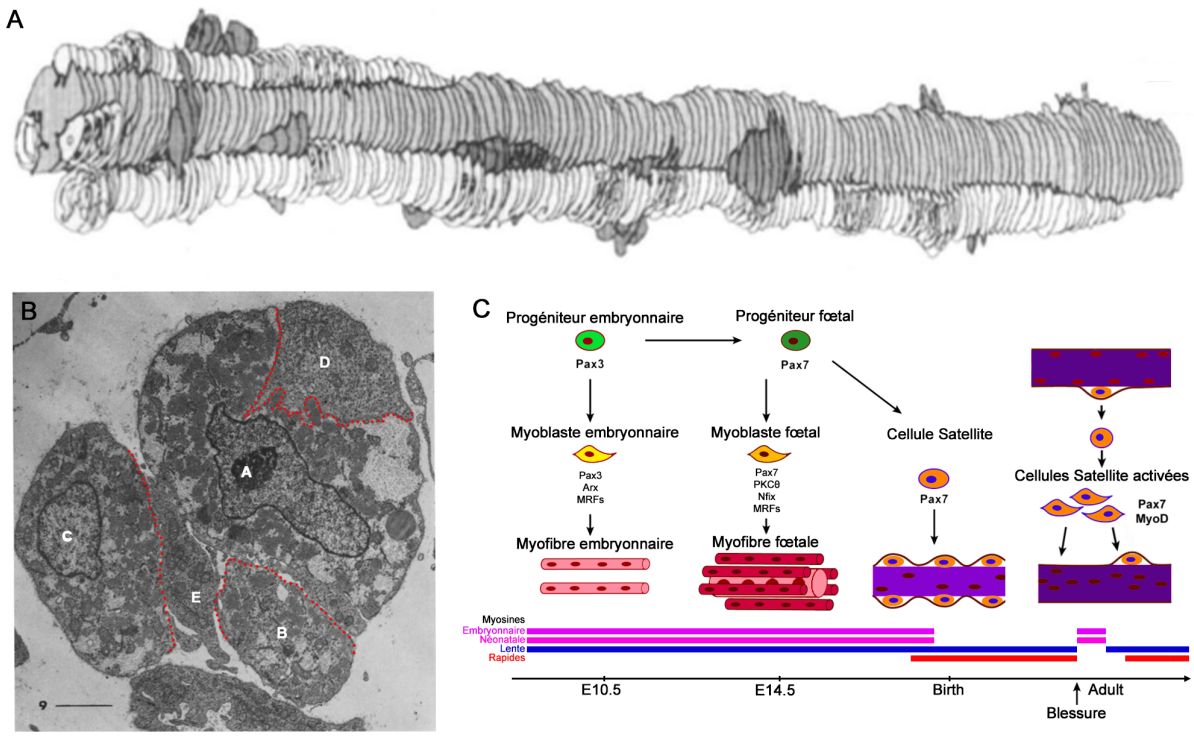


Figure 3 : Myogenèses embryonnaire, fœtale et postnatale

Figure adaptée de Duxson et al., 1989 (A), Kelly and Zacks, 1969 (B), and Esteves de Lima PhD thesis, 2015 (C).
A : Reconstitution tridimensionnelle de sections sériées d'un muscle des pattes arrières d'un fœtus à E21 de rat montrant la relation entre une myofibre primaire (gris claire), deux myofibres secondaires (blanc) qui se sont formées en contact avec la fibre primaire, et des cellules myogéniques mononuclées indifférenciées (gris foncé) dont certaines se trouvent entre les myofibres primaire et secondaire. B : Image de microscopie électronique montrant une fibre primaire (A), trois fibres secondaires (B,C,D) dont les membranes plasmiques sont surlignées d'une ligne pointillée rouge, et une cellule myogénique mononuclée indifférenciée (E) localisée entre la myofibre primaire et une myofibre secondaire. C : Schéma représentant l'origine et la formation des myofibres embryonnaires, fœtales et adultes par les myoblastes correspondant au cours des croissances pré- et postnatales, ainsi que les types de myosines exprimées par ces différentes myofibres.

que le facteur de transcription ARX régulait l'engagement des cellules dans la myogenèse embryonnaire, contrôlant l'expression de Myogénine avec MyoD (Biressi et al., 2008). Ils ont ensuite montré en 2010 que le facteur de transciption NFIX était spécifiquement exprimé dans le muscle fœtal et participait à l'inhibition de l'expression de gènes spécifiques des muscles embryonnaires et à l'induction de gènes spécifiques des muscles fœtaux, notamment en empêchant l'expression du gène *Myh7* via une action négative sur la transcription de *Nfatc4* (Messina et al., 2010). Plus récemment, l'équipe de Graziella Messina a pu mettre en évidence que NFIX se fixait directement sur le prometteur du gène *Myh7* codant pour la myosine de type lent pour bloquer son expression dans les myofibres fœtales, et ce nécessitant son interaction avec le facteur de transcription SOX6. Ils ont aussi observé que de son côté, SOX6 avait aussi un rôle dans les myofibres embryonnaires, où, via l'induction de l'expression de *Mef2c*, il stimulait l'expression du gène *Myh7* (Taglietti et al., 2016).

3. Régulation génique de la myogenèse

a. Histoire de la découverte des facteurs régulateurs de la myogenèse : les MRF

Le traitement de fibroblastes embryonnaires à la 5-azacytidine (molécule empêchant la méthylation de l'ADN lors de sa réplication) induit la trans-différentiation de ces cellules en myoblastes (Lassar Paterson, B.M., Weintraub, H., 1986), et la fusion d'une cellule musculaire de souris avec un fibroblaste humain induit l'expression des gènes musculaires du génome humain dans l'hétérokaryon (Pavlath and Blau, 1986), suggérant qu'une cellule musculaire produit des facteurs capables d'induire génétiquement l'identité myogénique. En 1987, Robert L. Davis, Harold Weintraub et Andrew B. Lassar ont découvert que l'induction de l'expression d'un seul ADNc dans une cellule fibroblastique était suffisante pour permettre sa trans-différentiation en cellule myogénique. Ils baptisèrent le gène codant cet ADNc *Myod1* pour Myogenic Determination gene 1 (*MyoD*) (Davis et al., 1987). De son côté, l'équipe de Charles Emerson isola un autre ADNc, doté des mêmes propriétés que *MyoD* avec en plus la capacité d'induire l'expression de *MyoD* : le gène *Myd* est ainsi placé en amont de *MyoD* dans la hiérarchie de la différentiation myogénique (Pinney et al., 1988). Ce gène n'a néanmoins jamais été caractérisé par la suite. Ces deux gènes ayant la propriété d'induire l'identité myogénique, restaient à découvrir les gènes responsables de la différentiation terminale des myoblastes en myotubes plurinucléés. C'est en étudiant les gènes exprimés entre l'induction de la myogenèse et la différentiation, que Woodring Wright, David Sasoon et Victor Lin découvrirent un ADNc capable d'induire la différentiation en myotubes dans un

contexte d'induction myogénique. Cet ADNc étant différent de celui de *MyoD*, il appelèrent ce nouveau gène *Myogénine* (Wright et al., 1989). Contenu des similitudes de séquences entre *MyoD* et *Myogénine*, la recherche d'autres gènes impliqués dans la myogenèse s'orienta vers la caractérisation d'autres gènes ayant une séquence proche de celle du gène *MyoD*. Ainsi, Braun et al. identifièrent le gène *Myf5*, aussi capable d'induire l'engagement dans la voie myogénique (Braun et al., 1989). Enfin, partant de l'hypothèse que différents facteurs de régulation de la myogenèse devaient être présents dans les muscles adultes, Simon J. Rhodes et Stephen F. Konieczny cherchèrent des gènes à la structure proche de celle de *MyoD* exprimés à l'âge adulte dans des muscles de rat. C'est ainsi qu'ils découvrirent le gène *Mrf4*, porteur de la séquence d'homologie entre *MyoD*, *Myogénine* et *Myf5*, et capable d'induire la conversion de fibroblastes en myoblastes. De plus, les cellules induites avec l'ADNc codant pour *Mrf4* activaient l'expression de *MyoD* et *Myogénine* alors que les cellules induites par *MyoD* ou *Myogénine* n'exprimaient pas *Mrf4*. Ils en conclurent que *Mrf4* si situait en amont de *MyoD* et *Myogénine* dans la cascade de régulation de la myogenèse (Rhodes and Konieczny, 1989). En deux années, les quatre gènes primordiaux de la myogenèse chez les vertébrés ont été découverts. Ces gènes codent pour des facteurs de transcriptions de la famille des protéines à hélice-boucle-hélice (bHLH) qui se fixent sur des séquences spécifiques d'ADN, les boites E (CANNTG), pour induire l'expression de leurs gènes cibles. Leur fixation à l'ADN nécessite leur hétéro-dimérisation avec des protéines de la famille E12/E47 qui sont aussi des facteurs de transcriptions bHLH mais d'expression ubiquitaire (résumé dans (Massari and Murre, 2000)).

b. Inactivation des MRF in vivo

Afin de caractériser le rôle de ces différents gènes in vivo, leur inactivation a été réalisée chez la souris par différentes équipes. En Octobre 1992, sont parus dans la même revue Cell, deux articles du laboratoire de Rudolf Jaenisch décrivant le phénotype résultant de l'inactivation de Myf5 (Braun et al., 1992) ou de MyoD (Rudnicki et al., 1992). Alors qu'un fort phénotype musculaire était attendu, les animaux knock-out (KO) pour Myf5 ou MyoD n'ont pas révélé de défaut de formation des muscles squelettiques à la naissance. Les animaux KO pour MyoD ne présentaient pas de défaut de viabilité tandis que les animaux KO pour Myf5 présentaient une létalité post-natale dû à une malformation des côtes empêchant la fermeture de la cage thoracique. Un an plus tard, la publication de la double inactivation de Myf5 et MyoD a rassuré la communauté myologiste : en absence de ces deux facteurs myogéniques, plus aucun muscle squelettique ne se formait chez la souris, confirmant ainsi la redondance fonctionnelle

entre les produits de ces deux gènes, et leur rôle de facteur maitre de la myogenèse (Rudnicki et al., 1993). La même année, deux articles ont été publiés dans la revue Nature rapportant l'effet de l'inactivation de Myogénine. Contrairement aux KO Myf5 et MyoD, l'inactivation de Myogénine affecte fortement la formation des muscles squelettiques et les souris meurent peu de temps après la naissance. Tous leurs muscles squelettiques sont très réduits en taille, et sont composés de très peu de myofibres multinucléées et d'un grand nombre de myoblastes qui n'ont pas fusionné. Myogénine a donc un rôle important au cours de la différentiation musculaire, en aval de Myf5 et MyoD qui ne compensent pas son inactivation. L'expression de Mrf4 diminue fortement en absence de Myogénine suggérant un contrôle de son expression par Myogénine (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). Si l'absence de muscles squelettiques suivant l'inactivation de Myf5 et MyoD, s'explique par l'absence de progéniteurs myogéniques, le phénotype musculaire dû à l'inactivation de Myogénine s'explique par un défaut d'engagement des progéniteurs dans la voie de différentiation myogénique terminale. En effet, une étude plus poussée du KO de Myogénine a confirmé la présence de progéniteurs myogéniques, et proposé un rôle de Myogénine plus important au cours de la différentiation des myoblastes en myotubes multinucléés (VENUTI et al., 1995). Plus tard, des analyses plus fine du déroulement de la myogenèse chez les simple KO Myf5 ou MyoD ont montrées que l'absence de Myf5 seulement empêchait la formation du myotome primaire et menait à un retard de développement des masse musculaires dorsales, compensés ensuite par l'expression de MyoD menant à un développement normal des masses musculaires à la naissance, et que la simple inactivation de MyoD menait à un retard de formation de la musculature ventrale, ensuite compensée par l'expression de Myf5 (Kablar et al., 1997; Braun et al., 1994; Tajbakhsh et al., 1996). L'interprétation des effets de l'inactivation du gène Mrf4 a été plus complexe. Trois allèles KO pour Mrf4 ont été générés et ont montré des phénotypes variables, allant de la viabilité à l'état adulte à la létalité post-natale, toujours avec un effet modéré sur la myogenèse (Braun and Arnold, 1995; Patapoutian et al., 1995; Zhang et al., 1995). Tandis que le KO viable à l'état adulte a montré une forte augmentation de l'expression du gène Myogénine qui a alors été proposé comme compensateur de la perte de Mrf4 (Zhang et al., 1995), le KO létal après la naissance a montré un phénotype fort semblable à celui des souris inactivées pour Myf5 (Patapoutian et al., 1995; Braun and Arnold, 1995). Compte tenu de la proximité des deux gènes (seulement 8kb séparent les gènes Myf5 et Mrf4) il a été proposé que l'inactivation de Mrf4 perturbait l'expression de Myf5, phénocopiant le phénotype de l'inactivation de ce dernier (Olson et al., 1996). Ces conclusions ont aussi remis en cause les observations des KO Myf5 dans lesquels

l'expression de Mrf4 n'avait pas été vérifiée. Deux équipes ont alors réalisé trois autres allèles KO de Myf5 qui affectaient ou non l'expression de Mrf4 et en ont conclu que seule l'absence des trois MRF Myf5, MyoD et Mrf4 conduisait à une absence totale de cellules engagées dans la voie myogénique (Kaul et al., 2000; Kassar-Duchossoy et al., 2004), démontrant ainsi la nécessité d'au moins un de ces trois gènes pour l'acquisition de l'identité musculaire squelettique chez l'embryon. Afin de mieux comprendre la hiérarchie entre ces facteurs de détermination myogéniques, plusieurs équipes ont réalisé différentes combinaisons des allèles KO des quatre MRF. Les animaux doubles KO pour Myogénine et Myf5, MyoD ou Mrf4 ont un phénotype similaire au simple KO pour Myogénine, confirmant la différence fonctionnelle entre ces trois facteurs et Myogénine. Cependant, bien que Myogénine soit le MRF qui ait le rôle le plus important au cours de la différentiation myogénique quelques myofibres primaires se forment chez les animaux KO pour Myogénine et les doubles KO mentionnés précédemment, suggérant que dans certains contextes, MyoD, Myf5 ou Mrf4 sont capables d'induire la différentiation terminale en myotubes (Rawls et al., 1995, 1998). Par contre, l'analyse du double KO de Mrf4 et MyoD a pu souligner une certaine redondance fonctionnelle entre ces deux gènes (Rawls et al., 1998). En effet ces animaux présentent une forte déficience musculaire comparable à celle des KO Myogénine, mais l'expression de Myogénine n'est pas perturbée en absence de MyoD et Mrf4. Cette étude a permis de montrer que Myf5 et Myogénine seuls, n'étaient pas capable d'induire efficacement la différentiation musculaire (Rawls et al., 1998). Les animaux triple KO pour Myogénine, MyoD et Mrf4, n'exprimant que Myf5 comme MRF, ont un phénotype plus grave que celui du simple KO Myogénine ou du double KO Mrf4:MyoD, montrant que Myf5 à lui seul n'est pas suffisant pour mener à bien la myogenèse axiale (Valdez et al., 2000). Enfin, la restauration du phénotype de malformation des côtes du KO Myf5 par le knock-in (KI) de l'ADNc de Myogénine au locus de Myf5 (Wang et al., 1996), et la restauration partielle du phénotype musculaire du KO Myogénine par le KI de l'ADNc de Mrf4 au locus de Myogénine (Zhu and Miller, 1997) ont mis en évidence l'importance de la spécificité spatiotemporelle des patron d'expression des quatre MRF. La restauration incomplète du phénotype du KO Myogénine par l'ADNc de Mrf4 au locus Myogénine démontre néanmoins la spécificité propre de ces deux MRF. Une étude structurale a d'ailleurs pu mettre en évidence que le domaine bHLH de MyoD adoptait une conformation différente de celui de Myogénine, leur conférant une activité différente et expliquant leurs différences fonctionnelles (Bergstrom and Tapscott, 2001). Toutes ces études ont donc montré que Myf5, MyoD et Mrf4 sont responsable de l'engagement des cellules pluripotentes dans un destin myogénique, que Myogénine

permettait la différentiation terminale des cellules myogéniques en myotubes, et que la spécificité fonctionnelle de ces gènes est rendue par la complexité de leurs patrons d'expression et leur spécificité structurelle propre.

c. Histoire de la découverte des facteurs génétiques qui régulent l'expression des MRF

Les cellules embryonnaires capables de s'engager dans le lignage myogénique apparaissent pour la première fois au cours du développement de l'embryon bien avant que l'expression des MRF ait été activée (Williams and Ordahl, 1994). Il doit donc exister d'autres facteurs de transcriptions exprimés plus précocement que les MRF et responsables de l'induction de leur expression et de l'engagement des cellules dans le lignage myogénique. Pour répondre à cette question, plusieurs équipes se sont intéressées aux cellules progénitrices du lignage musculaire, plus particulièrement celles qui migrent dans les bourgeons de membres et qui sont à l'origine des muscles des membres. En 1947, une mutation spontanée créait la souris KO splotch présentant de nombreux défauts développementaux, notamment un défaut de fermeture du tube neural faisant de cette souris un modèle pour étudier la spina bifida. Il a fallu attendre 1991 pour déterminer que le gène *Pax3* était muté chez le mutant splotch (Epstein et al., 1991). PAX3 est un facteur de transcription de la famille des protéines à homéodomaines présentant un domaine paired, famille dont les membres sont tous impliqués dans la régulation de processus développementaux (résumé en (Dahl et al., 1997; Buckingham and Relaix, 2015)). *Pax3* apparaissait comme un bon candidat pouvant contrôler l'expression des MRF compte tenu de son patron d'expression, entre autre dans la partie latérale des somites (Goulding et al., 1991) (d'où proviennent les progéniteurs myogéniques qui migrent ensuite dans les bourgeons de membres) et du phénotype qu'entraine sa mutation à l'état homozygote, les mutants splotch étant dépourvus de muscles des membres et de musculature ventrale (Franz et al., 1993; Franz, 1997). Plusieurs études ont pu démontré que l'ARNm de *Pax3* était exprimé dans les cellules progénitrices migrant dans les bourgeons de membres, et que la mutation de *Pax3* dans les animaux splotch empêchait la migration de ces cellules ainsi que l'expression de *Myf5*, *MyoD* et *Myogénine* dans les pattes de ces mutants (Bober et al., 1994; Williams and Ordahl, 1994; Goulding et al., 1994; Maroto et al., 1997). Afin de situer le rôle de *Pax3* par rapport aux MRF, Tajbakhsh et al. ont publié une étude dans laquelle ils ont réalisé la triple invalidation de *Pax3, Myf5* et *Mrf4* (allèle mutant de *Myf5* invalidant aussi *Mrf4*). Chez ses souris, aucun muscle axial ne se forme, et le tronc de ces animaux est dépourvu d'expression de *MyoD* et *Myogénine*, démontrant que *Pax3, Myf5* et *Mrf4* sont essentiels à la myogenèse axiale, et que deux voies contrôlent indépendamment

l'expression de *MyoD* : l'une dépendante de *Pax3*, l'autre de *Myf5* (Tajbakhsh et al., 1997). Les muscles cranio-faciaux n'ont pas été touchés par la triple inactivation, suggérant un autre mécanisme de contrôle de la formation des muscles de la tête. Parmi les 9 gènes *Pax* présents chez les vertébrés, *Pax3* forme un groupe à part avec son paralogue *Pax7* (Tremblay and Gruss, 1994), qui est aussi exprimé dans le dermomyotome et dans les cellules du lignage myogénique tout au long du développement (Jostes et al., 1990). Le KO de *Pax7* a aussi été généré chez la souris, et contrairement à son paralogue *Pax3*, en l'absence de *Pax7* les animaux se développent jusqu'à la naissance, mais la majorité meurt dans leurs deux premières semaines d'existance. Alors que l'équipe ayant généré la première souris KO de *Pax7* n'avait pas rapporté de phénotype musculaire (Mansouri et al., 1996), Seale et al. ont identifié *Pax7* comme étant exprimé dans les cellules satellites, cellules souches musculaires adultes. Les muscles des souris KO pour *Pax7* ont alors été plus attentivement étudiés et il a été observé que ces animaux formaient tous leurs muscles dont les myofibres ne présentaient pas d'anomalie de structure, étant néanmoins plus petites et que le KO entrainait une perte progressive des cellules satellites (Seale et al., 2000; Oustanina et al., 2004; Relaix et al., 2006). Entre 5 et 10% des animaux $Pax7^{-/-}$ arrivant à l'âge adulte (sur un fond génétique C57/BL6/129Sv), Oustanina et al., ont alors étudié l'effet de l'absence d'expression de *Pax7* chez ces animaux adultes. Ils ont observé une réduction du nombre de cellules satellites à l'état basal, et une altération de la régénération musculaire après cryodomage, démontrant l'importance de *Pax7* dans le maintien des cellules satellites et l'importance de ces cellules pour la régénération musculaire (Oustanina et al., 2004). L'expression de *Pax3* a aussi été détectée dans les cellules satellites quiescentes, mais de manière hétérogène en fonction des masses musculaires. En effet, alors que la majorité des cellules PAX7+ du diaphragme exprime aussi *Pax3*, son expression n'est retrouvée que dans la moitié des cellules PAX7+ des membres antérieurs, très rarement dans les membres postérieurs, et jamais dans les muscles cranio-faciaux (Relaix et al., 2006). Néanmoins, *Pax3* ne semble pas compenser l'absence d'expression de *Pax7* chez les souris $Pax7^{-/-}$ puisque la diminution du nombre de cellules satellites au cours de la croissance post-natale est identique dans les muscles exprimant *Pax3* (diaphragme) et les muscles ne l'exprimant pas (membres postérieurs). Enfin, la manipulation de l'expression de *Pax3* et *Pax7* sur des cellules satellites isolées et cultivées *in vitro* a pu montrer que *Pax3* et *Pax7* contrôlaient l'expression de *MyoD* mais pas de *Myf5* dans ces cellules et que *Pax7* y jouait un rôle anti-apoptotique, non compensé par *Pax3* chez les mutants $Pax7^{-/-}$ et responsable de la diminution du nombre de cellules satellites chez ce mutant (Relaix et al., 2006). *Pax7* semble donc avoir un rôle plus important après la

naissance, pour la croissance post-natale et la régénération adulte du muscle qu'au cours du développement. Cependant dans le double KO de *Pax3* et *Pax7*, les défauts de formation du myotome primaire sont similaires à ceux observés dans le simple KO de *Pax3* jusqu'à E10,5, puis les somites sont plus fortement atteints dès E11,5, et la formation des muscles est plus sévèrement compromise que dans le simple KO de *Pax3*. De plus, la population de cellules progénitrices myogéniques perd son identité musculaire, n'exprime plus les MRF et est retrouvée dans l'os ou le cartilage. Enfin, une étude dans laquelle le gène *Pax3* a été remplacé par celui de *Pax7* a pu mettre en évidence que *Pax7* pouvait remplacer *Pax3* et assumer ses fontions dans le tube neural dorsal, les cellules des crêtes neurales et la formation des somites mais pas dans la formation des muscles des membres qui nécessite la délamination et migration des cellules progénitrices, processus qui ne sont pas stimulés par l'expression de *Pax7* (Relaix et al., 2004). Ces résultats montrent l'importance d'une collaboration entre *Pax3* et *Pax7* pour le bon déroulement de la myogenèse pré-natale et la spécification des cellules progénitrices musculaires (Relaix et al., 2005).

4. Les progéniteurs musculaires

a. Genèse des progéniteurs myogéniques

La formation d'un muscle fonctionnel et de taille normale nécessite une régulation précise de la balance entre l'engagement des myoblastes dans la voie de différentiation myogénique, qui participent à la formation des myofibres, et le maintien d'un certain nombre de myoblastes qui prolifèrent pour continuer à contribuer à la croissance musculaire. La dérégulation de cette balance entraine de graves malformations musculaires (Rudnicki et al., 1993; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). De telles propriétés ont été attribuées à une population de cellules émergeant de la partie centrale du dermomyotome pour coloniser le myotome en formation. Ces cellules sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription PAX3 et PAX7 et sont positives pour les marqueurs du cycle cellulaire les différenciant des autres cellules composant le myotome qui sont toutes post-mitotiques et n'expriment pas ces deux facteurs de transcriptions (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Gros et al., 2005; Ben-Yair and Kalcheim, 2005). Les cellules PAX3+PAX7+ constituent donc la population de cellules prolifératives principale du myotome. Il a été rapporté par des expériences d'électroporation de la protéine GFP dans les cellules du centre du dermomyotome de poulet que l'invasion du myotome par ces cellules se faisait par le biais d'une division asymétrique à l'issu de laquelle un progéniteur restait dans le dermomyotome

et l'autre entrait dans le myotome (Gros et al., 2005). De plus, l'invasion du myotome par ces cellules n'est pas dépendante du myotome en lui-même puisque dans le contexte du KO de *Myf5* dans lequel le myotome ne se forme pas, des cellules PAX3+PAX7+ délaminent du dermomyotome en direction du site de formation du myotome (Kassar-Duchossoy et al., 2005). La migration de ces cellules ne dépend pas non plus de *Pax3* puisque des cellules PAX7+ ont été observées dans le myotome de souris KO pour *Pax3* (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Les cellules progénitrices qui délaminent de la partie hypaxiale du dermomyotome pour migrer vers les bourgeons de membres sont initialement seulement PAX3+. Elles atteignent leur destination aux alentours de E10,5 où les premières cellules exprimant *Myf5* sont détectés. L'expression de *Pax7* n'est détectable qu'aux alentours de E11,5 (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Les cellules PAX3+PAX7+ sont retrouvées, toujours en prolifération, un peu plus tardivement au cours du développement dans les muscles du tronc en formation, et à partir de E16,5 certaines sont localisées en contact étroit avec une myofibre et sous la lame basale qui l'entoure, en position de cellule satellite (Relaix et al., 2005). Afin de vérifier si les cellules PAX3+PAX7+ observées dans les muscles fœtaux provenaient des mêmes cellules PAX3+PAX7+ observées dans le myotome primaire, une équipe a réalisé une expérience de greffe de la partie centrale du dermomyotome de cailles dans des somites en formation de poulet et a observé que la majorité des cellules PAX7+ à E18,5 et après l'éclosion de l'œuf était des cellules de cailles (Gros et al., 2005). Compte-tenu du phénotype des animaux double KO pour *Pax3* et *Pax7*, chez qui la formation du myotome primaire est normale mais dont les phases suivantes de myogenèse sont abrogées, il a été proposé que toutes les cellules du lignage myogénique, à l'exception des cellules du myotome primaire, provenaient de la population de cellules PAX3+PAX7+ émergeant dans le myotome primaire ou dans les bourgeons de membres (Relaix et al., 2005; Biressi et al., 2007a). En effet, des études de lignage ont pu mettre en évidence qu'à la naissance toutes les myofibres provenaient de cellules ayant exprimé *Pax3* et *Pax7* (Hutcheson et al., 2009).

b. Diversité des progéniteurs myogéniques

Progéniteurs embryonnaires et fœtaux

Les progéniteurs myogéniques sont continuellement renouvelés tout au long de la myogenèse jusqu'à la naissance. Compte-tenu des différences observées entre les myofibres embryonaires et fœtales, il a été proposé que les progéniteurs à l'origine de ces myofibres, respectivement myoblastes embryonnaires et myoblastes fœtaux aient des propriétés différentes. Ces cellules mises en culture ne répondent pas de la même manière à certains traitements et requièrent des conditions de culture différentes (White et al., 1975; Blanco-

Bose and Blau, 2001; Cossu and Molinaro, 1987; Cusella De Angelis et al., 1994; Biressi et al., 2007b). En 2007, Biressi et al., ont publié un transcriptome comparatif des myoblastes embryonnaires (E11,5) et fœtaux (E16,5). Leur étude *in vitro* a montré que les myoblastes embryonnaires étaient plutôt prédisposés à s'engager dans la voie de différentiation myogénique alors que les myoblastes fœtaux étaient capables de se maintenir en prolifération plus longtemps avant de s'y engager. En accord avec cette observation, l'analyse du transcriptome a pu mettre en évidence différentes classes de gènes dont l'expression était significativement différente entre les deux classes de myoblastes : les myoblastes embryonnaires sont caractérisés par une sur-activation de gènes du développement embryonnaire tandis que les myoblastes fœtaux sont caractérisés par une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines d'adhésion suggérant un impact de l'environnement cellulaire sur l'identité des progéniteurs myogéniques. Cependant, la mise en place des propriétés des myoblates fœtaux se fait indépendamment des myofibres primaires puisqu'il a été montré que dans un contexte de sur-activation de la voie Notch, qui bloque les progéniteurs myogéniques dans le cycle cellulaire et empêche la formation de myofibres embryonnaires, les myoblastes survivaient jusqu'à la période fœtale et acquéraient les propriétés de myoblastes fœtaux (Mourikis et al., 2012a). La présence de myofibres primaires n'est donc pas indispensable à la maturation des myoblastes embryonnaires en myoblastes fœtaux, mais cette observation n'exclut pas l'importance d'autres cellules et molécules de leur environnement.

Importance de la Voie Notch

Cette dernière étude a d'ailleurs mis en évidence l'existence de deux populations de cellules PAX7+ au sein même des populations embryonnaires et fœtales. En effet, le niveau d'expression de *Pax7* n'est pas homogène dans toutes les cellules qui l'expriment. Les cellules exprimant fortement *Pax7* (cellules $PAX7^{High}$) montrent une forte activité de la voie Notch et une faible expression des MRF *MyoD* et *Myogénine* contrairement aux cellules exprimant un faible niveau de *Pax7* (cellules $PAX7^{Low}$) qui ont une plus faible activité de la voie Notch et expriment plus fortement *MyoD* et *Myogénine*. Ces observations se vérifient aussi bien dans les cellules PAX7+ embryonnaires (E11,5) et fœtales (E18,5). La voie Notch semble donc maintenir l'état progéniteur des cellules PAX7+. Pour confirmer le rôle de la voie Notch dans la maintenance des propriétés souches des cellules PAX7+, l'équipe a induit l'activité constitutive de la voie Notch dans les cellules MYF5+ de souris et a observé une maintenance de la population de cellules PAX7+ et un défaut de l'engagement de ces cellules dans la voie de différentiation puisqu'aucun muscle n'est formé dans ces fœtus. De plus,

l'activation constitutive de la voie Notch dans les cellules PAX7+ n'a pas le même effet sur les progéniteurs myogéniques embryonnaires et fœtaux, en effet, bien qu'aucun de ces deux types cellulaires ne se soit engagé dans la voie de différentiation, les cellules PAX7+ embryonnaires étaient fortement prolifératives alors que les cellules PAX7+ fœtales sortaient du cycle cellulaire et acquéraient un état de quiescence. Ces résultats montrent que l'activité Notch ne perturbe pas la maturation des myoblastes embryonnaires en myoblastes fœtaux (Mourikis et al., 2012b).

Importance de la voie Wnt/β-caténine

Les myoblastes embryonnaires peuvent aussi être divisés en deux groupes. En effet alors que les myoblastes embryonnaires épaxiaux expriment *Pax3* et *Pax7* dès le début de la myogenèse embryonnaire, les myoblastes embryonnaires hypaxiaux n'expriment d'abord que *Pax3* et commencent à exprimer *Pax7* alors que la myogenèse embryonnaire a déjà commencé. En partant de cette observation, l'équipe de Gabrielle Kardon a considéré que les myoblastes embryonnaires des membres étaient donc PAX3+PAX7^{-} et les myoblastes fœtaux des membres PAX3+PAX7+. Dans une étude publiée en 2009, cette équipe a inactivé la voie Wnt/β-caténine dans les lignages Pax3 ou Pax7 (Pax3CRE ou Pax7iCRE sur un fond génétique β-caténine$^{-/flox}$) et a observé que l'activité de cette voie était requise pour la délamination des cellules PAX3+ dans les bourgeons de membres mais qu'elle n'était pas essentielle dans les myoblastes embryonnaires pour mener à bien la myogenèse embryonnaire et qu'elle était nécessaire à la formation des myofibres fœtales, bien qu'aucune donnée de quantification du nombre de myofibres ni du nombre de cellules PAX3+/PAX7+ ne soit présentée dans cette étude (Hutcheson et al., 2009).

Des progéniteurs déjà lents ou rapides ?

L'existence d'une spécification du typage de fibre dès la myogenèse prénatale, a mené des chercheurs à s'intéresser à l'éventualité que les myoblastes embryonnaires et fœtaux soient déjà prédisposés à former des myofibres lentes ou rapides. Bien qu'aucune étude n'ait réussi à montrer cela chez les mammifères (Schiaffino and Reggiani, 2011), une étude chez le poulet a pu identifier différentes catégories de myoblastes embryonnaires et fœtaux ne formant in vitro qu'un seul type de myotube, soit lent, soit rapide, soit lent et rapide, et ce sur 30 générations de cellules à partir d'une population clonale (Stockdale and Miller, 1987; Miller and Stockdale, 1986). Néanmoins, les cellules du myotome primaire de poulet et de souris coexpriment des marqueurs lents et rapides suggérant que leurs progéniteurs n'étaient pas pré-programmés dans une voie lente ou rapide (Sacks et al., 2003; Niro et al., 2010).

5. Innervation des muscles axiaux fœtaux

La fonction principale du muscle squelettique est la contraction volontaire, induite par un signal nerveux. Le lien entre le système nerveux et les muscles squelettique se fait grâce à une cellule neurale particulière : le motoneurone. Celui-ci forme avec une myofibre et des cellules de Schwann l'unité motrice responsable de la contraction musculaire. Leur point de rencontre est appelé jonction neuromusculaire (JNM). Cette jonction s'établit au cours du développement prénatal, après que les trois types cellulaires ont acquis leur identité. Les motoneurones quittent le tube neural par ses cornes ventrales et migrent le long des prolongements des nerfs périphériques pour atteindre le site de la synapse. Les cellules de Schwann proviennent des crêtes neurales et suivent le chemin des motoneurones qui sécrètent des molécules de guidage. Les motoneurones atteignent le site de la synapse pendant que les myoblastes qui eux ont migré depuis les somites fusionnent pour former les myofibres (Hurren et al., 2015). L'adhésion entre l'extrémité terminale de l'axone et la myofibre se fait

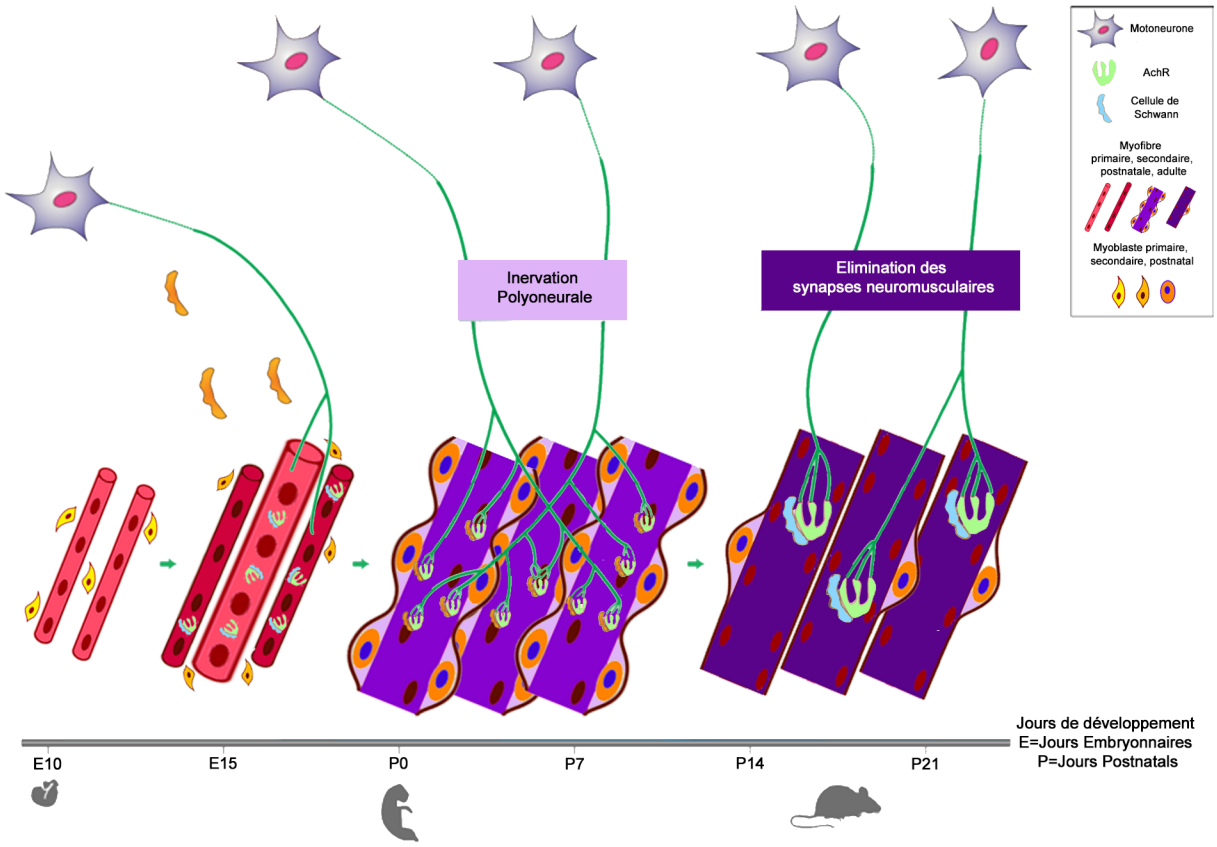


Figure 4 : Innervation des muscles axiaux

Figure adaptée de Bloch-Gallego, 2014.

par l'intermédiaire de la protéine d'adhésion N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) exprimée à la surface des deux cellules et dont le blocage empêche l'établissement de la JNM (Rutishauser et al., 1983; Covault and Sanes, 1986). N-CAM est d'abord aléatoirement localisée à la membrane de la myofibre en formation et dès le premier contact avec une terminaison axonale, sa localisation est restreinte autour de la JNM empêchant l'établissement de tout autre contact avec un motoneurone à un autre endroit de la myofibre. Ceci explique la sectorisation de l'innervation musculaire (Fladby and Jansen, 1990; Jansen and Fladby, 1990). Il a aussi été observé que la composition de la lame basale entourant les myofibres était différente au niveau de la JNM. Il a donc été proposé que cette particularité favorise le lieu de contact entre le motoneurone et la myofibre (Hunter et al., 1989). Le premier contact axone/myofibre détermine la localisation de la JNM, d'autres axones innervent ensuite la même myofibre dans la même zone. Ce premier contact s'établit dans une zone du myotube en croissance où sont regroupés des récepteurs à l'acéthylcholine (AchR). Le regroupement de ces récepteurs est indépendant de l'innervation (Yang et al., 2001) et dépend de la sécrétion d'Agrin par le motoneurone et de ses récepteurs MuSK et Lrp4 à la membrane de la myofibre (Yumoto et al., 2012). A ce stade chaque myofibres est poly-innervée, par plusieurs axones de différents motoneurones et un motoneurone présente plusieurs axones qui innervent tous le même muscle. Chez l'adulte, chaque myofibre est innervée par un seul axone (Dennis et al., 1981). Une étape de rétractation est donc nécessaire, qui a lieu graduellement après la naissance. Cette rétractation résulte de la compétition entre les différents axones, et dépend d'une contrainte spatiale et d'activité électrique. Ce processus fait intervenir des molécules produites par la myofibre qui influencent la compétition entre les axones en jouant sur l'adhésion axone/myofibre (synaptomédines) et sur la survie de la terminaison nerveuse (synaptotrophines ou synaptotoxines). Ce processus peut se prolonger jusqu'à l'âge adulte ou des myofibres polyinnervées sont parfois identifiées (Figure 4) (Sanes and Lichtman, 1999; Bloch-Gallego, 2015).

6. Myogenèse cranio-faciale

a. Développement des muscles de la tête

Les muscles de la tête ont une origine très hétérogène. Le crâne humain comporte plus de 60 muscles qui proviennent d'au moins 6 origines mésodermiques différentes (Diogo et al., 2015; Michailovici et al., 2015). La langue provient des somites occipitaux, la majorité des muscles du cou proviennent aussi des somites occipitaux sauf le muscle trapèze et le muscle

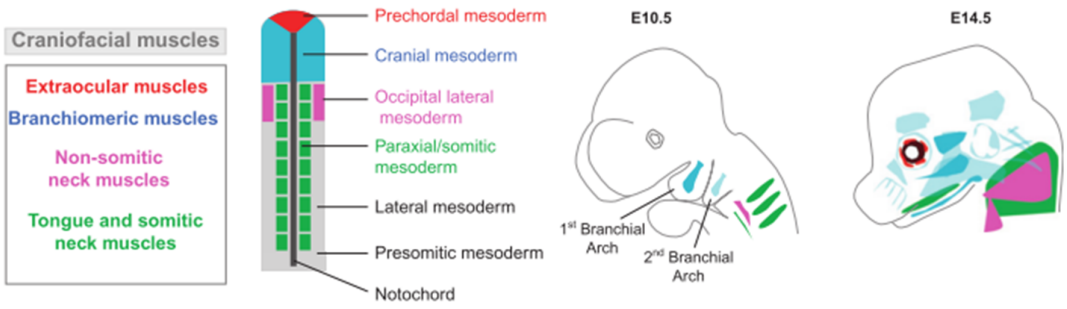


Figure 5 : Myogenèse crniofaciale

Figure tirée de Mayeuf-Louchard and Buckingham, 2014.

sternocleidomastoidien qui proviennent du mésoderme pharyngé. Les progéniteurs à l'origine de la formation des muscles branchiomériques (muscles de la face et du cou responsables des expressions faciales, des mouvements de la mâchoire et des fonctions de déglutition le long du pharynx et du larynx) proviennent du mésoderme crânial et transitent par les arcs branchiaux avant d'atteindre leur destination finale. Enfin, les muscles extra-oculaires responsables des mouvements de l'œil sont formés à partir de cellules provenant du mésoderme pré-chordal et du mésoderme paraxial (Michailovici et al., 2015). Bien que l'origine des cellules progénitrices des muscles de la tête et du cou soit différente de celle des muscles axiaux, ils se forment de la même manière : une fois la migration des progéniteurs terminée, ils fusionnent pour former des fibres musculaires, en deux vagues successives où les myofibres primaires servent d'échafaudages aux myofibres secondaires (Figure 5).

b. Contrôle génétique de la myogenèse cranio-faciale

Les MRF *MyoD* et *Myf5* sont aussi responsables de la régulation génétique de la différentiation musculaire cranio-faciale mais l'organisation temporelle des différentes étapes de la différentiation (dont le timing de l'expression de *Myf5* et *MyoD*) est différente de celle observée au niveau axial (Noden et al., 1999). Certains progéniteurs cranio-faciaux commencent à exprimer *Myf5* et *MyoD* plus tôt que les progéniteurs somitiques, mais généralement le temps séparant l'engagement des progéniteurs dans la voie myogénique (début de l'expression des MRF) et la différentiation terminale en myofibre (expression des gènes sarcomériques tels que la myosine) est plus long (Noden et al., 1999). L'observation par Tajbakhsh et al. en 1997 que le facteur de transcription PAX3 n'était pas exprimé dans les muscles de la tête, et qu'aucun défaut du développement de ces muscles n'était observé chez les animaux double KO pour *Pax3* et *Myf5* a mis en évidence que les gènes responsables de l'induction de l'expression des MRF dans les muscles cranio-faciaux étaient différents de ceux assurant cette fonction au niveau axial. Cinq facteurs de transcriptions ont alors été

identifiés, tous exprimés dans le lignage cranio-facial, capables d'induire l'expression des MRF, et dont le KO induit généralement des défauts de formation des muscles de la tête mais pas du tronc. Ainsi, *Capsulin* (ou *Tcf21*) et *Musculin* (ou *MyoR*) contrôlent la formation des muscles masticateurs, le double KO pour ces deux gènes entraine une absence des muscles majeurs de la mastication (Lu et al., 2002) bien que les simples KO ne montrent pas de malformations musculaires (Lu et al., 1999, 2000). L'absence de *Tbx1* induit une hypoplasie sévère des muscles issus du premier arc branchial (Jerome and Papaioannou, 2001; Kelly et al., 2004), et sa double inactivation avec celle de *Myf5* empêche complètement la formation de ces muscles. En effet, *Tbx1* collabore avec *Myf5* pour induire l'expression de *MyoD* dans les progéniteurs localisés dans le premier arc branchial (Sambasivan et al., 2009). *Pitx2* est lui nécessaire à la formation des muscles extra-oculaires (EOM), le KO de ce gène entrainant une absence de formation des EOM (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999). Cependant, une absence de formation des EOM avait déjà été observée dans le KO de *Myf5* (induisant aussi une inactivation de *Mrf4*) (Kassar-Duchossoy et al., 2004) et les EOM se forment mais sont hypoplasiques dans les simple KO de *Myf5* ou *Mrf4* (Sambasivan et al., 2009). *Pitx2* est exprimé dans les progéniteurs des EOM dans le double KO *Myf5:Mrf4*, il n'est donc pas capable de compenser l'absence des deux MRF et d'induire l'expression de *MyoD* et *Myogénine*. En 2011, l'équipe de Philip Gage a observé que *Pitx2* était capable de fixer le promoteur de *Myf5* et *MyoD* et d'en induire l'expression, positionnant *Pitx2* en amont de tous les gènes impliqués dans la formation des EOM (L'Honore et al., 2010; Zacharias et al., 2011). *Pitx2* est aussi exprimé dans les progéniteurs somitiques, mais dans ce lignage *Pax3* agit en amont de *Pitx2* le rendant dispensable à la myogenèse axiale (L'Honore et al., 2010). Plus récemment, le gène *Lhx2* a été indentifié comme étant exprimé dans les progéniteurs du premier arc branchial et pas dans les progéniteurs somitiques. Son KO induit un défaut de spécification des muscles pharyngés (Harel et al., 2012).

c. Les progéniteurs musculaires cranio-faciaux

Les muscles cranio-faciaux adultes possèdent aussi des cellules satellites associées à leur myofibres, et qui expriment *Pax7* mais pas *Pax3*. L'origine embryonnaire de ces cellules a été étudiée par des expériences de greffe caille/poulet. Ces expériences ont permis de déterminer que les cellules satellites cranio-faciales provenaient de cellules du mésoderme paraxial cranial. Dans la même étude, une analyse de lignage chez la souris a permis de mettre en évidence que la majorité des cellules PAX7+ des muscles de la têtes proviennent de progéniteurs exprimant le facteur de transcription MESP1 (marqueur précoce du mésoderme paraxial cranial (Saga et al., 1999)) (Harel et al., 2009). De plus, il a été observé que

contrairement aux cellules progénitrices des muscles axiaux, l'expression de *MyoD* et *Myf5* était détectée bien avant l'activation de l'expression de *Pax7* dans les territoires rostraux. Les cellules PAX7+ présentes chez l'adulte et responsables de la régénération musculaire n'ont donc commencé à exprimer *Pax7* qu'après l'engagement des cellules progénitrices dans la voie myogénique. Dans le mésoderme cranial, *Pax3* et *Pax7* ne sont donc pas responsables de l'acquisition d'une identité myogénique ni de l'induction de l'expression des MRF du moins jusqu'à l'activation tardive de l'expression de *Pax7* (Nogueira et al., 2015).

C. Myogenèses Post-natales et homéostasie

1. Croissance post-natale

Les deux premiers mois de la vie d'une souris consistent en une période de croissance intensive dont la prise de poids total est dûe pour moitié à la croissance musculaire (Gokhin et al., 2008). Chez la souris, le nombre de myofibres par muscle est atteint dès la naissance. Les raisons de cet arrêt de l'hyperplasie musculaire ne sont aujourd'hui pas connues. La croissance musculaire postnatale est donc essentiellement réalisée par hypertrophie des myofibres existantes, c'est-à-dire par augmentation de leur volume cytoplasmique (Ontell and Kozeka, 1984b). Cette croissance est assurée par addition de nouveaux noyaux aux myofibres par fusion des cellules progénitrices PAX7+ qui à l'issue de la myogenèse secondaire ne se sont pas différenciées et se trouvent localisées en contact avec une myofibre, sous sa lame basale (Shafiq et al., 1968; Moss and Leblond, 1970; Mauro, 1961; Ontell and Kozeka, 1984a). Les cellules PAX7+ post-natales continuent à proliférer pour fournir suffisamment de noyaux et permettre aux myofibres d'atteindre leur taille adulte (Schultz, 1996; Shinin et al., 2006). Chez les souris, la taille adulte est atteinte environ deux mois après la naissance, mais les cellules PAX7+ ne contribuent à la croissance musculaire par accrétion de myonuclei que pendant les trois premières semaines après la naissance, soit pendant environ 21 jours après la naissance (P21). En effet, bien que le nombre de myonuclei et la taille des myofibres augmentent et que le nombre de cellules PAX7+ diminue graduellement jusqu'à P21, le nombre de myonuclei et de cellules PAX7+ ne changent plus entre P21 et la fin de la croissance post-natale (White et al., 2010). Il a récemment été démontré que les hormones sexuelles (androgènes et œstrogènes) sécrétées à la puberté induisent l'expression de l'E3 ubiquitine ligase MIB1 dans les fibres musculaires en croissance menant à l'induction de la voie Notch dans les cellules PAX7+ qui sortent alors du cycle cellulaire pour entrer en quiescence (Kim et al., 2016). Le reste de la croissance des myofibres est assurée par

synthèse protéique (White et al., 2010). Ainsi, à la fin de la croissance postnatale, plus de 90% des noyaux d'une myofibre adulte proviennent de fusions postnatales (Biressi et al., 2007a; White et al., 2010). L'accrétion de nouveaux noyaux dans les fibres musculaires entre P0 et P21 est donc primordiale à la croissance musculaire postnatale.

a. Etablissement du typage de fibres

La maturation des myofibres au cours de la croissance postnatale ne passe pas seulement par une augmentation de leur taille. A la naissance, la majorité des myofibres exprime la chaine lourde de myosine embryonnaire (rapide), et soit la chaine lourde de myosine néonatale rapide) soit la chaine lourde de myosine lente (Condon et al., 1990). Au cours des premières semaines après la naissance, ces chaines lourdes de myosine rapides sont progressivement remplacées par les chaines lourdes de myosines rapides adultes MYH2A, MYH2X, MYH2B (DeNardi et al., 1993). Trois mécanismes sont responsables de la mise en place des différents types de fibres au cours de la croissance postnatale : la maturation des JNM, la charge mécanique appliquée aux myofibres, et les hormones thyroidiennes (Schiaffino and Reggiani, 2011).

b. Maturation des JNM

Les myofibres ne sont pas les seules à subir une maturation au cours de la croissance postnatale. Les JNM évoluent aussi après la naissance. Certains motoneurones se rétractent et meurent par apoptose afin de ne laisser qu'un seul motoneurone par myofibre. Ce motoneurone se spécialise aussi. Il existe trois types de motoneurones innervant spécifiquement les différents types de fibres : Les motoneurones S à contraction lente et résistants à la fatigue innervent les myofibres lentes de type 1 (S pour Slow-twitch en anglais), les motoneurones FR à contraction rapide et résistants à la fatigue innervent les myofibres rapides de type 2A (FR pour Fast-twitch and fatigue-Resistant en anglais) et les motoneurones FF à contraction rapide et fatigables innervent les myofibres rapides de type 2X et 2B (FF pour Fast-twitch and Fatigable en anglais). Ces motoneurones diffèrent par leur taille et leurs propriétés électriques, et se spécialisent au cours de la croissance postnatale (Kanning et al., 2010). Plus récemment, des marqueurs moléculaires ont été identifiés permettant de distinguer les motoneurones lents des motoneurones rapides. La protéine SV2A est spécifiquement présente dans les vésicules synaptiques des motoneurones innervant les myofibres de type 1 et 2A (Chakkalakal et al., 2010), tandis que DLK1, un récepteur médiateur de la voie Notch est spécifiquement exprimé par les motoneurones innervant les fibres rapides (Muller et al., 2014). Des études ont été réalisées afin de savoir qui du

motoneurone ou de la myofibre dictait le phénotype adulte à acquérir. Des expériences d'innervation croisées ont été réalisées sur des chatons et ont montré que la vitesse de contraction des fibres lentes et rapides était dépendante de l'innervation (Buller et al., 1960). Plusieurs équipes ont montré grâce à des expériences de dénervation des muscles des membres de rats que la production de myosines de type rapide était généralement indépendante de l'innervation, alors que la dénervation empêchait la production de myosine lente à la naissance (Butler-Browne et al., 1982; Gambke et al., 1983). De plus, il a été montré qu'au cours du développement fœtal, les futures muscles lents et rapides n'étaient pas innervés par les mêmes populations de motoneurones, suggérant la mise en place d'un mécanisme de spécificité d'appariement motoneurone/fibre avant la naissance. En effet, ces motoneurones fœtaux ne quittent pas la corne ventrale du tube neurale au même endroit, et expriment des quantités différentes d'acide sialique. Ils sont donc déjà distinguables spatialement et moléculairement dès la période fœtale (Rafuse et al., 1996; Milner et al., 1998). Le lien entre la spécificité de l'innervation fœtale et post-natale est toujours obscure aujourd'hui et les mécanises précis qui conduisent à l'appariement entre motoneurone et fibres lent(e) ou rapide ne sont pas connus. Une autre étude a récemment identifié un facteur sécrété par les myofibres de type lent et empêchant l'innervation de ces dernières par des motoneurones de type rapide : l'Ephrin-A3. Il s'agit d'une protéine sécrétée à potentiel répulsif, et proposée par l'équipe de D. Cornelison comme favorisant la rétraction des motoneurones rapides au cours de la maturation post-natale des JNM des fibres lentes (Stark et al., 2015).

c. Charges mécanique et hormonale

La naissance induit sur le nouveau-né un changement environnemental qui impose une charge mécanique aux muscles squelettiques, et plus spécialement aux muscles de la posture généralement de type lent. La maturation des myofibres commençant quelques jours après la naissance, il est possible que celle-ci soit stimulée par la nouvelle charge qui pèse sur les muscles. En effet, des rats nouveau-nés de 7 jours envoyés dans l'espace pendant le reste de leur croissance post-natale, où l'apesanteur empêche la charge mécanique, ont montré une altération de la maturation des fibres de type lent, sans impact sur la maturation des fibres rapides (Adams et al., 2000). La charge mécanique comme l'innervation semblent nécessaires à l'établissement des fibres lentes alors que la spécialisation des fibres rapides semble indépendante de l'innervation et de la charge mécanique, en ce qui concerne l'expression des gènes codant pour les chaines lourdes de myosines chez le rat.

Le taux d'hormone thyroïdienne joue aussi sur la synthèse des chaines lourdes de myosine. Sa sécrétion est dynamique au cours de la croissance post-natale : les nouveau-nés sont en hypothyroïdie, et la sécrétion de l'hormone augmente dans les semaines qui suivent la naissance. Celle-ci agit sur la transcription de nombreux gènes via son récepteur nucléaire. Il a été montré qu'une modulation de la thyroïdie pouvait jouer sur la maturation des fibres musculaires. En effet, une maintenance de l'hypothyroïdie chez des rats nouveau-nés induit un maintien de l'expression de la myosine néonatale et très peu de production de myosines rapides adultes dans le muscle rapide EDL, alors que l'effet sur le muscle lent soléaire est plus modéré, n'induisant qu'un léger retard de la production des myosines de type 1 et 2A (Gambke et al., 1983; Adams et al., 2000).

Bien que le muscle soit déjà constitué du bon nombre de fibres musculaires à la naissance, la croissance post-natale est primordiale pour la maturation de ces dernières et la mise en place des JNM. Les cellules satellites acquièrent aussi pendant cette période leur état de cellule souche adulte.

2. Homéostasie des Cellules Satellites

A la fin du XIXème siècle, la formidable plasticité du tissu musculaire squelettique faisait de lui un organe très étudié mais il a fallu attendre 1969 pour que soit publiée la première évidence de l'existence de cellules souches musculaires adultes. Dans cet article, Alexander Mauro décrit d'après des images de microscopie électronique de muscles de grenouilles une cellule intercalée entre la membrane plasmique d'une fibre musculaire et la membrane basale qui entoure la myofibre sur toute sa longueur. Il baptise cette cellule : Cellule Satellite (CS) (Mauro, 1961). En 2000, l'équipe de Mickael Rudnicki découvre que les CS sont caractérisées par l'expression spécifique du facteur de transcription PAX7 (Seale et al., 2000). Si les CS sont issues des cellules PAX7+ responsables de la croissance post-natale alors la majorité de ces dernières contribue à la croissance post-natale étant donné que le nombre de cellules satellite à l'âge adulte est jusqu'à quatre fois inférieur au nombre de cellules PAX7+ présentent à la naissance (Ontell and Kozeka, 1984b; White et al., 2010).

a. Origine des Cellules Satellites

De nombreuses études de lignage ont été réalisées afin de déterminer l'origine cellulaire des CS. Ces études ont utilisé des animaux exprimant une *Cre recombinase (Cre)* sous le contrôle du promoteur d'un gène d'intérêt, ainsi qu'un gène rapporteur exprimé uniquement dans les cellules exprimant la Cre et toutes leurs descendantes. Par exemple, chez des animaux

exprimant la Cre sous le contrôle du promoteur de *Pax3*, toutes les cellules provenant du dermomyotome sont marquées, et chez l'adulte, tous les muscles axiaux. Dans ce cas, il a été démontré que la majorité des CS des pattes postérieures provenait de cellules ayant un jour exprimé *Pax3* (Schienda et al., 2006). Afin d'affiner cette étude, en 2010, Lepper et Fan ont publié une étude dans laquelle ils ont généré une souris exprimant une Cre inductible par injection de tamoxifen (Cre-ERT2) sous le contrôle du promoteur de *Pax7*. Ce modèle leur a permis d'activer la *Cre recombinase* par injection de tamoxifen. En activant la *Cre recombinase* à E11,5, jour à partir duquel l'expression de *Pax7* a été détectée dans les cellules PAX3+ après leur migration dans les membres (Kassar-Duchossoy et al., 2005), ils ont pu suivre les progéniteurs PAX3+PAX7+ et ont observé qu'une partie des cellules satellites adultes des membres provenaient de ces progéniteurs somitiques bien qu'aucune quantification n'ait été réalisée (Lepper and Fan, 2010). Parmi les cellules PAX3+PAX7+ qui apparaissent au début de la myogenèse embryonnaire, certaines ne se sont donc jamais différenciées. L'information n'est pas connue pour les muscles dorsaux. En utilisant les promoteurs de *Myf5*, *MyoD* ou *Mrf4*, il a été mis en évidence que 10% des CS n'avaient jamais exprimé MYF5 (Kuang et al., 2007), mais que toutes les CS provenaient de cellules MyoD+ (Kanisicak et al., 2009), et MRF4+ (Sambasivan et al., 2013) bien que l'expression de *Myf5* et *MyoD* dans ces cellules ne soit pas nécessaire à la genèse de CS (Günther et al., 2013). Ces observations permettent de dire que l'expression des MRF *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* n'est pas forcément signe d'engagement définitif dans la voie de différentiation myogénique, ni de perte du potentiel souche. Cependant, les 10% de CSQ qui n'ont jamais exprimé *Myf5* sont considérées comme une population de CS plus « souches » que les autres, et ont en effet un potentiel d'auto-renouvellement plus important après transplantation (Kuang et al., 2007).

b. Maintien de la quiescence des cellules satellites

Les CS sont quiescentes à l'état basal. Des études transcriptomiques sur des CS quiescentes (CSQ) ont été réalisées afin d'identifier des gènes spécifiquement exprimés à ce stade de la vie des CS et essayer d'expliquer les mécanismes qui permettent intrinsèquement le maintien de cette quiescence (Fukada et al., 2007; Pallafacchina et al., 2010). Les CSQ expriment plusieurs gènes codant pour des protéines qui régulent négativement le cycle cellulaire tels que *Sprouty1, p21* ou *p57*, empêchant leur activation. Sprouty1, inhibiteur du récepteur aux tyrosines kinases ERK est fortement exprimé dans les CSQ, son expression diminue fortement dans les CS en prolifération, et sa réexpression en fin de régénération est essentielle pour le retour en quiescence et l'auto-renouvellement des CS (Shea et al., 2010). Le récepteur à la calcitonine (CalcR) montre la même dynamique d'expression au cours de la régénération

et la calcitonine, produite par la CS elle-même empêche leur activation (Fukada et al., 2007). Il a aussi été observé que les CSQ exprimaient l'ARNm de *Myf5* mais pas sa protéine. Dans les CSQ, l'ARNm de *Myf5* est en effet séquestré dans les granules mRNP avec le micro-ARN miR-31, empêchant sa traduction et permettant le maintien de l'état de quiescence de la CS (Crist et al., 2012). La voie Notch a aussi été montré comme active dans les CSQ et la délétion de son récepteur nucléaire *Rbpj* nécessaire à la transduction du signal et à l'activation de la voie induit une activation des CS qui s'engagent toutes dans la voie de différentiation, et conduit donc à une perte du réservoir de CS (Mourikis et al., 2012a; Bjornson et al., 2012). D'autres molécules ayant la capacité de bloquer l'effet des facteurs de croissance sont aussi exprimées par les CSQ suggérant l'existence d'un contrôle intrinsèque primordial de la quiescence par la CS elle-même (Fukada et al., 2007; Pallafacchina et al., 2010). La CSQ reçoit aussi des signaux de son environnement proche. Par exemple, les cellules musculaires lisses qui tapissent les vaisseaux sanguins secrètent de l'Angiopoietine-1 dont le récepteur Tie-2 est exprimé à la surface des CSQ. Cette interaction induit un signal bloquant la progression du cycle cellulaire (Abou-Khalil et al., 2009). L'environnement de la CS est aussi organisé afin de la protéger du milieu extérieur. C'est le rôle principal de la lame basale qui entoure chaque myofibre adulte avec ses CS. Celle-ci est notamment constituée de molécules captant les facteurs de croissance, lui permettant de contrôler l'exposition des CS à ces facteurs. Lors d'une lésion, la rupture de l'environnement stable de la CSQ participe d'ailleurs à son activation (Figure 6).

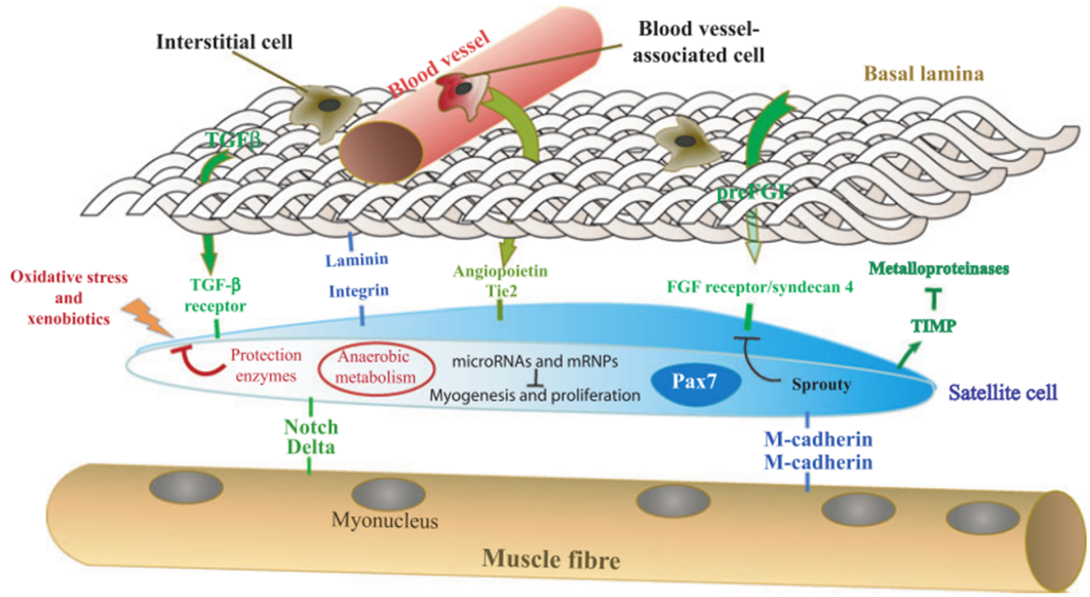


Figure 6 : La cellule Satellite Quiescente dans sa niche

Figure tirée de Montarras, et al., 2013.

3. Régénération

Chez l'adulte et au repos, le muscle squelettique est un tissu stable et les cellules myogéniques qui le composent sont post-mitotiques (Schmalbruch and Lewis, 2000). Les contractions musculaires journalières peuvent de temps en temps produire de petites lésions de la membrane plasmique des myofibres réparées par recrutement de vésicules intracellulaires, processus commun à d'autres types cellulaires soumis à un stress mécanique (Steinhardt et al., 1994). Cependant, un exercice physique prolongé, une blessure grave ou une exposition à une myotoxine entrainent des dommages plus importants nécessitant la mise en place d'un processus de réparation. On parle de régénération musculaire. Ce processus est aussi induit dans certaines maladies génétiques telles que les dystrophies musculaires. Dans son article révélateur de l'existence des cellules satellite, Alexander Mauro émet déjà l'hypothèse que les CS soient les principales actrices de la régénération musculaire (Mauro, 1961). Les CS sont en effet considérées comme le type cellulaire principalement responsable de la régénération musculaire. En 2011, trois équipes publient dans le même journal *Development* leur étude dans laquelle ils ont utilisé la toxine diphtérique pour tuer spécifiquement les cellules PAX7+ et démontrent qu'en l'absence de ces cellules la régénération musculaire est complètement abolie (Lepper et al., 2011; Murphy et al., 2011; Sambasivan et al., 2011b). De plus, l'inactivation de *Pax7* dans les cellules PAX7+ chez l'adulte conduit à une perte des CSQ à l'état basal et à un déficit de régénération. Ce déficit étant moins grave que dans les expériences utilisant la toxine diphtérique, il a été suggéré que les CS ayant perdu l'expression de *Pax7* pouvaient néanmoins participer à l'accrétion de myonuclei dans les myofibres endommagées mais pas à l'auto-renouvellement des CS. En effet, la perte d'expression de *Pax7* favorise l'engagement dans la voie de différentiation à défaut de la prolifération (Günther et al., 2013; Relaix et al., 2005; Rocheteau et al., 2012). De plus, l'inactivation de *Pax7* dans les cellules exprimant *Myf5* dès le développement embryonnaire n'empêche pas la genèse de CS PAX7+ adultes. Il a été proposé que dans ces conditions, les cellules PAX7+ soient générées par les progéniteurs MYF5^{-} à l'origine en temps normal des 10% de CS n'ayant jamais exprimé *Myf5*. Cependant, même en présence de ces cellules PAX7+ la régénération musculaire après lésion est fortement altérée (Günther et al., 2013), suggérant qu'elles ne sont pas capables d'assurer la genèse d'un nombre normal de CS et leur participation à la régénération musculaire. La participation des CS à la réparation d'un muscle lésé a lieu en plusieurs étapes : une première phase d'activation des CS est nécessaire, ces cellules étant quiescentes à l'état basal, s'ensuit une phase de prolifération intense, puis certaines CS s'engagent dans la voie de la différentiation pour réparer le muscle

et d'autres retrouvent leur état de quiescence permettant l'auto-renouvellement du réservoir de CS.

a. Activation des cellules satellites

L'appellation Cellule Satellite est généralement réservée à la cellule PAX7+ localisée entre la membrane plasmique d'une myofibre et la lame basale qui l'entoure. Une fois cette cellule activée, on parle de Cellule Précurseur Myogénique (CPM). Le premier événement permettant de rendre compte de l'activation d'une CSQ est l'expression de *MyoD* puis de *Myf5*, qui arrivent très rapidement après la lésion, bien avant qu'un signe de prolifération ne soit observé (Smith et al., 1994; Yin et al., 2013). L'ARNm de Myf5 étant déjà présent dans la CSQ, seule l'activation de sa traduction est nécessaire pour la production de la protéine (Crist et al., 2012). Par des évènements de divisions asymétriques, les cellules PAX7+ sont capables de générer deux types de CPM : celles qui s'engagent dans la voie de la différentiation perdent l'expression de *Pax7* et expriment *Myogénine*, celles qui s'auto-renouvellent conservent l'expression de *Pax7* généralement incompatible avec celle de *Myogénine* (Figure 7).

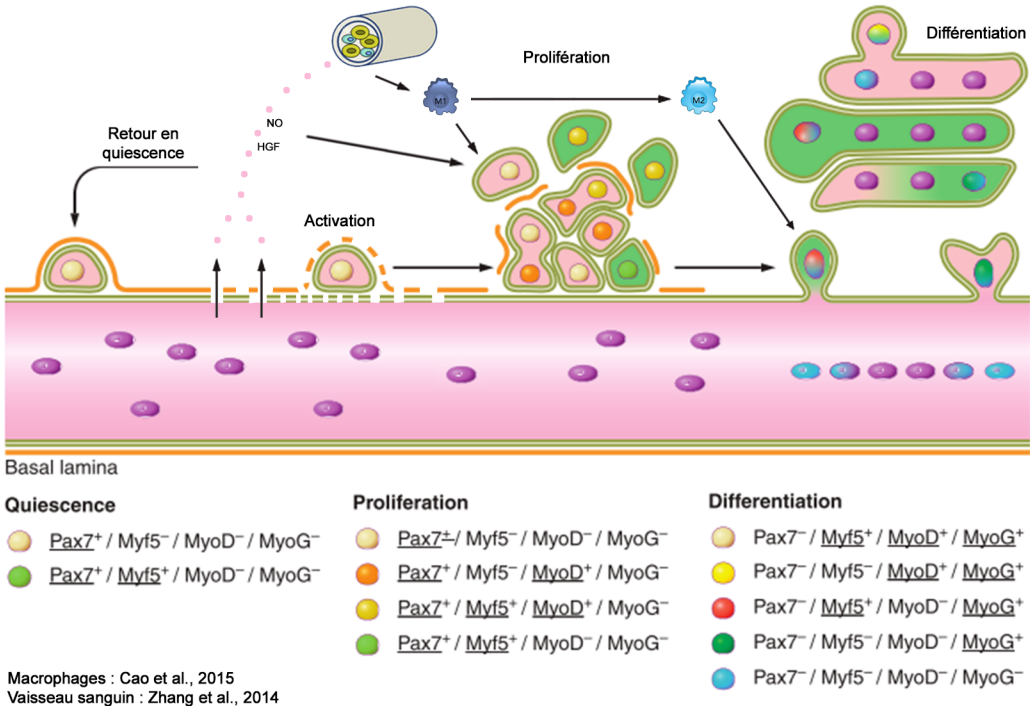


Figure 7 : Régénération musculaire squelettique

Figure adaptée de Yin, Price and Rudnicki, 2013, Cao et al., 2015 et Zhang et al., 2014.

Rôle des cellules inflammatoires

La lésion musculaire provoque une perméabilisation de la membrane plasmique des myofibres. La nécrose des myofibres conduit à la libération dans le milieu interstitiel de protéines et ARN cytosoliques ainsi que de calcium. Parmi les protéines libérées certaines sont des protéases calcium dépendantes comme la calpaïne qui participent à la dégradation des nombreuses protéines cytoplasmiques qui composent les sarcomères. Ces évènements sont accompagnés de l'activation de la cascade du complément qui permet le recrutement de cellules du système immunitaire (Tidball and Villalta, 2010). Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à être observées au site de lésion suivis de deux vagues de macrophages, pro-inflammatoires (Macrophages de type 1, M1) puis anti-inflammatoires (Macrophages de type 2, M2). Ces cellules participent d'une part à la lyse des débris nécrotiques, et permettent aussi l'activation des CS et leur engagement dans la voie myogénique. En effet les molécules secrétées par les M1 stimulent plutôt la prolifération des CS alors que les M2 favorisent plutôt leur différentiation (Cantini et al., 2002; Saclier et al., 2013). La lyse de la membrane des myofibres entraine aussi la libération d'oxyde nitrique (NO), dont la concentration augmente progressivement les premiers jours après la blessure. Les macrophages recrutés sur le lieu de blessure secrètent aussi du NO, et ce en partie stimulé par la présence de cellules musculaires. Ce NO favorise d'une part la maturation des macrophages et d'autre part permet l'activation de metalloprotéases (MMP) présentes au site de lésion, dont l'activité protéase permet la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) environnante et la libération de facteurs de croissance tels que le HGF capable de stimuler la prolifération des CS via son récepteur c-Met exprimé à leur surface (Wozniak et al., 2003). Les macrophages secrètent aussi de nombreux facteurs de croissance agissant sur l'entrée dans le cycle cellulaire des CS (Filippin et al., 2009).

Rôles de la voie Wnt/ β-caténine

Plusieurs voies de signalisation connues telles que les voies Wnt/β-caténine et Notch sont activées au cours des phases de prolifération des CPM, laissant penser que les ligands de ces voies soient sécrétés au cours de l'activation des CS. Le rôle de la voie Wnt/β-caténine sur la prolifération des CPM est controversé. En effet, des résultats contradictoires ont été obtenus par différentes équipes de recherche, surement à cause des diverses méthodes expérimentales utilisées. L'équipe de Thomas Rando a observé que la voie Wnt/β-caténine était active dans les cellules MYOD+ au cours des premiers jours de régénération et que son induction augmentait avec le temps quand les MPC étaient mises en culture. De plus, ils ont observé que l'inhibition de la voie n'avait d'effet sur les MPC qu'après la phase de prolifération

intense qui suit l'activation des CS. Ceci suggérant que la voie Wnt/β-caténine ne serait pas impliquée dans l'activation des CS (Brack et al., 2008a). L'équipe de Ketan Patel a de son côté observé que de cultiver des myofibres isolées sur des fibroblastes secrétant Wnt1, Wnt3a ou Wnt5a pendant 2,5 jours induisait une augmentation de l'expansion des cellules PAX7+. De plus, la majorité des cellules MYOD+ montrait une localisation nucléaire de la β-caténine (signe d'activation de la voie) alors qu'ils n'ont jamais observé de β-caténine dans les noyaux des cellules MYOG+. Ces résultats suggéraient plutôt que la voie Wnt/β-caténine soit active au début de la phase d'activation des CS (Otto et al., 2008). Enfin, l'équipe de Guillaume Grenier a montré qu'après quatre jours de traitement de myofibres isolées avec Wnt3a l'expansion des cellules PAX7+ était empêchée (Trensz et al., 2010). Ces trois études n'ayant pas étudié l'effet de l'activation de la voie Wnt/ β-caténine sur les MPC *in vivo*, et leurs études in vitro ayant été réalisé à des temps différents, il est difficile de conclure sur le rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours de l'activation des MPC. Des études plus récentes ont pu montrer qu'une sur-activation de la β-caténine entrainait soit l'entrée en apoptose des MPC soit leur sortie de cycle pour entrer dans la voie de différentiation (Parisi et al., 2015; Rudolf et al., 2016), bien qu'une autre étude n'ait pas observé ces phénotypes, sûrement à cause des divergences d'outils génétiques et de méthodes d'analyses utilisées (Murphy et al., 2014). Il est donc important que l'activation de la voie Wnt/β-caténine ne soit pas trop précoce au cours du processus de régénération afin de permettre aux MPC de suffisamment proliférer avant de s'engager dans la voie de différentiation myogénique. Le contrôle du niveau d'expression de la β-caténine semble primordial au bon déroulement de la régénération musculaire et la β-caténine favorise la différentiation myogénique.

Rôle de la voie Notch

L'implication de la voie Notch dans l'activation des CS est moins discutée. Pour une raison qui n'est pour l'instant pas connue, le récepteur Delta du ligand Notch1 voit son expression augmenter à la surface des CS dans les 24h qui suivent une lésion musculaire. Puis la partie intracellulaire de ce récepteur (NICD) dont la présence témoigne d'une activation de la voie Notch/Delta est retrouvée dans les CPM activées, permettant ainsi leur entrée dans le cycle cellulaire (Conboy and Rando, 2002). La régulation du niveau d'activité de cette voie au cours des différentes phases de la régénération musculaire semble très précis puisque que la sur-activation de la voie Notch favorise le retour en quiescence des CPM activées et empêche leur contribution à la régénération (Wen et al., 2012). A l'inverse, l'inhibition de la voie Notch empêche l'activation des CS ce qui perturbe aussi le processus de régénération (Luo et al., 2005). Enfin, une étude a pu mettre en évidence l'importance de la balance entre

l'activation des voies Wnt/β-caténine et Notch. En effet, l'activation de la voie Notch semble primordiale pour l'entrée des CS dans le cycle cellulaire et permet leur prolifération afin qu'il y ait suffisamment de cellules pour réparer le muscle endommagé. L'activation de la voie Wnt/β-caténine inhibe la voie Notch et permet aux CPM de s'engager dans la voie de différentiation myogénique. Une dérégulation de cette balance empêche le bon déroulement de la régénération musculaire (Brack et al., 2008b).

Migration des MPC

L'activation des CS n'est pas restreinte au site de blessure mais à toutes les CS d'une myofibre lésée, quel que soit le site de blessure. L'activation de CS éloignées du site de blessure est suivie de la migration de ces cellules vers le site de blessure. Une fois actives, les CPM seraient même capables de traverser la lame basale sous laquelle elles se trouvent pour rejoindre un site de lésion (Hughes and Blau, 1990; Partridge and Sloper, 1977; Schultz et al., 1985; Webster et al., 2016). La migration des CPM est notamment favorisée par l'expression à leur surface de la molécule anti-adhésion CD34 (Alfaro et al., 2011). De plus, les CPM expriment à leur surface les récepteur CXCR4 leur permettant de capter le signal de la molécule sécrétée SDF1 (ou CXCL12) secrétée par les fibroblastes résidents du muscle et recrutés au site de lésion (Ratajczak et al., 2003). Certains facteurs de croissance probablement libérés au site de blessure après l'endommagement de la matrice extra-cellulaire ont aussi montré un potentiel attractant sur les CPM, tels que le HGF (dont le récepteur c-Met est exprimé à la membrane des CPM) et le TGF-β (Bischoff, 1997). Plusieurs MMP sont aussi produites au site de blessure, notamment MMP-2 sécrétée par les CPM et les myofibres en régénération et MMP-9 sécrétée par les cellules inflammatoires recrutées au site de blessure. Une inhibition des MMP perturbe la migration de myoblastes *in vitro* laissant supposer un rôle similaire au cours de la régénération (Nishimura et al., 2008; Kherif et al., 1999) bien que l'utilisation d'un inhibiteur de plusieurs MMP (GM6001) n'empêche pas les CPM de traverser la lame basale dans un modèle *ex vivo* de cultures de myofibres isolées (Lund and Cornelison, 2013).

b. Différentiation et Auto-renouvellement des Cellules Satellites

L'engagement d'une CPM dans la voie de différentiation est directement lié aux facteurs qu'elle exprime. En effet, il a été montré que *Pax7* affectait la stabilité de MYOD, alors que *Myogénine* diminuait l'expression de *Pax7* (Olguin et al., 2007). Différents niveaux d'expression de *Pax7* ont d'ailleurs été observés dans les CPM activées, et les cellules exprimant un fort niveau de *Pax7* (cellules $Pax7^{High}$) se destinent généralement à l'auto-renouvellement contrairement aux cellules qui expriment un niveau bas de *Pax7* (cellules

Pax7^{Low}) qui ont plutôt tendance à se différencier (Rocheteau et al., 2012). De leur côté, *Myf5* et *MyoD* semblent jouer des rôles différents au cours de la myogenèse adulte et au cours des myogenèses embryonnaires et fœtales. En effet, de par les phénotypes des KO de *Myf5* ou de *MyoD* chez l'adulte au cours de la régénération, il a été établi que *Myf5* jouait plutôt un rôle sur la prolifération des CPM alors que *MyoD* jouait un rôle plus tardif dans l'engagement des CPM dans la voie de différentiation. Il a été observé que l'expression de *Myf5* et *MyoD* était la plus forte lorsque les CS étaient en phase G0 et G1 du cycle cellulaire respectivement. Ces observations suggèrent que la modification de la balance *Myf5*/*MyoD* détermine aussi la voie que suivent les CPM (Ustanina et al., 2007). En fonction du niveau d'expression de *Pax7*, *Myf5*, *MyoD* et *Myogénine*, une CPM s'oriente donc soit vers la différentiation terminale afin de participer à la reconstitution d'une myofibre, soit vers l'auto-renouvellement pour maintenir la réserve de CS. La production de ces deux types de CPM peut se faire grâce à des évènements de divisions symétriques ou asymétriques. En effet, l'utilisation de ces deux types de division est courant chez un grand nombre de cellules souches adultes. La division symétrique permet de générer un grand nombre de cellules souches filles identiques, et la division asymétrique de générer une cellule fille engagée dans la voie de différentiation tout en générant une cellule fille souche (Chen et al., 2016). Une myofibre adule d'EDL de souris comptant en moyenne 250 myonuclei et 7 CS, la majorité des CPM présentent dans le muscle lésé s'oriente vers la voie de différentiation. Il a d'ailleurs été observé par imagerie intra-vitale après blessure que la majorité des divisions des CPM était symétrique dans le plan de la myofibre lésée mais que des divisions asymétriques dans un plan perpendiculaire à celui de la myofibre lésée permettaient leur auto-renouvellement (Webster et al., 2016; Gurevich et al., 2016). Lors d'une division cellulaire, la cellule mère réplique son ADN et chaque chromosome se trouve alors sous la forme d'un brin matrice et d'un brin nouvellement synthétisé. Généralement, la ségrégation de ces deux brins se fait aléatoirement entre les deux cellules filles. Au cours de la régénération musculaire, les cellules Pax7^{High} héritent préférentiellement du brin d'ADN matrice, contrairement aux cellules Pax7^{Low} qui héritent aléatoirement du brin matrice ou du brin nouvellement synthétisé. La cellule héritant du brin matrice retient généralement l'expression de *Pax7* et s'oriente vers l'auto-renouvellement alors que la cellule héritant du brin nouvellement synthétisé exprime *Myogénine* et s'oriente vers la différentiation. Ce processus permet sûrement aux cellules souches d'effectuer un plus grand nombre de division en diminuant leur risque d'accumuler des mutations (Shinin et al., 2006; Rocheteau et al., 2012; Yennek et al., 2014; Conboy et al., 2007; Chakkalakal et al., 2014). Deux paramètres peuvent rendre compte de la symétrie de division d'une cellule : La

distribution égale ou inégale de protéines de polarité ou de contrôle du destin cellulaire entre les deux cellules filles, et l'environnement auquel elles se retrouvent exposées après la division.

Protéines de polarité et du destin myogénique

Plusieurs études ont pu monter la distribution asymétrique de facteurs menant à une asymétrie de destin cellulaire des deux cellules filles. Par exemple, il a été observé que les cellules PAX7+ n'ayant jamais exprimé *Myf5* réalisaient préférentiellement des divisions symétriques permettant d'augmenter rapidement le nombre de CPM, contrairement aux cellules PAX7+MYF5+ qui réalisaient préférentiellement des divisions asymétriques et généraient des cellules qui s'engageaient dans la voie de différentiation (Le Grand et al., 2009). La protéine CARM1 est localisée asymétriquement dans la cellule vouée à se différentier et permet l'expression de *Myf5* dans cette cellule en phosphorylant PAX7 qui induit lui-même l'expression du MRF (Chakkalakal et al., 2014). La protéine NUMB, inhibitrice de la voie Notch a aussi été montrée localisée asymétriquement dans des CPM en division, ségrégeant préférentiellement avec MYOG et favorisant la différentiation (Conboy and Rando, 2002; Conboy et al., 2005). Le complexe de polarité PAR3-PKCλ est aussi distribué asymétriquement dans les CPM en division, en faveur de la cellule qui s'engage dans la voie de différentiation, où il co-localise avec la forme phosphorylée de p38α/β et ensemble induisent l'expression de *MyoD* (Troy et al., 2012; Smith et al., 2007). Plus récemment, la protéine DYSTROPHINE a été identifiée comme fortement exprimée dans les CPM en prolifération. Il a été montré que cette protéine favorisait la division asymétrique des CPM en se localisant au pôle de la CPM en contact avec la lame basale, forçant sa co-localisation avec la protéine MARK2 et la localisation opposée de PARD3 au pôle de la cellule en contact avec la myofibre. L'absence d'expression de Dystrophine empêche l'asymétrie de localisation de PARD3 et ne favorise plus les divisions asymétriques menant à la multiplication symétrique des CPM et empêchant une réparation efficace des fibres lésées (Dumont et al., 2015a). Les patients atteints de la myopathie de Duchenne montrent en effet de nombreuses CPM incapables de fusionner (Kottlors and Kirschner, 2010). Il a ainsi été proposé que cette pathologie soit une maladie des cellules souches musculaires (Dumont et al., 2015a).

Rôle de l'environnement

Dans le cas des CPM, les divisions symétriques ou asymétriques peuvent modifier l'environnement des deux cellules filles et créer une nouvelle asymétrie. Une division dans le plan de la myofibre fournit le même environnement aux deux cellules filles qui sont alors toutes les deux en contact avec la myofibre endommagée et la lame basale qui l'entoure

(division symétrique). Une division dans un plan perpendiculaire à la myofibre permet à une des cellules filles d'être en contact seulement avec la lame basale et l'autre cellule fille seulement avec la myofibre (division asymétrique). Il a été démontré que l'asymétrie environnementale des cellules pouvait être liée à l'asymétrie de destin des deux cellules filles (Yennek et al., 2014). De plus, des protéines de la MEC ont été montré comme favorisant l'auto-renouvellement des CPM telles que le Collagène-VI ou la Fibronectine (Urciuolo et al., 2013; Bentzinger et al., 2013a). D'autre part, il a été montré que la voie de signalisation Wnt/PCP, voie de polarité planaire, favorisait la division symétrique, via Wnt7A et son récepteur Fzd7 induisant la co-ségrégation de VangL2 dans les deux cellules filles aux deux pôles opposés des deux cellules. L'activation de la voie PCP favorise la localisation de l'intégrine-α7 dans les deux cellules filles, leur permettant de rester en contact avec la laminine de la MEC (Le Grand et al., 2009). Notons que la lésion musculaire induite par injection de Cardiotoxine induit la lyse des myofibres mais ne désorganise pas le réseau de MEC, du moins de collagènes qui l'entoure. En effet, des images de microscopie intra-vitale ont permis grâce à la génération d'ondes de seconde harmoniques de révéler l'organisation des fibres de collagènes après lésion, qui forment des fibres fantômes, vides de myofibres, et servent de support aux MPC (Webster et al., 2016).

Différentiation myogénique terminale

La première étape vers la voie de différentiation est la sortie du cycle cellulaire. Elle fait intervenir l'expression d'inhibiteur de CDK (Cycline-dependent kinase) tels que p21 dont l'expression est induite par MyoD (Guo et al., 1995), p57 et p27 (Dumont et al., 2015b; Zalc et al., 2014). La cellule mononucléée, engagée dans la voie de différentiation et sortie du cycle cellulaire est appelée myocyte. Afin de comprendre le mécanisme transformant un myocyte en myotube, l'équipe de Stephen Tapscott a réalisé un séquencage des ARNm (RNASeq) de myocytes ou de myotubes en culture. Cette analyse a révélé que l'entrée en différentiation était gouvernée par des gènes cibles de *MyoD* et de ses deux cibles principales *Myogénine* et *Mef2*. Notamment, les myotubes sont caractérisés par l'expression de gènes codant pour des protéines du cytosquelette et des sarcomères alors que les myocytes expriment plutôt des gènes codant pour des protéines impliquées dans la communication de la cellule avec son milieu extérieur telles que des protéines de MEC ou des récepteurs à cytokines (Cao et al., 2010). La formation de myotubes a lieu en plusieurs étapes : la reconnaissance et l'adhésion de myocytes entre eux, puis la fusion de leurs membranes, et enfin la maturation de la myofibre (Knudsen and Horwitz, 1977). On distingue deux étapes de fusion, une première étape au cours de laquelle les myocytes fusionnent entre eux, puis une

deuxième étape où des myocytes fusionnent avec des myofibres en maturation (Yin et al., 2013). Deux études ont récemment identifié deux protéines responsables de la fusion des myocytes : la protéines membranaire et fusogène Myomaker et le micro-peptide Myomixer. Ces deux protéines collaborent pour permettre la fusion de myocytes entre eux ou avec un myotube, et il a été proposé que Myomixer localisé à la membrane plasmique stimule l'activité fusogène de Myomaker (Millay et al., 2013; Bi et al., 2017).

Auto-renouvellement des CS

Les cellules n'ayant pas perdu l'expression de *Pax7* sortent aussi du cycle cellulaire en fin de régénération. Bien que la sortie de cycle pour entrer en différentiation requiert l'expression de p21, p27 et p57, la sortie de cycle pour l'auto-renouvellement des CS ne requiert que p21 (Dumont et al., 2015b). Les CS ré-acquièrent l'expression des marqueurs de quiescence évoqués précédemment mais la régulation de ce processus n'est pas connue (Yin et al., 2013). Après lésion, un muscle récupère le même nombre de myofibres et de taille équivalente qu'avant lésion, et une fibre adulte avant et après lésion possède en moyenne toujours le même nombre de CS associées à leur membrane. Les processus moléculaires sous-jacents responsbes de cette précision ne sont pas connus non plus.

c. Ré-établissement du typage de fibre et ré-innervation après blessure

Les premières étapes de la régénération (activation, prolifération, différentiation et fusion) peuvent se passer d'innervation. Par contre, la croissance et la maturation des myofibres nouvellement formées requièrent la présence d'une stimulation nerveuse (Whalen et al., 1990). La ré-innervation a été étudiée sur des muscles soléaires de rat, et un potentiel d'action a pu être mesuré dès quatre jours après injection de myotoxine (Notexin). Dix jours après la blessure, 95% des myofibres sont ré-innervées (Grubb et al., 1991). La mise en place du typage de fibres a aussi été étudiée au cours de la régénération après injection de Notexin dans le muscle soléaire de rat et il a été observé qu'au début de la régénération, le muscle exprime la myosine embryonnaire (MyhE) et la myosine néonatle (MyhNeo), ensuite remplacées par défaut par les myosine rapides (MyhF), avant de voir apparaître les chaines de myosines lentes (MyhS) (Whalen et al., 1990). Après trois à quatre semaines de régénération toutes les fibres du soléaire sont positives pour MyhS et négatives pour les autres types de myosines et sont normalement innervées (Whalen et al., 1990). De plus, la régénération du muscle soléaire de rat a été étudiée dans un contexte de dénervation et quatre semaines après blessure, toutes les myofibres nouvellement formées du soléaire expriment des chaines lourdes de myosine rapides et pas de chaines lourdes de myosine lente. Le ré-établissement du typage de fibres lentes est donc dépendant de l'innervation (Whalen et al., 1990). De plus, ces observations

suggèrent que les CS du soléaire ne sont pas prédéterminées à former des fibres de types 1 ou 2A. Cependant, des expériences de stimulation électriques ont été réalisées sur des muscles soléaires et EDL dénervés de rat au cours de la régénération, et il a été observé qu'une stimulation lente n'avait pas le même effet sur un soléaire et un EDL dénervé. En effet sous l'effet d'une stimulation électrique de type lent, un EDL régénère de la même manière que s'il n'était pas innervé. Néanmoins, une stimulation électrique de type rapide sur un soléaire dénervé au cours de la régénération empêche la formation de fibres de type lent. Il semblerait donc que les muscles lents et rapides soient différemment sensibles à l'innervation, ainsi que leurs CS (Kalhovde et al., 2005). Une étude récente a mis en évidence la sécrétion d'une chimiokine répulsive l'ephrinA3 par les fibres lentes dont le récepteur ephA8 est spécifiquement exprimé par les motoneurones rapides. Les auteurs suggèrent que la sécrétion de cette molécule empêche l'innervation des fibres lentes par les motoneurones rapides (Stark et al., 2015). Dans ces études les lésions musculaires ont été réalisées par injection de Notexin, une myotoxine présente dans le venin du serpent tigre Australien *Notechis scatatus*. La notexin contient un peptide neurotoxique, la phospholipase A2 qui empêche le relargage d'acétylcholine par le motoneurone. Il se lie spécifiquement à la membrane plasmique de la myofibre et son activité hydrolytique induit une lyse de la membrane, une sortie des ions cytoplasmiques et une hyper-contraction de la myofibre conduisant à sa nécrose. Cette toxine provoque généralement la lyse de la majorité des fibres musculaires et ne touche que très peu les cellules environnantes (Hardy et al., 2016). Par conséquent, les motoneurones perdent juste leur contact avec les myofibres mais ne dégénèrent pas dans ce paradigme expérimental (Sanes and Lichtman, 1999).

d. Populations non myogéniques

Plusieurs types cellulaires résidents du muscle squelettique et différents des CS ont été identifiés comme pouvant participer à la régénération du muscle squelettique.

Mésoangioblastes

Les mésoangioblastes sont des cellules qui proviennent de l'aorte dorsale embryonnaire. Bien qu'elles ne proviennent pas des somites, ces cellules participent à la formation de plusieurs tissus mésodermiques tels que le muscle squelettique (De Angelis et al., 1999; Minasi et al., 2002).

Péricytes

Les péricytes sont des cellules contractiles du tissu conjonctif originaires du sclérotome, localisée sous la membrane basale des vaisseaux sanguins, et dont la contraction régule le flux sanguin (Pouget et al., 2008). L'équipe de Giulio Cossu a pu mettre en évidence que ces

cellules participaient à la régénération musculaire en fusionnant avec des myofibres endommagées, mais ne participaient pas à l'auto-renouvellement du réservoir de CS. Ces cellules sont CD45$^-$/CD34$^-$/CD56$^-$/CD144$^-$/CD146+/PDGFR-β 1+/NG2-proteoglycan+ ce qui les différencient des mésoangioblastes et des CS (Dellavalle et al., 2011).

Cellules Interstitielles résidentes du muscle

En 2010, trois équipes ont identifié en utilisant des marqueurs différents, des populations de cellules PAX7$^-$ résidant dans le milieu interstitiel musculaire. Ces trois types cellulaires sont toutes CD34+/CD45$^-$/CD31$^-$ et expriment un marqueur qui les différencient des autres. Les cellules PDGFRα+ ont un fort potentiel adipogénique inhibé par les CS et n'ont pas d'impact sur la fonction des CS (Uezumi et al., 2010). Les cellules SCA1+ ont aussi un fort potentiel adipogénique, pas de potentiel myogénique et favorisent la différentiation des CPM au cours de la régénération musculaire (Joe et al., 2010). Le marqueur PW1 est exprimé dans les SC adultes et au cours du développement post-natal, ainsi que dans des cellules PAX7$^-$ localisées dans le milieu interstitiel musculaire. Les cellules PW1+PAX7$^-$ participent à la régénération musculaire, ont un fort potentiel myogénique, adipogénique et musculaire lisse et acquièrent l'expression de *Pax7*, *Pax3*, *Myf5* en s'engageant dans la voie myogénique (Mitchell et al., 2010). L'interaction entre ces trois populations de cellules n'est aujourd'hui pas entièrement claire. En effet, les cellules PW1+ peuvent être séparées en plusieurs classes en fonction de leur niveau d'expression de PDGFRα et seules les cellules PW1+PDGFRα$^-$ possèdent un potentiel myogénique. De plus, certaines cellules PW1+ sont aussi SCA1+ mais plus le niveau de SCA1 est élevé moins les cellules ont de potentiel myogénique, et les cellules SCA1+PW1$^-$ n'ont pas de potentiel myogénique ni adipogénique, elles forment des cellules musculaires lisses (Pannérec et al., 2013). Bien que la séparation des populations PDGFRα+ et SCA1+ ne soit pas très claire aujourd'hui, seules les cellules PW1+ ont un potentiel myogénique.

Cellules souches musculaires dérivées (CSMD)

Un autre type cellulaire résident du muscle squelettique a été isolé à partir de son comportement in vitro différent de celui des CS. En effet ces cellules ont une faible capacité d'adhésion et sont capables de se maintenir en prolifération très longtemps. Ces cellules sont CD45$^-$/M-Cadherin$^-$/CD34$^-$/Flk-1+/Sca-1+/Desmin+ (Lee et al., 2000b; Qu-Petersen et al., 2002), ont un potentiel myogénique qui nécessite la présence de CS, participent à la réparation de myofibres et à l'auto-renouvellement du réservoir de CS après lésion (Lu et al., 2008; Qu-Petersen et al., 2002) et sont multipotentes. Elles sont en effet capables d'acquérir

différents destins cellulaires tels que les destins myogénique, adipogénique, osteogénique, chondrogénique, et hématopoïétique (Peng and Huard, 2004).

Cellules TWIST-2+

Très récemment, l'équipe d'Eric Olson a mis en évidence une nouvelle population, de cellules présentes dans le muscle adulte à l'état basal et exprimant spécifiquement la protéine membranaire TWIST2 (TW2). Ces cellules diffèrent des CS puisqu'elles sont localisées dans le milieu interstitiel. Au cours de la régénération, elles participent spécifiquement à la formation de myofibres rapides de type 2B et 2X avec les CS. La déplétion en cellules TW2+ n'a pas d'effet sur la régénération musculaire, mais leur absence cause une atrophie des fibres 2B. Les cellules TW2+ sont donc nécessaires au maintien de certaines fibres rapides au cours de l'homéostasie et constituent les premières cellules progénitrices musculaires (même si non-myogénique) spécifiques d'un type de fibres (Liu et al., 2017).

Cellules circulantes à potentiel myogénique

Après transplantation par voie sanguine ou directement dans un muscle en régénération, des cellules de la moelle osseuse sont capables de participer à la régénération du muscle squelettique. Ces cellules sont en effet capables de migrer jusqu'au site de lésion et de se différencier pour participer à la réparation des fibres musculaires endommagées après transplantation (Ferrari et al., 1998) ainsi qu'à l'auto-renouvellement des CS (LaBarge and Blau, 2002). Une population de cellules a été identifiée dans le lignage hématopoïétique, et baptisée Population Secondaire (PS) car elle absorbait très peu du colorant vital Hoechst 33342 par rapport aux autres cellules de la moelle osseuse. Ces cellules représentant 0,1% des cellules de la moelle possèdent la majorité du potentiel de cellules souches hématopoïétiques de la moelle (Goodell et al., 1996). Injectées dans la circulation de souris *mdx*, les cellules PS issues de la moelle osseuse de souris saines participent à la réparation du muscle squelettique (Gussoni et al., 1999). Les cellules SP ont ensuite été identifiées comme résidant dans d'autres tissus dont le muscle squelettique dans lequel elles participent à la réparation d'un muscle lésé et à la reconstitution du réservoir de CS (Seale et al., 2001). Une population de cellules circulantes a été identifiée comme exprimant un marqueur bien connu du lignage hématopoïétique AC133 et a aussi montré un potentiel myogénique après injection dans la circulation ou directement dans la masse musculaire de souris *scid/mdx*. Des cellules AC133+ ont été retrouvées sous la lame basale de myofibres régénérées et montrant l'expression de facteurs myogéniques tels que *M-cadhérine* et *Myf5*. De plus ce traitement a montré une amélioration de la force générée par les muscles traités. Les cellules AC133+ constituent un espoir pour la thérapie cellulaire des patients atteints de dystrophies puisque leur prélèvement

se fait par le sang, qu'elles sont facilement manipulables in vitro et que leur administration peut aussi se faire par la voie sanguine (Torrente et al., 2004). Ces études révèlent l'existence de cellules souches adultes pluripotentes capables de se différencier en plusieurs types cellulaires en fonction du tissu dans lequel elles se trouvent, malgré l'existence de cellules souches adultes résidentes d'un tissu donné comme les CS.

Les muscles squelettiques sont donc des tissus très plastiques, principalement mis en place au cours du développement prénatal mais qui subissent une maturation importante au cours de la croissance post-natale. Une fois l'homéostasie du tissu atteinte chez l'adulte, les systèmes de réparations permettent de la maintenir. Toutes ces étapes de la vie du muscle squelettique impliquent les cellules progénitrices musculaires et sont contrôlées par les nombreuses interactions que les cellules musculaires établissent avec leur environnement.

II. Les Progéniteurs Myogéniques et leur environnement

Les cellules souches constituent un type cellulaire particulier de cellules indifférenciées responsables du maintien de l'homéostasie d'un tissu. Beaucoup de chercheurs se sont demandés et se demandent encore comment ces cellules font pour garder leur propriétés souches. C'est en 1978 que pour la première fois est proposé le concept de niche par Schofield. En effet, l'environnement des cellules est essentiel pour adapter leur cycle de vie aux besoins du tissu dans lequel elles résident. Dans sa niche, la cellule souche est protégée du milieu extérieur et les signaux qu'elle reçoit sont filtrés afin de ne les mobiliser que lorsque c'est nécessaire. De plus, les molécules de l'environnement avec lesquelles les cellules souches sont en contact établissent une stabilité mécanique leur permettant de conserver leur état de quiescence (Figure 8) (Jones and Wagers, 2008).

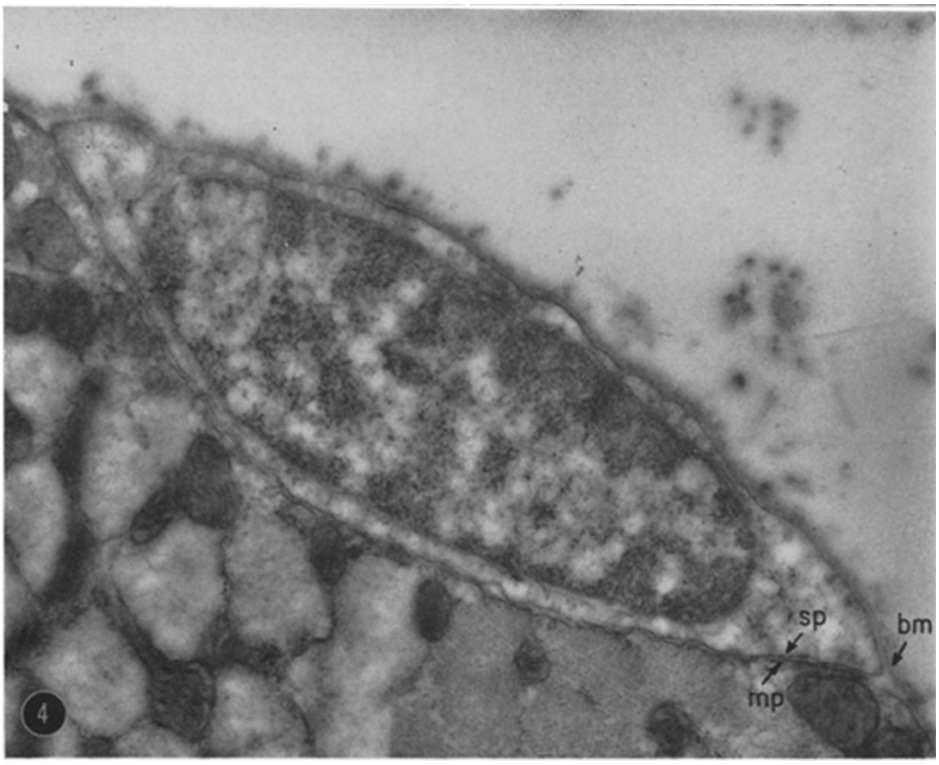


Figure 8 : Première image d'une cellules satellite par Alexander Mauro (1961)

Image tirée de Mauro, 1961, montrant une cellule satellite contre une myofibre avec leurs membranes plasmiques respectives (sp et mp) en contacte. La CS est localisée sous la lame basale qui entoure la myofibre (bm)

A. La niche des cellules satellites adultes : homéostasie et régénération

Dans un muscle adulte, la cellule satellite se trouve elle aussi dans une niche qui est composée à son pôle apical par la membrane plasmique de la myofibre sur laquelle elle repose, et à son pôle basal par la membrane basale qui entoure la myofibre (Figure 8) (Mauro, 1961). Cette position anatomique et les interactions qu'elle lui apporte permettent à la CS de rester quiescente à l'état basal, de s'activer lorsque le muscle la stimule, et de se différencier ou de s'auto-renouveler. Un fait marquant et caractéristique de la recherche actuelle sur les CS est qu'une fois sortie de leur niche et cultivées in vitro dans les conditions usuelles de culture cellulaire, les CS perdent leurs propriétés de cellules souches et ne sont plus capables de participer à la régénération musculaire *in vivo* après transplantation (Montarras et al., 2005; Collins et al., 2005; Sacco et al., 2008). Il y a donc dans leur environnement des facteurs responsables de la maintenance des caractéristiques qui font d'elles des cellules souches adultes. Notamment, les CSQ mises en cultures s'activent. Leur quiescence requiert donc la présence d'une niche intacte. L'élasticité de l'environnement a des conséquences sur le comportement des CS par des voies de mécano-transduction, et il a été montré que la culture de CS primaires sur un substrat dont l'élasticité est plus proche de celle de leur environnement *in vivo* leur rendait leur capacité à participer à la régénération après transplantation (Gilbert et al., 2010).

1. Interactions avec la fibre musculaire

L'adhésion entre la CS et la myofibre n'est pas très documentée. Ce contact physique a toujours été supposé depuis la découverte d'Alexander Mauro mais la fonction de ce contact n'a pas toujours été évident. En effet, en fonction de l'état du muscle, le contact d'une CPM

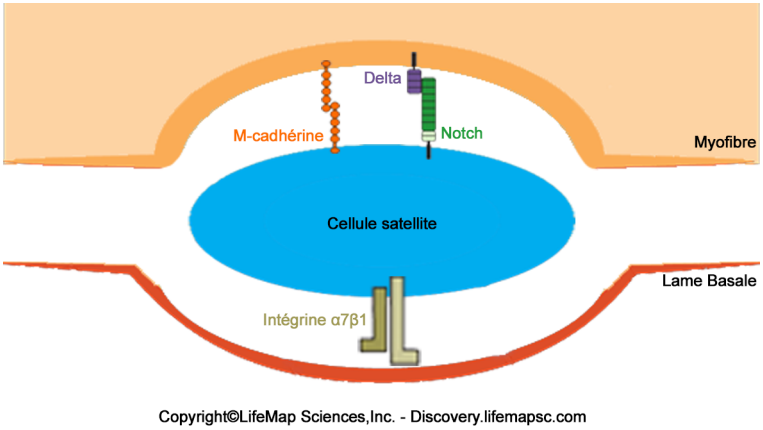


Figure 9 : Interactions de la Cellule Stellite avec son environnement

Figure tirée de lifemapsc.com et Krauss, 2017.

avec la myofibre peut se transformer en fusion ou en retour en quiescence. Certaines équipes ont supposé que l'interaction entre la CS et la myofibre permettait de maintenir sa quiescence. Un traitement du muscle à la marcaïne, qui lyse les myofibres mais pas la lame basale induit une activation des CS. Ces observations suggèrent que la préservation de la lame basale n'est pas suffisante pour le maintien de la quiescence des CS montrant donc l'importance de l'intégrité de la myofibre (Bischoff, 1990). Ces résultats laissent supposer que la myofibre intègre favorise la quiescence des CS (soit directement par contact physique soit en sécrétant des facteurs biochimiques) et que la lésion de la myofibre favorise leur activation (soit par libération passive de molécules cytoplasmiques, soit par déstabilisation des contacts Myofibre/CS). La molécule d'adhésion dépendante du calcium M-cadhérine (Mcad) s'accumule préférentiellement au site d'interaction de la CS avec la myofibre dans un muscle adulte à l'état basal (Irintchev et al., 1994) et a été montrée comme importante pour l'activation des CS et la fusion des myocytes avec des myotubes in vitro (Zeschnigk et al., 1995; Marti et al., 2009). Bien que l'absence de Mcad dans un modèle de souris KO n'altère pas la régénération musculaire ni la prolifération et la fusion des cellules musculaires *in vitro* (Hollnagel et al., 2002), la compensation de la perte de la Mcad par la N-cadhérine (Ncad) a été envisagée, et des résultats non publiés suggèrent que le double KO de Mcad et Ncad induit l'activation des CS en absence de lésion, suggérant un rôle redondant de ces deux molécules d'adhésion dans le maintien de la quiescence des CS (Krauss et al., 2017). Comme évoqué au paragraphe précédent, la voie Notch permet aussi le maintien de la quiescence des CS. La particularité de la voie Notch et que les ligands Delta ou Jag qui interagissent avec le récepteur Notch sont aussi des protéines membranaires (Andersson et al., 2011). Cette voie est donc activée lors d'un contact entre deux cellules. A l'état basal, Delta est exprimé à la surface de la myofibre et permet l'activation de la voie Notch via son récepteur Notch3 exprimé à la surface des CSQ. Cette interaction est essentielle pour le maintien de la quiescence des CS (Figure 9) (Montarras et al., 2013). Comme vu précédemment, la déstabilisation de la niche après une lésion cause l'activation des CSQ. L'asymétrie de la niche favoriserait aussi la division asymétrique des CPM activées. Lors d'une division apico-basale, la cellule fille en contact avec la myofibre et exprimant la Mcad a tendance à se différencier, suggérant que la présence de la Mcad favorise l'engagement dans la différentiation myogénique (Kuang et al., 2007).

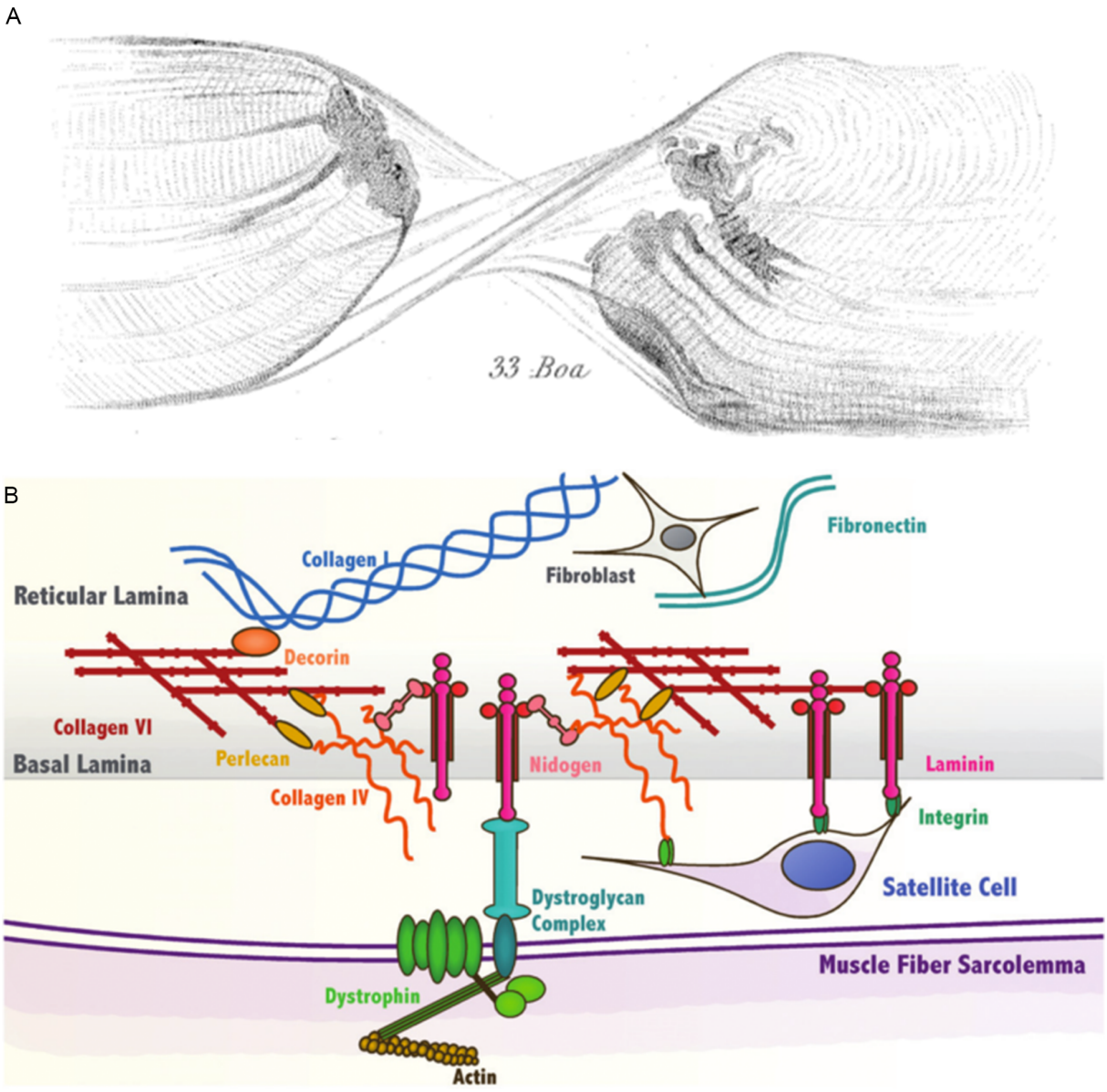


Figure 10 : Identification et structure de la Membrane Basale des fibres musculaires squelettiques

Figure tirée de Bowman, 1840 (A) et Thomas et al., 2015 (B).

A : Première identification de la lame basale entourant les fibres musculaires squelettiques des vertébrés par William Bowman en 1840. B : Schéma représentant la majorité des constituants de la membrane basale.

2. Interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire

Au pôle basal de la CS, la matrice extra-cellulaire (MEC) forme une membrane basale qui protège la CS du milieu extérieur. Les membranes basales sont retrouvées dans tous les tissus chez les métazoaires et forment ce revêtement permettant l'adhésion des cellules et le contrôle de leur homéostasie (Pozzi et al., 2016). C'est en étudiant la structure du muscle squelettique que la première membrane basale a été découverte, en 1840 par William Bowman (Figure 10A) (Bowman, 1840). La membrane basale du muscle squelettique est composée de deux couches : la lame basale (LB) directement en contact avec les CS et les myofibres, et la lame réticulée (LR), plus à l'extérieur. La LB est principalement constituée de Laminine-2 (211) et de Collagène IV qui forment un réseau de matrice grâce à la glycoprotéine Nidogène qui les relie entre elles. La LB est reliée aux CS et aux myofibres grâce à la Laminine. En effet, les CS expriment une famille de récepteurs bien connus des Laminines : les Intégrines. Du côté de la myofibre la Laminine interagit avec un complexe de dystroglycans présent à leur membrane. Ce complexe lie la Laminine à l'extérieur de la cellule avec la Dystrophine, protéine sous-membranaire à l'intérieur de la myofibre. La Dystrophine est elle-même reliée à l'actine filamentaire du cytosquelette de la myofibre, reliant ainsi ce dernier à la MEC. La LR est composée de Collagène I et de Fibronectine deux protéines de matrice qui ne sont donc pas en contact avec les CS et les myofibres à l'état basal. La LB et la LR sont connectées par un réseau de Collagène VI qui est relié au Collagène I (de la LR) par la Décorine et au Collagène IV (de la LB) par le Perlécan. La Décorine et le Perlecan sont des protéoglycans dont la charge négative leur permet de lier et de séquestrer les facteurs de croissance dans la membrane basale afin de réguler les signaux atteignant les CS et les myofibres (Figure 10B) (Thomas et al., 2015).

a. Laminin

Nomenclature et structure

La Laminine a été découverte en 1979 par Timpl, Rohde et leurs collègues comme composant des membranes basales. C'est une glycoprotéine assemblée en hétéro-trimère de trois chaines distinctes α, β et γ. Chez les vertébrés, cinq chaines α, trois chaines β et trois chaines γ ont été identifiées, chacune codée par un gène différent. L'assemblage aléatoire de ces différentes chaines donnerait 45 hétéro-trimères différents, or seulement 18 ont été identifiés à ce jour démontrant la stabilité des trimères formés (Durbeej, 2010). L'ancienne nomenclature des Laminines leur donnait un numéro en fonction de l'ordre dans lequel les trimères avaient été découverts. Pour plus de simplicité et de clarté, une nouvelle nomenclature a été mise en place en 2005 qui consiste à appeler les différents trimères par un numéro constitué de trois

chiffres, les numéros des trois chaines présentent dans un trimère donné dans l'ordre αβγ. Par exemple, la Laminin-1 (ancienne nomenclature) est constituée des chaines α1, β1 et γ1, son nom sous la nouvelle nomenclature est donc la Laminin-111 (Aumailley et al., 2005). Les Lamininines ont une distribution spécifique dans différents tissus dictée par l'expression des chaines α. La chaine α2 est généralement restreinte au système neuro-musculaire, ainsi la Laminine-211 est l'isoforme la plus représentée dans le muscle squelettique adulte (Sasaki et al., 2002). Des mutations ont d'ailleurs été identifiées dans le gène codant la chaine α2 de la Laminine chez des patients atteints de myopathies musculaires congénitales. Ce gène a été baptisé *Mérosine* et sa mutation conduit à une perte des liaisons entre la MEC et la myofibre, entrainant une instabilité de la membrane plasmique et une dégénérescence des myofibres (Tomé et al., 1994). L'étude récente d'un modèle murin de la mutation de la *Mérosine* humaine a montré une diminution de la taille des fibres musculaires au cours de la période fœtale (pas de défauts plus précoces) accompagnée d'une forte diminution du nombre de cellules PAX7+ et MYOG+. Cette étude a permis de mettre en évidence que les défauts musculaires observés suite à une mutation de ce gène apparaissaient *in utero*, et suggère que l'intégrité de la lame basale est indispensable au maintien des cellules progénitrices musculaires (Nunes et al., 2017). De plus, l'injection intramusculaire de Laminin-111 augmente la prolifération et le nombre de cellules PAX7+ suite à une lésion musculaire induite par exercice physique eccentrique (Zou et al., 2014). D'autres études ont rapporté les effets du KO de la chaine α2 de la Laminine chez la souris sur l'intégrité des fibres musculaires sans étudier plus précisément l'effet sur les CS (Bentzinger et al., 2005; Gawlik et al., 2010). La laminine a donc un impact majeur sur l'homéostasie des cellules progénitrices musculaires chez la souris, la mutation humaine entrainant une myopathie, il est raisonnable de penser que l'homéostasie des CS soit perturbée chez les patients mutés dans le gène *Mérosine*.

Lamininines et Intégrines

Les principaux récepteurs des Lamininines sont les intégrines. Ces protéines membranaires s'organisent en hétéro-dimères d'une chaine α et d'une chaine β. A ce jour, 18 chaines α et 8 chaines β ont été identifiées, et le dimère le plus représenté dans le muscle squelettique adulte est l'isoforme α7β1 (Hynes, 2002). Le KO de l'intégrine-β1 spécifiquement dans les cellules satellites à l'état basal induit une activation des CSQ, démontrant que l'intégrine-β1 est essentielle au maintien de la quiescence des CS. De plus, l'absence d'intégrine-β1 dans les cellules PAX7+ au cours de la régénération affecte l'expansion des CPM activées et leur auto-renouvellement. Bien qu'il ne soit pas démontré que l'interaction Intégrine-β1/Laminine

est en cause dans ce phénotype, ces observation suggèrent une régulation de toutes les étapes de la vie des CPM par la MEC (Rozo et al., 2016). *In vitro*, l'intégrine-α7β1 promeut l'adhésion et la migration des myoblastes sur un substrat constitué de Laminine (Yao et al., 1996). De plus, la culture des CS primaires *in vitro* sur un milieu constitué de protéines de MEC appelé Matrigel améliore les propriétés des cellules les rapprochant de celles des CPM activées (Grefte et al., 2012). Lors d'une division apico-basale, la cellule fille en contact avec la lame basale conservant l'interaction Intégrine-α7β1/Laminine a tendance à s'auto-renouveler, suggérant que cette interaction participe au maintien des propriété souches des CS (Kuang et al., 2007). Des mutations dans le gène codant l'intégrine-α7 mènent aussi au développement de myopathies chez l'homme et la souris. L'absence d'intégrine-α7 chez la souris provoque en plus du phénotype dystrophique une diminution de l'expression de la Laminine-α2. Le phénotype dystrophique de ces souris est sauvé par l'expression ectopique de la Laminin-111, suggérant que la déficience musculaire soit due à la diminution d'expression de la laminine. Cette étude n'a pas étudié plus précisément l'effet de la mutation de l'intégrine-α7 sur les CS (Figure 9) (Gawlik et al., 2006; Rooney et al., 2009).

b. Collagène

Les Collagènes constituent une famille de protéines qui forment des hélices triples composées de trois chaines de polypeptides. Il a été identifié à ce jour 26 types de collagène génétiquement distincts caractérisés par une très grande variabilité de structure et de fonction (Gelse et al., 2003). Comme évoqué précédemment, la MEC du muscle squelettique est composée de plusieurs types de collagènes essentiels à l'homéostasie musculaire. Notamment, le Collagène-VI (ColVI) a été montré comme indispensable à la régénération musculaire. En effet en absence de ColVI l'auto-renouvellement des CS est altéré, surement car la rigidité du tissu est diminuée de moitié (deux fois plus élastique) ce qui favorise l'engagement des CPM dans la voie de différentiation *in vivo* et *in vitro*. Bien que la majorité du ColVI soit produite par les fibroblastes résidents du muscle (Zou et al., 2008b), les CPM activées produisent aussi du ColVI requis pour leur propre fonction au cours de la régénération (Urciuolo et al., 2013; Tierney and Sacco, 2016). Chez l'Homme des mutations dans les gènes codant les chaines du ColVI sont à l'origines de plusieurs pathologies musculaires telles que la myopathie de Bethlem et la dystrophie musculaire congénitale de type Ulrich, toutes deux caractérisées par des faiblesses et des contractures musculaires (Bertini and Pepe, 2002). L'organisation des réseaux de Collagènes autour des fibres musculaires est donc indispensable à l'intégrité des muscles adultes.

c. Fibronectine

A l'état basal, la Fibronectine faisant partie de la LR n'a pas d'interaction directe avec la CSQ, mais après une blessure, les CPM activées expriment et secrètent de la Fibronectine. De plus, les CSQ et les CPM sont caractérisées par l'expression de *Syndecan4* qui code pour une protéine de membrane connue pour être un récepteur à la Fibronectine. La perte de fonction de la fibronectine dans des cellules PAX7+ activées en culture de fibres isolées empêche l'expansion des cellules PAX7+ par division asymétrique (Bentzinger et al., 2013b), et la diminution de l'expression de la fibronectine dans des CPM juste avant leur transplantation dans un muscle adulte blessé diminue fortement leur capacité à participer à la régénération musculaire (Tierney and Sacco, 2016). Ces résultats démontrent que la production de fibronectine par la CPM elle-même est indispensable à leur expansion post-blessure.

3. Interaction avec les cellules résidentes du muscle

La niche des CS n'est pas seulement constituée de protéines de matrice. Elle comprend aussi tous les types cellulaires interstitiels qui résident au sein du muscle squelettique et sont indispensables à son maintien.

a. Fibroblastes

Les Fibroblastes constituent le type cellulaire principal du tissu conjonctif et sont considérés comme étant les cellules responsables de la production de la majorité des protéines composant les tissus conjonctifs et les MEC dans la plupart des tissus dont le muscle squelettique (Sanderson et al., 1986; Alexakis et al., 2007; Zou et al., 2008b). Les fibroblastes sont caractérisés par l'expression du gène *Tcf4* et sont présents dans le milieu interstitiel entre les myofibres du muscle squelettique adulte (Mathew et al., 2011). Ils sont d'ailleurs indispensables au bon déroulement de la régénération musculaire au cours de laquelle ils interagissent avec les CPM activées qui stimulent leur production de protéines de la MEC. L'ablation des CS PAX7+ dérégule la production de protéines de la MEC par les Fibroblastes et l'ablation des Fibroblastes TCF4+ dérégule le cycle des CPM et favorise leur entrée dans la voie de différentiation à défaut de leur auto-renouvellement (Murphy et al., 2011). Il a été observé récemment que les CS communiquaient avec les Fibroblastes en sécrétant des exosomes contenant le miR-206 capable de stimuler la production de collagènes (Fry et al., 2016). De plus, les CS sont aussi requises pour induire la production de ColVI par les fibroblastes au cours de la régénération musculaire (Braghetta et al., 2008). Dans le milieu interstitiel entourant les fibres musculaires, des cellules fibro/adipogénique ont aussi été mises

en évidence, leur nombre augmente transitoirement au cours de la régénération musculaire, et leur isolation puis culture in vitro avec des cellules musculaires a permis de montrer que ces cellules aussi appelées FAP (Fibro/adipogénic Progenitors) favorisaient la différentiation des cellules musculaires (Joe et al., 2010).

b. Cellules endothéliales

Le fonctionnement du muscle squelettique requiert un apport important en oxygène fourni par le sang qui traverse le muscle squelettique via de nombreux capillaires. Un processus de revascularisation est donc essentiel à la reformation d'un muscle fonctionnel après une blessure. Les cellules endothéliales (cellules épithéliales constituant la paroi des vaisseaux sanguins) prolifèrent et migrent alors afin de reconstituer le réseau de capillaires qui irriguera le muscle régénéré (Grounds, 2008; Luque et al., 1995). A l'état basal, les CS sont localisées en moyenne à moins de 21µm d'un capillaire, mais ne sont pas en contact direct, les capillaires étant localisés dans le milieu interstitiel. Un dialogue entre les cellules endothéliales et les CS a été mis en évidence in vitro. En effet, les myoblastes répondent aux facteurs de croissance sécrétés par les cellules endothéliales et possèdent des propriétés angiogéniques (Christov et al., 2007). Une étude récente a rapporté que les CS conservaient leurs propriétés souches jusqu'à deux à trois semaines après la mort chez la souris et l'homme respectivement. Ils ont observé que les CS post-mortem ne se trouvaient pas dans des conditions d'hypoxie extrême comparées à d'autres types cellulaires. Leur localisation proche des capillaires musculaires pourraient expliquer ces observations, bien qu'elles soient essentiellement dues au fait que les CSQ aient un métabolisme très bas, consommant peu d'oxygène (Latil et al., 2012).

c. Motoneurones

Les motoneurones n'ont pas pour seul rôle l'induction de la contraction musculaire. En effet il a été suggéré qu'ils soient aussi importants pour le comportement des CS. Ces dernières sont localisées préférentiellement autour des jonctions musculaires des fibres lentes (Kelly, 1978), et la différence en nombre de CS par fibre lente et rapide (moins de CS par fibre rapide que par fibre lente) pourrait être expliqué par la différence d'innervation de ces deux types de fibres (Gibson and Schultz, 1982). De plus, la dénervation d'un muscle préalablement innervé induit une diminution du nombre de CS qui sont préalablement activée puis meurent par apoptose (Kuschel et al., 1999). L'innervation pourrait donc être importante pour la maintenance des CS (Montarras et al., 2013). Plusieurs évidences suggèrent une interaction entre les CS et les motoneurones dans des conditions de lésions, mais aucune interaction

directe n'a aujourd'hui été démontrée. Par exemple, les myocytes qui s'engagent dans la voie de différentiation (MYOG+) suite à une blessure produisent de le Sémaphorine 3A (Sema3A) (Tatsumi et al., 2009), qui a été montrée comme étant un facteur de guidance des motoneurones vers le muscle squelettique, mais une étude récente n'as pas observé de défaut de ré-innervation après injection de Cardiotoxine dans les animaux spécifiquement délétés pour la Sema3A dans les cellules PAX7+ (Tatsumi et al., 2017). La Cardiotoxine n'affectant pas les axones, ces résultats n'excluent pas un rôle des CS dans la ré-innervation après une blessure plus drastique. Les différents éléments de la niche des CS sont donc indispensables à leur homéostasie, et leur perturbation induit la sortie de quiescence des CS. Une perturbation chronique de l'environnement des cellules satellites est souvent la cause des myopathies. Par exemple, les mutations dans le gène *Mdx* codant pour la protéine Dystrophine et responsables de la Dystrophie Musculaire de Duchenne induisent une absence de cette protéine qui en temps normal se localise sous la membrane plasmique des myofibres. En absence de Dystrophine, en plus du phénotype observé dans les CS elles-mêmes (Dumont et al., 2015a) la structure des myofibres est altérée envoyant constamment un signal d'activation aux CS qui prolifèrent sans pouvoir s'engager dans la voie de différentiation menant à leur épuisement. Un approfondissement des connaissances concernant la composition et la fonction de la niche des CS est donc indispensable au futur développement de thérapies.

B. Environnement des progéniteurs myogéniques au cours du développement prénatal

La stabilité de la niche des CS est primordiale à leur homéostasie dans un muscle adulte. Les myoblastes sont aussi très réceptifs à leur environnement au cours du développement musculaire prénatal. En effet, des expériences de greffes de somites nouvellement formés retournés ou déplacés ont permis de montrer que les cellules somitiques n'étaient pas préalablement programmées à s'engager dans une voie ou une autre, mais que leur spécification se faisait en réponse à leur environnement (Ordahl and Le Douarin, 1992).

1. Facteurs sécrétés par les tissus adjacents

Les premières étapes de la myogenèse sont orchestrées par des facteurs sécrétés par les tissus environnant du dermomyotome (DM) : le tube neural (TN), l'ectoderme, la notochorde (NC) et le mésoderme latéral (ML) afin de réguler l'engagement des cellules progénitrices dans la voie myogénique.

a. Facteurs affectant la myogenèse épaxiale

La myogenèse dans la partie épaxiale du DM est initiée par la sécrétion de Shh et Wnt1/Wnt3 par le TN qui induisent l'expression de *Myf5* via la voie Wnt/β-caténine dans les cellules de la lèvre épaxiale, ou lèvre Dorso-Médiale (LDM) du DM (Borycki et al., 1999; Borello et al., 2006; Tajbakhsh et al., 1998). Wnt1 et Wnt3 induisent aussi l'expression de Wnt11 dans les cellules de la partie médiale du DM, et dont la sécrétion active la voie de polarité planaire (PCP) dans les cellules du myotome, leur permettant de s'orienter parallèlement au TN (Gros et al., 2009; Marcelle et al., 1997). Par opposition aux voies Shh et Wnt qui sont pro-myogéniques, le TN sécrète aussi des facteurs anti-myogéniques comme BMP-4, indispensable à la sécrétion de Wnt1 et Wnt3 et donc de Wnt11 vus précédemment. Un inhibiteur de cette voie dans les cellules à destin myogénique est donc essentiel à leur engagement dans cette voie. En effet, les cellules de la LDM expriment le facteur *Noggin* qui inactive BMP-4 et l'empêche de bloquer leur identité myogénique. L'expression de *Noggin* est aussi régulée par Wnt1 et Wnt3 (Marcelle et al., 1997; Hirsinger et al., 1997). L'ED sécrète aussi du Wnt6, qui permet de maintenir l'organisation épithéliale de la partie centrale du DM, évitant que ces cellules ne se dé-épithélialisent et entrent dans le myotome (Linker et al., 2005). Les cellules du sclérotome, issu de la partie ventrale des somites sécrètent le ligand Slit-1 dont le récepteur Robo-2 est exprimé par les cellules myogéniques ayant délaminé dans le myotome. L'interaction Slit/Robo est essentielle à la détermination de la direction de migration des cellules progénitrices et à l'orientation des myofibres qui forment le myotome (Halperin-Barlev and Kalcheim, 2011). Au cours de sa croissance le myotome continue à recevoir des signaux de son environnement, notamment Shh qui régule la balance prolifération /différentiation (Kahane et al., 2013). La migration des cellules progénitrices PAX3+PAX7+ depuis le DM central vers le myotome est induite par la sécrétion de FGF par les cellules du myotome. Ces facteurs activent la voie de signalisation MAPK/ERK dans les cellules progénitrices permettant la production de la protéine SNAIL-1 qui induit la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules dermomyotomales PAX3+PAX7+ qui migrent alors vers le myotome (Delfini et al., 2009).

b. Facteurs affectant la myogenèse hypaxiale

Les progéniteurs hypaxiaux ont généralement une étape de migration à réaliser avant de s'engager dans la différentiation myogénique. Des signaux sont donc nécessaires pour empêcher la différentiation précoce de ces progéniteurs. La lame latérale principalement ainsi que l'ectoderme latéral sécrètent au niveau de la lèvre ventro-latérale (LVL) du BMP-4 qui empêche l'engagement dans le voie de différentiation myogénique (Pourquié et al., 1996;

Amthor et al., 1999). Les cellules myogéniques de la lèvre hypaxiale reçoivent aussi des signaux Wnt de l'ectoderme dorsal permettant le maintien de leur structure épithéliale et de l'expression de *Pax3* (résumé dans (Buckingham and Mayeuf, 2012)). Les progéniteurs hypaxiaux PAX3+ délaminent de la LVL et migrent pour former les muscles des membres, le diaphragme et la langue. Cette migration est principalement régulée par trois récepteurs exprimés à la surface des cellules PAX3+ : c-MET, CXCR4 et EphA4 qui répondent respectivement au signal attractif des molécules HGF et SDF1 et répulsif de la molécule Ephrin-5A (Brand-Saberi et al., 1996; Heymann et al., 1996; Vasyutina et al., 2005; Swartz et al., 2001). Ces trois molécules sont sécrétées par les cellules du mésenchyme des bourgeons de membres qui se trouvent sur le chemin de migration des cellules PAX3+ et qui régulent ainsi la compartimentation des masses musculaires. Tout au long de leur migration, les cellules PAX3+ continuent de recevoir des signaux empêchant leur différentiation, jusqu'à ce qu'elles atteignent leur site définitif et commencent à exprimer les MRF.

c. Facteurs influençant la myogenèse craniofaciale

Les facteurs influençant l'identité myogénique des progéniteurs musculaires cranio-faciaux sont moins bien caractérisés que dans les somites, certains ont le même effet et d'autres des effets opposés à la myogenèse axiale. En effet, alors que les voies BMP et FGF-ERK ont le même effet inhibiteur sur les myogenèses axiale et cranio-faciale, la voie Wnt n'a pas le même effet sur ces deux types de myogenèse. La sécrétion de protéines WNT par la partie dorsale du TN participe à l'induction de la myogenèse axiale comme vu précédemment, alors qu'elle inhibe la myogenèse cranio-faciale dans le mésoderme cranial et les arcs branchiaux (Tzahor et al., 2003). Comme au cours de la myogenèse axiale, les progéniteurs myogéniques axiaux ont donc besoin pour acquérir leur identité myogénique de molécules antagonistes de ces voies inhibitrices du destin myogénique. En effet, de telles molécules sont sécrétées par les cellules des crêtes neurales craniales, Noggin, Gremlin et Frzb (Tzahor et al., 2003). Comme au cours de la myogenèse axiale, la voie Notch bloque aussi l'expression de *MyoD* dans les progéniteurs cranio-faciaux et empêche leur entrée dans la voie de différentiation musculaire. Par contre, la voie Notch n'a pas d'impact sur l'expression de *Pax7* ni sur le nichage des cellules PAX7+ cranio-faciales contrairement aux cellules PAX7+ axiales (Czajkowski et al., 2014). Des expériences de transplantations de progéniteurs somitiques aux emplacements des progéniteurs des muscles extra-oculaires ont néanmoins montré que les progéniteurs somitiques conservaient leur dynamique de différentiation propre à la formation des muscles axiaux, et continuaient d'exprimer les marqueurs spécifiques du myotome, mais formaient des muscles extra-oculaires normaux. Ces résultats suggèrent l'existence de

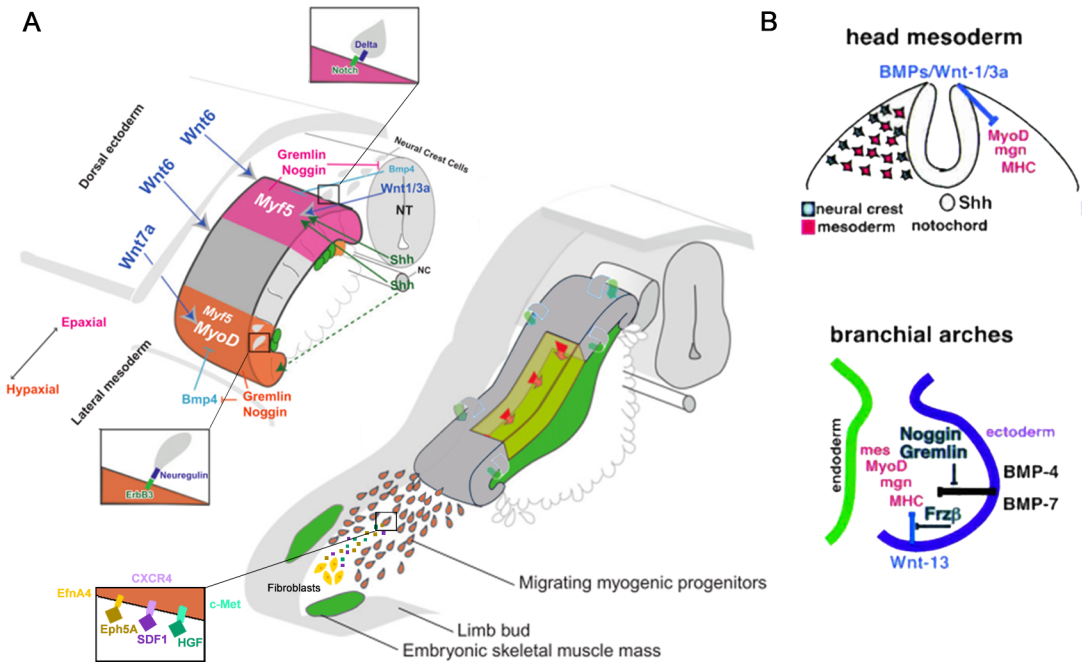


Figure 11 : Signaux extracellulaires régulant la myogenèse

Figure tirée et adaptée de Mayeuf and Buckingham, 2012 (A) et Tzahor et al., 2003 (B)

propriétés intrinsèques différenciant ces deux types de progéniteurs et de signaux environnementaux spécifiques capables d'induire la différentiation myogénique (Figure 11) (Noden, 1986; Borue and Noden, 2004; Noden and Trainor, 2005).

2. Rôle des cellules résidentes du muscle squelettique au cours de développement prénatal

a. Cellules des crêtes neurales

Des cellules des crêtes neurales qui délaminent de la partie dorsale du TN et migrent dans différentes directions traversent la partie dorso-médiale du DM. Certaines de ces cellules expriment le ligand Delta de la voie Notch. Il a été démontré que les progéniteurs myogéniques localisés dans la LDM expriment le récepteur Notch et que les cellules des crêtes neurales permettaient la spécification des progéniteurs myogéniques par un contact « kiss and run » (Rios et al., 2011). D'autres cellules des crêtes neurales voient leur trajet migratoire passer par la partie hypaxiale du DM. Ces cellules expriment la Neuréguline-1 qui interagit avec son récepteur Erb3 exprimé à la surface des progéniteurs hypaxiaux. Cette interaction induit un signal promouvant l'expression de *Pax3* et retardant la différentiation (Ho et al., 2011). Les cellules progénitrices à l'origine des muscles craniofaciaux résident

aussi un temps en contact avec des cellules des crêtes neurales céphaliques lorsqu'elles se trouvent dans les arcs branchiaux. L'expression de *Myf5* dans ces progéniteurs apparaît d'ailleurs juste après leur rencontre avec les cellules des crêtes neurales (Noden et al., 1999). Cependant, l'ablation des crêtes neurales n'empêche pas l'expression de *Myf5* ni la différentiation des progéniteurs myogéniques. Par contre, en leur absence les muscles craniofaciaux sont désorganisés et n'ont souvent pas de contact tendineux démontrant que les crêtes neurales céphaliques permettent plutôt l'organisation des masses musculaires et leur interaction avec les tissus environnants (Figure 11) (Noden and Trainor, 2005; Rinon et al., 2007).

b. Fibroblastes

Les fibroblastes les plus proches des progéniteurs myogéniques au cours du développement font partie du tissu conjonctif dense irrégulier (TCDI), par opposition aux fibroblastes du tissu conjonctif spécialisé qui constitue les os et le cartilage et aux fibroblastes du tissu conjonctif dense régulier qui constitue les tendons (Nassari et al., 2017). Les fibroblastes du TCDI localisés dans les bourgeons de membres sécrètent les molécules de guidage HGF, SDF-1 et EPHRIN5A permettant la migration des cellules PAX3+ et l'organisation des futures masses musculaires des membres, les cellules PAX3+ exprimant les récepteurs de ces trois molécules c-MET, CXCR4 et EPH4 (Figure 11) (Brand-Saberi et al., 1996; Heymann et al., 1996; Vasyutina et al., 2005; Swartz et al., 2001). La sécrétion de HGF permet aussi la migration des progéniteurs myogéniques à l'origine des muscles de la langue, du diaphragme et des épaules (Dietrich et al., 1999). De plus, les fibroblastes expriment spécifiquement la protéine TCF4, effecteur de la voie Wnt/β-caténine dont l'activité est essentielle à la formation et l'organisation des muscles des membres. En effet, la perturbation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules à l'origine du mésenchyme des membres en formation provoque une désorganisation des masses musculaires des membres (Kardon et al., 2003). Un phénotype similaire est observé dans les KO *Tbx5*, aussi exprimé par les fibroblastes et dont l'absence affecte l'expression de *Tcf4* et l'activité de la voie Wnt/β-caténine fibroblastique dans les membres antérieurs (Hasson et al., 2010).

c. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales formant les vaisseaux des muscles des membres ont la même origine dermomyotomale que les cellules progénitrices musculaires (Yvernogeau et al., 2012). Dans leur cellule progénitrice commune, la balance entre l'expression du facteur endothélial *Foxc2* et l'expression du facteur myogénique *Pax3* détermine la voie dans laquelle la cellule

s'engage (Mayeuf-Louchart et al., 2014). En absence d'expression de Foxc2 (et Foxc1), toutes les cellules s'engagent dans la voie myogénique, mais aucune d'entre elles ne migre dans les membres. Ces résultats suggèrent que la formation des vaisseaux sanguins des membres est indispensable à la migration des progéniteurs musculaires dans les membres en formation (Yvernogeau et al., 2012; Mayeuf-Louchart et al., 2016) et confirment le phénotype observé dans les animaux KO pour le gène *Flk1* spécifiquement exprimé dans les cellules endothéliales. Le réseau vasculaire de ces animaux ne se développe pas, et cela empêche la migration des cellules PAX3+ dans les membres (Yvernogeau et al., 2012). De plus, les cellules des vaisseaux sanguins des membres en formation secrètent du PDGFB qui inhibe la myogenèse et attire les cellules du tissu conjonctif, dictant l'organisation et la répartition des masses musculaires et du tissu conjonctif qui l'entoure. Ainsi, une perturbation de la formation des vaisseaux des membres affecte la myogenèse (Tozer et al., 2007). Enfin, il semble que la migration des deux types cellulaires soit liée puisqu'ils répondent tous les deux à la chimiokine SDF-1 (Abduelmula et al., 2016).

d. Motoneurones

Peu de données existent décrivant l'impact des motoneurones sur les cellules PAX7+ au cours du développement prénatal. Il a néanmoins été observé que la formation des myotubes fœtaux s'initiait généralement proche de la terminaison nerveuse de la fibre embryonnaire adjacente. Il n'a pour autant jamais été mis en évidence de lien direct ou indirect entre la cellule neurale et le myoblaste secondaire (Harris et al., 1989). Cependant, la contraction des fibres musculaires au cours de la myogenèse fœtale semble affecter le comportement des cellules PAX7+. En effet, le blocage de la contraction musculaire au cours de la myogenèse fœtale affecte via la voie YAP/TAZ l'activité de la voie Notch qui favorise l'expansion des cellules PAX7+ en inhibant leur engagement dans la voie de différentiation, altérant ainsi la formation des muscles fœtaux (Lima et al., 2016).

3. MEC et myogenèses prénatales

La matrice extra-cellulaire (MEC) est un élément important des tissus, puisque qu'elle sert de support et de structure aux cellules qui s'assemblent pour former un tissu ou un organe. Ce support permet la migration et la polarisation des cellules au sein du tissu, deux mécanismes indispensables à la mise en place des tissus au cours du développement prénatal. La MEC n'est pas statique, elle est constamment remodelée, dégradée et réassemblée au cours du développement.

a. Mise en place du Myotome

Progéniteurs épaxiaux

Une MEC essentiellement constituée de Fibronectine est déjà présente autour du mésoderme pré-somitique à l'origine des somites, et est cruciale pour la formation de ces structures épithéliales (Martins et al., 2009). Une membrane basale (MB) est ensuite assemblée autour de chaque somite, entre le somite et la matrice de fibronectine qui l'entoure, principalement composée de Laminine-111, de Collagène IV, de Nidogène et de Perlécan (Leivo et al., 1980; Zagris et al., 1993; Soulintzi and Zagris, 2007). La partie dorsale du somite s'organise ensuite en un épithélium appelé le dermomyotome (DM), dont proviennent tous les progéniteurs myogéniques axiaux. L'organisation épithéliale du DM est stabilisée par des jonctions N-CAM et N-Cadhérines entre les cellules du DM entre-elles (Duband et al., 1987) et par la liaison entre l'intégrine-α6β1 (ITG-α6β1) exprimée à la membrane des cellules du DM et la laminine de la MB (Figure 12) (Bajanca et al., 2004). Cette structure permet de maintenir les cellules du DM dans leur état indifférencié, en favorisant leur division symétrique (Bajanca et al., 2006). En effet, le blocage de l'interaction intégrine-α6β1/Laminine induit un détachement des cellules du DM de leur MB et une entrée dans la voie de différentiation myogénique (Bajanca et al., 2006). La formation du myotome est ensuite initiée par une augmentation du nombre de divisions asymétriques des cellules du DM produisant une cellule fille $Numb^-$ restant dans le DM et une cellule fille Numb+ qui délamine pour former le myotome (Venters and Ordahl, 2005). Numb est connu pour avoir différents rôles, principalement comme inhibiteur de la voie Notch, mais aussi comme molécule de recyclage des intégrines. Aucun lien n'a néanmoins été établi entre l'expression asymétrique de Numb dans les cellules quittant le DM pour former le myotome et leur engagement dans la voie de différentiation (Thorsteinsdóttir et al., 2011). De plus, l'induction de l'expression de Numb dans les cellules PAX3+PAX7+ du DM induit une augmentation du nombre de cellules progénitrices laissant penser que Numb aurait un autre rôle dans ces cellules que celui d'inhiber la voie Notch (Jory et al., 2009). L'expression de l'*intégrine-α6β1* par les cellules du DM et du myotome semble liée à l'expression de *Myf5* puisque dans le KO de *Myf5*, les cellules qui délaminent du DM ont perdu l'expression de l'ITG-α6β1. Contrairement à Numb, l'ITG-α6β1 n'est pas distribuée asymétriquement après la division asymétrique menant à la formation du myotome suggérant que cette molécule ne soit pas impliquée dans l'engagement des cellules du myotome dans la voie de différentiation (Bajanca et al., 2004). Le myotome est lui-même séparé du sclérotome par une MB qui se forme dès la délamination des premières cellules MYF5+ITG-α6β1+Numb+ du DM et est principalement constituée de

laminine-111, laminine-511 et collagène IV. L'expression d'ITG-α6β1 à la surface des cellules délaminant du DM semble essentielle à la mise en place de cette MB puisqu'en absence d'expression de *Myf5* et donc d'ITG-α6β1 l'organisation de cette MB est fortement altérée (Bajanca et al., 2006). La MB du myotome permet ensuite de maintenir les cellules qui la contactent dans un état indifférencié, les cellules MYF5+ sont ainsi toujours en contact avec la MB alors que les cellules MYOG+ en sont plus éloignées. De plus, l'interaction ITG-α6β1/Laminine semble importante pour l'orientation de l'élongation des myocytes du myotome (Bajanca et al., 2006). Au fur et à mesure de leur élongation, les myocytes du myotome expriment l'ITG-α4β1 puis l'ITG-α5β1, leur permettant surement d'interagir par leurs extrémités rostrale et caudale avec la matrice de fibronectine qui entoure les somites. L'apparition de l'expression de *MyoD* est secondaire à celle de *Myf5* dans la partie épaxiale du myotome. Les myocytes qui commencent à exprimer *MyoD* expriment aussi l'ITG-α7β1 et perdent l'expression de l'ITG-α6β1 (Bajanca et al., 2004). Les premières traces de laminin-211 apparaissent alors au sein du myotome entre les myocytes en élongation (Cachaço et al., 2005). La formation du myotome est suivie par la dissociation du dermomyotome par le biais de divisions asymétriques. En effet, les cellules filles apicales issues de cette division conservent l'expression de la N-Cadhérine et du récepteur au FGF FREK formant la population de cellules PAX3+PAX7+ qui envahit ensuite le myotome. Il est supposé que des interactions N-Cadhérine/N-Cadhérine et la sécrétion de FGF par le myotome favorisent cette dernière étape. La cellule fille basale devient une cellule du derme. La dissociation du dermomyotome s'accompagne d'une augmentation de l'expression de MMP2 surement responsable de la dégradation de la MB du dermomyotome (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Cinnamon et al., 2006; Deries et al., 2010; Thorsteinsdóttir et al., 2011).

Progéniteurs hypaxiaux

Au niveau de la lèvre ventro-latérale (LVL) du DM, la MB est plus discontinue et contrairement aux progéniteurs épaxiaux, les progéniteurs hypaxiaux n'expriment que très faiblement l'ITG-α6β1. Par contre, ils expriment l'ITG-α4β1 (Figure 12) (Bajanca et al., 2004). Ce sont l'expression de récepteur cMet induit par *Pax3* et la réception du signal HGF émit par les fibroblastes qui permettent aux progéniteurs hypaxiaux de délaminer de la LVL du DM pour entamer leur migration. Des MMP sont surement impliquées dans ce processus car la MB est dégradée aux sites de délamination. Les mécanismes gouvernant la délamination des progéniteurs hypaxiaux ne sont aujourd'hui pas connus, mais il est supposé que l'activation de *c-Met* par *Pax3* soit liée (directement ou indirectement) à la dégradation de la MB puisque la sur-expression de *Pax3* dans des embryons de souris entraine des

dégradations de matrice et des migrations de progéniteurs ectopiques (Relaix et al., 2006). Les cellules PAX3+ qui migrent dans les membres expriment les ITG-α1 et -α5, l'ITG-α1β1 étant connue pour interagir avec les collagènes I, IV et IX et les Laminine-111 et -211 et l'ITG-α5β1 avec la fibronectine. Certaines de ces protéines de matrices étant présentes dans les membres en développement, il a été proposé que les ITG-α1 et -α5 participent à la migration des cellules PAX3+ dans les membres (Bajanca and Thorsteinsdottir, 2002; Cachaço et al., 2005). De plus, le blocage de l'interaction intégrine/fibronectine empêche la migration des cellules PAX3+ dans les membres d'embryons de poulet (Brand-Saberi et al., 1993).

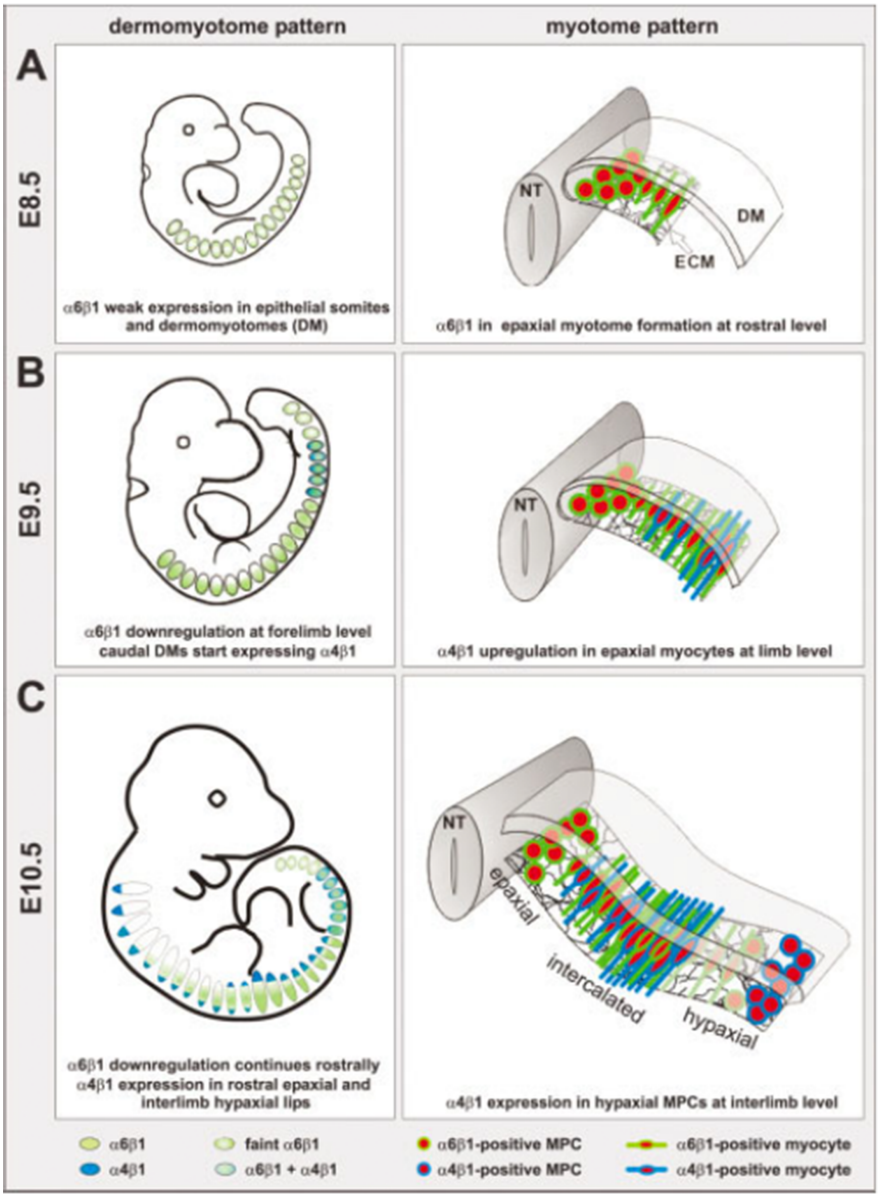


Figure 12 : Intégrines et mise en place du myotome

Figure tirée de Bajanca et al., 2004.

b. Myogenèses primaire et secondaire

Les myogenèses embryonnaires et fœtales produisent les myofibres qui composent le muscle adulte dans lequel elles sont toutes entourées d'une lame basale avec leurs cellules satellites. Des images de microscopie électronique ont permis d'analyser la mise en place de la membrane basale au cours du développement prénatal. Au moment de leur formation, la membrane plasmique des myofibres embryonnaires n'est pas protégée par une membrane basale bien qu'un réseau de protéines de MEC soit déjà présent entre ces myofibres. Une fine couche de MEC se dépose ensuite autour des myofibres et une lame basale fine mais continue entoure les rosettes de fibres primaires et secondaires au cours de la myogenèse fœtale. A la naissance, chaque myofibre est individuellement recouverte de sa propre membrane basale qui est presque identique à la MB adulte (Chiu and Sanes, 1984). Ces études de microscopie électronique ont été réalisées avant que les marqueurs Pax3 et Pax7 ne soient identifiés. Les myoblastes primaires et secondaires ont donc été identifiés dans le tissu musculaire en formation comme des cellules mononuclées en contact avec les myofibres. Il a été observé que ces cellules se trouvaient en position de cellule satellite à la naissance (Mauro, 1961). Des études plus récentes ont pu mettre en évidence que la majorité des cellules PAX7+ se trouvaient sous la lame basale et en contact avec une myofibre à la naissance et que les premières cellules PAX7+ en position de cellule satellite apparaissaient au cours de la myogenèse fœtale (Relaix et al., 2005). Le processus menant ces cellules du milieu interstitiel où elles se trouvent au cours de la myogenèse embryonnaire vers leur niche est peu connu. Une étude publiée en 2012 a pu mettre en évidence l'implication de la voie Notch dans le nichage des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale. Le KO de l'effecteur Rbpj de la voie Notch mène à un engagement précoce de la majorité de progéniteurs dans la voie de différentiation myogénique, ne permettant pas de les étudier au cours de la myogenèse fœtale. Afin de contourner ce problème, l'équipe de Carmen Birchmeier a étudié la myogenèse fœtale chez des souris double KO pour Rbpj et MyoD qui sauve le phénotype musculaire embryonnaire du mutant Rbpj et permet l'étude du développement fœtal. Dans ce contexte, cette équipe a observé un défaut de colonisation de la niche par les cellules PAX3+ des muscles dorsaux et conclut que la voie Notch contrôlait l'assemblage de la matrice autour de la cellule PAX3+ ainsi que l'adhésion de ces cellules à leurs myofibres (Bröhl et al., 2012). Des études plus approfondies seraient nécessaires à une meilleure compréhension de ce processus et des molécules mises en jeu.

c. Différences entre progéniteurs fœtaux et adultes

Une étude récente a comparé la capacité de cellules progénitrices musculaires fœtales et adultes à réparer un muscle adulte lésé (Tierney and Sacco, 2016). De façon intéressante, cette étude a pu mettre en évidence que des cellules progénitrices isolées de muscles fœtaux (E16,5) contribuaient de manière plus robuste à la réparation d'un muscle lésé que des CPM adultes, mais participaient moins que ces dernières à l'auto-renouvellement des CS. Malgré les nombreux points communs entre les myogenèses prénatale et adulte, les auteurs de l'étude ont alors proposé une différence majeure entre ces deux types myogenèses : les CPM adultes en début de régénération doivent passer par une phase importante de prolifération, une myofibre ne comportant que 7 CS en moyenne, qui devront accréter l'équivalent d'environ 250 noyaux par fibre musculaires tout en contribuant à l'auto-renouvellement des CS qui permettront d'autres cycles de régénération. Les cellules fœtales étant présentes en très grand nombre ont plutôt tendance à participer à la formation des fibres musculaires sans contribuer à la population de cellules qui entrera en quiescence et constituera les CS. Le nombre de cellules PAX7+ diminue d'ailleurs considérablement au cours de la myogenèse fœtale et de la croissance post-natale. Plusieurs équipes ont pu déceler des différences transcriptomiques entre les cellules progénitrices adultes et fœtales (Sakai et al., 2013; Tierney and Sacco, 2016). L'équipe d'Alessandra Sacco a pu montrer que les cellules fœtales secrètent spécifiquement des molécules de la MEC leur permettant de se maintenir dans les premières phases de régénération avant de s'engager dans la voie de la différentiation, leur conférant un avantage au cours de la régénération musculaire. De plus, la co-transplantation de cellules adultes et fœtales améliore considérablement les capacités régénératives des CPM adultes. Cette équipe propose donc que l'environnement de la cellule, adulte ou fœtale, lui confère des propriétés transcriptionnelles lui permettant de s'adapter à son milieu et au rôle qu'elle a à y jouer, et met encore une fois en évidence l'importance de la communication entre une cellule et son environnement (Tierney and Sacco, 2016). Enfin, ces transplantations ont été réalisées sur des animaux ne présentant pas de déficit musculaire, mais dans des conditions de dystrophies telles que chez les animaux Mdx atteints de la myopathie de Duchenne, la transplantation de cellules progénitrices fœtales a un effet moins bénéfique sur la réparation des fibres malades que la transplantation de CPM adultes (Sakai et al., 2013). Bien que les deux études citées n'aient pas utilisé la même méthode d'isolation des cellules progénitrices adultes et fœtales, ces résultats soulignent l'importance de l'environnement d'une cellule sur son comportement.

III. Les gènes à homéo-domaine *Sine Oculis*

Au cours de l'évolution, la sélection des espèces a permis la mise en place de mécanismes menant au développement d'organismes de plus en plus spécialisés. La gastrulation, la mise en place d'un axe antéro-postérieur ou l'apparition des gènes à homéo-domaines font partie des grandes inventions de la nature qui ont fait évoluer les espèces (Peterson and Davidson, 2000). Les gènes à homéo-domaines contrôlent généralement la croissance de l'organisme pendant le développement et ont permis l'apparition d'appendices pourvoyant de nouvelles fonctions aux organismes. Ils ont surtout été étudiés chez la drosophile par des expériences de mutagenèse au cours du développement embryonnaire. Les gènes à homéo-domaines ont été regroupés dans une famille de gènes grâce à leur forte homologie de séquence. Ces gènes ont été décrits comme codant pour des protéines majoritairement nucléaires ; leur homéo-domaine leur permet de se fixer à une séquence spécifique d'acides nucléiques. La fonction de cette interaction a par la suite été démontrée : les gènes à homéo-domaines codent pour des facteurs de transcriptions qui régulent l'expression de leur gènes cibles en interagissant avec les régions régulatrices de ces derniers, favorisant ou inhibant leur expression (Scott et al., 1989).

A. Les gènes Six : Identification et fonctions

1. Découverte et évolution des gènes *Six*

Au cours d'un crible visant à étudier les gènes impliqués dans le développement du système visuel chez la drosophile, le gène *Sine oculis* (*So*) a été identifié. Une mutation perte de fonction de ce gène conduit à l'absence de développement de l'œil et du lobe optique chez la drosophile (Cheyette et al., 1994), et une induction de l'expression de *So* dans un tissu non rétinien est suffisante pour induire la formation d'une rétine ectopique (Figure 13A-C) (Weasner et al., 2007). *So* est le gène fondateur d'une famille de gènes constituée par homologie de séquence : la famille des gènes *Six* pour *Sine Oculis Homeobox related genes*. Deux autres gènes *Six* ont ensuite été identifiés chez la drosophile, *Optix* et *DSix4*. *So* et *Optix* ont tous les deux été impliqués dans le développement du système optique (Seimiya and Gehring, 2000), tandis que *DSix4*, a été impliqué dans le développement de dérivés mésordermaux (Seo et al., 1999) et la formation des gonades (Kirby et al., 2001). Des gènes *Six* ont ensuite été identifiés dans un grand nombre d'autres espèces incluant l'homme (Boucher et al., 1996), la souris (Oliver et al., 1995a; Kawakami et al., 1996a; Toy and Sundin, 1999), le poulet (Esteve and Bovolenta, 1999; Lopez-Rios et al., 1999), la grenouille

(Seo et al., 1999; Zuber et al., 1999), le poisson (Seo et al., 1999, 1998a; b; c) et le nématode (Seo et al., 1999), mais aucune séquence homologue n'a été retrouvée dans les génomes d'organismes unicellulaires tels que la levure (Kawakami et al., 2000). Malgré presque cinquante espèces de vertébrés et quarante espèces d'invertébrés possédant au moins un gène de la famille *Six*, l'histoire évolutive précise de ces gènes n'a pas encore été élucidée (Kumar, 2009). En comparant les séquences des gènes *Six* chez toutes les espèces étudiées, il a néanmoins été déduit que deux duplications auraient eu lieu à partir de *So*, menant à la présence de trois gènes *Six* chez la drosophile, puis une autre duplication de chacun de ces gènes menant aux six gènes *Six* des vertébrés (Kumar, 2009). Ces six gènes *Six* peuvent être regroupés en trois classes : *Six1* et *Six2* ont évolué à partir de *So*, *Six3* et *Six6* à partir d'*Optix*, et *Six4* et *Six5* à partir de *DSix4* (Figure 13D) (Seo et al., 1999).

2. Les protéines SIX

Les protéines SIX sont des facteurs de transcriptions possédants deux domaines très conservés au cours de l'évolution. Un homéo-domaine (HD) composé d'un motif helice-tour-hélice leur permet d'interagir avec les régions régulatrices de leurs gènes cibles et un domaine SIX (SD) leur permettant d'interagir avec d'autres protéines, et leur conférant leur spécificité de liaison à l'ADN (Figure 13E).

a. L'homéo-domaine des protéines SIX

En 1996, Kiyoshi Kawakami et ses collègues ont mis en évidence que le facteur de transcription AREC3 (Cell-type specific ARE binding factor) contrôlait l'expression du gène *Atp1a1*, de manière spécifique en fonction du type cellulaire, et ce en reconnaissant le motif ARE (ATP1A1 Regulatory Element) présent dans son promoteur (Kawakami et al., 1996a). Ils ont ensuite remarqué la forte homologie de séquence entre l'ADNc d'*Arec3* murin et celui de *sine oculis* de drosophile. Le gène murin *Arec3* est alors baptisé *Six4*, et cette étude constitue la première identification de séquence de liaison à l'ADN pour une protéine de la famille Six (Kawakami et al., 1996a). En 1994, M. Salminen et ses collègues analysaient le promoteur du gène Aldolase A humain, pour identifier une séquence régulatrice de son expression : le motif MEF3 (Salminen et al., 1996). Quelques années plus tard, en 1998, François Spitz et ses collègues pointaient la similitude entre les motifs ARE et MEF3, et démontraient l'affinité de *Six1* et *Six4* pour ce dernier (Spitz et al., 1998). Le motif MEF3 ayant été retrouvé dans le promoteur de plusieurs gènes musculaires tels que l'*Aldolase A* (Salminen et al., 1996) , la *Myogénine* (Spitz et al., 1998), ou la *Troponine C* cardiaque (Parmacek et al., 1994), les gènes *Six* constituaient une nouvelle famille importante pour le développement et la physiologie du muscle squelettique.

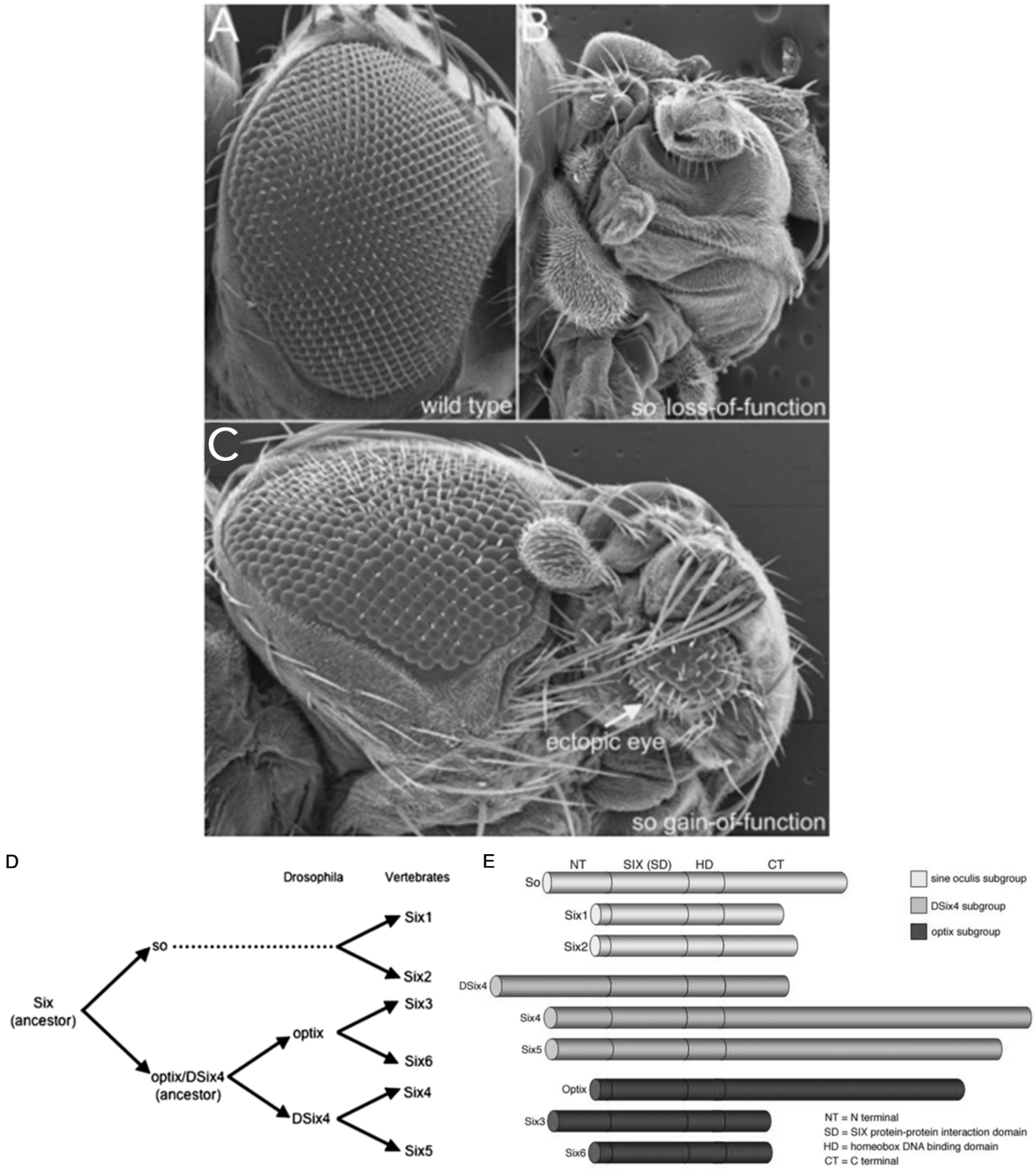


Figure 13 : Sine oculis homeobox related genes

Figure tirée de Kumar 2009. A : Œil de drosophile adulte sauvage. B : Œil de drosophile adulte mutante pour so. C : Œil de drosophile adulte après induction ectopique de so montrant la formation d'un œil surnuméraire (flèche blanche) D : Evolution des gènes ayant évolué depuis so. E : Structure des protéines SIX/SO et relations entre les protéines de drosophiles et de vertébrés.

Les protéines SIX1, SIX4 et SIX5 sont en effet capables de lier les sites MEF3 de ces trois gènes musculaires, tandis que SIX1, SIX2 et SIX4 partagent la capacité de se lier aux motifs ARE. SIX3 ne reconnait aucun de ces deux sites consensus et sa seule cible connue aujourd'hui est le gène *Rhodopsine* dont l'expression ne semble pas être régulée par d'autres protéines SIX (Manavathi et al., 2007). Certaines protéines SIX ont donc des cibles communes d'autres sont spécifiques, et les raisons n'en sont pas très claires.

b. Le domaine SIX des protéines SIX

Par homologie de séquence entre les protéines SIX1, SIX2 et SIX4, un deuxième domaine conservé entre les protéines SIX a été identifié en N-terminal de l'HD et baptisé Domaine SIX (SD) (Hu et al., 2008). Ce domaine a premièrement été considéré comme un domaine de liaison à l'ADN puis le SD s'est révélé comme étant un domaine d'interaction avec d'autres protéines (Pignoni et al., 1997). Le SD est aussi nécessaire à la spécificité de liaison des protéines SIX sur l'ADN, sa délétion empêche en effet les protéines SIX de reconnaître leurs sites MEF3, mais n'empêche pas la liaison à l'ADN via des sites moins spécifiques tels que les homéoboites (Ikeda and Kawakami, 1995; Hu et al., 2008).

Les protéines EYA

La première protéine caractérisée pour interagir avec SO est la protéine EYA codée par le gène *Eyes Absent* (*eya*). *So* et *eya* ont des patrons d'expression similaire au cours du développement chez la drosophile, et leur perte de fonction entraine une absence de formation de l'œil (Cheyette et al., 1994; Bonini et al., 1993). Chez les vertébrés, les gènes *Eya* sont au nombre de quatre *Eya1-4*. Les protéines EYA ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN. Elles ont néanmoins un domaine N-terminal (DNT) ou domaine de trans-activation qui dispose d'une activité thréonine-phosphatase et un domaine C-terminal, le domaine EYA (DE) qui possède une activité tyrosine-phosphatase et permet aux protéines EYA d'interagir avec d'autres protéines (Xu et al., 1997a). L'activité phosphatase de ces deux domaines leur permet de réguler l'état de phosphorylation de leurs partenaires et est importante pour leur activité de trans-activation transcriptionelle (Xu et al., 1997a; Li et al., 2003). Généralement, le facteur de transcription composite formé de SO et EYA est activateur de la transcription de ses gènes cibles (Ohto et al., 1999). Chez les vertébrés, l'interaction avec les protéines EYA1, EYA2 et EYA3 a été démontrée avec SIX1/2 et SIX4/5 mais pas avec SIX3, et la co-expression de SIX et EYA dans une même cellule induit la translocation nucléaire d'EYA (Heanue et al., 1999; Ohto et al., 1999). Les protéines EYA possèdent aussi une activité indépendante de SO/SIX. Elles sont capables d'interagir avec d'autres protéines, telles que le facteur de transcription SOX2, seul autre facteur de transcription (avec SO/SIX) connu pour

interagir avec EYA, et il a été suggéré que cette interaction permette l'activation de la transcription des gènes cibles de SOX2 (Zou et al., 2008a; Ahmed et al., 2012a). Son interaction avec la protéine ABL (Abelson) induit sa translocation dans le cytoplasme, où son activité phosphatase est requise pour le développement de l'œil de drosophile (Xiong et al., 2009). EYA peut aussi interagir avec des protéines de polarité cellulaire telles que PAR3, PAR6, NUMB et PKC-Zeta régulant ainsi la symétrie de division grâce à son activité tyrosine-phosphatase (El-Hashash et al., 2011b). Dans le noyau, EYA interagit avec la protéine NEMO qui phosphoryle EYA, phosphorylation nécessaire à son activité de trans-activation transcriptionelle (Morillo et al., 2012), et avec la protéine histone H2AX. La déphosphorylation de H2AX par EYA dans des conditions de dommages à l'ADN permet le recrutement du complexe de réparation de l'ADN et promeut la survie cellulaire (Cook et al., 2009). Les protéines EYA ont donc des rôles variés aussi bien au niveau cytoplasmique que nucléaire, leur interaction avec les protéines SO/SIX est donc cruciale pour réguler leur fonction, étant responsable de la translocation nucléaire des protéines EYA.

Les protéines GRC et DACH

Les protéines SIX ne fonctionnent pas toujours comme activateurs de la transcription. En effet d'autres partenaires ont été identifié comme ayant une action différente des protéines EYA. L'interaction de *Groucho* (*Grc*) (ou *TLE* chez l'homme) avec les protéines SIX mène à une répression de ses gènes cibles. Bien que Groucho soit capable d'interagir avec toutes les protéines SIX, ce sont surtout SIX3 et SIX6 qui ont montré une collaboration répressive avec *Grc5* et *Grc6* (Zhu et al., 2002; Lopez-Rios, 2003). *Dachshund* code pour la protéine DACH, qui bien qu'elle possède un domaine de liaison à l'ADN et contrôle l'expression de gènes cibles, est aussi capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription et de moduler leur activité. Notamment, il a été démontré qu'interagissant avec SIX1 et SIX6, DACH jouait un rôle de co-répresseur (Li et al., 2002b, 2003). De plus, DACH est aussi capable d'interagir avec EYA modulant ainsi l'activité du complexe SIX/EYA (Chen et al., 1997). Ainsi, SIX DACH et EYA peuvent former un réseau de régulation dans lequel l'activité phosphatase de EYA permet de passer d'un complexe inhibiteur SIX/DACH à un complexe activateur SIX/EYA. DACH, dans certains contextes cellulaires semble aussi important pour l'activité activatrice du complexe SIX/EYA (Heanue et al., 1999; Ikeda et al., 2002). Dans ce sens, des résultats non publiés obtenu dans l'équipe montrent que dans les cellules myogéniques, l'activité d'un gène rapporteur Luciférase sous le contrôle d'un promoteur poly-MEF3 voit son activité augmenter en présence de *Six*, *Eya* et *Dach*. Ce réseau de régulation est primordial pour le développement des reins, de la musculature ventrale, du squelette, de l'oreille interne et de la placode olfactive (Figure 14) (Li et al., 2003).

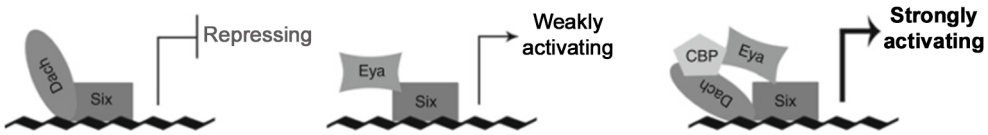


Figure 14 : Le complexe SIX / EYA / DAC

Figure tirée de Christensen et al., 2008.

B. Rôle des homéo-protéines SIX au cours du développement et chez l'adulte

1. Le réseau de gènes de détermination rétinienne (RDGN)

a. Rôle des gènes du RDGN chez la drosophile

Le contrôle de l'expression des gènes responsables de la formation de l'œil de drosophile au cours du développement ne se fait pas par une cascade de signalisation linéaire mais plutôt par un réseau complexe de boucles de régulations et de circuits d'auto-régulation (Desplan, 1997). Les membres de ce réseau appelé RDGN pour *Retinal Determination Gene Network* (Réseau de gènes de la détermination Rétinienne) ont deux caractéristiques : leur perte de fonction empêche la formation de l'œil, et leur expression forcée induit la formation d'un œil ectopique. Le RDGN comprend ainsi principalement les gènes *eyless* (*ey*), *twin of eyless* (*toy*), *sine oculis* (*so*), *eyes absent* (*eya)* et *dachshund* (*dac*) (Jemc and Rebay, 2007). L'acquisition du destin de cellule de l'œil de drosophile est initiée par l'expression de *toy* qui induit l'expression d'*ey* dans les cellules progénitrices du disc imaginal de l'œil (Czerny et al., 1999). Une vague de spécification de ces cellules progénitrices est alors initiée dans la partie postérieure du disque imaginal et se propage vers sa partie antérieure. Cette vague de spécification est aussi appelée le sillon morphogénétique (SM) (résumé dans (Treisman, 2013; Kumar, 2010)). Avant le passage du SM, les cellules progénitrices prolifèrent et expriment *ey* et *toy* qui permettent le maintien de la prolifération et empêchent la spécification de ces cellules en bloquant l'expression de *so* et *eya* (Davis and Rebay, 2017). Au passage du SM, la spécification des cellules progénitrices est initiée par l'induction de l'expression de *so*, *eya* et *dac* par *ey* et *toy* (Punzo et al., 2002; Niimi et al., 1999; Halder et al., 1998). Le complexe *so-eya* régule ensuite l'expression de *dac et* d'*ey* créant ainsi une boucle de régulation positive de ce réseau de gènes (Pauli et al., 2005; Pappu et al., 2005). Après le passage du SM, *ey*, *eya* et *so* induisent l'expression *d'Atonal* (*Ato*), un autre facteur de transcription à motif bHLH, première marque de l'identité de cellule de l'œil (Jarman et al., 1994; Sun et al., 1998; Zhang et al., 2006; Jemc and Rebay, 2007). *Eya*, *so* et *Dac* bloquent ensuite l'expression d'*ey* dans ces cellules prêtes à se différencier en cellules omatidiales ou

en photorécepteurs (Kenyon et al., 2005; Atkins et al., 2013). Cette hiérarchie est soulignée par le fait que la formation d'un œil ectopique suite à l'expression forcée d'*ey* ou de *toy* requiert l'expression de *so*, *eya* et *dac* (Shen and Mardon, 1997; Halder et al., 1995). De plus, la formation d'œil ectopique est plus efficace lorsque l'expression de plusieurs gènes du RDGN est forcée que l'expression d'un seul, suggérant des interactions entre protéines du RDGN (Curtiss et al., 2007). Généralement, l'induction de l'expression de gènes permettant à une cellule de faire un choix de destin est accompagnée par l'inhibition de l'expression d'autres gènes, bloquant ainsi d'autres destins. Ce principe est retrouvé dans les cellules prêtes à acquérir une identité de cellule de l'œil, dans lesquelles les gènes *eya* et *so* induisent l'expression d'*ato*, et *so* inhibe l'expression d'*ey* permettant l'installation de leur identité de cellule de l'œil. Ainsi, le RDGN permet, l'acquisition du destin de cellule de l'œil, leur spécification puis leur différentiation. Ce réseau a été le premier étudié, et ce type de régulation a été retrouvée au cours du développement d'autres organes, et même de la spécification de la cellule œuf chez les vertébrés. Il est donc aussi conservé au cours de l'évolution (Davis and Rebay, 2017). Un paralogue de *so*, *D-six4* est co-exprimé dans le mésoderme de l'embryon de drosophile avec *eya*, et leur perte de fonction respective conduit aux mêmes phénotypes : un défaut de structuration des dérivés mésodermiques dont font partie les muscles somatiques (Liu et al., 2009; Clark et al., 2006). De plus, *pox meso*, un autre homologue des gènes Pax est aussi exprimé dans le mésoderme et est important pour l'organisation des muscles abdominaux de drosophiles et pour induire l'entrée dans le destin myogénique (Duan et al., 2007). Il semblerait donc que le RDGN ait des paralogues dans les dérivés mésodermiques, mais la hiérarchie et les liens précis entre ces différents gènes n'a pas été rapporté (Figure 15) (Dobi et al., 2015).

b. Le RDGN chez les vertébrés

Les gènes du RDGN chez la drosophile ont des orthologues chez les vertébrés : Les gènes *Pax* sont orthologues de *ey* et *toy*, les gènes *Six* de *so*, les gènes *Eya* de *eya*, et les gènes *Atoh* d'*ato*. La conservation du RDGN chez les vertébrés a été étudiée au cours du développement de plusieurs organes. Le redéploiement de ce réseau dans le muscle squelettique sera discuté plus tard.

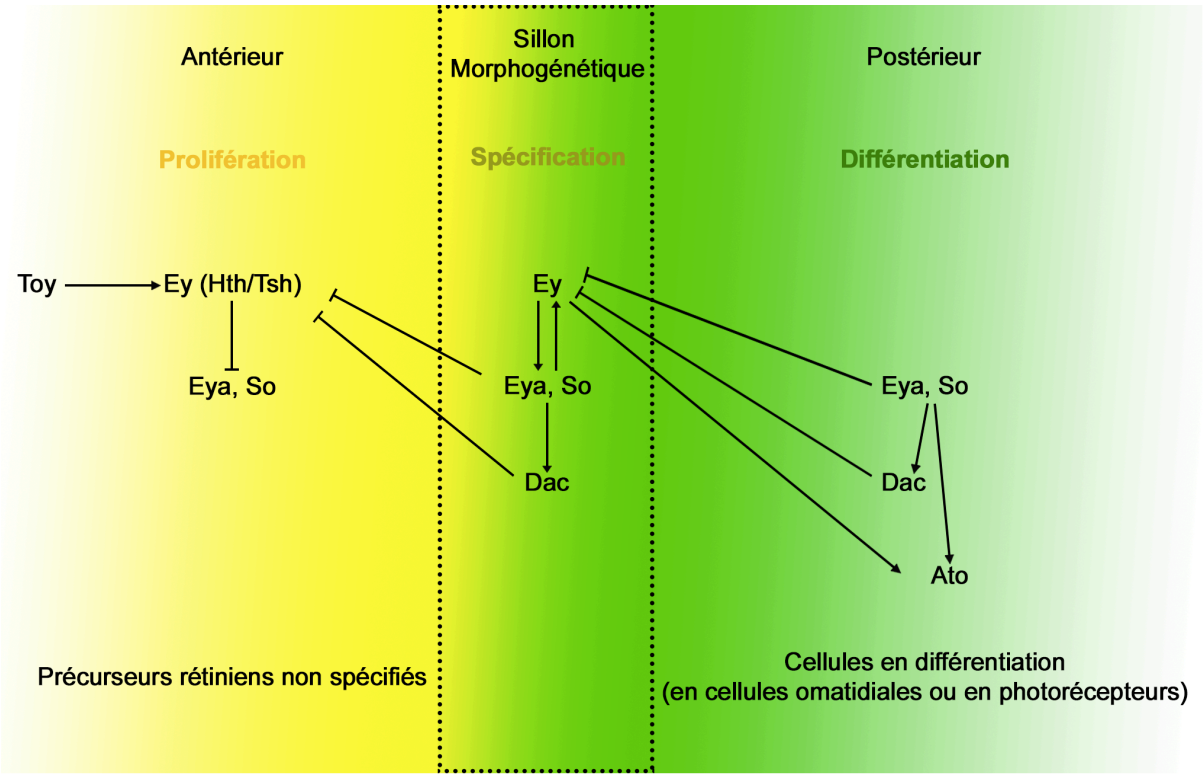


Figure 15 : RDGN et développement de l'œil de drosophile

Relations entre les gènes du RDGN en fonction de l'avancement dans la voie de différentiation des cellules de l'œil.

Développement des placodes sensorielles

Les placodes sensorielles, à l'origine des terminaisons sensorielles de l'œil, du nez et de l'oreille dérivent de l'ectoderme qui au cours de la gastrulation se divise en ectoderme neural et ectoderme non-neural dans la partie rostrale de l'embryon. Il a été démontré que *Pax3* était impliqué dans la formation du Bord Neural (BN), région de l'ectoderme non-neural qui borde l'ectoderme neural. Le BN se spécifie ensuite en crêtes neurales (CN) et en ectoderme pré-placodal (EPP) qui formera ensuite les différentes placodes sensorielles. Les gènes *Six* et *Eya* sont eux importants pour la formation de l'EPP et la différentiation des placodes sensorielles, (résumé dans (Moody and LaMantia, 2015), tandis que les gènes *Pax* sont importants pour définir l'identité des différentes placodes (Pieper et al., 2011). Notamment, *Pax6* est indispensable à la spécification des cellules de la lentille et de la rétine à partir de la placode de l'œil (Li et al., 1994; Schedl et al., 1996) ainsi que pour l'expression d'*Eya1* et *Eya2*, exprimés dans l'œil de vertébré en développement (Xu et al., 1997b). L'expression forcée de *Six3* induit l'expression du gène *Six3* endogène et celle de *Pax6*, menant à l'initiation de la formation d'un œil ectopique, dont la différentiation terminale n'est cependant pas complétée

(Loosli et al., 1999). La perte d'expression de *Six3*, *Six6* et *Pax6* conduit à des malformations de l'œil, aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Kumar, 2010; Carl et al., 2002). Ces résultats suggèrent que le RDGN soit conservé au cours du développement de l'œil de vertébrés, bien que ce réseau soit moins caractérisé que chez la drosophile. Compte-tenu de ces données, il a aussi été proposé que le RDGN de drosophile soit redéployé au cours du développement des autres placodes sensorielles (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004), et il a été démontré que SIX1 et EYA1 contrôlaient l'identité des cellules de la cochlée (placode de l'oreille), en contrôlant l'expression *d'Atoh1*, homologue d'*ato* (Ahmed et al., 2012a). Bien que les réseaux de régulation du développement des organes sensoriels soient moins décrits chez les vertébrés que celui du développement de l'œil de drosophile, l'ensemble des résultats publiés à ce sujet suggèrent que la relation entre les orthologues des membres du RDGN de drosophile soit conservée chez les vertébrés. Les duplications du génome ayant conduit à la présence de plusieurs orthologues vertébrés des gènes de drosophile, il est possible que les réseaux de contrôle de l'identité cellulaire au cours du développement soient plus complexes chez les vertébrés expliquant la difficulté de les étudier et de précisément définir les relations génétiques existant entre les différents membres des réseaux de régulations. D'autres gènes *Six* sont aussi exprimés au cours du développement de l'œil de vertébrés. Le gène *Six5* est exprimé dans la rétine en développement, et aussi dans l'œil adulte. Sa perte de fonction chez la souris induit une cataracte au niveau des yeux, mais aucune mutation dans le gène humain de *SIX5* n'a été identifiée chez les patients souffrant de cette maladie. Enfin, *Six4* est aussi exprimé dans les cellules oculaires, mais aucun défaut du développement de l'œil n'a été identifié suite à la perte de fonction de cette protéine (Kumar, 2010). Le gène *dSix4* chez la drosophile duquel ont évolué *Six4* et *Six5* n'est pas exprimé dans l'œil en développement mais plutôt des certaines cellules du mésoderme. Celui-ci est en effet important pour la spécification des cellules à l'origine de la formation des muscles et des gonades de drosophiles (Kirby et al., 2001; Clark et al., 2006). L'interaction entre ces gènes *Six* et les autres membres du RDGN dans l'œil de vertébré n'est pas plus documentée.

Développement rénal

Chez la souris, la formation du rein passe par la génération de deux organes transitoires d'origine mésodermiques : le pronephros se forme à E8,5 et se transforme en mésonephros à E9,5 avant de former le métanephros à E10,5, rein mature, à partir du mésenchyme métanéphrique (résumé dans (Xu, 2013)). Les gènes *Six*, *Eya* et *Pax* sont exprimés dans ces différentes structures laissant supposer que le RDGN soit aussi redéployé au cours de la formation du rein chez les vertébrés (Xu et al., 2003). Les souris KO pour *Eya1*, *Six1* ou *Pax2*

sont en effet incapables de former leurs reins (Xu et al., 2003). Dans ce système, c'est cependant EYA1 qui se situe au sommet du réseau de régulation de la nephrogenèse, et contrôle l'expression de *Six1*, et avec SIX1 l'expression de *Six2* et *Pax2* (Xu et al., 2003). EYA1 ne possédant pas de domaine de fixation à l'ADN, il collabore surement avec un autre facteur de transcription pour induire l'expression de *Six1*, interaction qui n'a pas encore été documentée. Le redéploiement du RDGN au cours de l'évolution, dans la formation de différents organes et chez différentes espèces met en avant l'importance de l'organisation de ce réseau pour permettre à une cellule d'acquérir le bon destin cellulaire et de proliférer et maturer suffisamment avant de s'engager dans sa voie de différentiation terminale, permettant à un embryon de contrôler l'identité de ses cellules et de former ses organes (Figure 16).

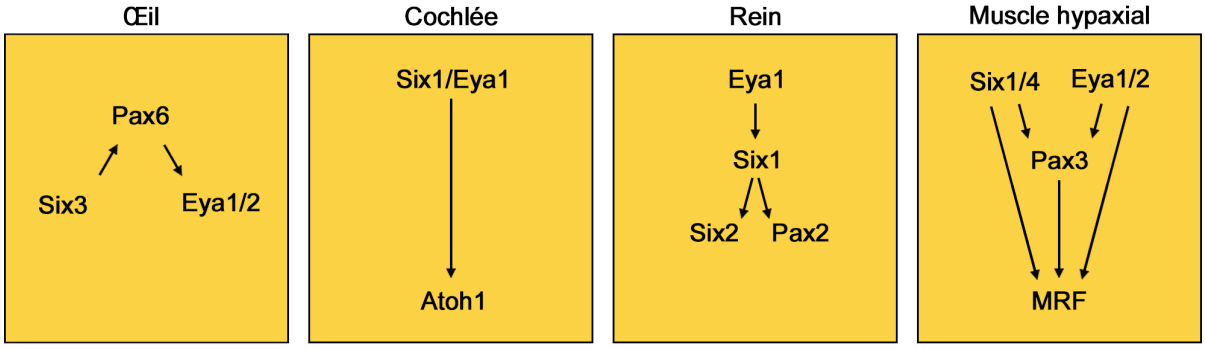


Figure 16 : Redéploiement du RDGN chez les vertébrés

2. Patrons d'expression et knock-out murins

a. Six1

Patrons d'expression

Le patron d'expression de *Six1* a été étudié par hybridation *in situ* (Oliver et al., 1995b) et grâce au knock-in (KI) du gène rapporteur codant pour la β-galactosidase au locus du gène *Six1* (Laclef et al., 2003a; b) dans des embryons de souris. Son ADNc est pour la première fois détectée à E8 dans la partie la plus antérieure du mésoderme cranial, au niveau des arcs branchiaux et dans les somites, puis son expression s'étend à tout le mésoderme cranial et aux structures dérivées du mésoderme axial et paraxial. Au cours des jours qui suivent, l'expression de *Six1* est détectée dans les territoires embryonnaires à l'origine des muscles squelettiques axiaux et cranio-faciaux, de la placode nasale, de l'hypophyse, des reins, du squelette de la face, des nerfs craniaux, du thymus, de la glande thyroïde, et des gonades. Chez le fœtus puis chez l'adulte, l'expression de *Six1* est principalement retrouvée dans les muscles squelettiques (Oliver et al., 1995b; Laclef et al., 2003b). Le patron d'expression de

Six1 a été plus précisément étudié au cours du développement des membres d'embryons de souris et de poulet. Son expression a été détectée dans les cellules myogéniques et dans le mésenchyme qui l'entoure (Oliver et al., 1995b; Laclef et al., 2003a), mais il a été montré que *Six1* n'était pas exprimé dans les même cellules que *Scleraxis* exprimé dans les cellules à l'origine de la formation des tendons (Figure 17) (Bonnin et al., 2005).

Phénotype du KO

Laclef et al. et Li et al., ont publié en 2003 les premiers embryons de souris KO pour *Six1*. A la naissances ces animaux montraient de nombreuses malformations affectant les systèmes olfactif et stato-acoustique et les glandes lacrymales et submandibullaire (Laclef et al., 2003b; Suzuki et al., 2010; Yajima et al., 2014). De plus, la formation du squelette facial semblait fortement affectée. En effet, l'absence d'expression de *Six1* conduit à la formation d'os et de certains cartilages de plus petite taille et mal organisés, cependant la différentiation du cartilage et la structure interne des os ne semblaient pas affectées suggérant un rôle de *Six1* dans l'assemblage du squelette facial et non dans l'engagement des cellules dans un destin chondrogénique ou ostéogénique (Laclef et al., 2003b). La formation des poumons est aussi altérée en absence de *Six1*, organe dont la formation nécessite la coordination de la voie de signalisation Shh-Fgf10 par *Six1* (El-Hashash et al., 2011a). *Six1* semble aussi nécessaire à la formation de la glande parotide et de la glande thyroïde puisqu'en absence de *Six1* aucune de ces deux glandes ne se forme. La formation des reins est aussi affectée, voir absente chez 30% des embryons mutants (Kobayashi et al., 2007). Enfin, la formation des muscles axiaux, et plus particulièrement des muscles ventraux, est aussi fortement altérée chez les embryons KO pour *Six1* (voir détails au paragraphe suivant) ainsi que l'organisation et la fermeture de la cage thoracique. Certains organes provenant de territoires embryonnaires où une forte expression de *Six1* avait été observé au cours du développement n'ont montré aucun défaut histologique en absence d'expression de *Six1* tels que l'hypophyse, les muscles cranio-faciaux, les tendons et les tissus conjonctifs, néanmoins, les autres gènes de la famille *Six* sont exprimés dans ces tissus et pourraient compenser l'absence de *Six1* (notamment *Six3*,*4* et *6* dans l'hypophyse, *Six3* et *4* dans les placodes olfactives, et *Six2* et *Six4* dans les muscles cranio-faciaux) (Laclef et al., 2003b; Li et al., 2003). Afin d'expliquer ces défauts d'organogenèse, il a été rapporté que *Six1* contrôlait la prolifération cellulaire dans une lignée immortalisée de myoblastes (Li et al., 2003), bien que cette fonction n'ait pas été rapportée dans les cellules musculaires *in vivo* (Laclef et al., 2003a). Aussi, l'induction de la transcription des gènes cibles de SIX1 nécessite l'activité phosphatase de son co-facteur EYA1 qui partage généralement ses patrons d'expression avec *Six1* (Li et al., 2003). Le

phénotype des souris KO pour *Eya1* montrant un phénotype similaire à celui pour *Six1* au niveau des reins et de l'oeil, la double invalidation de *Six1* et *Eya1* a été réalisée chez la souris. Comparée aux simples KO, la double invalidation entraine une aggravation des malformations musculaires, des placodes sensorielles et des reins (phénotype apparaissant chez le double hétérozygote) et une malformation de l'hypophyse qui n'était pas atteinte chez les deux simples KO. Ces observations ont mis en évidence que dans certains organes *Six1* et *Eya1* agissent dans la même voie de signalisation alors que dans d'autres organes ils semblent avoir aussi des fonctions indépendantes (Li et al., 2003; Zou et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que SIX1 et EYA1 recrutait le complexe SWI/SNF afin de remodeler la chromatine au niveau des séquences régulatrices de leurs gènes cibles *Neurog1* et *Neurod1*, d'induire leur expression et de permettre la formation de l'oreille interne (Ahmed et al., 2012b). *Six1* est donc indispensable à la formation de plusieurs organes, en accord avec les patrons d'expression observés chez les embryons de souris.

b. Six4

Patrons d'expression

L'analyse de l'expression de SIX4 par immunohistochimie a détecté la protéine dans la rétine en développement (Niiya et al., 1998), dans le système nerveux central en développement (Ohto et al., 1998) et dans des cellules musculaires en prolifération et différenciées *in vitro* ainsi que les cellules satellites quiescentes et activées et les myonuclei des fibres musculaires squelettiques (Kawakami et al., 1996a; Spitz et al., 1998; Yajima et al., 2010; Chakroun et al., 2015). La génération d'une souris exprimant le gène rapporteur *LacZ* au locus *Six4* a permis de détecter son expression dans d'autres organes. *Six4* partage les mêmes territoires d'expression que *Six1* au cours de l'embryogenèse, à part dans la tête où Six1 est exprimé dans tout le mésoderme cranial et *Six4* dans l'ectoderme (Ozaki et al., 2001a). *Six1* et *Six4* se trouvent au même locus sur le chromosome 12 de souris et ne sont séparés que de 100kb ce qui pourrait expliquer leur co-régulation spatiotemporelle (Figure 17) (Grifone et al., 2005).

Phénotype du KO

Contrairement aux souris KO pour *Six1* qui meurent à la naissance à cause d'un grand nombre de malformations, les souris KO pour *Six4* se développent jusqu'à l'âge adulte et ne présentent pas de phénotype anormal apparent. De plus, certains gènes dont l'expression est régulée par *Six4* comme *Myogénine* dans les somites (Ohto et al., 1999) ou *NeuroD1* et *NeuroD3* dans la racine dorsale des ganglions (Ma et al., 1997; Lee et al., 2000a), ont une expression normale en absence de *Six4* (Ozaki et al., 2001a). Il a donc été suggéré que l'absence d'expression de *Six4* était compensée par l'expression d'autres gènes *Six*,

notamment *Six1* qui partage les mêmes patrons d'expression, et SIX5 qui possède une structure 3D similaire. Ces deux protéines montrent également une affinité de liaison comparable pour les sites d'ADN reconnus par SIX4 (Ozaki et al., 2001a).

Le double KO *Six1*:*Six4*

Le double KO pour *Six1* et *Six4* a été publié en 2005 par Grifone et al. Les souris double KO meurent à la naissance et présentent généralement un phénotype plus grave que les simple KO pour *Six1*. Leur structure globale est plus affectée, ils ont une posture plus courbée, n'ont pas d'oreille ni de paupière, un abdomen gonflé et des malformations cranio-faciales plus importantes. En effet, au niveau axial, la partie ventrale des côtes ne s'est pas développée empêchant la formation et la fermeture de la cage thoracique. Plusieurs autres organes montrent une altération exacerbée chez les double KO tels que le squelette cranial, les muscles squelettiques (Grifone et al., 2005), les reins, (Kobayashi et al., 2007) et les papilles gustatives (Suzuki et al., 2011). L'absence de *Six1* et *Six4* entraine aussi l'apoptose d'une majorité des cellules du ganglion trigeminal mettant en évidence l'importance de ces deux protéines dans la survie des neurones sensitifs au cours de la gangliogenèse (Konishi et al., 2006). Au niveau des placodes olfactives, l'absence de *Six1* et *Six4* conduit à la formation d'un épithélium olfactif (EO) légèrement plus épais que chez les embryons contrôle, mais qui n'exprime pas les marqueurs neuronaux contrairement aux simple KO *Six1* chez qui l'EO exprime les marqueurs neuronaux mais avec des patrons d'expression perturbés (Chen et al., 2009). Enfin, un nouveau phénotype est apparu chez les double KO, l'absence de *Six1* et *Six4* empêche la différentiation testiculaire des gonades accompagné d'une diminution de l'expression des gènes de détermination sexuelle tels que *Sry*, défaut non observé chez les simples KO (Fujimoto et al., 2013). Dans la majorité des organes étudiés, il semblerait que *Six4* n'ait pas un rôle primordial en présence de *Six1* mais soit capable de compenser certaines de ses fonctions en son absence menant à une aggravation des phénotypes du simple KO *Six1* au double KO *Six1*:*Six4*.

c. Six2

Patrons d'expression

L'expression de *Six2* est détectée par hybridation in situ à partir de E8,5 dans le mésoderme de la tête, tout d'abord restreinte à sa partie antérieure puis s'étendant au cours du développement, ainsi que dans la partie antérieure de l'intestin. Son expression est ensuite détectée dans les 1er et 2ème arcs branchiaux ainsi que dans l'ectoderme cranial situé entre la mandibule et le maxillaire en formation. On la trouve aussi dans les cellules mesodermo-mésenchymateuses dérivées de la splanchnopleure et à l'origine des cellules musculaires

lisses et du tissu conjonctif des viscères. *Six2* est aussi exprimé dans le rein en développement, plus précisément dans le néphrotome puis dans les tubules du mésonéphros et le mésenchyme qui les entoure. Il a d'ailleurs été montré que les cellules SIX2+ du mésenchyme entourant le rein en développement étaient des cellules progénitrices à l'origine de la formation de tous les types cellulaires des tubules rénaux (Kobayashi et al., 2008). A E11,5, *Six2* est exprimé transitoirement dans la partie ventro-latérale des somites thoraciques, et dans les bourgeons de membres postérieurs. *Six2* est aussi transitoirement exprimé dans différents organes dont une composante provient de l'ectoderme, tels que l'œsophage, l'estomac et l'intestin. Enfin, *Six2* semble être exprimé dans les tendons qui positionnent les muscles des pattes aux doigts, bien qu'une co-localisation avec un marqueur des tendons serait nécessaire pour valider cette hypothèse (Oliver et al., 1995b). Comme *Six1*, *Six2* est exprimé dans une variété de tissus au cours du développement laissant penser qu'il aurait un rôle primordial pour la formation de ces organes (Figure 17).

Phénotype du KO

Les souris KO pour *Six2* meurent à la naissance confirmant que son activité est essentielle pour le développement d'un organisme fonctionnel. En absence de *Six2* le développement rénal est fortement altéré en raison d'un engagement prématuré des cellules progénitrices dans la voie de différenciation menant à un épuisement du pool de cellules progénitrices et à une hypoplasie rénale (Self et al., 2006). En effet, l'expression de *Six2* et son interaction avec EYA1 dans ces cellules progénitrices est indispensable pour empêcher ces cellules de subir la transition mésenchyme/épithélium qui feront d'elles des cellules différentiées (Kobayashi et al., 2008; Park et al., 2012; Xu et al., 2014). De plus, il a été montré que *Six2* pouvait activer l'expression du gène *Gdnf*, sécrété par les cellules mésenchymateuses et indispensable au développement du rein (Brodbeck et al., 2004). A la naissance, le crâne des animaux KO pour *Six2* semble plus petit comparé à celui des animaux contrôles. Il semblerait que ce phénotype soit dû à un défaut de la formation de la base craniale, la majorité des autres os de la tête se formant avec peu de défauts. La base craniale entoure et protège le cerveau et lors de sa formation est tout d'abord constituée de cartilage qui est ensuite remplacé par de l'os par ossification endochondrale. Dans les souris KO pour *Six2*, la différenciation des chondrocytes est altérée, ils prolifèrent moins et se différencient plus, menant à une fusion prématurée des os de la base craniale qui n'ont pas terminé leur croissance (He et al., 2010). Enfin, bien qu'aucun phénotype cardiaque n'ait été décrit dans les animaux KO pour *Six2*, ce dernier est exprimé dans des progéniteurs cardiaques. L'ablation spécifique des cellules SIX2+ par la toxine diphtérique à un stade où des progéniteurs cardiaques SIX2+ sont localisés dans le

second champ cardiaque conduit à une hypoplasie du ventricule droit, démontrant l'importance de ces cellules dans la formation du cœur. Le rôle de *Six2* dans ces cellules reste à préciser (Zhou et al., 2017). Peu de données décrivent les facteurs régulant l'expression des gènes *Six*, cependant il a été montré que le gène *Hoxa2* exprimé dans le 2ème arc branchial se liait aux séquences régulatrices de *Six2* pour en abolir l'expression et permettre la formation des dérivés de cet arc branchial. La double invalidation de *Hoxa2* et *Six2* restaure en partie le phénotype du simple KO *Hoxa2* dans lequel l'expression de *Six2* dans les cellules du deuxième arc branchial perturbe la formation de ses dérivés (Kutejova et al., 2008).

Triple invalidation de *Six1*, *Six2* et *Six4*

Les gènes *Six1*, *Six2* et *Six4* sont exprimés dans les cellules des crêtes neurales à l'origine des structures céphaliques (CNC). Leur invalidation par injection d'ARN double brin dans les CNC d'embryons de poulet a permis de mettre en évidence leur rôle respectif au cours du développement cranio-facial. L'inactivation de *Six1* affecte la formation du prosencéphale menant à une sévère holoprosencéphalie, l'inactivation de *Six2* conduit à une perte du plexus choroïde et l'inactivation de *Six4* perturbe la formation du septum pellucidum démontrant que ces trois gènes ont des rôles très différents dans les CNC, où leur expression ne peut pas entièrement compenser la perte de l'expression d'un autre. En effet, la triple inactivation des trois gènes conduit à une anencéphalie sévère suggérant l'importance de ces trois gènes dans le développement cranio-facial (Garcez et al., 2014).

d. Six5

Patron d'expression

L'insertion du gène *LacZ* codant pour la β-galactosidase au locus de *Six5* et l'utilisation d'un transgène exprimant le gène *LacZ* sous le contrôle de 4,3kb du promoteur du gène *Six5* ont permis d'analyser son expression au cours du développement embryonnaire et fœtal (aucune image publiée ne montre son profil d'expression par hybridation *in situ*). La β-galactosidase commence à être détectée à E8,5 dans les bourrelets neuraux antérieurs, puis une faible expression est retrouvée dans les cellules musculaires lisses tapissant les organes du système digestif et dans les cellules à l'origine des muscles squelettiques de la langue, du dos et des membres. Une expression plus forte est retrouvée dans le sclérotome, les méninges, la glande surrénale, le cartilage des os en développement, la trachée, le foie, les tubules rénaux et l'œil. Chez l'adulte, l'expression de *Six5* n'est quasiment pas détectable (Klesert et al., 2000; Heath et al., 1997). Par RTqPCR, l'expression de *Six5* a été détectée dans des tissus embryonnaires tels que la tête, les membres, le foie, les reins et le cœur, et dans des tissus adultes tels que les muscles squelettiques, le cœur, les testicules, le cerveau, les cellules musculaires lisses, le

thymus, les reins et le foie, mais son expression doit être trop faible pour détecter le signal du gène rapporteur (Heath et al., 1997). Enfin, l'expression de SIX5 a été rapportée par immunohistochimie dans les myonuclei des fibres musculaires squelettiques adultes (Grifone et al., 2004) et dans les cellules satellites (Figure 17) (Yajima et al., 2010).

Phénotype du KO

Le gène *Six5* a été découvert chez la souris au cours de l'étude de la Dystrophie Myotonique (DM), maladie causée par un nombre anormal de répétitions du triplet CTG en 3' du gène *Dmpk* (Dystophy myotonic protein kinase-encoding gene) perturbant son expression. Ces triplets sont aussi retrouvés en 5' du gène *Six5* baptisé *Dmahp* (DM locus-associated homeodomain protein) avant d'être apparenté à la famille *Six* (Boucher et al., 1995; Heath et al., 1997). Un modèle de souris KO pour *Six5* a été généré afin de comprendre l'effet de sa mutation dans la DM et il a été observé que les animaux KO développaient une opacité lenticulaire laissant penser que la dérégulation de l'expression de *Six5* était responsable du phénotype de cataracte retrouvé dans la DM (Klesert et al., 2000). Une étude plus approfondie des animaux $Six5^{-/+}$ et $Six5^{-/-}$ a permis de démontrer que la sévérité et le taux de développement de cataracte étaient inversement corrélés à l'activité de *Six5* et que le développement de ce phénotype était progressif au cours du temps. L'apparition de la cataracte est donc due à une perte d'expression progressive de *Six5* (et *Dmpk*) au cours du temps (Sarkar et al., 2000). La diminution de l'expression de *Six5* est aussi responsable en partie des défauts de conductions cardiaques (Wakimoto et al., 2002) et de stérilités (Sarkar et al., 2004) retrouvés dans la DM.

Double invalidation de *Six4* et *Six5*

La double invalidation de *Six4* et *Six5*, dont la simple invalidation est viable, a été réalisée dans le but d'étudier leurs rôles au cours de la régénération musculaire squelettique. L'étude rapporte qu'aucun animal $Six4^{-/-}Six5^{-/-}$ et très peu d'animaux $Six4^{-/-}Six5^{-/+}$ ne sont nés alors que les animaux $Six4^{-/+}Six5^{-/-}$ sont viables et fertile. Les raisons de cette létalité n'ont pas été étudiées mais ces résultats renforcent le statut de compensation des gènes *Six* les uns envers les autres (Yajima et al., 2010). Le phénotype musculaire de ces animaux sera décrit plus tard.

e. Six3

Patron d'expression

Le patron d'expression de *Six3* a été étudié chez des embryons de souris par hybridation *in situ*, et une expression a été détectée à partir de E6,5 dans la partie antérieure de l'embryon, à E8,2 dans la partie antérieure de la plaque neurale à l'origine de l'ectoderme de la cavité nasale et des placodes olfactives, puis à E8,5 dans les cellules à l'origine des dérivés neuraux

les plus antérieurs tels que l'hypothalamus, les vésicules optiques, la partie ventrale du prosencépale et la neurohypophyse. L'expression de *Six3* est ensuite restreinte à la partie la plus rostrale du tube neural à l'origine du télencéphale et de la vésicule optique et à E11,5 *Six3* est exprimé dans l'œil en formation plus précisément au niveau de la rétine, du cristallin et des pédicules optiques. Plus tard au cours du développement, son expression s'éteint petit à petit pour ne subsister que dans l'œil et la cavité nasale (Figure 17) (Oliver et al., 1995a).

Phénotype du KO

Les embryons KO pour *Six3* meurent à la naissance. Ils leur manquent la partie antérieure de la tête, notamment le nez et les yeux mais le reste du corps se forme normalement. En effet, en absence de *Six3*, la partie rostrale du crâne et les dérivés maxillo-faciaux sont très rétrécis, en conséquence de l'absence dès E12,5 du télencéphale et des vésicules optiques. Cette étude a pu mettre en évidence, que la formation de la partie antérieure de la tête nécessitait une répression de l'expression de *Wnt1* par *Six3*. L'absence de *Six3* mène donc à une postériorisation du crâne (Lagutin et al., 2003). L'expression de *Six3* dans les cellules du diencéphale est aussi importante pour y induire l'expression de *Shh* indispensable à la séparation des deux hémisphères cérébraux. Une diminution de l'activité de *Six3* mène à la séparation incomplète des deux hémisphères se manifestant par une holoprosencéphalie, aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Geng et al., 2008). *Six3* est aussi impliqué dans la différentiation de la vésicule optique en neurorétine (NR) et épithélium pigmentaire rétinien (EPR). En effet *Six3* réprime l'expression de *Wnt8b* afin de permettre la différentiation en NR. En absence de *Six3*, spécifiquement dans les cellules de la rétine, ou dans les cellules SIX3+, la formation de la NR ne se fait pas, par contre le développement de l'EPR n'est pas affectée, démontrant la spécificité d'expression de *Six3* dans une partie seulement des cellules de la vésicule optique (Liu et al., 2010a; Liu and Cvekl, 2017).

f. Six6

Patron d'expression

L'expression de *Six6* a été analysée par hybridation *in situ* avec une sonde ne reconnaissant pas l'ARNm de *Six3* (Jean et al., 1999), et confirmée ensuite par insertion du gène *LacZ* codant pour la β-galactosidase au locus *Six6* (Li et al., 2002b). L'expression de *Six6* est détectée à partir de E8 dans le diencéphale, à l'origine de la formation de l'hypothalamus et de la neurohypophyse, puis dans les pédicules optiques et la neurorétine. Il est ensuite exprimé dans l'adéno- et la neuro-hypophyse ainsi que dans l'hypothalamus. *Six6* partage donc son patron d'expression avec *Six3*, dont l'expression est généralement plus étendue (Figure 17).

Phénotype du KO

Le KO de *Six6* n'est pas létal chez la souris, mais entraine une hypoplasie de l'hypophyse et de la rétine variable en fonction du fond génétique. En effet, avec l'association de son co-represseur *Dach*, *Six6* contrôle la prolifération des cellules progénitrices de l'hypophyse et de la rétine en réprimant l'expression des inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases *p27, p19* et *p57*. De plus, *Six6* est important pour le développement du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Les animaux KO montrent ainsi un rythme circadien anormal (Clark et al., 2013). Enfin, l'hypophyse et l'hypothalamus sont importants pour le développement et le maintien de la fonction reproductive, et il a été montré que *Six6* induisait directement l'expression de l'hormone *GnRH* par les neurones de l'hypothalamus. En absence de *Six6*, le nombre de neurones hypothalamiques est diminué et les animaux mâles et femelles ont une fonction reproductive altérée (Larder et al., 2011).

Les gènes *Six* chez les mammifères sont donc impliqués dans un grand nombre de procédés développementaux dans une grande variété d'organes au cours desquels leur origine évolutive laisse une trace permettant le regroupement de leur fonction avec au moins un autre gène *Six*.

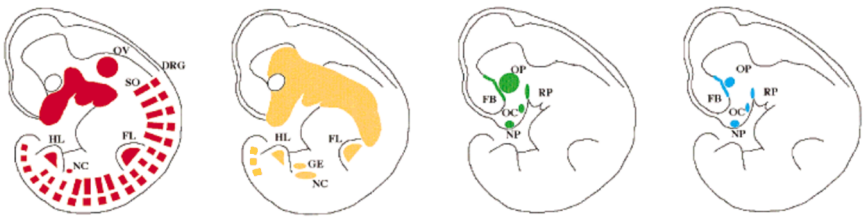


Figure 17 : Patron d'expresion des gènes Six chez la souris

Figure tirée et adaptée de Kawakamiet al., 2000.

DRG, dorsal root ganglia ; FB, Forebrain ; FL, Forelimb ; GE, genital eminece ; HL, Hindlimb ; NC, nephrogenic cord ; NP, nasal placode ; OC, optic chiasm ; OP, optic placode ; OV, optic vesicle ; RP, rathke's pouch ; SO, somites.

3. Les gènes *SIX* chez l'Homme

a. Mutations perte de fonction

Compte-tenu de l'implication des gènes *Six* dans le développement des organes murins et de drosophiles, il n'est pas étonnant que la mutation de gènes *SIX* soit aussi retrouvée dans des pathologies humaines. En effet, des mutations dans le gène *SIX1* ont été retrouvées chez des patients atteints du syndrome de BOR (Branchio-Oto-renal), maladie autosomale dominante caractérisée par des pertes d'audition, par la présence de vestiges des arcs branchiaux et des anomalies rénales (Ruf et al., 2004). Généralement, ces mutations empêchent soit l'interaction de SIX1 avec EYA1, soit la liaison de SIX1 à l'ADN suggérant que *EYA1* soit aussi important pour le développement des organes impliqués dans cette maladie chez l'Homme (Patrick et al., 2009); des mutations dans le gènes *EYA1* ont aussi été retrouvées chez des patients atteints du syndrome de BOR (Abdelhak et al., 1997). Des mutations dans le gène *SIX2* ont été retrouvées dans des cas de malformation rénales (Weber et al., 2008), et dans le gène *SIX3* dans des cas de holoprosencéphalie (séparation incomplète des deux hémisphères cérébrales) et d'aprosencépahlie/atélencéphalie (absence de dérivés du prosencéphale). Des mutations dans le gène *SIX5*, perturbant son interaction avec EYA1 ont aussi été retrouvées dans le syndrome de BOR (Hoskins et al., 2007). Comme chez la souris, le gène *SIX5* humain a été impliqué dans la Dystrophie Myotonique, mais les différences phénotypiques observées entre les patients et les souris KO pour *Six5* remettent en cause la réelle implication de la diminution de l'expression de *SIX5* dans les phénotypes de cette maladie (Klesert et al., 1997, 2000). Enfin, une délétion du locus portant les gènes *SIX6*, *SIX1* et *SIX4* a été retrouvée chez des patients atteints d'anophtalmie, d'anomalie hypophysaires et montrant une hypotonie musculaire ; l'hémizygotie de ces trois gènes a pu être confirmée chez ces patients (Gallardo et al., 1999; Grifone et al., 2005). Les gènes *SIX* sont donc aussi importants pour le développement de nombreux organes chez l'Homme (résumé dans (Christensen et al., 2008)).

b. Mutations gain de fonction

Les gènes *Six* étant importants au cours du développement, ils sont rarement exprimés chez l'adulte à l'exception du muscle squelettique (Oliver et al., 1994). Ces gènes contrôlant l'expression notamment des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire ou dans la survie cellulaire au cours du développement, leur expression ectopique chez l'adulte provoque généralement le développement de cancers (résumé dans (Christensen et al., 2008)). Ainsi, des mutations gain de fonction ont été retrouvé dans le gène *SIX1* dans des tumeurs du sein (Coletta et al., 2010; Ford, 1998; Reichenberger et al., 2005), de l'ovaire (Behbakht et al.,

2007), du col de l'uterus (Wan et al., 2008), ainsi que dans des carcinomes hépatocellulaires (Ng et al., 2006), des rhabdomyosarcomes (Khan et al., 1999; Yu et al., 2004), et dans les tumeurs de Wilms (Li et al., 2002a). *SIX2* a été impliqué dans des cancers du poumon (Rauch et al., 2006), *SIX3* dans des chondrosarcomes (Hisaoka et al., 2004; Laflamme et al., 2003), *SIX5* dans le développement de tumeurs ovariennes (Winchester et al., 2000) et *SIX6* dans des leucémies (Soulier et al., 2005). L'implication de ces gènes à homéodomaine aussi bien dans des mécanismes de prolifération que d'acquisition de destin cellulaire suggère une régulation très fine de leur expression par une variété de facteurs. En effet, l'expression de *Six1* peut être contrôlée par des facteurs du cycle cellulaire tels que E2F1 et promouvoir la prolifération (Young et al., 2003), ou par des facteurs de spécification de destin cellulaire comme les gènes *Pax* permettant l'engagement dans un destin cellulaire (Punzo et al., 2002). L'interaction SIX/EYA a aussi été caractérisée dans la cadre de modèles tumoraux, et les mutations empêchant cette interaction perturbent la transition épithelio-mésenchymateuse et la formation de métastases normalement induits par la surexpression de SIX (Patrick et al., 2013).

4. Rôle des gènes *Six* dans le muscle squelettique

En 1995, dans leur étude descriptive du patron d'expression des gènes *Six1* et *Six2* chez la souris, Guillermo Oliver et ses collègues décrivent pour la première fois l'expression de ces deux gènes *Six* dans le muscle squelettique (Oliver et al., 1995b). En 1996, Kiyoshi Kawakami et ses collègues ont publié l'évidence de l'expression de *Six4* (*Arec3*) dans une lignée de myoblastes immortalisés C2C12 et au cours de leur différentiation (Kawakami et al., 1996a; b), et en 1998, François Spitz et ses collègues démontrent que le site MEF3 présent dans le promoteur de *Myogénine* est indispensable à son expression au cours du développement embryonnaire, et que *Six1* et *Six4* sont capables de se lier à ce site MEF3, d'induire l'expression de *Myogénine* dans des cellules C2C12, et partagent le patron d'expression de *Myogénine* au cours du développement embryonnaire de souris (Spitz et al., 1998). Enfin, dans un système de culture de somites de poulet Heanue et ses collègues ont pu montrer l'implication de *Six1* dans l'acquisition de l'identité myogénique, en collaboration avec *Eya2* et *Dach2* (Heanue et al., 1999). En effet, dans ce modèle de culture, la sur-expression de *Six1* avec *Eya2* ou de *Dach2* avec *Eya2* est suffisante pour induire l'expression de *Pax3*, *MyoD*, *Myogénine* et des chaines lourdes de myosine, positionnant ces gènes en amont de la cascade génétique qui préside la myogenèse squelettique chez les amniotes.

a. Les gènes Six au cours de la myogenèse prénatale

En 2003, Laclef et ses collègues ont publié le premier KO du gène *Six1* (s1KO) chez la souris, dont l'inactivation cause une létalité post-natale. A la naissance, ces animaux montrent une hypoplasie musculaire sévère probablement responsable de leur létalité. Au niveau des membres, la partie distale est la plus affectée, les masses musculaires dorsales sont absentes dans la partie distale des membres antérieurs et leur taille est un peu diminuée dans la partie distale des membres postérieurs, les masses musculaires ventrales sont absentes de la partie distale des membres postérieurs et leur taille est fortement diminuée dans la partie distale des membres antérieurs. La formation d'autres muscles hypaxiaux est aussi altérée, le diaphragme est réduit à une fine couche de tissu conjonctif et ne contient pas de fibres musculaires, et la langue est fortement réduite en taille. La formation des muscles épaxiaux est moins atteinte bien que certains muscles superficiels du dos et intercostaux soient très réduits en taille voire absents. A part les muscles de la tête d'origine somitique comme la langue, les autres muscles cranio-faciaux ne sont pas atteints. A E18,5, la proportion de fibres lentes et rapides n'est pas affectée. Les défauts observés sont surement dus à un défaut de myogenèse primaire puisqu'ils sont déjà présents à E13,5. Les myofibres primaires servant d'échafaudage au reste des myofibres, aucune conclusion n'est possible concernant l'implication de *Six1* au cours de la myogenèse secondaire et une inactivation inductible au cours de cette période serait nécessaire pour conclure. L'expression de *Myf5*, *MyoD* et *Pax3* n'est pas altérée dans les somites ni dans le dermomyotome en absence d'expression de *Six1*, et les cellules PAX3+ délaminent et peuvent migrer vers les membres bien qu'en nombre réduit. L'absence de *Six1* provoque ensuite un retard d'expression de *MyoD* et *Myogénine* et une absence d'expression de *Myf5* dans les bourgeons de membres responsable avec la diminution du nombre de cellules PAX3+ y migrant des altérations de la myogenèse primaire hypaxiale (Laclef et al., 2003a; Giordani et al., 2007). L'expression de *Six4* n'est pas non plus altérée, et bien que le KO de *Six4* (s4KO) ne présente pas de phénotype musculaire (Ozaki et al., 2001a), le double KO de *Six1* et *Six4* (s1s4KO) présente un phénotype plus drastique que le s1KO démontrant la compensation de l'absence d'expression de *Six1* par *Six4* (Grifone et al., 2005). En effet, tous les muscles des pattes sont absents chez les fœtus s1s4KO, les autres muscles ventraux du tronc sont aussi absents ainsi que la langue. Les gènes *Six1* et *Six4* sont donc indispensables à la myogenèse hypaxiale. Certains muscles du dos ne sont pas correctement organisés, et la formation des muscles cranio-faciaux n'est pas non plus altérée dans le s1s4KO (à part les muscles d'origine somitique). Comme chez le s1KO, les défauts musculaires observés chez le s1s4KO sont déjà présent à E13,5 suggérant encore que les

gènes *Six1* et *Six4* sont requis pour la myogenèse primaire, surtout hypaxiale. Notamment, une forte réduction de l'expression de *Pax3* dans les cellules de la lèvre hypaxiale du dermomyotome les empêche d'acquérir leur identité myogénique, aucune cellule β-GAL+ (KI *Six1-LacZ*) ne migre dans les membres, et l'extension ventrale de la lèvre hypaxiale n'a pas lieu. Ces cellules β-GAL+PAX3- sont reroutées médialement et migrent sous l'aorte, certaines d'entre elles meurent par apoptose comme en témoigne leur activité caspase-3. De plus, l'expression des MRF est aussi altérée. L'expression de *Myf5* et de *Myod* est fortement diminuée, bien que *Myf5* conserve son expression dans la lèvre épaxiale du dermomyotome, l'expression de *Myogénine* presque abolie et aucune expression de *Mrf4* n'est observée en absence de *Six1* et *Six4*. Ces défauts d'expression sont aussi plus importants que chez les mutant splotch (Pax3KO) plaçant les gènes *Six1* et *Six4* en amont du réseau de régulation de la myogenèse hypaxiale. Une partie de la myogenèse épaxiale demeure cependant indépendante de *Six1* et *Six4* ; certaines cellules de la partie caudale du dermomyotome sont capables d'activer l'expression de *Pax3* en absence de *Six1* et *Six4* et pourraient participer de la formation des muscles dorsaux résiduels des fœtus s1s4KO (Grifone et al., 2005). La dose de protéines SIX semble être importante au cours de la myogenèse, les animaux s1KOs4HZ montrant un phénotype intermédiaire entre ceux des animaux s1KO et s1s4KO (Giordani et al., 2007). Bien que l'expression de *Six5* ait été détectée dans les cellules à l'origine de certains muscles squelettiques, aucun défaut musculaire n'a été observé chez les animaux s5KO (Personius et al., 2005). Enfin, l'expression de *Six2* a été détectée dans les arcs branchiaux et transitoirement dans la partie dorsale de somites caudaux, mais aucune malformation musculaire n'a été rapportée en absence de ce gène (Self et al., 2006). L'expression de *Six3* et *Six6* n'ayant pas été détectée dans le lignage myogénique, aucune étude n'a aujourd'hui rapporté de défaut musculaire suite à l'invalidation de l'un ou l'autre de ces deux gènes. Les gènes *Six1*, *Six2*, *Six4* et *Six5* sont donc les seuls gènes *Six* exprimés, plus ou moins longtemps dans des cellules qui participent à la myogenèse, et l'absence de *Six1* seul et *Six1* et *Six4* combinés mènent à des défauts de développement musculaires. Les gènes *Eya* sont aussi exprimés au cours de la myogenèse chez les vertébrés, et cette dernière est transitoirement retardée chez les embryons KO pour *Eya1* (e1KO). Les doubles mutants pour *Eya1* et *Eya2* (e1e2KO) présentent un phénotype musculaire similaire à celui des doubles mutants s1s4KO. En effet l'expression de *Pax3*, *MyoD*, *Mrf4* et *Myogénine* est très diminuée chez les embryons e1e2KO et la myogenèse hypaxiale est totalement abrogée (Grifone et al., 2007). L'expression de *Six1* est maintenue dans les cellules de la lèvre hypaxiale du DM des embryons e1e2KO et l'expression d'*Eya1* maintenue dans les parties latérales et médiales du

DM mais pas dans les bourgeons de membres des embryons s1s4KO et Pax3$^{-/-}$ suggérant une collaboration de ces gènes dans l'induction du destin myogénique dans les cellules somitiques (Grifone et al., 2007). Bien que la hiérarchie entre les gènes *Six*, *Eya* et *Pax* dans les cellules somitiques reste à préciser, ces gènes sont requis pour l'installation du destin myogénique par induction de l'expression de MRF, bHLH de la même famille que *ato*/*Atoh* qui se trouvent aussi en aval des gènes *Pax*/*Six*/*Eya* dans le développement de l'œil de drosophile et des vertébrés. Le RDGN est donc redéployé dans le lignage myogénique chez les vertébrés, mais la présence de nombreux orthologues de chaque gène de drosophile chez les vertébrés et leurs redondances structurale et fonctionnelle rend difficile l'établissement d'un réseau hiérarchique précis.

b. Les gènes Six dans les cellules progénitrices du muscle adulte

Plusieurs études ont pu détecter l'expression des gènes *Six*, notamment des protéines SIX1, SIX4 et SIX5 dans les cellules souches musculaires adultes, d'une part dans les cellules satellites quiescentes ainsi que dans les CPM activées MYOD+ et dans les cellules engagées dans la voie de différentiation MYOG+ (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Yajima and Kawakami, 2016; Sakakibara et al., 2016; Pallafacchina et al., 2010; Liu et al., 2013; Chakroun et al., 2015). *Six1* est le gène *Six* le plus exprimé dans ces cellules, et son niveau d'expression est plus important dans les CPM activées que dans les CSQ (Le Grand et al., 2012).

Rôle de SIX1 dans les cellules souches musculaires adultes

L'invalidation de *Six1* spécifiquement dans les cellules satellites *in vivo* (Six1$^{lox/lox}$:Pax7$^{CRE-ERT2/+}$) ou *in vitro* dans des myoblastes primaires (ARN interférence, ARNi) a pu mettre en évidence que *Six1* n'était pas nécessaire pour le maintien de la quiescence des CS et que son absence n'entrainait pas de défaut de prolifération (cellules Ki67+ ou MYOD+) ni d'engagement dans la voie de différentiation (cellules MYOG+). Cependant, alors que l'inactivation de *Six1* par ARNi ne provoque pas de défaut de différentiation *in vitro*, les cellules satellites extraites des animaux Six1$^{lox/lox}$:Pax7$^{CRE-ERT2/+}$ et cultivée *in vitro* montrent une différentiation moins efficace que les cellules contrôles et une augmentation du nombre de cellules de réserve Pax7+Ki67-, accompagnée d'une augmentation de l'expression de *Pax7* et du récepteur à la Calcitonine (*CalcR*) deux marqueurs des CSQ. Ces résultats suggèrent que *Six1* favoriserait la différentiation des cellules musculaires et sont confirmés par les observations *in vivo* au cours de la régénération puisqu'en absence de *Six1* dans les cellules PAX7+ les muscles injectés avec de la cardiotoxine reforment des fibres plus petites avec moins de noyaux, et le nombre de cellules PAX7+ auto-renouvellées est augmenté (Le Grand

et al., 2012). La sur-expression de *Six1* dans des myoblastes primaires *in vitro*, entraine d'ailleurs une diminution de leur prolifération et une différentiation plus efficace (Yajima et al., 2010). Il semblerait que SIX1 contrôle l'expression de *Myod* et de *Myogénine* au cours de la différentiation (Le Grand et al., 2012; Liu et al., 2013), son absence empêchant donc un engagement efficace des myoblastes dans la voie de différentiation bien que les CPM activées par la mise en culture de fibres isolées du muscle EDL n'aient pas de défaut d'expression de *Myogénine* (Le Grand et al., 2012). De plus, *Six1* contrôle aussi l'expression de *Dusp6*, modulateur de la voie ERK qui lorsqu'elle est active favorise le retour en quiescence des CPM. En absence d'expression de *Dusp6* (aussi bien chez les animaux $Six1^{lox/lox}$:$Pax7^{CRE-ERT2/+}$ et $Dusp6^{-/-}$) , la voie ERK est sur-activée et les CPM s'auto-renouvellent en excès. *Six1* empêche donc un retour en quiescence prématuré des CPM en bloquant la voie ERK par son contrôle directe de l'expression de *Dusp6* (Le Grand et al., 2012). Ces études montrent donc un rôle de *Six1* aussi bien dans le contrôle de l'engagement des CPM dans la voie de différentiation que de leur auto-renouvellement, par l'induction de l'expression de *Myod*, *Myogénine* et *Dusp6*.

Rôle de SIX4 et SIX5 dans les cellules souches musculaires adultes

Aucune étude d'inactivation spécifique de *Six4* ou *Six5* dans les cellules satellites n'a été réalisée, les KO de ces deux gènes étant viables chez la souris. Cependant, des expériences sur des myoblastes primaires ont été réalisées *in vitro*. La sur-expression de *Six4* ou *Six5* entraine une diminution de la prolifération des myoblastes, et une baisse de l'efficacité de leur différentiation, suggérant qu'un sur-dosage de ces protéines n'est pas favorable au comportement des cellules musculaires *in vitro* (Yajima et al., 2010). Leur inactivation par ARNi a permis de montrer que *Six4* favorisait plutôt la différentiation musculaire alors que *Six5* aurait un rôle anti-prolifératif sans action sur la différentiation. Enfin, les animaux $Six4^{-/+}Six5^{-/-}$ ne présentent pas de défauts musculaires à l'état basal, mais des myoblastes issus de ces animaux et cultivés *in vitro* montrent une sur-prolifération (Yajima et al., 2010). De plus, la diminution de l'expression de *Six4* par injection d'ARNi dans un muscle en régénération induit la formation de moins de myofibres et de plus petite taille soulignant l'importance de l'expression de ce gène au cours de la régénération musculaire (Chakroun et al., 2015). Enfin, une étude a rapporté que la baisse du niveau d'expression de *Six4* et *Six5* dans les animaux $Six4^{-/+}Six5^{-/+}Dmd^{Mdx/Y}$ améliorait le phénotype des animaux myopathes en augmentant leur capacité de régénération, leur conférant une durée de vie plus longue (Yajima and Kawakami, 2016). Ces résultats suggèrent que le dosage de l'expression des gènes *Six* est important pour une bonne régulation de la prolifération et différentiation des cellules musculaires, au cours de

la régénération. Il a récemment été démontré que la protéine DYSTROPHINE codée par le gène *Dmd* avait une localisation polarisée dans les CPM en division au cours de la régénération musculaire, polarité permettant leur division asymétrique. Les CPM $Dmd^{Mdx/Y}$ ne réalisant plus que des divisions symétriques ne s'engagent pas dans la voie de différentiation ce qui perturbe la réparation des myofibres lésées (Dumont et al., 2015a). La publication de Yajima et al. de 2016 ne rapporte cependant pas l'étude de l'impact de la baisse du niveau d'expression de *Six4* et *Six5* dans les CPM $Dmd^{Mdx/Y}$. Il serait donc intéressant d'étudier la polarité de la protéine DYSTROPHINE dans les CPM ayant une diminution d'expression de *Six4* et *Six5* considérant aussi que les protéines SIX sont importantes pour la translocation nucléaire d'EYA, protéines aussi impliquées dans la régulation de la symétrie de division lorsqu'elles sont dans le cytoplasme (El-Hashash et al., 2011b).

c. Régulation de la transcription des gènes cibles de SIX dans les cellules progénitrices

Les protéines SIX étant des facteurs de transcription à homéodomaine, leur rôle au cours d'évènements développementaux passe par le contrôle de la transcription de leurs gènes cibles. Le contrôle de l'expression des gènes cibles des protéines SIX au cours de la myogenèse a été intensément étudiée. Une étude publiée en 2010 a réalisé le profil d'interaction de SIX1 avec l'ADN à l'échelle du génome par des expériences de ChIP-on-chip dans des cellules C2C12 en prolifération et au cours de la différentiation, et a répertorié plusieurs classes de gènes cibles potentiels de *Six1* (dont SIX1 se lie aux séquences régulatrices) :

- Des gènes impliqués dans le développement musculaire tels que *Myf5*, *Myod*, *Myogénine*, *Mef2* et *Pitx2*.
- Des gènes codant pour des protéines de l'appareil contractile musculaire, tels que des chaines lourdes de *myosine*, la *Titine* ou des *Troponines*
- Les gènes codant pour les protéines SIX elles-mêmes
- Des gènes impliqués dans le développement neuronal

Cette étude a aussi mis en évidence la présence de sites de fixation de MYOD et MYOG (E-box) à proximité des sites MEF3 laissant penser à une collaboration entre ces protéines dans l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (Liu et al., 2010b).

Contrôle de l'expression de *Myf5*

Myf5 est le premier MRF à être exprimé dans la lèvre épaxiale du dermomyotome, et la régulation spatio-temporelle de son expression se fait par l'utilisation de différents enhancers localisés dans une région de 140kb en 5' du gène. Son expression dans la lèvre épaxiale du

dermomyotome est dirigée par une séquence située à -5,5kb de son promoteur et dans la lèvre hypaxiale à E9,5 par une région située entre -140 et -88kb, puis à E10,5 dans la lèvre hypaxiale et les bourgeons de membres par une région située entre -58 et -48kb, une région située à -111kb régule son expression dans la région centrale du myotome à E9,5 et à -1kb dans les arcs branchiaux (résumé dans (Daubas and Buckingham, 2013)). En 2007, Giordani et ses collègues ont pu mettre en évidence que le site de fixation de PAX3 localisé dans la région -58-48kb (Bajard et al., 2006) jouxtait un site MEF3, utilisé par SIX1 pour contrôler l'expression de *Myf5*, et que les protéines SIX capables de se lier à ce site collaborait avec PAX3 pour induire l'expression de *Myf5* dans les bourgeons de membres (Giordani et al., 2007). Une étude plus récente a pu montrer que l'enhancer localisé à -111kb régulait aussi l'expression de *Myf5* dans les membres via la collaboration de PAX3 et SIX, mais avec un effet moins important des protéines SIX (Daubas and Buckingham, 2013). Les protéines SIX participent donc à l'activation de l'expression de *Myf5*, à différents temps et lieux au cours de la myogenèse embryonnaire. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail l'activation directe de l'enhancer épaxial de *Myf5* par les protéines SIX.

Contrôle de l'expression de *MyoD et de ses gènes cibles*

Le contrôle de l'expression de *MyoD* est réalisé via trois régions enhancer ; une région au niveau de son promoteur, une région de régulation distale DRR située à -6kb et une région enhancer centrale (CE) localisée à -20kb. Il a été démontré que SIX1 et SIX4 et en leur absence SIX2 étaient capables d'activer l'expression de *MyoD* en se liant au DRR et au CE (Liu et al., 2010b; Relaix et al., 2013). De plus, la mutation des sites MEF3 présents dans le CE et le DRR de *MyoD* abolit totalement l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de ces séquences, dans tous les territoires embryonnaires où *MyoD* est normalement exprimé, démontrant la nécessité absolue des protéines SIX pour contrôler l'expression de *MyoD in vivo* (Relaix et al., 2013). *Six2* est donc un bon candidat pour compenser la perte d'expression de *Six1* et *Six4* dans les fœtus s1s4KO et induire la myogenèse épaxiale. De plus, la liaison de SIX1 au CE de *Myod* est requise pour l'activation de sa transcription au cours de la régénération musculaire dans les CPM, et stabilise la chromatine permettant à MYOD de se lier à son propre enhancer (Liu et al., 2013). Un autre modèle de différentiation in vitro consiste à utiliser des lignées de fibroblastes qui sous l'induction de *MyoD* acquièrent une identité myogénique et s'engagent dans la voie de différentiation après expression de *Myogénine* et *Mhc* (Davis et al., 1987). L'équipe d'Alexandre Blais a pu mettre en évidence qu'en absence d'expression de *Six4* les fibroblastes n'étaient pas capables de s'engager dans la voie de différentiation myogénique après induction de l'expression de *Myod*. *Six4* est donc

essentiel à l'activation des gènes cibles de *Myod* tel que *Myogénine*. SIX4 est en effet capable de recruter la déméthylase UTX aux sites de fixation de *Myod* permettant la déméthylation des histones de ces séquences et les rendant accessibles aux facteurs initiateurs de la transcription (Chakroun et al., 2015; Seenundun et al., 2010). D'autre part, Santolini et al., ont réalisé ces expériences de transdifférentiation de fibroblastes en cellules myogéniques après induction de l'expression *Myod* sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) issus d'embryons WT ou s1s4KO et ont pu montrer qu'en l'absence de SIX1 et SIX4, l'expression de *Myod* n'était pas suffisante pour induire une identité myogénique (Santolini et al., 2016). Ces études démontrent donc que la collaboration SIX/MYOD est requise pour l'induction de la myogenèse *MyoD* dépendante.

Contrôle de l'expression de *Myogénine*

Le gène *Myogénine* est l'une des premières cibles découvertes pour les protéines SIX chez la souris. Spitz et al., ont en effet montré en 1998 que son promoteur comportait un site MEF3 et démontré que la fixation de protéines SIX était requise pour induire son expression chez des embryons de souris (Spitz et al., 1998). De plus, les expériences de transdifférentiation présentées ci-dessus ont permis de mettre en évidence l'importance de la collaboration SIX/MYOD dans l'activation de l'expression de Myogénine (Chakroun et al., 2015; Santolini et al., 2016) et sont en accord avec la notion qu'en absence de fixation des protéines SIX sur les séquences régulatrices des gènes cibles de *MyoD*, ce dernier est incapable d'exercer correctement son activité de gène maître de la myogenèse. Cependant, dans certaines conditions, telles que dans les muscles épaxiaux et cranio-faciaux, *MyoD* est capable d'induire l'identité myogénique en absence des protéines SIX1 et SIX4. Afin de s'affranchir d'une compensation de la perte d'expression de *Six1* et *Six4* par *Six2* et *Six5*, une étude de perte d'expression de tous les gènes *Six* exprimés dans les muscles squelettiques serait nécessaire pour finalement déterminer si les protéines SIX sont toujours indispensables à la bonne activation de MYOD et à son activité.

d. Régulation de l'expression des gènes cibles de SIX dans les fibres musculaires

Les différents types de fibres ont des propriétés contractiles et métaboliques différentes régulées par l'innervation mais aussi par une composante génétique. En effet, SIX1 et son co-facteur EYA1 sont plutôt enrichies dans les noyaux des fibres rapides, et l'induction de leur expression dans un muscle lent tel que le soléaire suffit à changer le typage de ses fibres en fibres rapides en activant l'expression des gènes du métabolisme glycolytique et des gènes codant pour les protéines contractiles rapides des sarcomères (Grifone et al., 2004). Les fibres musculaires adultes ne co-expriment pas des gènes lents et rapides, contrairement aux cellules

musculaires embryonnaires. En effet les gènes lents et rapides peuvent être exprimés dans les myocytes du myotome et ces cellules ne sont pas spécialisées : elles co-expriment les gènes lents et rapides. En accord avec les résultats précédents, une étude transcriptomique de myotomes à E10,5 provenant d'embryons WT et s1s4KO a été réalisée, et il a été observé qu'en l'absence de *Six1* et *Six4*, l'expression d'un grand nombre de gènes musculaire était diminuée et plus particulièrement de gènes de type rapide, tels que *Tnnc2*, *Tnnt3*, *Atp2a1*, *Myh1*, *Myh2*, ou *Eno3*. De plus, SIX1 et/ou SIX4 sont capables de se lier aux séquences régulatrices de certains de ces gènes *in vitro*, et l'induction de l'expression de *Six1* ou *Six4* dans des myoblastes primaires issus des muscles dorsaux résiduels des fœtus s1s4KO restaure l'expression de ces gènes rapides (Niro et al., 2010). L'absence d'expression des gènes rapide dans le fœtus s1s4KO perdure jusqu'à la naissance, et les muscles dorsaux résiduels de ces fœtus sont constitués de plus de fibres lentes que les muscles contrôles, fibres aussi positives pour les myosines embryonnaires et néonatales mais négatives pour les myosines, troponines et α-actinine rapides adultes. Ces défauts sont illustrés par une importante désorganisation des sarcomères des fibres fœtales s1s4KO observée par microscopie électronique, et une absence de formation des JNM. Enfin, la perte d'expression des gènes de type rapide directement contrôlée par SIX1 et SIX4 est accompagnée d'une diminution de l'expression du gène codant pour la protéine HDAC4, de l'activité de la voie ERK et d'une sortie du noyau de la protéine SOX6, toutes trois impliquées dans la répression des gènes du programme lent. Ces résultats suggèrent que *Six1* et *Six4* favorisent d'une part l'expression des gènes rapides, mais contrôlent aussi l'expression des gènes responsables de l'inhibition du programme lent (Richard et al., 2011). Plus récemment, il a été démontré que SIX4, en collaboration avec un co-activateur BAF60C activait l'expression de *Deptor* dans les fibres rapides permettant l'activation de la voie Akt, mécanisme indispensable au maintien du métabolisme glycolytique dans les fibres musculaires adultes (Meng et al., 2013). L'inactivation spécifique de *Six1* dans les fibres musculaires chez des souris $Six1^{lox/lox}HSA^{CRE/+}$ a très récemment permis de mettre en évidence le rôle indispensable de *Six1* pour la spécialisation des fibres rapides. La protéine SIX1 est en effet prédominante dans les noyaux des fibres de type rapide, et les fibres du muscle soléaire dépourvues de protéine SIX1 expriment toutes la chaine lourde de myosine lente et ont perdu l'expression de la chaine lourde de myosine rapide IIA. De plus, ces fibres musculaires montrent une forte diminution de leur métabolisme glycolytique et oxydatif. Une étude transcriptomique des muscles de souris $Six1^{lox/lox}HSA^{CRE/+}$ a permis de mettre en évidence le contrôle par SIX1 de l'expression de gènes du métabolisme glycolytique, de gènes codant pour des protéines de contraction rapides

et de gènes régulant l'homéostasie intracellulaire du calcium (Sakakibara et al., 2014, 2016). Enfin, un enhancer contenant six sites MEF3 régule l'expression des trois gènes codant pour les chaines lourdes de myosines rapide, et d'un long ARN non codant Linc-MYH sous le contrôle de SIX1. Le Linc-MYH est exprimé dans le noyaux des fibres rapide où il favorise l'expression des gènes de types rapide et empêche l'expression des gènes de type lent (Sakakibara et al., 2014). Enfin, la protéine SIX5 a aussi été détectée dans les myonuclei de myofibres adultes, mais aucun résultats n'a été publié concernant son activité dans ces cellules (Grifone et al., 2004). Ainsi, les protéines SIX1 et SIX4, avec leurs co-facteurs, sont indispensables à la spécialisation des fibres musculaires de type rapide.

Les protéines SIX sont donc impliquées dans toutes les étapes de la vie d'une cellule musculaire, de sa genèse dans le dermomyotome, en passant par la myogenèse prénatale, et l'établissement du métabolisme des myofibres rapides et de leurs jonctions neuromusculaires, jusque dans les cellules satellites du muscle adulte. Dans toutes ces cellules elles contrôlent aussi bien l'expression de gènes importants pour l'établissement de l'identité myogénique, tels que *Myf5* et *MyoD*, que pour l'engagement dans la voie de différentiation comme *Myogénine* et la fonction des cellules différentiées comme les chaines lourdes de myosine. Le contrôle de l'expression de ces gènes requiert la collaboration avec d'autres protéines tels que les protéines EYA, MYOD ou UTX et avec un long ARN non-codant. Les différents types musculaires squelettiques (masses musculaires hypaxiales, épaxiales et cranio-faciales) ne sont pas atteints de la même manière en absence de SIX1 et/ou SIX4 ; il reste donc à déterminer si la formation des muscles épaxiaux et cranio-faciaux requiert SIX2 et SIX5 pour induire l'expression des facteurs myogéniques ou si elle passe par un système différent de régulation de la myogenèse n'impliquant pas les protéines SIX et nécessitant un autre facteur capable d'induire l'identité myogénique en amont des MRF dans ces masses musculaires.

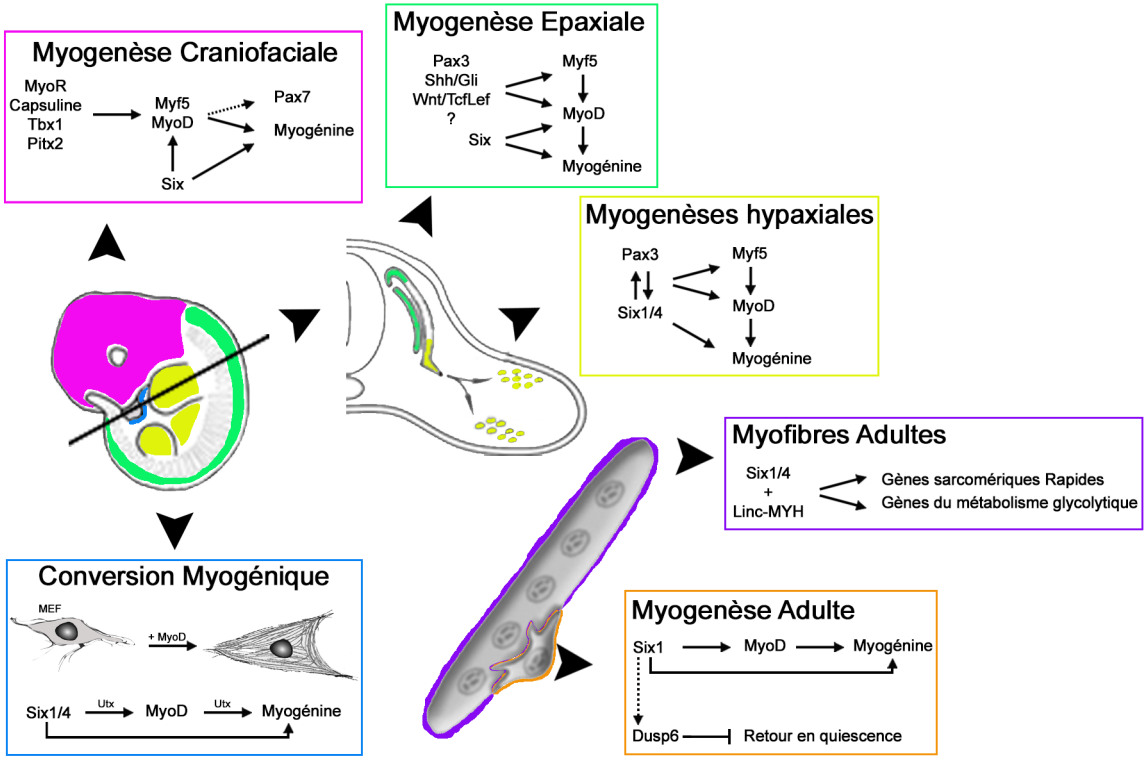


Figure 18 : Les gènes Six et les myogenèses

Objectifs

Le but de mon projet de thèse a été d'étudier le rôle des homéoprotéines SIX et de leurs co-facteurs EYA au cours de la myogenèse. Bien que le rôle de *Six1* et *Six4* soit connu au cours de la myogenèse hypaxiale, l'expression de *Six2* et *Six5* dans les muscles épaxiaux et craniofaciaux résiduels dans animaux mutants pour *Six1* et *Six4* ne permet pas d'exclure un rôle des protéines SIX dans la formation de ces masses musculaires. Nous avons donc généré des mutants composites des différents gènes *Six* chez la souris afin de déterminer le rôle précis des gènes *Six1*, *Six2*, *Six4* et *Six5* au cours des différentes myogenèses hypaxiale, épaxiale et craniofaciale. Nous présenterons ici l'étude phénotypique des masses musculaires résiduels chez les animaux $Six1^{-/-}Six2^{-/-}$, $Six1Six4^{-/-}Six2^{-/-}$, $Six1Six4^{-/-}Six5^{-/-}$, $Six2^{-/-}Six5^{-/-}$ et $Six1Six4^{-/-}Six2^{-/-}Six5^{-/-}$.

Nous souhaitions aussi étudier plus précisément le rôle des protéines SIX et EYA spécifiquement dans les cellules PAX7+ au cours de la myogenèse prénatale et de la régénération musculaire. Les animaux mutants pour *Six1* et *Six4* ayant un phénotype musculaire plus drastique que les simples KO *Six1* ou *Six4*, l'étude de la perte d'expression de ces deux gènes semblait requise. Les animaux double KO pour *Six1* et *Six4* meurent à la naissance, l'étude d'un double KO inductible aurait donc été nécessaire, mais les gènes *Six1* et *Six4* étant localisés au même locus, la génération d'animaux transgéniques inductibles n'a pas été concluante. Nous avons donc choisi d'étudier la population de cellules PAX7+ dans les muscles épaxiaux résiduels des fœtus double KO pour *Six1* et *Six4* avant la naissance.

Enfin, la perte de fonction des protéines EYA n'ayant jamais été rapportée au cours de la régénération musculaire squelettique, nous avons donc décidé de réaliser cette étude, chez des animaux KO inductible et conditionnel d'*Eya1* dans les cellules satellites ($Eya1^{lox/lox}Pax7^{CreERT2/+}$), le KO constitutif d'*Eya1* n'étant pas viable, chez des animaux KO constitutif d'*Eya3*, et chez des animaux composites $Eya1^{lox/lox}Pax7^{CreERT2/+}Eya3^{-/-}$. Après plusieurs mois d'étude, nous nous sommes aperçu que les animaux $Eya1^{lox/lox}Pax7^{CreERT2/+}$ utilisés ne menait pas à une absence d'une protéine EYA1 après injection de tamoxifen. Nous ne présenterons donc ici que les résultats obtenus chez les animaux $Eya3^{-/-}$.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont été regroupés en trois parties : deux premières parties sous la forme d'articles non-soumis et rédigés en anglais, et une dernière partie de données préliminaires rédigée en français.

Article I :

Overlapping functions of SIX homeoproteins during embryonic myogenesis

Article 2 :

SIX1 and SIX4 homeoproteins regulate PAX7+ cells progenitor properties during fetal epaxial myogenesis

Partie 3 :

Eya3 n'est pas requis pour la régénération musculaire squelettique adulte

Overlapping functions of SIX homeoproteins during embryonic myogenesis

Maud Wurmser[1,2,3], Nathalie Chaverot[1,2,3], Glenda Comai[4], Josiane Demignon[1,2,3], Guillermo Oliver[5], Shahragim Tajbakhsh[4], Stephen Tapscott[6], Ramkumar Sambasivan[7], Pascal Maire[1,2,3,*]

1. Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France
2. CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France
3. Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France
4. Institut Pasteur, Paris, France
5. Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, Illinois, USA.
6. Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA.
7. Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Bengaluru, India

* Corresponding author:

Pascal Maire

24 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris, France

Telephone number +33 1 44 41 24 13

Fax number +33 1 44 41 24 21

Email address pascal.maire@inserm.fr

Abstract

Four distinct SIX homeoproteins are expressed in myogenic lineage during mouse embryonic development: SIX1, SIX2, SIX4 and SIX5. They bind MEF3 DNA elements present in the regulatory regions of myogenic regulatory factors (MRFs) and genes expressed in undifferentiated and differentiated myogenic cells. While *Six1* mutation leads to severe muscle development defects, *Six4* and *Six5* single mutations do not; however, double *Six1*/*Six4* mutation leads to an aggravation of the *Six1* mutant muscle phenotype characterized by an absence of hypaxial myogenesis. We further characterized the phenotype of compound *Six* mutant embryos and showed that the absence of *Six1* and *Six2* completely impairs craniofacial myogenesis and worsen muscle limb development observed in single *Six1* mutant. We thus described an unknown role of SIX proteins in the control of craniofacial myogenesis and refined the genetic cascade operating at the head level. We also showed that mouse fetuses devoid of SIX1, SIX2, SIX4 and SIX5 activity are still able to develop epaxial musculature, but that *Pax7* expression in myogenic progenitors of these mutants is reduced and intermingled with *Myogenin* expression.

Introduction

Axial and craniofacial myogenesis is based on the expression of one of the three Myogenic Determination Genes (MDG) *Myf5*, *MyoD* or *MRF4* in uncommitted pluripotent cells of the dermomyotome or the unsegmented head mesoderm. Several genes and signaling cascades driving the expression of these MDGs have been characterized in the embryo; these upstream signals appear to diverge spatially and temporally. For example, the early expression of *Myf5* in epaxial cells of the somite is controlled by the synergy between Gli/Hedgehog (Borycki et al., 1999; McDermott et al., 2005a), Lef/Wnt (Tajbakhsh et al., 1998; Borello et al., 2006) and RBPJ/Notch (Rios et al., 2011) signaling pathways. However, in hypaxial dermomyotome its early expression is controlled by the synergy between atypical Wnt signaling (Chen et al., 2005), PAX3 (Bajard et al., 2006) and SIX1/4 homeoproteins (Laclef et al., 2003a; Grifone et al., 2005); in branchial arches *Myf5* is under the control of a Tbx1/Pitx2 genetic cascade (Sambasivan et al., 2011a; L'Honore et al., 2010; Zacharias et al., 2011). Although much is known about the control of myogenic regulatory factors *Myf5*, *MyoD*, *MRF4* and *Myogenin* and myogenic identity acquisition driven by SIX homeoproteins during embryonic development (Laclef et al., 2003a; Grifone et al., 2005; Relaix et al., 2013), an intriguing observation is that even in double *Six1Six4* mutant (s1s4KO) epaxial and craniofacial myogenesis is still happening. This suggests either that the role of SIX homeoproteins in controlling myogenic epaxial and craniofacial fate is less crucial, or that other *Six* genes are involved. In favor of the latest hypothesis we previously showed that the mutation of SIX-binding sites present in *MyoD* regulatory sequences impaired the activation of the *LacZ* reporter transgene in the embryo, although the cells carrying the mutant transgene have acquired myogenic competence (Relaix et al., 2013). This suggests that the binding of SIX on *MyoD* regulatory elements is required for proper chromatin opening and subsequent transcription factor binding (Relaix et al., 2013; Chakroun et al., 2015; Santolini et al., 2016). To test this hypothesis and analyze the fate of somitic and branchial arches mesodermal cells devoid of SIX activity we investigated the phenotype of compound *Six* mutants during mouse embryogenesis.

Results/Discussion

***Six2* is involved in hypaxial myogenesis where *Six1* and *Six4* are required to maintain the myogenic fate.**

We and others have shown that *Six1* mutant embryos are devoid of diaphragm and specific limb muscles; distal forelimbs and hindlimbs being more severely affected than proximal ones (Laclef et al., 2003a; Li et al., 2003). Analysis of *Six4* and *Six5* mutants did not reveal myogenic abnormalities (Klesert et al., 2000; Ozaki et al., 2001a). However, analysis of limb phenotype of double *Six1Six2* mutant (s1s2KO) did reveal that *Six2* is involved in hypaxial migrating myogenesis. Figure1 A shows that distal dorsal hindlimb muscles are reduced in size, and that ventral distal hindlimb musculature is absent. Similar to s1s4KO, distal and proximal musculatures seem absent in forelimbs of s1s2KO mice (data not shown); this suggests that *Six* dosage is a key parameter required for hypaxial limb myogenesis. Contrary to s1s4KO mice lacking all hypaxial musculature including trunk and abdominal muscles, in s1s2KO mutants, non-migrating hypaxial myogenesis is not impaired (Figure 2A). This suggests that *Six2*, not expressed in hypaxial lips of the somitic dermomyotome contrary to *Six1* and *Six4*, might be important for muscle progenitor proliferation in the limb bud, either directly or indirectly. *Six1* and *Six2* may exert redundant roles to modulate limb myogenic progenitor fate in a cell autonomous way or not. We previously showed that in s1s4KO fetuses hypaxial dermomyotome cells did not express *Pax3*; instead of migrating laterally in the hindlimb bud they are misrouted ventrally under the neural tube, some of which dying by apoptosis (Grifone et al., 2005). Analysis of the behavior of these misrouted cells (Six1-β-Gal+) showed that they do not express the endothelial markers CD31 (Figure1B), however, they express SRF and α-SMA two markers of the smooth muscle fate and are located in the periphery of the dorsal aorta. Thus, *Six1* and *Six4* are required for the skeletal myogenic fate acquisition of hypaxial dermomyotome cells of the somite; in the absence of *Six1* and *Six4*, cells differentiate by default into smooth muscle lineage. It has been shown that hypaxial dermomyotome cells can temporally give rise to endothelial progenitors, smooth and skeletal muscle progenitors (Yvernogeau et al., 2012); the balance between non canonical Wnt (Chen et al., 2005), Notch and BMP (Ben-Yair and Kalcheim, 2008; Applebaum et al., 2014) signaling modulate the behavior of these cells and the equilibrium between *Pax3* and *Foxc1/2* gene expression (Mayeuf-Louchart et al., 2016). Downregulation of *Pax3* expression in s1s4KO hypaxial cells may lead to the upregulation of *FoxC1/2* that would explain their smooth muscle fate. While *Six1* expression is maintained in hypaxial cells of $Pax3^{-/-}$ animals

(Grifone et al., 2007), *Pax3* is no more expressed in s1s4KO cells (Grifone et al., 2005). This difference may explain why s1s4KO hypaxial cells are rerouted medially at the hindlimb level; phenotype not observed in splotch mutants.

***Six*-independent epaxial myogenesis.**

We have previously shown that loosing *Six1* and *Six4* expression abolishes hypaxial myogenesis but those mutants show remaining epaxial muscles; similar results were observed in double s1s2KO and triple s1s4s5KO and s1s2s4KO fetuses (Figure 2A, B). To fully investigate if SIX homeoproteins are required for epaxial myogenesis, we generated quadruple KO fetuses lacking all *Six* genes normally expressed in the muscle lineage: *Six1*, *Six2*, *Six4* and *Six5* (s1s2s4s5KO). Interestingly, at E14.5, these fetuses still show some very disorganized MYH+ myofibers, forming a dorsal muscle mass that is clearly reduced in size (Figure 2B). *Six* gene expression is therefore not required for inducing epaxial myogenesis. We already showed that SIX binding sites were required for *MyoD* expression in embryos (including epaxial expression; Relaix et al, 2013), we therefore propose that s1s2s4s5KO remaining epaxial muscles are formed from MYF5+ progenitors. Interestingly early epaxial myogenesis still takes place in compound *Pax3Pax7* double mutant (Relaix et al, 2005). The master genes responsible for epaxial *Myf5* expression in the absence of *Six* genes remain to be determined. GLI and TCF/LEF proteins are good candidates known to activate early *Myf5* epaxial expression in epaxial lips of the dermomyotome in synergy with Notch signaling (Relaix et al., 2005; McDermott et al., 2005; Ikeya and Takada, 1998; Rios et al, 2011; Borello et al, 2006; Sieiro et al, 2016). SIX proteins also seem to be required for the maintenance of the PAX7+ progenitor cell population. Indeed, PAX7 expression seems decreased in s1s2s4s5 E14.5 fetuses. Its detection was revealed only after a drastic acetone treatment not required for control sections (Figure 2C, E and methods). The number of PAX7+ cells/area is also decreased in s1s2s4s5KO; similar results were observed in E18.5 s1s4s5KO and E14.5 s1s2s4KO fetuses (Figure 2C-E). This reveals a *Six* gene dose-dependence of *Pax7* expression; situation reminiscent to the requirement of *Six1a* and *Six1b* for the proliferation of PAX7+ cells in zebrafish (Nord et al., 2013). Finally, in the absence of SIX proteins, PAX7+ cells seem to lose their progenitor state, illustrated by the increase in the proportion of PAX7+MYOG+ cells in s1s2s4s5KO epaxial muscles (Figure 2G-H). Interestingly SIX4 ChIP-Seq data revealed SIX binding sites in the promoter region of *Pax7* (Chakroun et al, 2015), suggesting a direct link between *Pax7* expression level and SIX nuclear protein quantity.

***Six1* and *Six2* are required for craniofacial myogenesis.**

In s1KO and s1s4KO, we did not observe any craniofacial deficiencies (Laclef et al., 2003a; Grifone et al., 2005). Because of the redundancy between *Six* genes observed in axial myogenesis (Grifone et al., 2005), and the expression of *Six2* in head mesoderm and the first and second branchial arches (Oliver et al., 1995b) we wondered if other *Six* genes could be involved in craniofacial myogenesis. We observed that *Six2* and *Six5* are not required for head myogenesis. Indeed, craniofacial muscle masses form normally in *Six2Six5* double knock-out fetuses (s2s5KO) (Figure 3A) and have a normal distribution of PAX7+ cells (Figure 3B, C). Nevertheless, cranial muscle masses are reduced in triple s1s4s5KO fetuses except for extra-ocular muscles (EOM); the masseter muscles seem to have less PAX7+ cells (Figure 3A-C). This demonstrates that in a s1s4KO context, *Six5* is required for craniofacial muscle growth. So, although simple KO for *Six* genes do not disturb head myogenesis, several *Six* genes seem to be important for normal cranial muscle development. Unexpectedly, the double invalidation of *Six1* and *Six2* leads to a total absence of craniofacial myogenesis (Figure 3D). Those two *Six* genes are thus required for the formation of all head muscles including EOM, and this phenotype reveals the functional and expression pattern redundancy between SIX1 and SIX2 proteins. It now remains to determine if SIX proteins directly control MRF expression in craniofacial myogenic progenitors or if they lie upstream of already known MRF inducers such as *Tbx1*, *Pitx2*, *MyoR* and *Capsulin* (Lu et al., 2002; Sambasivan et al., 2009; L'Honore et al., 2010; Zacharias et al., 2011). SIX4 ChIP-Seq data revealed SIX binding sites in the promoter regions of *Tbx1* and *Pitx2* (Chakroun et al, 2015), suggesting that SIX homeoproteins may control the expression of these two genes in myogenic territories and may lie upstream of the craniofacial myogenesis gene network.

To conclude, our previous work demonstrated that *Six1* and *Six4* were required for hypaxial myogenesis. In the present study, we determined more precisely that these two homeoproteins are required to determine the myogenic fate of hypaxial dermomyotome cells upstream of MRFs. We also showed that *Six1* and *Six2* are required for craniofacial myogenesis, and that *Six2* is involved (although not essential) in hypaxial myogenesis; *Six2* precise role remaining to be determined. We finally showed that *Six* genes are not required for inducing epaxial myogenesis but are required for maintaining the pool of PAX7+ progenitors in epaxial muscles.

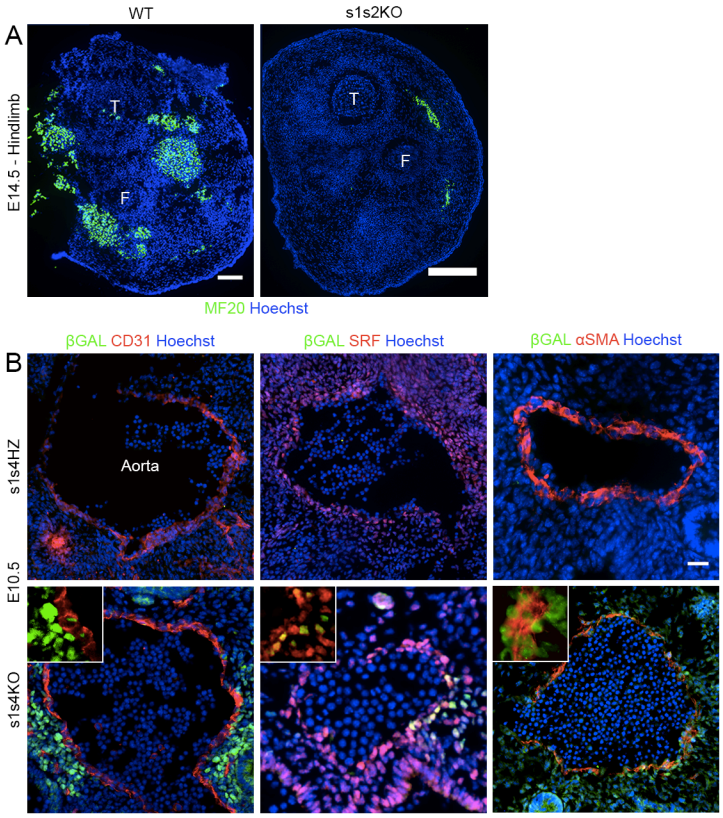


Figure 1 : Absence of *Six2* expression worsen hypaxial myogenesis defects of *Six1* mutant embryos, and both *Six1* and *Six4* are required for hypaxial progenitors to keep their myogenic identity.
A : Immunostaining for MF20 (green) on transverse sections of E14.5 WT (left panel) and s1s2KO (right panel) distal hindlimb transverse section showing remaining muscle masses. Sb=100µm. B : Immunostainings for β-galactosidase (β-GAL) (green) and CD31, SRF or αSMA (red) on transverse section of E10.5 s1s4HZ (upper panels) and s1s4KO (lower panels) fetuses at the anterior limb bud level. Sb=20µm. All patterns show the aorta in central position. Nuclei are stained with Hoechst (blue).

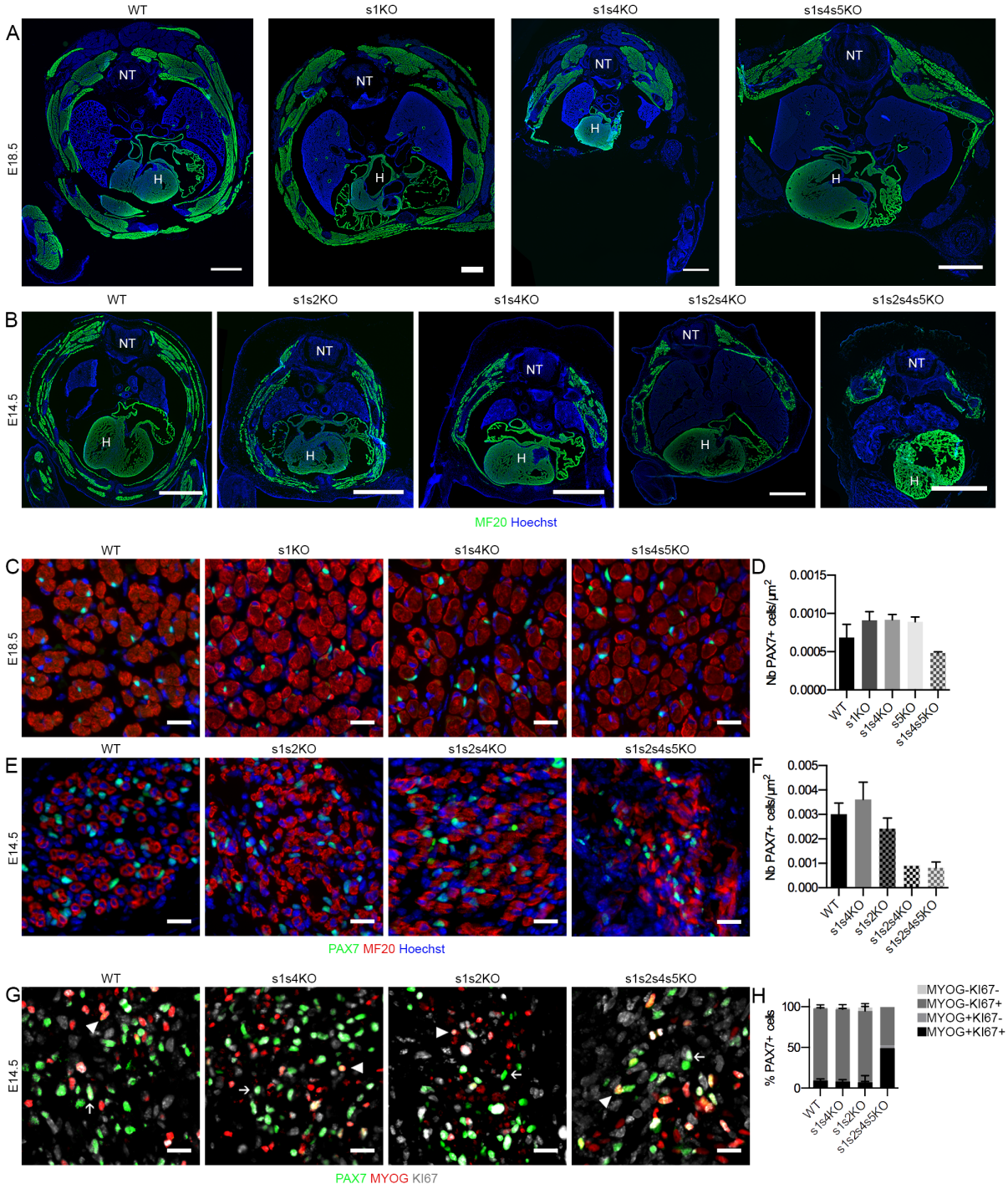


Figure 2 : Loss of SIX expression is correlated with decreased back muscle masses and *Pax7* expression.
A,B : Immunostainings for MF20 (green) on transverse sections of E18.5 WT, s1KO, s1s4KO and s1s4s5KO (A) and E14.5 WT, s1s2KO, s1s4KO, s1s2s4KO and s1s2s4s5KO (B) fetuses trunk at the heart level. Pictures show entire sections of the trunk, sb=1000µm. C,E : Immunostainings for PAX7 (green) and MF2O (red) on transverse sections of E18.5 WT, s1KO, s1s4KO and s1s4s5KO (C) and E14.5 WT, s1s2KO, s1s2s4KO and s1s2s4s5KO (E) fetuses trunk at the heart level, sb=20µm. D,F : Quantification of the number of PAX7+ cells per µm² in the back muscles of E18.5 WT, s1KO, s1s4KO, s5KO and s1s4s5KO fetuses (D) and E14.5 WT, s1s4KO, s1s2KO, s1s2s4KO and s1s2s4s5KO fetuses (F). G : Immunostainings for PAX7 (green), MYOGENIN (red) and Ki67 (grey) on transversal sections of E14.5 WT, s1s4KO, s1s2KO and s1s2s4s5KO fetuses trunk at the heart level. Arrowheads show PAX7+MYOG+Ki67+ cells and arrows show PAX7+MYOG-Ki67+ cells. Sb=20µm. H : Quantification of the percentage of PAX7+ cells that are MYOGENIN±Ki67± in the back muscles of E14.5 WT, s1s4KO, s1s2KO and s1s2s4s5KO fetuses. Nuclei are stained with Hoechst (blue). NT=Neural Tube, H=Heart.

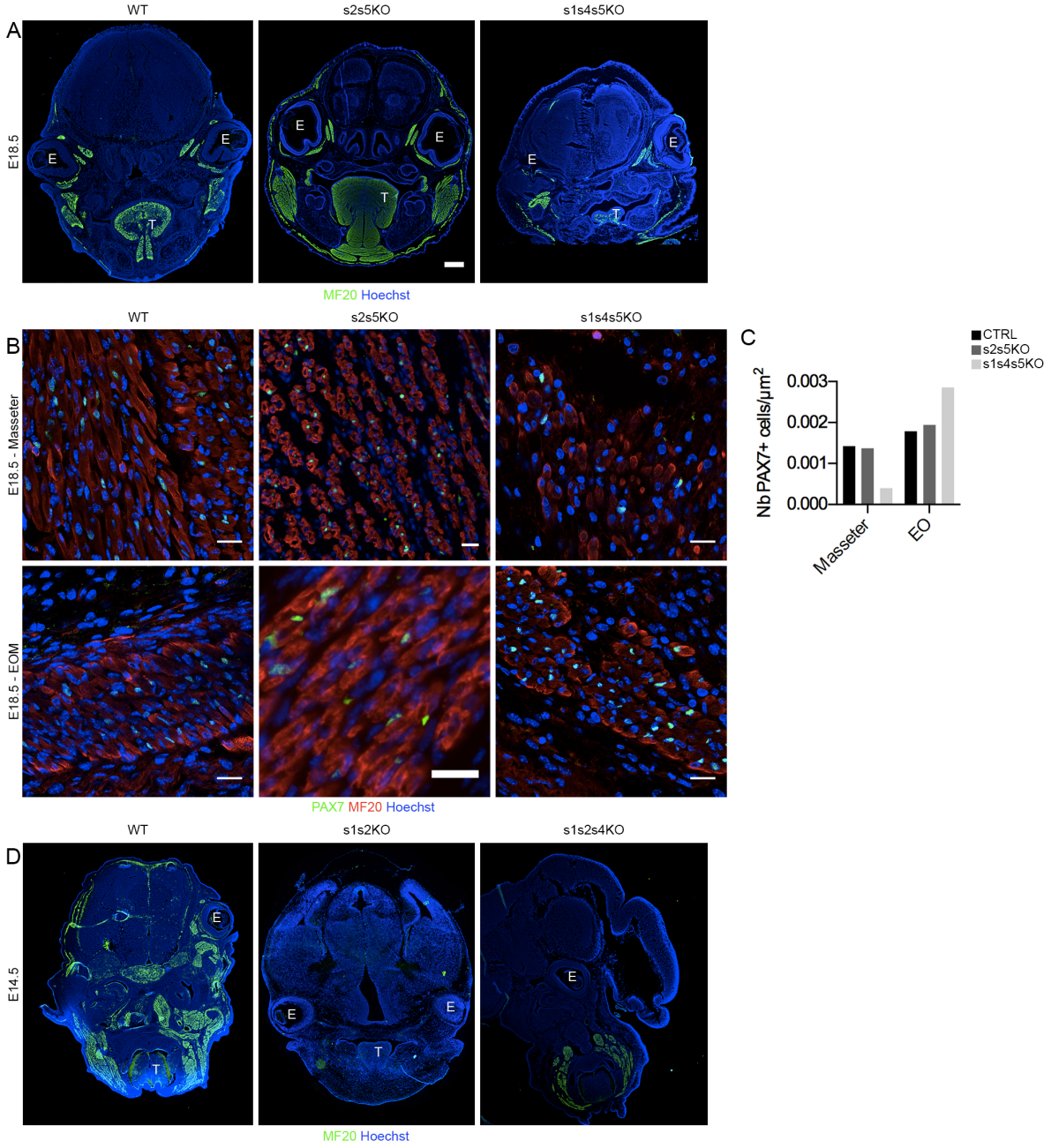


Figure 3 : *Six1* and *Six2* are required for craniofacial myogenesis.
A : Immunostainings for MF20 (green) on frontal sections of E18.5 WT, s2s5KO and s1s4s5KO fetuses head at the eyes level. Pictures show entire sections of the head. Sb=300µm. B : Immunostainings for PAX7 (green) and MF2O (red) on frontal sections of E18.5 WT, s2s5KO and s1s4s5KO fetuses head at the eyes level. Upper and lower panels are centered on the masseter muscle, and on extraocular muscles (EOM) respectively. Sb=20µm. C : Quantification of the number of PAX7+ cells per µm² in the Masseter and Extra-Occular muscles of WT, s2s5KO and s1s4s5KO fetuses (n=1). D : Immunostainings for MF20 (green) on frontal sections of E14.5 WT, s1s2KO and s1s2s4KO fetuses head at the eyes level. Pictures show entire sections of the head. Sb=300µm. Nuclei are stained with Hoechst (blue). E=Eye, T=Tongue.

Methods

Mice and animal care

Animal experimentation was carried out in strict accordance with the European convention STE 123 and the French national charter on the Ethics of Animal Experimentation. Protocols were approved by the Ethical Committee of Animal Experiments of the Institut Cochin, CNRS UMR 8104, INSERM U1016. *Six5*$^{-/+}$ (Klesert et al, 1997) and *Six2*$^{-/+}$ (Self et al, 2006) mice were crossed with *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$ or with *Six1*$^{-/+}$ mice to obtain *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$*Six2*$^{-/+}$*Six5*$^{-/-}$, *Six1*$^{-/+}$Six2$^{-/+}$, *Six2*$^{-/+}$*Six5*$^{-/-}$ or *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$Six2$^{-/+}$ adults. *Six1*$^{-/-}$, *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$, *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Six5*$^{-/-}$, *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Six2*$^{-/-}$*Six5*$^{-/-}$, *Six1*$^{-/-}$*Six2*$^{-/-}$ and *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Six2*$^{-/-}$ mutants and there littermate control fetuses were obtained by crossing corresponding two- to four-month old heterozygous mice respectively, backcrossed on C57BL/6N background (Laclef et al., 2003a; Grifone et al., 2005). Note that *Six5*$^{-/-}$ animals were viable and fertile even in a *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$*Six2*$^{-/+}$ genetic background.

Fetus preparation

Fetuses were staged, taking the appearance of the vaginal plug at embryonic day (E) 0.5. Harvested 14.5 or 18.5 days post-fertilization, fetuses were decapitated and their skin was removed (except for E14.5 fetuses). They were fixed in 4% PFA for 15 min (E14.5) or 30 min (E18.5) at room temperature and kept in 15% sucrose-PBS at 4 °C overnight. Then they were embedded into OCT and snap frozen in isopentane (-30 °C), cooled in liquid nitrogen and kept at -80 °C until use. Transverse trunk sections (10µm thickness; cryostat) at the heart level were transferred to positively charged-slides (SuperFrost-plus; Thermo Fisher Scientific) and kept at -80 °C until use.

Immunohistochemistry

Fetuses sections were rehydrated in PBS before antigen retrieval treatment in a pH6 citrate buffer solution at 95 °C for 15 min followed by 20 min of cooling. They were permeabilized in 0.5% Triton for 30 min and blocked with 0.5% Triton complemented with 5% horse serum for 3h at room temperature. Sections were incubated with primary and secondary antibodies at 4 °C overnight and 1h at room temperature, respectively; antibodies were diluted in the blocking solution. For s1s2s4s5KO fetuses, PAX7 immunostaining required additional steps: sections were permeabilized with cold -20°C acetone for 10 min, air-dried 10 min, then blocked and incubated with antibodies as previously explained. SIX1 immunostaining required an amplification step using a biotinylated secondary antibody. Sections were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin for 30 min and treated with Alexa Fluor 488 tyramide for 10 min (SuperBoost tyramide signal amplification kit; Thermo Fisher Scientific). Immunostained sections were mounted in Fluorescence mounting medium (DAKO) before imaging. Images were taken on an upright fluorescent microscope (Olympus BX63), equipped with an ORCA-Flash4.0 LT Hamamatsu camera, using Metamorph 7 software. See table 1 for antibody references.

Table 1 : Antibodies used for immunostainings on cryosections

Target	Species	Compagny	Reference	Dilution
CD31	Rat IgG	BD Pharmingen	550274	1:100
Ki67	Rabbit IgG	Abcam	ab15580	1:100
MF20	Mouse IgG2b	DSHB	-	1:50
MYOGENIN	Mouse IgG1	Santa Cruz	sc-12732	1:100
PAX7	Mouse IgG1	Santa Cruz	sc-81648	1:100
PAX7	Ginea Pig IgG	Brohl et al., 2012	-	1:1000
SRF	Rabbit IgG	Santa Cruz	sc-13029	1:100
αSMA	Mouse IgG2a	Sigma Aldrich	A5228	1:200
βGalactosidase	Chicken IgG	Abcam	ab134435	1:100

SIX1 and SIX4 homeoproteins regulate PAX7+ cells progenitor properties during fetal epaxial myogenesis

Maud Wurmser[1,2,3], Hiroshi Sakaï[4], Elisa Negroni[5], Nathalie Chaverot[1,2,3], Josiane Demignon[1,2,3], Fabien Le Grand[5], Vincent Mouly[5], Shahragim Tajbakhsh[4], Athanassia Sotiropoulos[1,2,3], Pascal Maire[1,2,3,*]

1. Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France
2. CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France
3. Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France
4. Institut Pasteur, Paris, France
5. Institut de Myologie, Paris, France

* Corresponding author:

Pascal Maire

24 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris, France

Telephone number: +33 1 44 41 24 13

Fax number: +33 1 44 41 24 21

Email address: pascal.maire@inserm.fr

Abstract

PAX7+ cells are essential for myogenesis in developing muscle and during adult muscle regeneration where they are also called satellite cells. At the basal state, adult satellite cells are located in a niche between the plasma membrane of a myofiber and the basal lamina surrounding it. This environment is required to maintain satellite cell quiescence at the basal state and assure their maintenance. This niche location is acquired prenatally during fetal myogenesis. SIX homeoproteins are encoded by the *Sine oculis homeobox related* genes *Six1* to *Six6* in vertebrates among which *Six1*, *Six2*, *Six4* and *Six5* are known to be expressed in muscle lineage. In this study, we report that in *Six1*:*Six4* double KO (s1s4KO) mouse fetuses, the homing of PAX7+ cells into their niche is perturbed during fetal myogenesis. Transcriptomic analysis, transplantation experiments and *in vitro* studies allowed us to conclude that homing of PAX7+ cells into their niche during fetal myogenesis requires an adequate environment provided by the combination of myofiber and PAX7+ cell properties. Transplantation experiments also confirmed that *Six1* and *Six4* are required for proper myofiber reinnervation after injury and establishment of myofiber fast phenotype. In addition, we showed that muscles transplanted with fetal s1s4KO PAX7+ cells after injury are composed of numerous tiny myofibers. We could then link this phenotype to s1s4KO cell behavior observed *in vitro* with abnormal fusion. *Six1* and *Six4* are therefore required for the establishment of a proper environment allowing myofiber maturation and PAX7+ cell homing during fetal myogenesis, and myofiber growth and reinnervation after injury.

Introduction

Satellite cells (SCs) are muscle stem cells responsible for adult skeletal muscle regeneration ((Mauro, 1961) and reviewed in (Yin et al., 2013)). These cells derive from PAX7+ progenitor cells also responsible for skeletal muscle growth during fetal and post natal myogenesis (Lepper and Fan, 2010). They require Notch signaling to maintain their progenitor properties and their pool to adulthood (Mourikis et al., 2012a), but also to find the way to their niche in mouse fetus (Bröhl et al., 2012). Indeed, adult SCs are located in a specialized environment, the so-called satellite cell niche, between plasma membrane of a differentiated myofiber and the basal lamina surrounding it (Mauro, 1961). In this niche SCs are protected from the outside environment allowing them to maintain their stemness (reviewed in (Yin et al., 2013)). The positioning of SCs in this niche happens during fetal myogenesis; at birth, most PAX7+ cells are located under the basal lamina (Relaix et al., 2005; Bröhl et al., 2012). Although the timing of PAX7+ cells homing into their niche has been described, several cellular and molecular cues involved in this process remain to be clearly identified. The six *Sine oculis homeobox related* (*six*) genes encode for the transcription factors SIX1 to SIX6 in vertebrates. *Six1*, *Six4* and *Six5* are expressed in SCs where *Six1* and *Six4* control myogenic regulatory factor (MRF) gene expression which in turn directs SCs to the differentiation fate (Yajima et al., 2010; Pallafacchina et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Liu et al., 2013; Chakroun et al., 2015; Yajima and Kawakami, 2016; Sakakibara et al., 2016). The total knock-out (KO) of *Six1* and *Six4* in mice (s1s4KO mice) results in a total abrogation of hypaxial myogenesis leading to an absence of ventral musculature including limb and intercostal muscles, tongue and diaphragm; s1s4KO mice die perinatally. S1s4KO fetus still have remaining back muscles that are reduced in size; however their craniofacial muscles seem unaffected (Grifone et al., 2005).

In this study, we analyzed the PAX7+ cell population present in remaining back muscles of s1s4KO fetus and observed that the absence of *Six1* and *Six4* does not affect PAX7+ cell genesis but has an effect on their correct location. Indeed, instead of being under the basal lamina like wild-type (WT) PAX7+ cells, most s1s4KO PAX7+ cells are still in the interstitial space in E18.5 back muscles. To identify the downstream targets of *Six1* and *Six4* whose misregulation may be involved in this homing deficiency we performed a transcriptomic analysis of WT and s1s4KO PAX7+ cells and total muscle at two stages of development. We identified genes encoding extracellular matrix (ECM) proteins, secreted chemoattractant molecules and sarcomeric proteins; misregulated expression was observed either in FACS-sorted PAX7+ cells and/or s1s4KO fetus myofibers. Upon transplantation into injured adult

Tibialis anterior (TA) muscles devoid of endogenous SCs, fetal s1s4KO PAX7+ cells participate to the regeneration of the host muscle, self-renew like WT cells and are found in their normal location; however, they only form atrophic and denervated myofibers expressing slow type myosin heavy chain. *In vitro* experiments confirmed the *in vivo* data allowing us to conclude that *Six1* and *Six4* are required for myofibers and PAX7+ cells maturation and to produce an adequate environment allowing PAX7+ cell homing.

Results

SIX1 and SIX2 homeoproteins are expressed in a sub-population of PAX7+ cells during fetal myogenesis but do not interfere with their proliferation nor differentiation status.

We and others have already reported that *Six1* gene is expressed in myogenic territories during embryonic and fetal development as well as in adult muscle fibers (Oliver et al., 1995b; Laclef et al., 2003a) and their associated stem cells, the so-called satellite cells (SCs) (Le Grand et al., 2012; Yajima et al., 2010; Liu et al., 2013; Sakakibara et al., 2016). To analyse the expression of SIX homeoproteins in the PAX7+ cell population during fetal myogenesis and test for the potential involvement of SIX proteins in the control of this cell population behavior co-immunostaining where performed. We observed that half of the PAX7+ cell population expresses SIX1 at the beginning (E14.5) and the end (E18.5) of mouse fetal myogenesis (Figures 1A-C), showing a constant expression of *Six1* in this cell population. By contrast, almost all PAX7+ cells are positive for SIX2 at E14.5 and around 60% at E18.5 (Figure 1D-F) indicating a less stable *Six2* expression during fetal myogenesis in PAX7+ cells. It has been shown that the PAX7+ cell population is composed of at least two populations in regard of *Pax7* expression, $Pax7^{high}$ and $Pax7^{low}$ populations that differ in their stemness properties (Rocheteau et al., 2012). Thus, we investigated if the PAX7+SIX1+ and PAX7+SIX1- cells had the same proliferation or differentiation potential and observed that both populations behave in the same way (Figure 1G-J). Around 70% of PAX7+ cells are KI67+ independently of SIX1 accumulation and almost all PAX7+ cells are MYOG- regardless of SIX1 expression (Figure 1G-J). Therefore, we concluded that *Six1* and *Six2* expression is active in PAX7+ cell population during fetal myogenesis; SIX1 expression is restricted to a sub-population of PAX7+ cells; and this segregation has no impact on proliferation and myogenic differentiation of fetal PAX7+ cells.

SIX1 and SIX4 proteins are required for PAX7+ cell homing during fetal myogenesis.

Six1 and *Six4* expression patterns are very similar during embryogenesis, and their proteins are able to bind to the same DNA sequence on their target genes; property they also share

with *Six5* (Ozaki et al., 2001b). These 3 genes have been shown to be expressed in adult PAX7+ cells (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Yajima and Kawakami, 2016; Sakakibara et al., 2016; Pallafacchina et al., 2010; Liu et al., 2013) and we have shown that mouse embryos mutant for *Six1* and *Six4* have a stronger myogenic phenotype than simple *Six1* or *Six4* mutants (Grifone et al., 2005; Ozaki et al., 2001a). In fact, *Six1Six4* double knock-out (*s1s4*KO) mice have no ventral musculature showing that these two genes are essential for hypaxial myogenesis during embryogenesis. By contrast, back and cranio-facial muscles, although reduced in size, are formed in s1s4KO fetus (Grifone et al., 2005). We wondered if the absence of *Six1* and *Six4* could modify fetal PAX7+ cell population in the remaining back muscles of s1s4KO fetus; no modification was observed in the number of PAX7+ cells/μm^2 neither in E14.5 nor E18.5 back muscles (Figure 2A-B). The homing process of PAX7+ cells from interstitial space to their niche – between myofiber plasma membrane and basal lamina – takes place during mouse embryogenesis, between E14.5 and birth (Relaix et al., 2005; Bröhl et al., 2012; Kassar-Duchossoy et al., 2005). To test the hypothesis that *Six1* and *Six4* genes could participate to this process, we analyzed the location of PAX7+ cell population relative to the basal lamina (Laminin immunostaining) during fetal myognesis in WT and s1s4KO fetuses. We observed that all PAX7+ cells are located in the interstitial space at E14.5, 40% at E16.5 and only 20% of the PAX7+ cell population remained in the interstitial space at E18.5 in WT fetuses. This suggests that PAX7+ cell homing is a dynamic and gradual process happening during fetal myogenesis. In s1s4KO fetuses, we observed a decrease in interstitial PAX7+ cell number between E14.5 and E18.5; at E18.5, 65% of the PAX7+ cells are still located in the interstitial space (Figure 2A,C). Although some s1s4KO PAX7+ cells are able to find a way to their niche, the homing process is perturbed for the majority of PAX7+ cells in s1s4KO back muscles. To check if this location impairment has an effect on PAX7+ cell differentiation, we analyzed the behaviour of MYOG+ cells. In WT conditions, 20% of MYOG+ cells are located in the interstitial space at E14.5, and 80% are under the basal lamina. This indicates that at E14.5, most myogenic cell differentiation takes place under the basal lamina, where PAX7+ cells are absent. This also suggests that, in the interstitial space, PAX7+ cells are able to commit to myogenic differentiation. At E18.5, 10% of MYOG+ cells are located in the interstitial space. No major difference was observed neither in the percentage of interstitial MYOG+ cells nor in the number of MYOG+ cells/μm^2 in back muscles of s1s4KO at E14.5 and E18.5 (Figures 2D-F). Furthermore, we observed no difference in the percentage of PAX7+KI67+ and PAX7+BrdU+ cells in s1s4KO fetuses, this excludes a potential proliferation deficiency in

PAX7+ mutant cells (Figure 2G-I). These data suggest that SIX1 and SIX4 homeoproteins are required for a proper homing of fetal PAX7+ cells; also, the impairment of PAX7+ cell location observed in s1s4KO does not affect their proliferation or myogenic differentiation. We observed no PAX7+ cells homing deficiency in remaining back and limb muscles in E18.5 s1KO and s5KO. Homing deficiency was not worsened in s1s4s5KO back muscles, indicating that the homing phenotype is specific to s1s4KO back muscles (Supplemental Figure 1).

Genes coding for sarcomeric, extra-cellular matrix and secreted proteins are misregulated in whole back muscles and their associated PAX7+ cells in s1s4KO.

To better understand the PAX7+ cells homing phenotype observed in s1s4KO fetuses, we performed a transcriptomic analysis of mRNAs. Messenger RNA were extracted from FACS-sorted Pax7-nGFP+ cells and whole back muscles, when the homing process just starts (E15.5) and just before birth (E18.5) in WT and *s1s4*KO fetuses (Figure 3A). We first looked for genes with a dynamic expression pattern between E15.5 and E18.5 in WT conditions; and then for genes with a dynamic expression perturbed in s1s4KO. Affymetrix data were confirmed by RT-qPCR experiments. We observed that the expression levels of *Pax3*, *Myf5*, *MyoD* and *Myogenin,* two well-known SIX targets, were not modified in s1s4KO Pax7-nGFP+ cells; this is in agreement with our immunostaining data concerning *Myogenin*. We also observed that the absence of *Six1* and *Six4* was not compensated by an upregulation of *Six2* or *Six5* expression and did not affect *Pax7* expression level. In Pax7-nGFP+ cells, the *Integrin-α4,* involved in the contact between myoblasts and myofibers (Rosen et al., 1992), is expressed in WT cells at E15.5 but not in s1s4KO cells. The expression of *Mmp2*, involved in extra-cellular matrix (ECM) degradation, is strongly increased in WT cells between E15.5 and E18.5 but not expressed in s1s4KO cells. The receptor Cxcr7 and the ECM molecules *Fibulin5, Hemicentin2* and *Mgp* are also up-regulated during fetal WT myogenesis but not in the s1s4KO cells. In whole back muscles, *Gjd4* and *Talin* encoding plasma membrane proteins are up-regulated in WT conditions but not in s1s4KO back muscles, whereas the membrane protein Doublecortin encoding gene (*Dcx*) is strongly up-regulated in s1s4KO conditions. S1s4KO back muscles secrete also more Ephrin ligands, repulsive molecules, and produce less Fibronectin (decreased expression of *Fsd2*) and less Tenascin-C (decreased expression of *TnC*) ECM proteins. Finally, we also observed an increased expression of the genes encoding the secreted molecules CXCL12 (SDF1) and CXCL14 in s1s4KO muscles. We also compared our Affymetrix data with those published by Biressi *et al.*; they compared gene expression between embryonic (E11.5) and fetal (E16.5) myoblasts or myotubes (Biressi

et al., 2007b) and identified embryonic and fetal markers. Table 1 shows the fold-changes (FC) and p-values obtained by comparing the expression of genes identified by Biressi *et al.* with our data in WT and s1s4KO Pax7-nGFP+ cells at E18.5 vs E15.5, then in s1s4KO vs WT at E15.5 and E18.5. Most fetal genes (Biressi FC > 1.5) are up-regulated in E18.5 WT Pax7-nGFP+ cells compared to E15.5 suggesting that their expression continues to be dynamic during fetal myogenesis. Most of them are less up-regulated in E18.5 s1s4KO than in WT Pax7-nGFP+ cells. However, fetal genes are usually not down-regulated and embryonic genes not up-regulated in s1s4KO Pax7-nGFP+ cells suggesting a maturation delay in mutant Pax7-nGFP+ cells (Table 1). A similar comparison has been done with whole back muscles (our data) and myotubes (Biressi et al.) and is summarized in Table 2. Most fetal genes (Biressi FC > 1.5) are down-regulated in E15.5 and/or E18.5 s1s4KO back muscles; this also suggests a maturation delay of s1s4KO myofibers (Table 2). We also compared our Affymetrix transcriptomic data with those published by Bröhl *et al.* in 2012; they reported a PAX3+ cells homing deficiency in a mouse model with altered Notch signaling pathway. Unexpectedly, only three genes down-regulated in the Bröhl study are also down-regulated in our s1s4KO PAX7+ cells (*Hmcn2*, *Lrn* and *Msc*) suggesting that other pathways than the Notch one are deficient in s1s4KO PAX7+ cells; signaling pathways potentially involved in the homing process (Table 3). Finally, we compared our transcriptomic data with Tierney *et al.* GSEA results comparing fetal (E16.5) and adult (2 month-old) myogenic cells. In this study, they characterized some genes specifically expressed in fetal cells that might participate to better engraftment of PAX7+ cells in an adult muscle regeneration paradigm. We observed that some of these fetal genes, mostly encoding extracellular matrix proteins like *Elastin*, *Col15a1*, *Fibrilin1*, *Col5a1*, *Col6a3*, *Col12a1*, *Matrilin2* and *TnC* are more up-regulated during WT fetal myogenesis than in s1s4KO PAX7+ cells. On the other hand, genes encoding proteins like *Col6a2*, *Fibrilin2* and *Fibronectin1* are down-regulated in s1s4KO PAX7+ cells at E18.5; again, these results suggest a disorganization in the maturation process of mutant PAX7+ cells (Table 4). Some studies suggested that PAX7+ cells need to cross the basal lamina to reach their niche (Hughes and Blau, 1990; Alameddine et al., 1991). We thought that metalloproteinases might participate in this process and that a decreased *Mmp2* expression in s1s4KO PAX7+ cells could participate to their homing deficiency. To test this hypothesis, we investigated PAX7+ cell location in E18.5 Mmp2KO back muscles but observed the same number of PAX7+ cells/μm^2 and percentage of interstitial PAX7+ cells than in WT conditions. These results indicate that MMP2 alone is not required for PAX7+ cells homing during fetal myogenesis

(Supplemental Figure 2A-B). In our study, the most down-regulated gene in s1s4KO whole back muscles is encoding CXCL14 chemokine. This molecule is able to interact with CXCR4 and CXCR7 receptors; this interaction could potentially counteract the CXCR4-SDF1 (also called CXCL12) pathway (Tanegashima et al., 2013b; a) involved in myogenic cell attraction (Vasyutina et al., 2005). Thus, we wanted to investigate PAX7+ cell homing in conditions where the CXCR4-SDF1 pathway is disrupted. We injected a CXCR4/7 blocking molecule, the AMD3100 compound to pregnant females, every day from E14.5 to E18.5 and looked for PAX7+ cell location in relation to the basal lamina (Supplemental Figure 2C). We observed no difference in number of PAX7+ cells/μm^2 and percentage of interstitial PAX7+ between fetuses coming from injected and not injected females (Supplemental Figure 2D-E). We also investigated PAX7+ cell homing in P0 new born animals lacking *Cxcr4* expression in cells expressing *Pax7* or originating from *Pax7*-expressing cells. We observed no deficiency in the homing process of PAX7+ cells under these conditions (Supplemental Figure 2F-G). These results suggest that molecules signaling through CXCR4 are not required for PAX7+ cell homing process, neither in PAX7+ cells nor in myofibers.

The ECM niche is built during fetal myogenesis.

To investigate the timing of establishment of the PAX7+ cell niche during fetal myogenesis we performed confocal images of back muscle transverse sections at beginning (E14.5), middle (E16.5) and end (E18.5) of fetal myogenesis; we investigated Laminin and Fibronectin organisation around myofibers and PAX7+ cells. We observed that the Laminin network is already visible at E14.5 and is getting thicker and clearer with time. At this stage, Fibronectin network is not yet apparent and will only appear at E16.6; it is thicker at E18.5 (Figure 4). Those precise pictures allowed us to confirm that PAX7+ cells are not in contact with myofibers at E14.5 and all lye in the interstitial space. At E16.5, where 50% of PAX7+ cells are already located under the basal lamina in WT muscles, we could catch/find some PAX7+ cells that seemed to be crossing the basal lamina. We were also able to distinguish the reticular lamina from the basal lamina. Indeed, Laminin is mostly located in the basal lamina whereas Fibronectin is part of the reticular lamina (reviewed in (Thomas et al., 2015)). In E16.5 muscles, PAX7+ cells not yet in their niche are located between the basal and the reticular lamina (Figure 4). At E18.5, most PAX7+ cells are located under the basal lamina and the reticular lamina surrounding it (Figure 4).

Homing properties of fetal s1s4KO PAX7+ cells upon transplantation into adult TA muscles.

S1s4KO fetuses die at birth (E19), therefore it is impossible to study the hypothesis of a delayed homing of s1s4KO PAX7+ cells. To bypass this issue we transplanted FACS-sorted s1s4HZ and s1s4KO Pax7-nGFP+ cells into immuno-deficient adult TA muscles after freeze injury. To avoid the competition with endogenous PAX7+ cells, we used *Rag2*$^{-/-}$*γC*$^{-/-}$ *Pax7*$^{DTR/+}$ mice and performed an intra-muscular injection of Diphteriatoxin 5h before injury and transplantation to kill endogenous PAX7+ cells. S1s4KO cells were injected into one TA and the contralateral one was injected with s1s4Heterozygous (s1s4HZ) cells as control. The nls-*LacZ* gene inserted at the *Six1* locus (Laclef et al., 2003a; b) allowed us to track myofibers formed from transplanted cells; *Six1* being expressed in all myonuclei of fast adult muscles (Oliver et al., 1995b; Laclef et al., 2003a; Sakakibara et al., 2016). GFP expressed under the control of the *Pax7* promoter allowed us to track self-renewed Pax7-nGFP+ engrafted cells. Transplanted and injured TA were harvested 30 days post-injury (dpi) (Figure 5A). First, we confirmed the efficiency of the diphteriatoxin injection. Indeed, while the host region of DTA-injected TA were negative for PAX7 staining, the engrafted-part was positive (Figure 5B). SIX1 immunostaining also revealed that s1s4KO engrafted cells only give rise to s1s4KO myofibers; we only detected SIX1 protein in the host region of TA engrafted with s1s4KO cells (Figure 5B). The approximate volume of the graft was similar between s1s4HZ and KO transplanted TA; however, s1s4KO cells formed a higher number of small myofibers compared to control myofibers, as assessed by cross-sectional area (CSA) measurement (Figure 5C-D). Furthermore, while most newly formed control myofibers were fast myofibers (MY32+) with no expression of the slow myosin heavy chain (MYH7), most s1s4KO myofibers were mixed MY32+MYH7+ myofibers (Figure 5D). Because slow myofibers usually have a smaller diameter, we validated that the CSA difference between s1s4HZ and s1s4KO myofibers was not due to their fiber-type (Figure 5C-D). Then, we then assessed the number of self-renewed Pax7-nGFP+ cell and their location in relation to the newly formed myofibers and basal lamina. The number of self-renewed Pax7-nGFP+ cells was slightly reduced in KO-engrafted TA but not significantly. The percentage of interstitial mutant Pax7-nGFP+ cells was increased compare to the percentage of interstitial s1s4HZ Pax7-nGFP+ cells, however it is much lower than the percentage of interstitial PAX7+ cells observed in E18.5 s1s4KO fetuses (Figures 5C-D, 2C). These observations either suggest that the homing process is different during fetal and adult myogenesis, or that PAX7+ cell homing deficiency observed in E18.5 s1s4KO fetuses has been recovered after 30 days of regeneration. We

already published that *Six1* and *Six4* were required to induce the fast program of myofibers (Niro et al., 2010; Richard et al., 2011; Sakakibara et al., 2014; Santolini et al., 2016; Sakakibara et al., 2016) but a proper innervation is also important for the maintenance of fiber type (Whalen et al., 1990), and for myofiber growth (Schiaffino et al., 2013). To determine if the slow atrophic phenotype of s1s4KO newly formed myofibers was only due to the intrinsic absence of *Six1* and *Six4* expression or also to innervation defects, we assessed neuro-muscular junctions (NMJ) on newly formed myofibers. We easily observed α-bungarotoxin accumulation in s1s4HZ engrafted TA (host and graft regions); however, we could not observe α-bungarotoxin accumulation in the graft region of s1s4KO engrafted TA, even though the host region showed α-bungarotoxin accumulation (Figure 5E). Furthermore, while Myogenin expression is usually turned off in adult muscles, it's expression is reinduced upon denervation (Merlie et al., 1994). Thus, we assessed Myogenin expression in transplanted TA and observed numerous Myogenin positive nuclei in the graft region of s1s4KO engrafted TA whereas few were present in the graft region of s1s4HZ engrafted TA (Figure 5E). Finally, we wondered if muscle environment was affected in s1s4KO engrafted TA. We therefore looked for blood vessels and fibronectin deposition and observed that s1s4KO engrafted TA seemed more vascularized and seemed to have more fibronectin filament between their fibers than s1s4HZ engrafted TA (Supplemental Figure 5E). However, this might be related to the increased number of myofibers in s1s4KO engrafted TA. Together, these observations suggest a deficient reinnervation of s1s4KO muscles after cryodamage.

Upon transplantation of Pax7-nGFP+ cells into TA muscles of *Rag2*$^{-/-}$*γC*$^{-/-}$*Pax7*$^{+/+}$ mice (Supplemental Figure 3A), the random contribution of s1s4KO engrafted-Pax7-nGFP+ cells with host-PAX7+ cells induced a high variability in newly formed myofiber phenotype (Supplemental Figure 3). Indeed, some mice showed a high number of slow MYH7+ myofibers (Supplemental Figure 3C) compare to others (Supplemental Figure 3D). Nevertheless, in these conditions, PAX7+GFP+ (engrafted) and PAX7+GFP- (endogenous) cell numbers per myofiber were significantly reduced in s1s4KO engrafted TA compare to *s1s4HZ* condition. This suggests that self-renewal of engrafted and endogenous PAX7+ cells is perturbed, although the percentage of interstitial PAX7+ cells does not seem to be affected (Supplemental Figure 3E). Furthermore, the approximate s1s4KO graft volume is also slightly increased without modification of the CSA of newly formed myofibers, this suggests that when myofibers are not totally knocked-out, s1s4KO PAX7^{+} cells have an increased spreading capacity in the muscle tissue (Supplemental Figure 3B).

***Six1* and *Six4* are dispensable for myogenic differentiation but required for myocyte fusion *in vitro*.**

To better understand the behaviour of s1s4KO PAX7+ cells, we analysed their properties in *in vitro* conditions. First, we tested their proliferation capacity and observed no difference in the percentage of Ki67+, BrdU+ or PH3+ cells between WT and s1s4KO cells kept in proliferation medium (PM), confirming our *in vivo* data (Figure 6A,B). We also tested their adhesion properties on Matrigel and observed the same number of WT and s1s4KO cells attached after 10h and 48h of culture in PM (Figure 6C). WT and s1s4KO primary myoblasts were also imaged in PM for 6h and their random migration did not appear different, excluding major migration defects (Figure 6D). We concluded that in proliferation conditions, WT and s1s4KO PAX7+ cells behave in the same way. Because SIX homeoproteins are known to control MRF expression in hypaxial progenitors, we compared the behaviour of WT and s1s4KO primary myoblast in differentiation medium (DM). After 3 days in DM, we quantified the percentage of nuclei contained in MYH+ cells containing more than one nucleus (fusion index). While 50% of WT nuclei were found in MYH+ cell containing more than one nucleus, we found only 20% in s1s4KO conditions (Figure 6E). This suggests that *Six1* and *Six4* are required for the formation of multinucleated myotubes *in vitro*. Then, we determined the proportion of nuclei in different types of differentiated cells: 1 nucleus, 2 nuclei or more than 2 nuclei MYH+ cells. After 3 days in DM, we found that most WT nuclei are located in more than 2 nuclei-containing MYH+ cells, while most s1s4KO nuclei are found in 1 nucleus-containing MYH+ cells (Figure 6E). This indicates that s1s4KO cells are able to enter the differentiation program, however they have troubles to fuse with other differentiated cells. We also tested the capacity of WT and s1s4KO cells to generate reserve cells in DM. While the percentage of PAX7+ nuclei after 3 days in DM is similar between WT and s1s4KO cultures, the proportion of PAX7+MYOG- cells among all MYH- mononucleated cells is slightly reduced; also, the proportion of PAX7-MYOG- is increased in s1s4KO cultures compared to WT (Figure 6E). This observation suggests that under differentiation conditions, s1s4KO PAX7+ are less able to keep their stemness.

S1s4KO myotubes are less efficient in attracting s1s4KO myoblast.

Finally, we tested directed myoblast migration properties upon attraction (Figure 6F). We observed no difference in the migration of WT and s1s4KO myoblast upon HGF or SDF1 attraction, well-known myoblast attraction factors (Brand-Saberi et al., 1996; Heymann et al., 1996; Vasyutina et al., 2005). Then, we tested migration properties of WT and s1s4KO PAX7+ cells upon attraction with conditioned media (CM) from WT or s1s4KO myotubes.

We observed an increased number of migrated s1s4KO cells upon WT CM attraction. This suggests that in a WT environment, s1s4KO cells are able to respond to an attraction source, confirming our transplantation data with increased spreading properties of s1s4KO PAX7+ cells in WT conditions. In addition, the number of s1s4KO migrating cells is strongly reduced upon incubation in s1s4KO CM suggesting that these conditions are less favorable for cell attraction. Nevertheless, incubation with WT primary myoblasts and s1s4KO CM did not decrease their migration ability (Figure 6F).

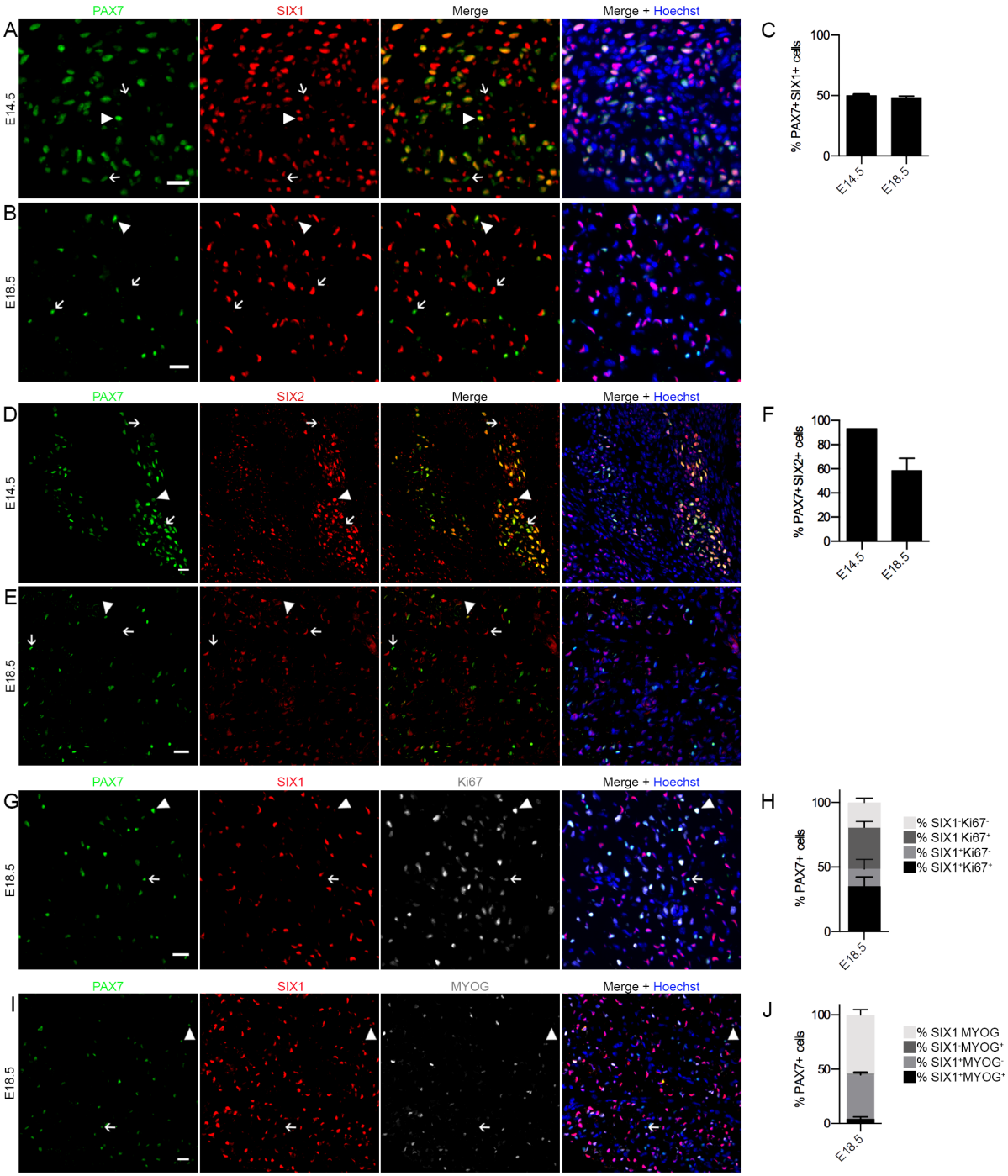


Figure 1 : SIX1 and SIX2 are expressed in the PAX7+ cell population during fetal myogenesis.
Transversal section of E14.5 (A,D) and E18.5 (B,E,G,I) WT embryos/fetuses. A,B : Immunostaining for PAX7 (green), and SIX1 (red) (A) shows PAX7 and SIX1 proteins in back muscles. Arrow heads show a PAX7+SIX1+ cell and arrows show a PAX7+SIX1- and a PAX7-SIX1+ cell. C : Quantification of the percentage of PAX7+SIX1+ cells (E14.5 n=2 and E18.5 n=4). D, E : Immunostaining for PAX7 (green), and SIX2 (red) in back muscles. Arrow heads show a PAX7+SIX2+ cell and arrows show a PAX7+SIX2- and a PAX7-SIX2+ cell. F : Quantification of the percentage of PAX7+SIX2+ cells (E14.5 n=1 and E18.5 n=4). G : Immunostaining for PAX7 (green), SIX1 (red) and Ki67 (grey) in back muscles. Arrow heads show a PAX7+SIX1+Ki67+ cell and arrows show a PAX7+SIX1-Ki67+ cell. H : Quantification of the percentage of SIX1±Ki67± cells within the PAX7+ cell population (n=3). I : Immunostaining for PAX7 (green), SIX1 (red) and MYOG (grey) in back muscles. Arrow heads show a PAX7+SIX1+MYOG- cell and arrows show a PAX7+SIX1-MYOG- cell. J : Quantification of the percentage of SIX1±MYOG± cells within the PAX7+ cell population (n=2). In all panels, Hoechst staining shows nuclei and sb=20µm.

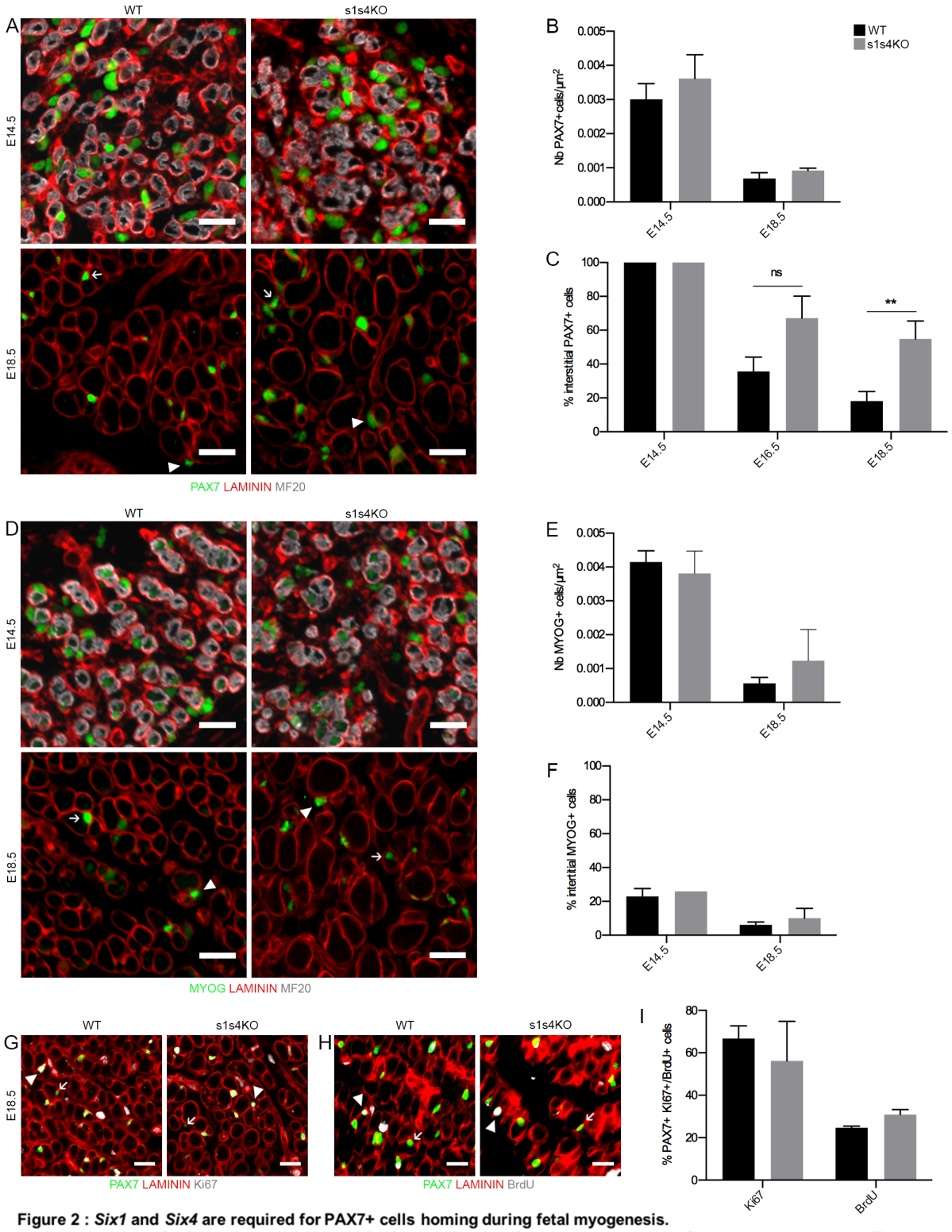


Figure 2 : *Six1* and *Six4* are required for PAX7+ cells homing during fetal myogenesis.
A : Immunostaining for PAX7 (green), LAMININ (red) and MF20 (grey) in the back muscles of transversally sectionned E14.5 and E18.5 WT and s1s4KO fetuses. B,C : Quantification of the number of PAX7+ cells per µm² (E14.5 n=3 and E18.5 n=4) (B) and the percentage of interstitial PAX7+ cells (E16.5 n=3 and E18.5 n=6) (C) in the back muscles of WT and s1s4KO fetuses at E14.5 and E18.5. Mann-Witney significance test (Prisme software) : ** p-value = 0.0022. D : Immunostaining for MYOGENIN (green), LAMININ (red) and MF20 (grey) in the back muscles of transversally sectionned E14.5 and E18.5 WT and s1s4KO fetuses. E,F : Quantification of the number of MYOGENIN+ cells per µm² (E) and the percentage of interstitial MYOGENIN+ cells (F) in the back muscles of WT and s1s4KO fetuses at E14.5 and E18.5 (n=3). A,D : Arrowheads show interstitial PAX7+ cells and arrows show PAX7+ cells under the basal lamina. G,H : Immunostaining for PAX7 (green), LAMININ (red) and Ki67 (G) or BrdU (H) (grey) in the back muscles E18.5 WT and s1s4KO fetuses. Arrow heads show PAX7+Ki67/BrdU+ cells and arrows show a PAX7+ Ki67/BrdU- cells. I : Quantification of the percentage of PAX7+Ki67+ and PAX7+BrdU+ cells in the back muscles of WT and s1s4KO fetuses. In all panels, Hoechst staining shows nuclei and sb=20µm (n=2).

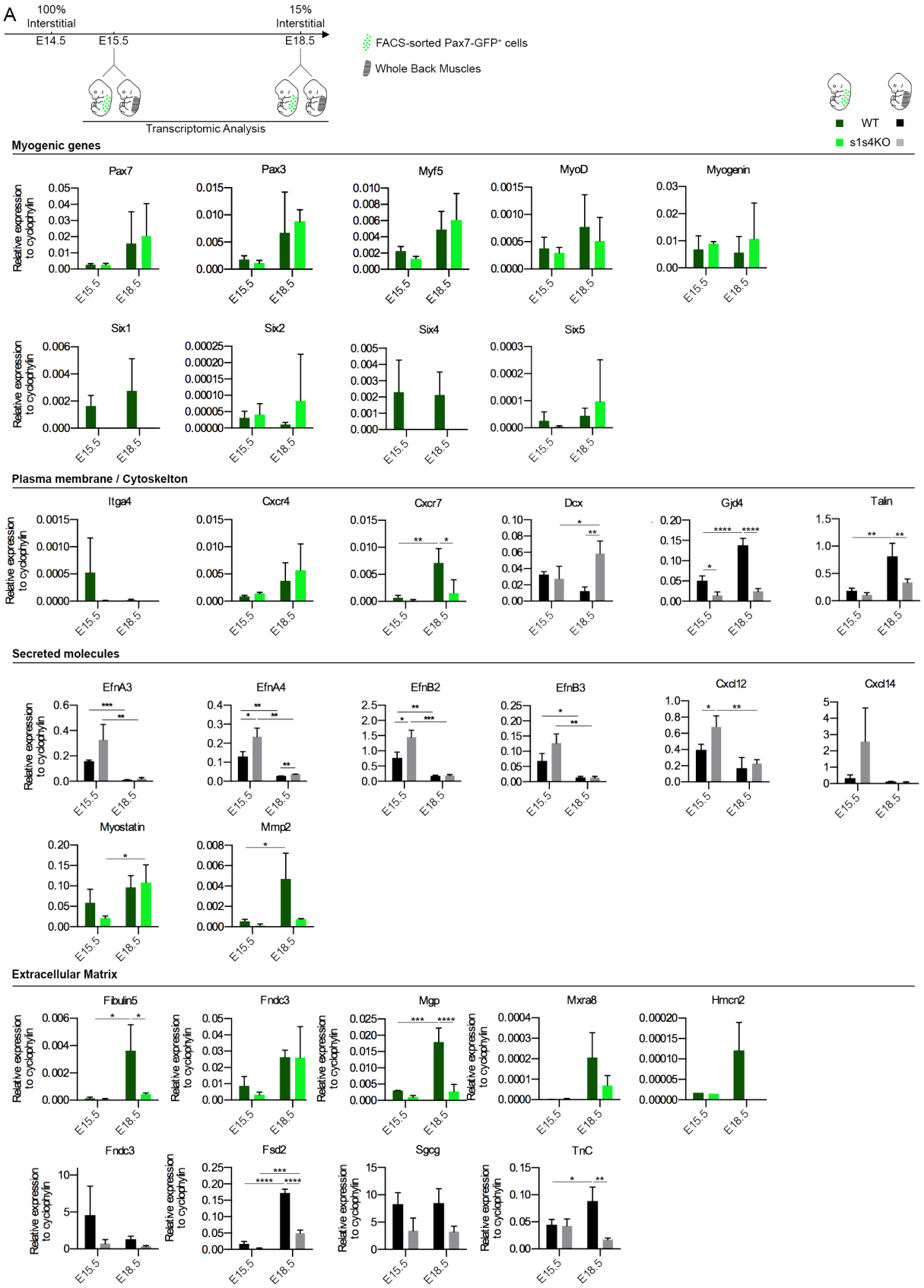


Figure 3 : Some cell structure, ECM and secreted proteins are mis-regulated in s1s4KO PAX7+ cells and whole back muscles.
A : scheme representing the timing of the transcriptomic study. Affymetrix analysis were performed on E15.5 and E18.5 FACS-sorted PAX7+ cells and whole back muscles RNA. Graphs represent RTqPCR validation of target genes expression in PAX7+ cells in WT (dark green) and s1s4KO (light green) and in whole back muscles in WT (black) and s1s4KO (grey) with at list n = 3. Two ways anova significance test (prism software) : * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 ; *** p-value < 0.001 ; **** p-value < 0.0001.

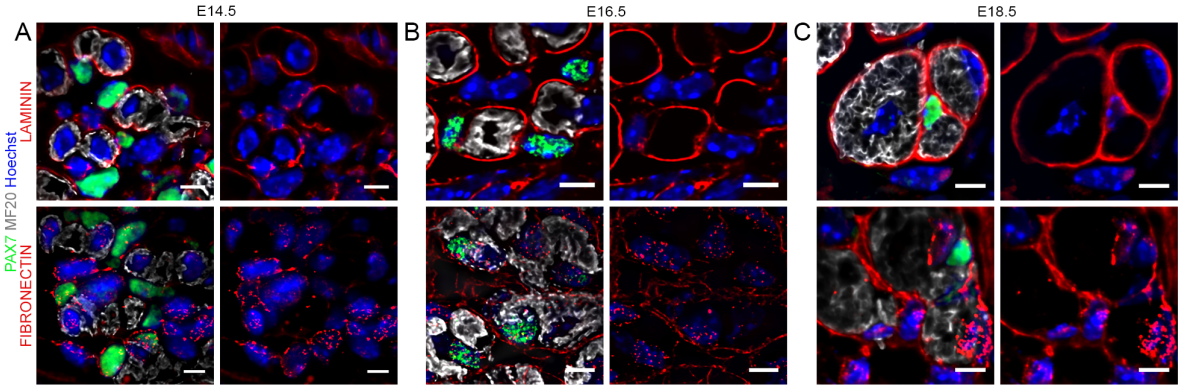


Figure 4 : Characterisation of ECM protein localization using confocal microscopy.

Confocal and Z projected images of E14.5 (A), E16.5 (B) and E18.5 (C) WT back muscles transversal sections immuno-stained with PAX7 (green), LAMININ (red, upper panels) or FIBRONECTIN (red, lower panels) and MF20 (grey) antibodies. On all panels Hoechst (blue) shows nuclei. Sb=5µm.

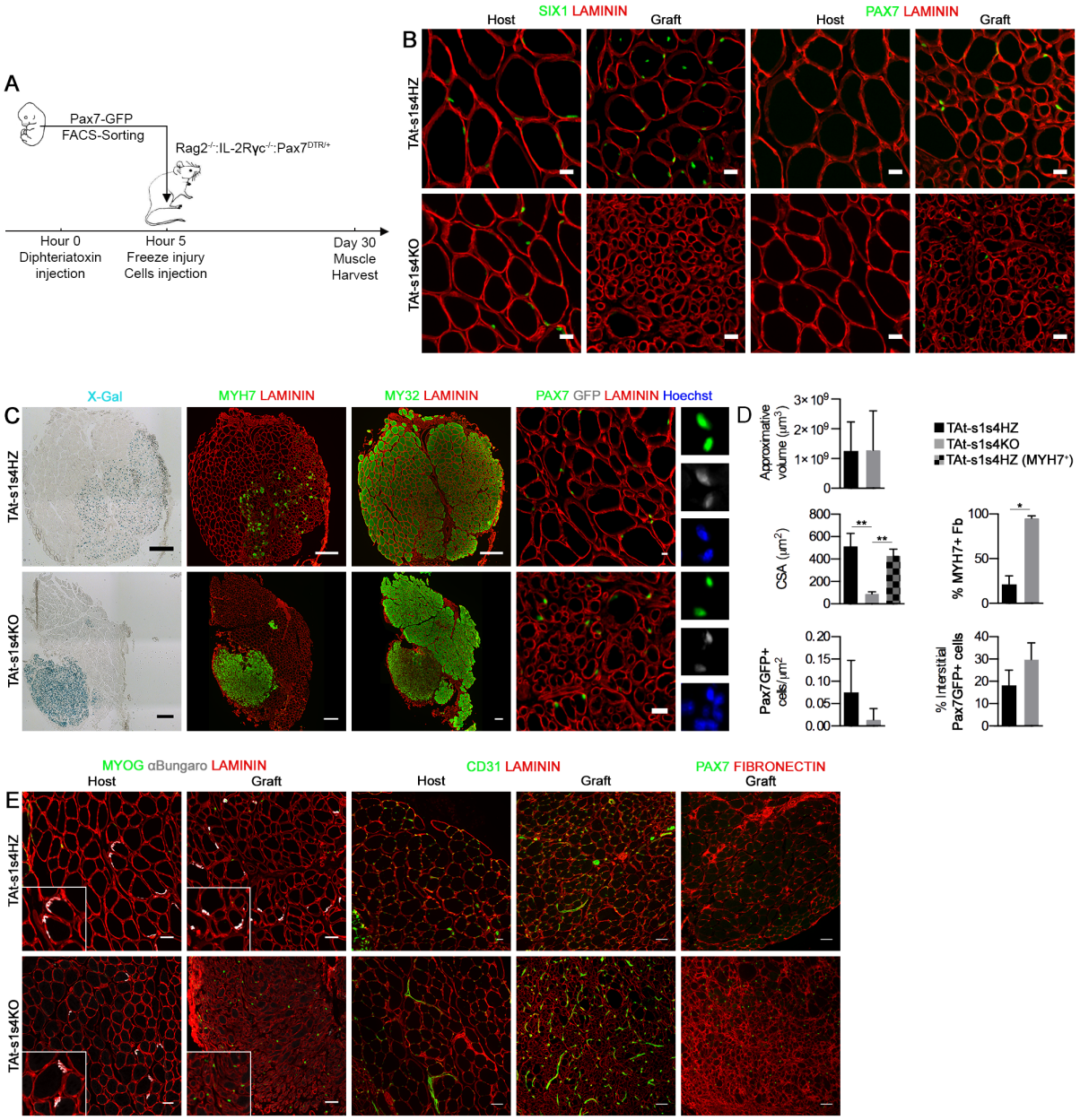


Figure 5 : Homing properties of fetal PAX7+ cells are different upon transplantation into adult muscles.
A : Scheme representing the timing of the transplantation experiments. Briefly, E18.5 s1s4HZ and KO FACS-sorted PAX7+ cells were transplanted into cryodamaged TA muscles of Rag2$^{-/-}$:IL-2Rγc$^{-/-}$:Pax7$^{DTR/+}$ mice, five hours after diphteriatoxin injection. Grafted TA were harvested 30 days after injury/transplantation. B: Immunostaining for SIX1 (green, left panels) or PAX7 (green, right panels) and LAMININ (red) on the host (left panels) and engrafted (right panels) regions of transversal sections of TA muscles transplanted with s1s4HZ (upper panels) or s1s4KO (lower panels) cells ; sb=20µm. C : X-Gal staining and immunostainings for MYH7 (Slow), MY32 (Fast) or PAX7 (green), LAMININ (red), GFP (grey) and Hoechst (blue) of transversal sections of TA muscles transplanted with s1s4HZ (upper panels) or s1s4KO (lower panels) cells ; sb=300µm exept for the zoom right panels where sb=20µm. D : Quantification of the percentage of MYH7+ fibers in the graft area, graft fiber mean cross sectional area (CSA), approximate graft volume, number of Pax7GFP+ cells per graft µm^2 and percentage of interstitial Pax7GFP+ cells in the graft in TA engrafted with s1s4HZ (black) and s1s4KO (grey) cells. The mixed black-and-grey bar represents the mean CSA of MYH7+ fibers in the heterozygous conditions. * = p-value < 0.05 in Mann Whitney significance test, ** = p-value < 0.01 in one way Anova significance test (prism software). E : Immunostainings for MYOGENIN (green) and αBungarotoxin (grey), CD31 (green) or PAX7 (green) and LAMININ (red) on the host (left panels) and engrafted (right panels) regions of transversal sections of TA muscles transplanted with s1s4HZ (upper panels) or s1s4KO (lower panels) cells ; sb=50µm.

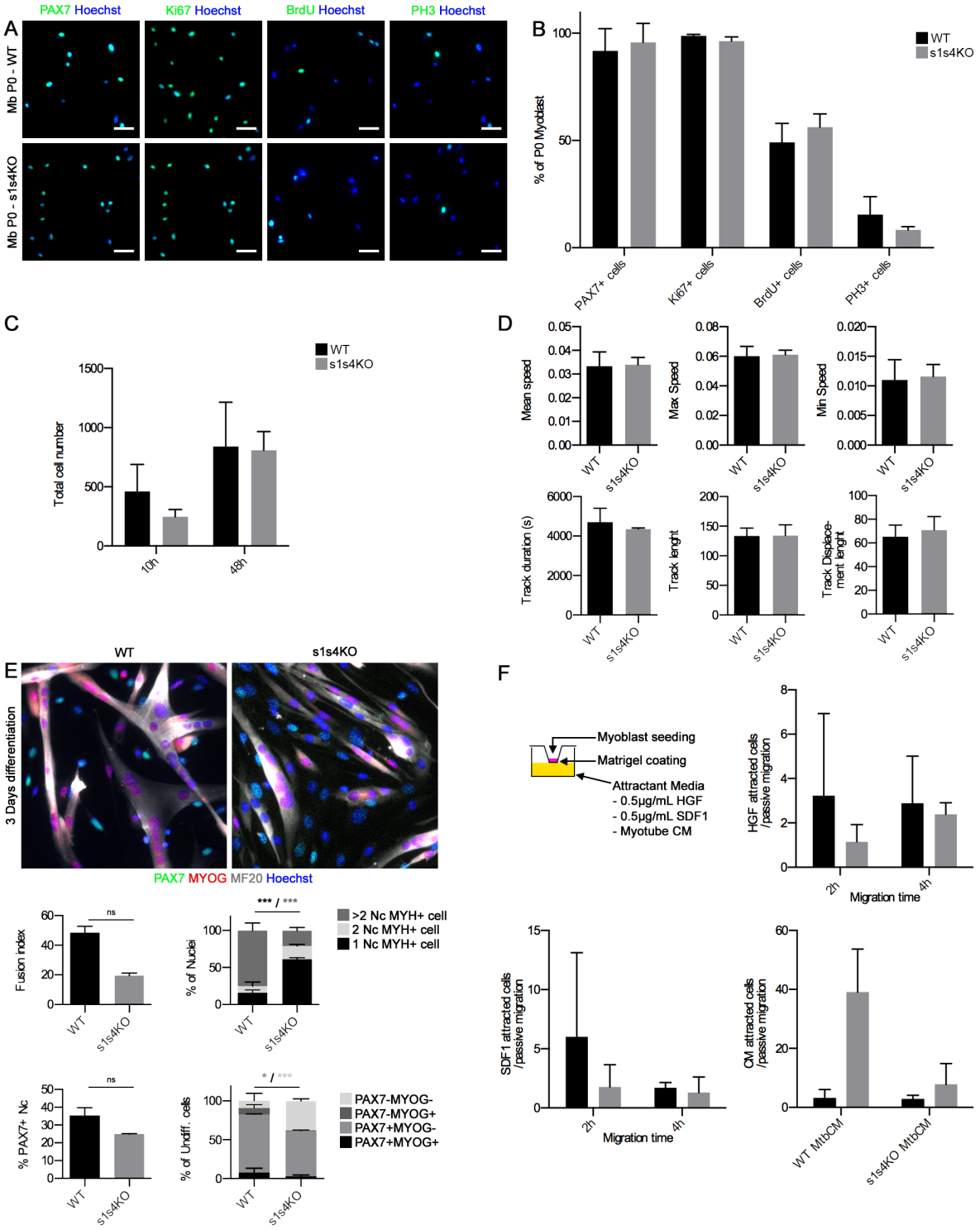


Figure 6 : The absence of *Six1* and *Six4* expression does not perturb myoblast proliferation, impairs their fusion and the attraction properties of myotubes.

A: Immunostaining for PAX7, Ki67, BrdU and Phospho-Histone H3 (PH3) (Green) on freshly isolated (P0) WT (upper panels) and s1s4KO (lower panels) myoblasts cultivated in proliferation medium. Sb=50µm. B : Quantification of the percentage of proliferating PAX7+, Ki67+, BrdU+ or PH3+ WT and s1s4KO myoblasts. C : Quantification of the number of P0 WT and s1s4KO myoblasts that attached to a matrigel coating after 10 hours and 24 hours in proliferation medium. D : Quantification of the mean, maximum and minimum speed and the duration, length and displacement length of the track of WT and s1s4KO myoblast cultivated on Matrigel and in proliferation medium live imaged for 6 hours. E : Immunostaining for PAX7 (green), MYOG (red) and MF20 (grey) on WT and s1s4KO cells after 3 days in differentiation medium and quantification of fusion index, percentage of nuclei in 1 nucleus, 2 or >2 nuclei MYH+ cells, percentage of reserve PAX7+ cells, and percentage of PAX7±MYOG±MYH- mononucleated cells in WT and s1s4KO culture after 3 days in differentiation medium. F : Scheme explaining the transwell migration assay and quantification of the number of WT or s1s4KO myoblasts that migrated upon attraction by chemotactic molecules (HGF and SDF1) or WT and s1s4KO myotube conditioned media normalized per cells that migrated passively.

Table 1 : Comparison of Biressi's Fetal and Embryonic Myoblast transcriptome with E15.5 and E18.5 FACS-sorted Pax7+ cells transcriptome

Title	Gene ID	Biressi	WT 18vs15		s1s4KO 18vs15		E15 s1s4KOvsWT		E18 s1s4KOvsWT		Description
		Fet vs Emb	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	
Transciption factors and signaling											
Pax3	18505	-2.54	1.07972	0.67022	**1.49042**	0.05052	-1.27099	0.20443	1.08607	0.64699	paired box 3
Arx	11878	-2.94	**1.38046**	0.02987	1.10293	0.44617	1.04593	0.72299	-1.19667	0.18022	aristaless related homeobox
Foxc1	17300	-2.23	1.40575	0.24434	1.40051	0.24912	1.50008	0.17296	1.49448	0.17650	forkhead box C1
Foxc2	14234	-1.86	1.20853	0.11795	1.04907	0.66947	1.03746	0.74253	-1.11040	0.36120	forkhead box C2
Smad6	17130	-2.19	-1.10693	0.49169	1.29666	0.10262	-1.22769	0.18375	1.16912	0.29995	SMAD family member 6
Meox1	17285	-4.08	1.35324	0.15464	-1.07292	0.72405	1.11809	0.57790	-1.29858	0.21166	mesenchyme homeobox 1
Meox2	17286	-2.03	1.18571	0.51340	-1.02641	0.91923	-1.11260	0.67972	-1.35406	0.25836	mesenchyme homeobox 2
Mef2c	17260	-2.86	-1.39435	0.33137	-1.79222	0.10709	**2.61251**	0.01741	2.03253	0.05842	myocyte enhancer factor 2C
Mdfi	17240	-2.67	-1.26217	0.05523	-1.03120	0.77489	1.18048	0.14875	**1.44489**	0.00757	MyoD family inhibitor
Nfatc4	73181	-2.05	1.15245	0.48670	-1.17213	0.43801	-1.04510	0.82634	-1.41175	0.11433	nuclear factor of activated T cells. cytoplasmic. calcineurin dependent 4
Tcf15	21407	-2.83	-1.15749	0.41837	-1.00550	0.97526	1.01319	0.94095	1.16634	0.39560	transcription factor 15
Twist1	22160	-2.86	1.29128	0.41994	-1.33463	0.36517	1.75874	0.09725	1.02052	0.94781	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
Uncx4.1	22255	-1.96	-1.27088	0.05709	**1.38004**	0.01748	**-1.40403**	0.01372	1.24917	0.07321	UNC homeobox
Cited1	12705	3.24	-1.39711	0.15079	**-2.11036**	0.00753	1.18260	0.44858	-1.27729	0.27844	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich c-terminal domain 1
Dtx4	207521	2.39	1.17431	0.26838	1.11750	0.43470	-1.10495	0.48116	-1.16112	0.30095	deltex 4 homolog (Drosophila)
Fosb	14282	3.68	**4.92024**	0.00001	**3.64673**	0.00007	1.13093	0.49311	-1.19302	0.33309	FBJ osteosarcoma oncogene B
Jag1	16449	1.82	**1.79507**	0.01669	1.11712	0.58383	1.45827	0.08778	-1.10190	0.63048	jagged 1
Junb	16477	2.61	**4.58230**	0.00214	**2.51081**	0.02742	1.86249	0.10651	1.02052	0.95409	jun B proto-oncogene
Msc	17681	1.99	1.41377	0.12726	1.16521	0.47397	-1.51200	0.07666	**-1.83454**	0.01755	musculin
Notch1	18128	1.94	1.68264	0.08398	1.24006	0.43829	1.31642	0.32776	-1.03075	0.91141	notch 1
Nfia	18027	2.64	**1.76462**	0.00009	1.18847	0.05803	1.18279	0.06385	**-1.25532**	0.01956	nuclear factor I/A
Nfib	18028	2.56	**1.27775**	0.00033	1.01413	0.74045	**1.12636**	0.01960	**-1.11861**	0.02542	nuclear factor I/B
Nfic	18029	2.43	**2.26168**	0.00007	**1.64031**	0.00179	**1.38205**	0.01712	1.00235	0.98320	nuclear factor I/C
Nfix	18032	4.84	**1.95377**	0.00022	**1.46324**	0.00682	1.10598	0.36662	-1.20730	0.11129	nuclear factor I/X
Adhesion and Extracellular matrix proteins											
Cdh11	12552	-2.53	-1.51569	0.45685	-1.72359	0.33605	1.00653	0.99054	-1.12979	0.82431	cadherin 11
Cdh4	12561	-1.81	1.19731	0.16093	-1.16082	0.23661	1.06872	0.58419	-1.30049	0.05421	cadherin 4
Efnb2	13642	-2.26	1.48563	0.41192	1.36300	0.51738	1.16500	0.74700	1.06884	0.88786	ephrin B2
Itga4	16401	-2.34	**-10.33670**	2.11E-07	**-1.78914**	0.00375	**-6.47833**	1.18E-06	-1.12131	0.44972	integrin alpha 4
Itga9	104099	-2.28	**-1.36664**	0.00522	-1.19057	0.06651	**-1.30770**	0.01144	-1.13922	0.15129	integrin alpha 9
Sema3d	108151	-2.86	1.00671	0.95143	**1.34044**	0.02492	-1.05752	0.61339	1.25908	0.06228	semaphorin 3D
Sema4g	26456	-2.53	-1.14558	0.24644	-1.08309	0.48369	-1.08935	0.45371	-1.02992	0.79304	semaphorin 4G
Bgn	12111	2.81	**2.18232**	0.00005	**1.84006**	0.00030	1.10617	0.34567	-1.07217	0.50848	biglycan
Cd34	12490	3.03	**3.14338**	0.00078	**2.31011**	0.00498	1.10088	0.67138	-1.23601	0.36015	CD34 antigen
Cd44	12505	3.47	**2.89570**	0.00052	1.54102	0.05270	**1.77429**	0.01674	-1.05906	0.77071	CD44 antigen
Dcn	13179	1.74	2.48550	0.07577	2.35341	0.09155	-1.14321	0.77200	-1.20737	0.68409	decorin
Eln	13717	2.07	**1.89211**	0.01409	**1.68482**	0.03378	1.07431	0.73436	-1.04536	0.83329	elastin
Fmod	14264	2.26	1.40285	0.10738	1.22073	0.31656	1.10104	0.62011	-1.04374	0.82439	fibromodulin
Itga7	16404	2.86	1.63312	0.09553	1.31481	0.32258	1.26978	0.38448	1.02229	0.93441	integrin alpha 7
Itga8	241226	2.07	**2.73605**	0.00084	**2.13226**	0.00457	1.00074	0.99707	-1.28223	0.23665	integrin alpha 8
Lamb1-1	16777	1.69	1.37042	0.05870	1.20625	0.22620	-1.11378	0.47278	-1.26536	0.13847	laminin B1
Lama4	16775	4.4	1.00941	0.95914	-1.39951	0.09427	-1.04094	0.82646	-1.47051	0.06112	laminin. alpha 4
Lama5	16776	1.84	1.07919	0.73912	-1.24422	0.35177	1.08005	0.73651	-1.24323	0.35343	laminin. alpha 5
Lamc1	226519	2.76	**2.18000**	0.00013	**1.44739**	0.01149	1.07497	0.54145	**-1.40111**	0.01773	laminin. gamma 1
Ltbp3	16998	2.88	**1.49163**	0.00943	-1.02919	0.81317	1.17103	0.21688	-1.31095	0.05056	latent transforming growth factor beta binding protein 3
Ltbp4	108075	2.52	**2.09235**	0.00005	**1.71351**	0.00044	**-1.24475**	0.04830	**-1.51995**	0.00213	latent transforming growth factor beta binding protein 4
Matn2	17181	3.37	**3.60871**	3.19E-07	**3.05351**	9.39E-07	1.02863	0.74409	-1.14893	0.13500	matrilin 2
Mcam	84004	2.67	1.13302	0.65821	1.08895	0.76196	-1.16885	0.58183	-1.21615	0.49215	melanoma cell adhesion molecule
Col1a1	12842	2.39	1.60903	0.24178	1.30646	0.49760	1.04310	0.91346	-1.18070	0.67056	collagen. type I. alpha 1
Col4a1	12826	1.62	**1.52858**	0.01421	**1.37792**	0.04613	1.04979	0.73006	-1.05672	0.69557	collagen. type IV. alpha 1
Col5a1	12831	1.86	**1.85142**	0.00241	**1.63877**	0.00813	-1.20669	0.22027	-1.36328	0.05962	collagen. type V. alpha 1
Col6a1	12833	3.42	1.43973	0.10456	1.22345	0.34075	-1.13966	0.52986	-1.34113	0.17866	collagen. type VI. alpha 1
Col14a1	12818	1.86	-1.16984	0.59600	1.39448	0.27558	-1.77324	0.07856	-1.08700	0.77654	collagen. type XIV. alpha 1
Col15a1	12819	4.82	**3.57932**	0.00009	**2.18359**	0.00223	1.41148	0.08690	-1.16133	0.42185	collagen. type XV. alpha 1
Col16a1	107581	1.88	1.24729	0.10849	1.24681	0.10901	-1.01405	0.91199	-1.01444	0.90960	collagen. type XVI. alpha 1
Tnc	21923	2.02	**2.63969**	0.00000	**1.63296**	0.00028	1.17288	0.08093	**-1.37824**	0.00386	tenascin C
Vcam1	22329	3.32	**2.31334**	0.00373	**2.83165**	0.00103	1.31368	0.22499	1.60802	0.05133	vascular cell adhesion molecule 1
Mgp	17313	3.43	1.40598	0.29026	-1.10736	0.74339	**-2.11422**	0.03763	**-3.29170**	0.00418	matrix Gla protein
Structural and cytoplasmic proteins											
Actn2	11472	-2.47	1.25476	0.55134	1.66752	0.19874	1.29355	0.50064	1.71907	0.17595	actinin alpha 2
Tcap	21393	-2.22	1.08581	0.72410	1.20058	0.44030	-1.03884	0.86980	1.06436	0.78876	titin-cap
Dag1	13138	1.89	**1.88941**	0.00020	**1.59855**	0.00145	1.14336	0.21237	-1.03375	0.74569	dystroglycan 1
Lmna	16905	2.5	**1.96787**	0.00368	**1.51825**	0.03699	**1.54031**	0.03234	1.18838	0.33183	lamin A
Lmnb2	16907	1.9	-1.08147	0.64113	1.18055	0.33471	1.05677	0.74154	1.34921	0.10113	lamin B2
Secreted proteins and receptors											
Ctgf	14219	-2.68	1.37372	0.11011	1.32691	0.14815	1.01160	0.94956	-1.02340	0.89910	connective tissue growth factor
Fgf4	14175	-2.12	1.18662	0.06262	**1.21960**	0.03648	1.00490	0.95226	1.03283	0.69387	fibroblast growth factor 4
Fgf5	14176	-2.68	-1.48306	0.08677	-1.19416	0.40516	-1.27817	0.25886	-1.02919	0.89024	fibroblast growth factor 5
Fgf6	14177	-2.21	1.00004	0.99970	1.15696	0.22276	-1.08470	0.48209	1.06657	0.57511	fibroblast growth factor 6
Fgf9	14180	-2.35	-1.02253	0.92401	1.09433	0.70083	-1.16633	0.51581	-1.04231	0.85928	fibroblast growth factor 9
Fst	14313	-3.49	**1.21114**	0.01137	**1.23519**	0.00694	**-1.14577**	0.04876	-1.12346	0.08221	follistatin
Pdgfra	18595	-1.75	1.34465	0.08251	1.05765	0.71701	1.13524	0.42009	-1.11990	0.46977	platelet derived growth factor receptor. alpha polypeptide
Pdgfrb	18596	-1.61	1.29579	0.25723	-1.16935	0.48242	1.22417	0.36884	-1.23776	0.34467	platelet derived growth factor receptor. beta polypeptide
Pdgfc	54635	-1.83	1.20280	0.46757	-1.50984	0.12724	1.06314	0.80674	-1.70818	0.05795	platelet-derived growth factor. C polypeptide
Erbb2	13866	-1.77	-1.37112	0.18488	-1.49302	0.10268	-1.16014	0.51403	-1.26328	0.31403	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
Tgfbr2	21813	1.68	**1.76596**	0.04050	1.01817	0.94028	1.29171	0.30386	-1.34275	0.24146	transforming growth factor. beta receptor II
Metabolism											
Ldh2	16832	-1.8	-1.54581	0.12012	-1.45498	0.17259	-1.07894	0.76930	-1.01554	0.95241	lactate dehydrogenase B
Ckm	12715	2.41	1.85437	0.09122	**3.82992**	0.00311	-1.07066	0.83726	1.92904	0.07545	creatine kinase. muscle

Genes with p-value > 0.05 are feeld with grey and their respective Fold Change (FC) value is written in bold.

Table 2 : Comparison of Biressi's Fetal and Embryonic Myotube transcriptome with E15.5 and E18.5 Whole back muscle transcriptome

Title	Gene ID	Biressi Fet vs Emb	WT 18vs15 FC	WT 18vs15 P-value	s1s4KO 18vs15 FC	s1s4KO 18vs15 P-value	E15 s1s4KOvsWT FC	E15 s1s4KOvsWT P-value	E18 s1s4KOvsWT FC	E18 s1s4KOvsWT P-value	Description
Transcription factors, Receptors, Signaling and Secreted proteins											
Eya2	14049	-2.87	**-1.30612**	0.00758	1.17885	0.05110	**-1.55550**	0.00034	-1.01024	0.89516	eyes absent 2 homolog (Drosophila)
Foxk1	17425	-1.01	**-1.86150**	0.00007	**-1.91991**	0.00005	1.07450	0.25855	1.04181	0.58251	forkhead box K1
Foxo1	56458	-1.61	**-1.32507**	0.00672	**-1.63039**	0.00041	1.08790	0.22405	-1.13100	0.15696	forkhead box O1
Fst	14313	-2.78	**-1.59367**	0.00180	-1.18751	0.09765	1.10171	0.26288	**1.47853**	0.00656	follistatin
Gdf8	17700	-3.50	2.54460	0.05566	**6.94155**	0.00268	**-5.35998**	0.00313	-1.96484	0.16900	myostatin
Meox1	17285	-1.55	**-2.10743**	0.00115	**-1.84415**	0.00312	-1.19669	0.16933	-1.04719	0.75441	mesenchyme homeobox 1
Meox2	17286	-3.55	**-1.94621**	0.00014	**-1.97408**	0.00013	-1.15924	0.07933	-1.17584	0.10781	mesenchyme homeobox 2
Msx1	17701	-2.60	1.04055	0.51998	**1.27409**	0.00592	-1.08316	0.17572	1.13043	0.10279	msh homeobox 1
Nfatc4	73181	-1.57	**-1.86336**	0.00022	**-3.00640**	0.00001	**1.54135**	0.00087	-1.04677	0.61649	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 4
Pax3	18505	-4.34	**1.83120**	0.00036	**1.90228**	0.00025	-1.03551	0.65767	1.00319	0.97342	paired box 3
Tcf15	21407	-6.18	**1.44721**	0.01325	**1.79059**	0.00155	-1.32593	0.02516	-1.07166	0.57445	transcription factor 15
Mef2c	17260	-1.55	**2.12589**	0.00249	**2.85891**	0.00044	-1.34364	0.07185	1.00087	0.99600	myocyte enhancer factor 2C
Twist1	22160	-3.01	-1.03670	0.81072	**-1.88897**	0.00449	1.58040	0.01202	-1.15293	0.40177	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
Zfp148	22661	-1.07	-1.03843	0.35943	**-1.11874**	0.02555	**1.10774**	0.02371	1.02822	0.52875	zinc finger protein 148
Myf6	17878	1.00	1.62428	0.08490	**11.90540**	0.00004	**-10.44290**	0.00003	-1.42475	0.21877	myogenic factor 6
Lbx1	16814	1.17	**1.46893**	0.02228	**2.41553**	0.00042	**-1.52805**	0.00929	1.07615	0.61332	ladybird homeobox homolog 1 (Drosophila)
PKC-theta	18761	1.28	1.24222	0.15711	**1.76385**	0.00550	**-2.17717**	0.00064	**-1.53331**	0.02705	protein kinase C, theta
Structural and cytoplasmic proteins											
Actn2	11472	-1.81	1.19021	0.40049	**1.75581**	0.02647	**-1.61459**	0.03188	-1.09448	0.68345	actinin alpha 2
Tcap	21393	-1.75	**5.29806**	0.00061	**3.25845**	0.00358	**-2.01915**	0.02172	**-3.28302**	0.00537	titin-cap
Myh7	140781	-3.17	-1.57206	0.19582	1.43557	0.28893	**-2.01978**	0.04477	1.11735	0.75559	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta
Tnnt1	21955	-1.57	**3.14503**	0.00408	**7.76730**	0.00020	**-2.12880**	0.01597	1.16014	0.61306	troponin T1, skeletal, slow
Tnnc1	21924	-1.29	**1.80968**	0.03017	**4.16174**	0.00050	**-2.23419**	0.00521	1.02933	0.90412	troponin C, cardiac/slow skeletal
Tnni1	21952	-1.18	-1.11320	0.63813	**2.04972**	0.01613	-1.42076	0.11981	1.60600	0.09285	troponin I, skeletal, slow 1
MLC1sa	216459	-1.16	-1.73858	0.10793	-1.05781	0.85417	-1.19474	0.52237	1.37567	0.35862	myosin, light polypeptide 6B
Tpm3	59069	-3.06	**4.67599**	0.00001	**7.80531**	1.41E-06	**-2.12087**	0.00024	-1.27056	0.09072	tropomyosin 3, gamma
Myl3	17897	-4.86	**11.09320**	0.00006	**35.89510**	0.00001	**-2.75167**	0.00356	1.17593	0.56671	myosin, light polypeptide 3
Tpm1	22003	-1.37	**4.19777**	7.45E-09	**4.05294**	8.64E-09	**-1.11589**	0.00801	**-1.15577**	0.00568	tropomyosin 1, alpha
Tnni3	21954	4.05	**2.71666**	0.00011	**4.27339**	0.00001	-1.19207	0.12808	1.31958	0.06330	troponin I, cardiac 3
Myl2	17906	4.57	**10.35610**	0.00035	**24.61730**	0.00006	**-1.77423**	0.09430	1.33978	0.43985	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow
Myh8	17885	4.78	**2.45014**	0.01848	**8.80698**	0.00024	**-4.94006**	0.00069	-1.37435	0.33923	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal
Tnnt3	21957	1.24	**2.61480**	0.00588	**10.97450**	0.00005	**-4.78621**	0.00027	-1.14037	0.62152	troponin T3, skeletal, fast
Adhesion and extracellular matrix proteins											
Cdh11	12552	-2.28	**-2.75885**	0.00004	**-4.49180**	4.28E-06	**1.61888**	0.00136	-1.00572	0.95845	cadherin 11
Dystrophin	13405	-1.35	1.88862	0.06567	**3.62094**	0.00390	**-2.45327**	0.01212	-1.27958	0.45665	dystrophin, muscular dystrophy
Itga7	16404	2.04	**-2.21974**	0.00891	1.15512	0.51705	**-1.91009**	0.01358	1.34237	0.24691	integrin alpha 7
Excitability											
Casq1	12372	2.55	**6.39884**	0.00002	**20.57360**	1.39E-06	**-8.94053**	4.80E-06	**-2.78070**	0.00109	calsequestrin 1
Atp2a1	11937	2.17	**2.72301**	0.00797	**3.92570**	0.00178	**-4.69669**	0.00052	**-3.25779**	0.00569	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1
Pvalb	19293	1.83	**12.65100**	0.00023	1.40190	0.33790	1.03646	0.90583	**-8.70675**	0.00089	parvalbumin
Metabolism											
Ldh2	16832	-2.04	**-2.40633**	0.00022	**-1.77999**	0.00206	-1.20702	0.10777	1.12001	0.38865	lactate dehydrogenase B
Ckm	12715	7.17	-1.07536	0.79934	**2.81593**	0.00911	**-4.88622**	0.00064	-1.61361	0.16128	creatine kinase, muscle
Eno3	13808	1.17	1.54569	0.09065	**3.63497**	0.00099	**-2.83666**	0.00168	-1.20623	0.45873	enolase 3, beta muscle

Genes with p-value > 0,05 are feeld with grey and their respective Fold Change (FC) value is written in bold,

Table 3 : Comparison of Bröhl's E17.5 FACS-sorted myogenic cells transcriptome with E15.5 and E18.5 FACS-sorted Pax7+ cells transcriptome

Title	Gene ID	Bröhl FC Rbpj:MyoD dKOvsWT	WT E18vsE15 FC	WT E18vsE15 P-value	s1s4KO E18vsE15 FC	s1s4KO E18vsE15 P-value	E15 s1s4KOvsWT FC	E15 s1s4KOvsWT P-value	E18 s1s4KOvsWT FC	E18 s1s4KOvsWT P-value	Description
Basal lamina assembly											
Col18a1	12822	-1.80	1.18175	0.26993	**1.65631**	0.00717	**-1.83532**	0.00258	-1.30946	0.09201	collagen, type XVIII, alpha 1
Itga7	16404	-4.50	1.63312	0.09553	1.31481	0.32258	1.26978	0.38448	1.02229	0.93441	integrin alpha 7
Sgca	20391	-6.90	1.08248	0.73356	1.50900	0.10463	1.32350	0.24780	**1.84498**	0.02608	sarcoglycan, alpha (dystrophin-associated glycoprotein)
Dag1	13138	-2.60	**1.88941**	0.00020	**1.59855**	0.00145	1.14336	0.21237	-1.03375	0.74569	dystroglycan 1
Cd82	12521	-2.80	1.49113	0.08548	1.32637	0.20300	1.36700	0.16342	1.21595	0.36524	CD82 antigen
Col4a2	12827	-1.90	1.17074	0.42067	1.12214	0.55220	-1.09511	0.63783	-1.14254	0.49347	collagen, type IV, alpha 2
Chodl	246048	-6.40	**2.47140**	0.00084	**2.59229**	0.00061	-1.40735	0.08611	-1.34172	0.13085	chondrolectin
Hmcn2	665700	-13.00	**8.58068**	3.37E-10	**3.34905**	3.22E-08	**1.14742**	0.04708	**-2.23295**	7.78E-07	hemicentin 2
Lrrn1	16979	-3.70	-1.12997	0.57199	**-1.95587**	0.01197	-1.26207	0.29430	**-2.18451**	0.00548	leucine rich repeat protein 1, neuronal
Cell adhesion											
Megf10	70417	-3.10	1.05496	0.73641	-1.01932	0.90386	**1.46518**	0.03760	1.36253	0.07862	multiple EGF-like-domains 10
Odz4	23966	-3.50	1.36803	0.07598	-1.12333	0.47128	1.12171	0.47659	-1.37000	0.07489	teneurin transmembrane protein 4
Gpc1	14733	-1.70	1.21055	0.07064	1.08318	0.40885	1.08207	0.41461	-1.03283	0.73368	glypican 1
Ctnnal1	54366	-2.10	-1.58338	0.09246	**-1.88103**	0.03034	-1.21160	0.44794	-1.43937	0.16847	catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1
Mcam	84004	-1.90	1.13302	0.65821	1.08895	0.76196	-1.16885	0.58183	-1.21615	0.49215	melanoma cell adhesion molecule
Tspan7	21912	-2.10	1.63745	0.19675	1.37225	0.39261	**2.29018**	0.04553	1.91926	0.09969	tetraspanin 7
Notch signaling and targets											
Hey1	15213	-4.70	-1.01265	0.95101	1.20723	0.37013	-1.53606	0.06238	-1.25649	0.28289	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
Heyl	56198	-9.90	1.21871	0.23875	1.39963	0.06241	**-1.46685**	0.03896	-1.27724	0.15392	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like
Dtx4	207521	-2.60	1.17431	0.26838	1.11750	0.43470	-1.10495	0.48116	-1.16112	0.30095	deltex 4 homolog (Drosophila)
Msc	17681	-1.80	1.41377	0.12726	1.16521	0.47397	-1.51200	0.07666	**-1.83454**	0.01755	musculin
Notch1	18128	-2.20	1.68264	0.08398	1.24006	0.43829	1.31642	0.32776	-1.03075	0.91141	notch 1
Notch3	18131	-5.80	1.08541	0.64166	1.28631	0.17571	-1.10671	0.56623	1.07082	0.69699	notch 3

Genes with p-value > 0,05 are feeld with grey and their respective Fold Change (FC) value is written in bold,

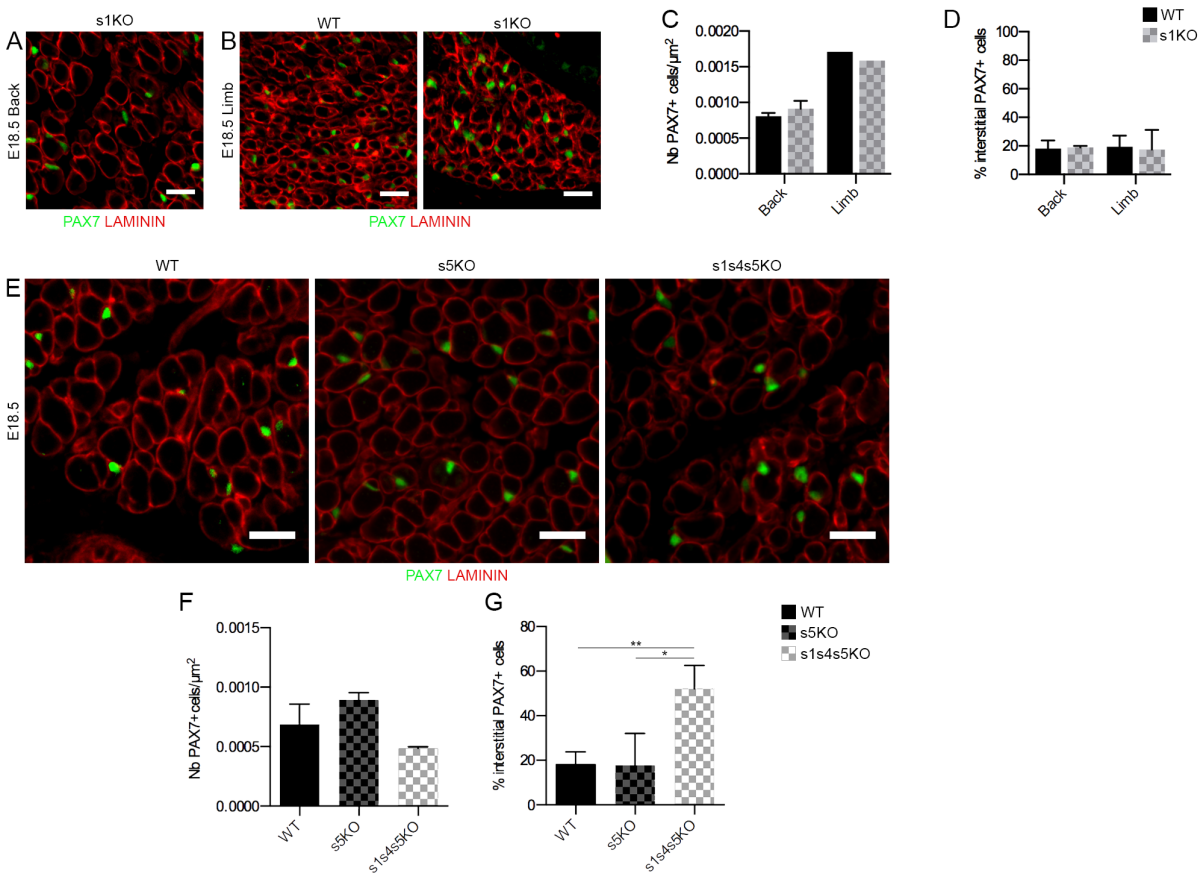
Table 4 : Comparison of Tierney's Fetal and 2 month-old MuSC enrichment after GSEA analysis with an ECM geneset with E15.5 and E18.5 FACS-sorted Pax7+ cells transcriptome

Title	Gene ID	Tierney E16vs2mo		WT E18vsE15		s1s4KO E18vsE15		E15 s1s4KOvsWT		E18 s1s4KOvsWT		Description
		CE	RMS	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	
Prelp	116847	No	-4.10770	**5.73243**	0.00016	**4.47470**	0.00045	1.66176	0.08882	1.29716	0.35023	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
Vtn	22370	No	-3.40913	**1.37050**	0.03953	**1.81014**	0.00170	-1.01184	0.92919	1.30534	0.07146	vitronectin
Lamb2	16779	No	-2.87226	**2.02294**	0.00118	**1.49602**	0.02292	-1.07721	0.61818	**-1.45661**	0.03056	laminin, beta 2 (laminin S)
Lama3	16774	No	-2.77097	1.10689	0.25856	1.09014	0.33157	1.04691	0.59799	1.03106	0.72361	laminin, alpha 3
Reln	19699	No	-2.41160	1.00318	0.96655	-1.10293	0.21915	1.05880	0.45920	-1.04500	0.56575	reelin
Col8a1	12837	No	-2.28161	1.34301	0.51173	1.31293	0.54385	1.68438	0.25939	1.64666	0.27904	collagen, type VIII, alpha 1
Lamc3	23928	No	-2.18854	1.16792	0.12725	-1.00006	0.99950	1.09818	0.33464	-1.06357	0.51836	laminin, gamma 3
Ecm1	13601	No	-2.00843	1.18351	0.46347	-1.00836	0.97059	1.00674	0.97626	-1.18541	0.45937	extracellular matrix protein 1
Dcn	13179	No	-1.74789	2.48550	0.07577	2.35341	0.09155	-1.14321	0.77200	-1.20737	0.68409	decorin
Tnxb	81877	No	-1.64785	**1.55267**	0.00403	1.28535	0.05257	1.05485	0.64155	-1.14516	0.25442	tenascin XB
Chad	12643	No	-1.50437	1.37901	0.06876	1.28547	0.13915	1.32477	0.10317	1.23491	0.20496	chondroadherin
Lamc2	16782	No	-1.42102	**1.55948**	0.00153	**1.58882**	0.00119	1.01486	0.87974	1.03396	0.73280	laminin, gamma 2
Col7a1	12836	No	-1.36595	1.08414	0.47610	1.10991	0.36281	-1.02468	0.82714	-1.00089	0.99362	collagen, type VII, alpha 1
Matn4	17183	No	-1.27855	1.03905	0.65481	-1.07165	0.42600	-1.06213	0.48592	-1.18268	0.07644	matrilin 4
Fmod	14264	No	-1.25038	1.40285	0.10738	1.22073	0.31656	1.10104	0.62011	-1.04374	0.82439	fibromodulin
Spon2	100689	No	-1.15179	1.30929	0.14583	1.30798	0.14714	1.01926	0.91203	1.01823	0.91663	spondin 2, extracellular matrix protein
Ecm2	407800	No	-1.11632	**1.58409**	0.01109	**2.15679**	0.00058	-1.04334	0.76959	1.30498	0.09377	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific
Cav1	12389	No	-0.96509	**11.15270**	0.00007	**4.75136**	0.00123	**2.28925**	0.03203	-1.02534	0.93951	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
Kera	16545	No	-0.75971	1.38242	0.05863	1.04698	0.76268	1.09620	0.54930	-1.20451	0.24101	keratocan
Col4a4	12829	No	-0.68690	1.27376	0.05100	1.10871	0.35671	1.05823	0.60628	-1.08566	0.45844	collagen, type IV, alpha 4
Hmcn1	545370	No	-0.44763	-1.17407	0.06409	-1.09586	0.25554	1.03098	0.69389	1.10455	0.22009	hemicentin 1
Hspg2	15530	No	-0.31004	**2.82336**	2.94E-07	**1.79295**	0.00002	**1.37407**	0.00144	-1.14601	0.07576	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)
Lamc1	226519	No	-0.24388	**2.18000**	0.00013	**1.44739**	0.01149	1.07497	0.54145	**-1.40111**	0.01773	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
Col2a1	12824	No	-0.17758	1.18359	0.46938	1.30457	0.26524	1.34730	0.21609	1.48501	0.11268	collagen, type II, alpha 1
Cav2	12390	No	-0.09104	**3.59249**	0.00005	**1.98575**	0.00294	1.28213	0.16536	-1.41103	0.06733	caveolin 2
Col9a2	12840	No	-0.06199	1.17529	0.32641	1.05543	0.73595	1.10493	0.53647	-1.00781	0.96108	collagen, type IX, alpha 2
Col11a2	12815	No	-0.03469	**1.26058**	0.01506	1.10893	0.20603	1.13854	0.12245	1.00157	0.98386	collagen, type XI, alpha 2
Col5a2	12832	No	0.10017	**2.44599**	0.00001	1.20337	0.08704	**1.68300**	0.00059	-1.20773	0.08206	collagen, type V, alpha 2
Lama2	16773	No	0.13688	**2.69780**	0.00000	**2.27503**	0.00001	1.12325	0.18699	-1.05571	0.51982	laminin, alpha 2 (merosin)
Bgn	12111	No	0.19345	**2.18232**	0.00005	**1.84006**	0.00030	1.10617	0.34567	-1.07217	0.50848	biglycan
Nid2	18074	No	0.21021	**-1.53166**	0.02706	-1.39968	0.06583	1.04218	0.80018	1.14045	0.42931	nidogen 2 (osteonidogen)
Col4a5	12830	No	0.21191	**1.21737**	0.04825	**1.26723**	0.02305	1.10632	0.26584	1.15163	0.13315	collagen, type IV, alpha 5
Lamb3	16780	No	0.29613	1.02043	0.89101	1.16491	0.31688	-1.15307	0.34836	-1.01007	0.94587	laminin, beta 3
Col6a1	12833	No	0.49199	1.43973	0.10456	1.22345	0.34075	-1.13966	0.52986	-1.34113	0.17866	collagen, type VI, alpha 1
Cspg4	121021	No	0.54602	**1.56553**	0.04986	-1.00036	0.99858	-1.06400	0.75760	**-1.66632**	0.03023	chondroitin sulfate proteoglycan 4
Col3a1	12825	No	0.55109	**1.47718**	0.00125	**1.43787**	0.00194	-1.07627	0.38643	-1.10570	0.24586	collagen, type III, alpha 1
Col8a2	329941	No	0.62842	1.24989	0.10440	1.21072	0.15504	1.18650	0.19789	1.14932	0.28621	collagen, type VIII, alpha 2
Spon1	233744	No	0.73424	-1.19305	0.61712	**-2.43878**	0.03034	1.51088	0.25869	-1.35297	0.39911	spondin 1, extracellular matrix protein
Agrn	11603	Yes	0.96843	-1.04846	0.76779	-1.26160	0.17199	1.10228	0.54714	-1.09164	0.58693	Agrin
Col4a1	12826	Yes	0.97973	**1.52858**	0.01421	**1.37792**	0.04613	1.04979	0.73006	-1.05672	0.69557	collagen, type IV, alpha 1
Cav3	12391	Yes	0.98191	-1.24783	0.40516	**-1.81240**	0.04595	1.25779	0.38926	-1.15475	0.58363	caveolin 3
Eln	13717	Yes	1.09147	**1.89211**	0.01409	**1.68482**	0.03378	1.07431	0.73436	-1.04536	0.83329	elastin
Efemp2	58859	Yes	1.17031	-1.04233	0.81212	1.04340	0.80759	1.00198	0.99095	1.08971	0.62442	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
Col15a1	12819	Yes	1.20708	**3.57932**	0.00009	**2.18359**	0.00223	1.41148	0.08690	-1.16133	0.42185	collagen, type XV, alpha 1
Fbln2	14115	Yes	1.30267	1.16637	0.30237	1.22056	0.19126	-1.17471	0.28206	-1.12256	0.43163	fibulin 2
Col16a1	107581	Yes	1.37262	1.24729	0.10849	1.24681	0.10901	-1.01405	0.91199	-1.01444	0.90960	collagen, type XVI, alpha 1
Fbn1	14118	Yes	1.39796	**1.84080**	0.00026	1.03866	0.70982	**1.25510**	0.04971	**-1.41207**	0.00799	fibrillin 1
Col6a2	12834	Yes	1.50093	**1.48250**	0.01892	1.02788	0.84282	-1.24468	0.14169	**-1.79518**	0.00242	collagen, type VI, alpha 2
Col4a2	12827	Yes	1.53588	1.17074	0.42067	1.12214	0.55220	-1.09511	0.63783	-1.14254	0.49347	collagen, type IV, alpha 2
Fbln1	14114	Yes	1.58960	-1.19198	0.23864	1.14214	0.36343	-1.25162	0.14231	1.08772	0.55898	fibulin 1
Lama5	16776	Yes	1.77982	1.07919	0.73912	-1.24422	0.35177	1.08005	0.73651	-1.24323	0.35343	laminin, alpha 5
Col5a1	12831	Yes	1.86021	**1.85142**	0.00241	**1.63877**	0.00813	-1.20669	0.22027	-1.36328	0.05962	collagen, type V, alpha 1
Gpc1	14733	Yes	1.87005	1.21055	0.07064	1.08318	0.40885	1.08207	0.41461	-1.03283	0.73368	glypican 1
Col6a3	12835	Yes	1.95022	**2.81445**	0.01071	1.73233	0.11692	-1.09883	0.77078	-1.78522	0.10093	collagen, type VI, alpha 3
Col1a2	12843	Yes	2.22475	**1.32213**	0.03262	1.14403	0.24898	-1.00193	0.98621	-1.15790	0.21256	collagen, type I, alpha 2
Fbn2	14119	Yes	2.24110	-1.13999	0.54865	**-2.13767**	0.00668	1.01940	0.92908	**-1.83947**	0.01950	fibrillin 2
Col1a1	12842	Yes	2.31344	1.60903	0.24178	1.30646	0.49760	1.04310	0.91346	-1.18070	0.67056	collagen, type I, alpha 1
Col12a1	12816	Yes	2.34225	**3.04114**	0.00089	**1.76344**	0.03068	1.32514	0.22984	-1.30141	0.25848	collagen, type XII, alpha 1
Matn2	17181	Yes	2.53170	**3.60871**	3.19E-07	**3.05351**	9.39E-07	1.02863	0.74409	-1.14893	0.13500	matrilin 2
Lum	17022	Yes	2.65793	1.65598	0.39059	1.70996	0.36264	1.09897	0.86937	1.13479	0.82571	lumican
Col18a1	12822	Yes	2.75357	1.18175	0.26993	**1.65631**	0.00717	**-1.83532**	0.00258	-1.30946	0.09201	collagen, type XVIII, alpha 1
Fn1	14268	Yes	2.76882	1.05967	0.57438	**-1.42479**	0.00723	-1.13971	0.22305	**-1.72075**	0.00059	fibronectin 1
Vcan	13003	Yes	3.70766	1.18465	0.11693	-1.00981	0.92188	-1.16045	0.16135	**-1.38820**	0.00934	versican
Gpc3	14734	Yes	3.75064	**1.28419**	0.00173	1.03241	0.57274	-1.01429	0.80033	**-1.26164**	0.00267	glypican 3
Tnc	21923	Yes	4.31728	**2.63969**	1.95E-06	**1.63296**	0.00028	1.17288	0.08093	**-1.37824**	0.00386	tenascin C (hexabrachion)

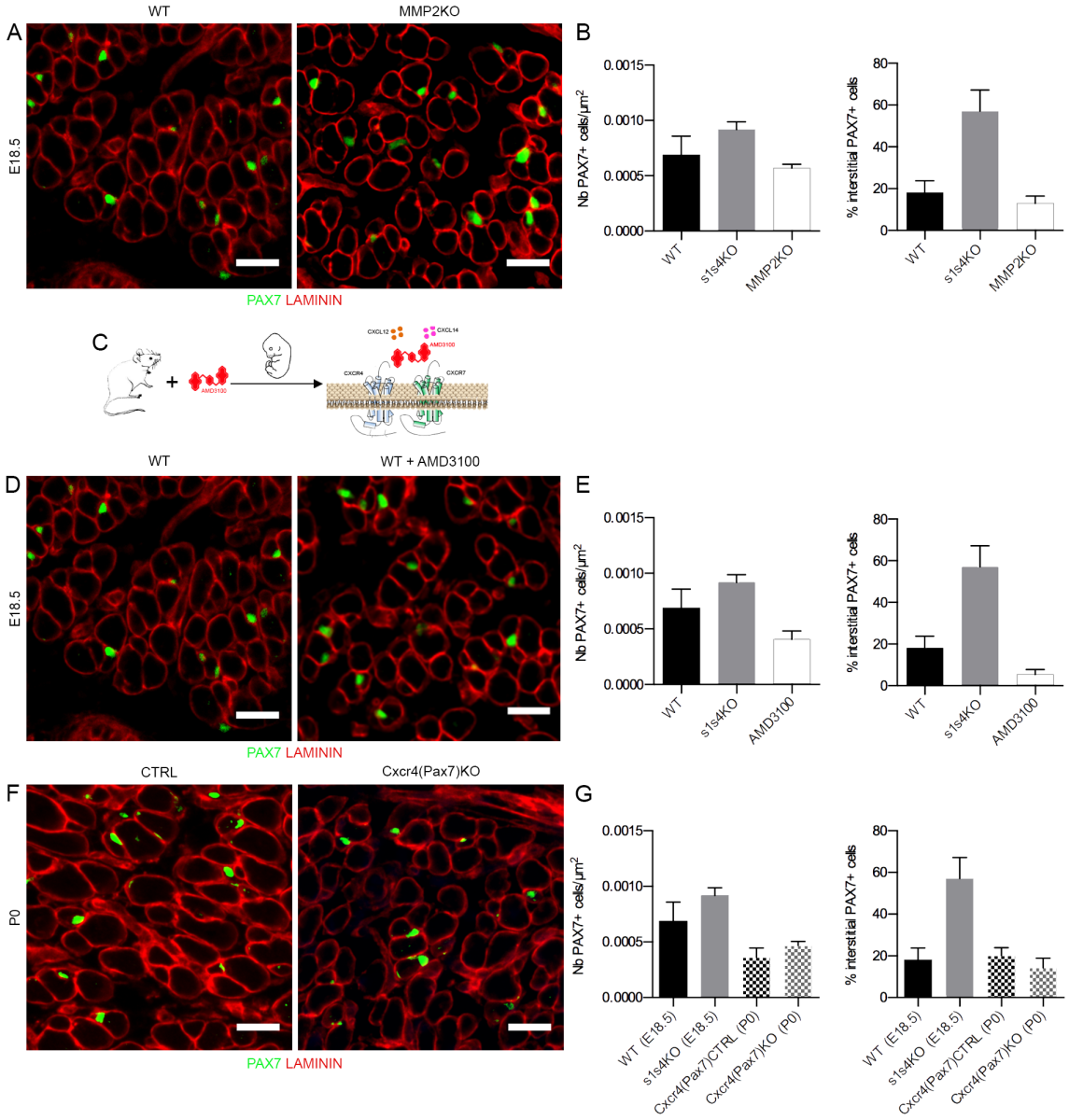
Genes with p-value > 0,05 are feeld with grey and their respective Fold Change (FC) value is written in bold,

CE = Core Enrichment ; RMS = Rank Metric Score (GSEA analysis)

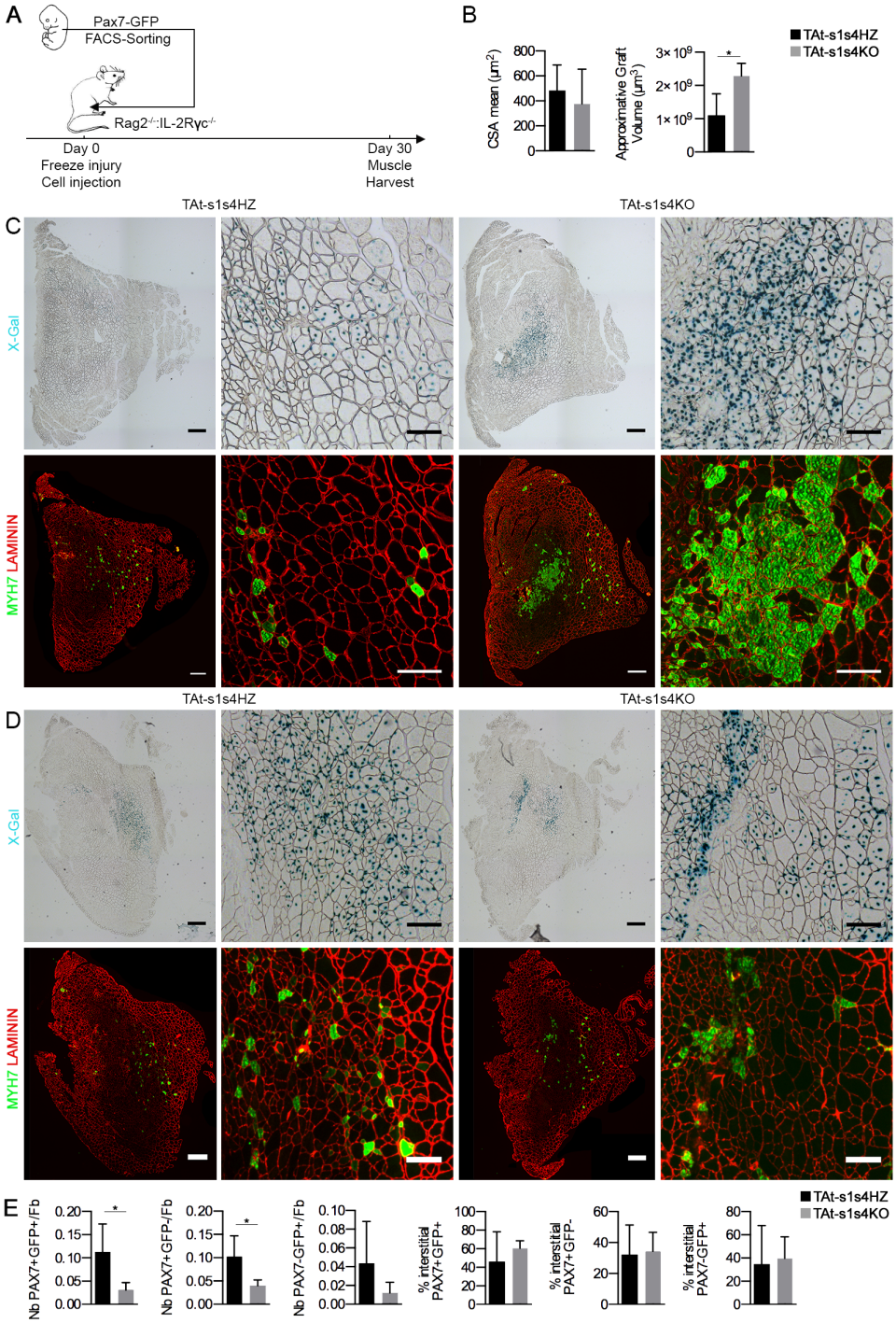
The CE column ingates if the corresponding participates in the enrichment of the pathway between the sample studied (Tierney et al, 2016).



Supplemental Figure 1 : PAX7+ cell homing deficiency is specific of s1s4KO fetuses.
A,B,E : Immunostaining for PAX7 (green) and LAMININ (red) in the back muscles (A, E) and limb muscles (B) of E18.5 WT, s1KO (A,B), s5KO and s1s4s5KO (E) fetuses. C,D,F,G : Quantification of the number of PAX7⁺ cells per µm² (C,F) and the percentage of interstitial PAX7⁺ cells (D,G) in the back (C,D,F,G) and limb (C,D) muscles of WT, s1KO (C,D), s5 and s1s4s5KO (F,G) fetuses. sb=20µm. * = p-value < 0.05 and ** = p-value < 0.01 in one way Anova significance test (prism software).



Supplemental Figure 2 : Neither MMP2 nor CXCR4 are required for PAX7+ cells homing during fetal myogenesis
A : Immunostaining for PAX7 (green) and LAMININ (red) on transversal sections of the back muscles of E18.5 WT and Mmp2KO fetuses. B : Quantification of the number of PAX7+ cells per µm² and the percentage of interstitial PAX7+ cells in the back muscles of E18.5 WT and Mmp2KO fetuses. C : Scheme explaining the protocol used to block CXCR4/7 receptors with AMD3100 compound. D : Immunostaining for PAX7 (green) and LAMININ (red) on transversal sections of the back muscles of E18.5 WT fetuses with our without AMD3100 injection. E : Quantification of the number of PAX7⁺ cells per µm² and the percentage of interstitial PAX7⁺ cells in the back muscles of E18.5 WT fetuses with our without AMD3100 injection. F : Immunostaining for PAX7 (green) and LAMININ (red) on transversal sections of the back muscles of P0 CTRL and *Cxcr4* conditional KO in *Pax7* expressing cells (Cxcr4(Pax7)KO) new borns. B : Quantification of the number of PAX7+ cells per µm² and the percentage of interstitial PAX7+ cells in the back muscles of P0 CTRL and Cxcr4(Pax7)KO new borns. In all panels sb=20 µm.



Supplemental Figure 3 : Collaboration between host and engrafted PAX7+ cells induces variability into regenerated myofibre phenotype.

A : Scheme representing the timing of the transplantation experiments. Briefly, E18.5 s1s4HZ and KO FACS-sorted PAX7+ cells were transplanted into cryodamaged TA muscles of Rag2$^{-/-}$:IL-2Rγc$^{-/-}$ mice. Grafted TA were harvested 30 days after injury/transplantation. B : Quantification of fiber mean cross sectional area (CSA) and approximate graft volume in TA engrafted with s1s4HZ (black) and s1s4KO (grey) cells. C,D : X-Gal staining and immunostainings for MYH7 (Slow) (green) and LAMININ (red) of transversal sections of TA muscles transplanted with s1s4HZ (left panels) or s1s4KO (right panels) cells, the right images of each panel in zoomed into the left images ; whole TA sb=300µm, zoom sb=100µm. C and D represent two different mice. E : Quantification of the number of PAX7+GFP+/PAX7+GFP-/PAX7-GFP+ cells per µm^2 and percentage of interstitial PAX7+GFP+/PAX7+GFP-/PAX7-GFP+ cells in TA engrafted with s1s4HZ (black) and s1s4KO (grey) cells. * = p-value < 0.05 and ** = p-value < 0.01 in Mann Whitney significance test (prism software).

Discussion

In this study, we observed a defect in PAX7+ cell homing in s1s4KO foetuses. Transcriptomic, transplantation and *in vitro* data allowed us to conclude that SIX1 and SIX4 are required in PAX7+ cells and myofibers for the establishment of an adequate environment for PAX7+ cells maturation during fetal myogenesis.

SIX1 expression in PAX7+ cells.

It has been shown that all PAX7+ cells express SIX1 in adult limb muscle (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Chakroun et al., 2015). We observed that SIX1 is only expressed in half of PAX7+ cell population of back muscles from E14.5 to E18.5. This either suggests that during postnatal growth all PAX7+ cells activate *Six1* expression; PAX7+SIX1- cells are all incorporated in growing myofibers; or that limb and epaxial PAX7+ cells are distinct in terms of *Six1* expression. Indeed, it has already been shown that several populations of PAX7+ cells could be distinguished depending on their *Pax7* expression level or metabolism state; properties influencing PAX7+ cell fate (Rocheteau et al., 2012). The implication of *Six1* to this heterogeneity remains to be determined. In mouse, *Six1* and *Six4* control the expression of genes involved in glucose metabolism in adult myofibers; they are also required for the activation of several genes involved in the glycolytic pathway and associated fast type muscle genes (Meng et al., 2013; Sakakibara et al., 2014). Whether this is also true for fetal PAX7+ cells remains to be established; s1s4KO PAX7+ are only able to give rise to myofibers expressing slow Myosin heavy chain *in vitro* and *in vivo* ((Richard et al., 2011), and this study, see below).

PAX7+ cell homing during fetal myogenesis.

It has been shown that PAX7+ cell homing happens during fetal myogenesis (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005); Brohl et al, 2012) but has never been fully characterized. We observed that the homing process was gradual during fetal myogenesis and started from E14.5; at this time all PAX7+ cells are located in the interstitial space of growing muscle masses. Laminin network of the basal lamina is established before Fibronectin network of the reticular lamina; interstitial PAX7+ cells were located in between these two networks at E14.5. Confocal images allowed us to identify PAX7+ cells that seemed to be crossing the basal lamina to enter their niche. Although we did not provide live imaging evidence of PAX7+ cells crossing the basal lamina at this stage, this process has been described *in vivo* during adult muscle regeneration and *in vitro* (Hughes and Blau, 1990; Kowalski et al., 2016; Sacco et al., 2008; Webster et al., 2016; Lafreniere et al., 2006). Importantly, it has been described that secondary myofibers forming during fetal myogenesis

appear under the basal lamina surrounding primary myofibers (Duxson et al., 1989). These data, together with our observations showing that all PAX7+ are located in the interstitial space at E14.5, were also in favor of a migration of PAX7+ cells through the basal lamina during fetal myogenesis.

PAX7+ cell homing deficiency in s1s4KO back muscles.

PAX3+ cell homing deficiency during fetal myogenesis has already been observed in back muscles of mouse embryos in a context of Notch signaling deficiency (Bröhl et al., 2012). Nevertheless, we did not observe misregulation of Notch target genes in our transcriptomic data suggesting that this pathway is not disturbed in s1s4KO fetuses and that s1s4KO PAX7+ cell homing deficiency is not due to an alteration of the Notch pathway. This also suggests that several signaling pathways are involved in the homing process of PAX7+ cells. A comparison of our transcriptomic data with those of other studies on fetal myogenic progenitor cells (Biressi et al., 2007b; Bröhl et al., 2012; Tierney and Sacco, 2016) suggested a delay in maturation of PAX7+ cells and myofibers in absence of *Six1* and *Six4* expression from E15.5. The establishment of a mature phenotype might be required for proper homing of PAX7+ cells. *In vitro*, s1s4KO cells generated less efficiently reserve cells, but produced more MYOG+ cells under differentiation conditions than WT cells; phenotype reminiscent of the one observed in embryonic myoblast compared to fetal myoblast (Biressi et al., 2007b). This observation is also in favour of a delay in maturation of s1s4KO PAX7+ cells.

Myogenesis and fusion deficiency.

We already described the epaxial phenotype of s1s4KO fetuses with hypoplasic back muscle masses (Grifone et al., 2005). E18.5 s1s4KO myofibers did not seem smaller than WT myofibers, suggesting that s1s4KO back muscles were formed with/composed of less myofibers than WT muscles. Muscle phenotype observed after transplantation of fetal s1s4KO PAX7+ cells into an adult muscle was different; fetal s1s4KO PAX7+ formed numerous but very small myofibers compared to WT cells after transplantation. This phenotype should be linked to the fusion deficiency observed in s1s4KO cells *in vitro*. PAX7+ cells used for transplantation and *in vitro* studies were from the same pool of cells and were extracted from E18.5 back muscles, whereas the cells that formed the myofibers present at E18.5 were their ancestors. We hypothesized that *Six1* and *Six4* are required for cell fusion only in late fetal cells, and that fusion occurred normally until E18.5 in KO fetuses, leading to E18.5 myofibers with a correct number of myonuclei. Finally, decreased number of myofibers in back muscles of s1s4KO fetuses is already observed at E13.5 suggesting that it is caused by a deficiency happening earlier than fetal myogenesis (Grifone et al., 2005). *Six4*

is also known to control the Akt/mTor pathway involved in myofiber hypertrophy in adult myofibers (Meng et al., 2013). Therefore, the adult myofiber atrophy observed in fetal s1s4KO PAX7+ muscle/animal 30 days after transplantation could also be the consequence of Akt/mTor signaling deficiency.

Myofiber type establishment and reinnervation.

We and others have already shown that *Six1* and *Six4* are involved in the establishment of the fast/glycolytic phenotype of adult myofibers (Sakakibara et al., 2014; Meng et al., 2013; Grifone et al., 2005; Sakakibara et al., 2016). Our observations were in agreement with these data: after transplantation all s1s4KO myofibers expressed the slow myosin heavy chain (MYH7) even though they were located in a fast muscle (TA). Metabolic properties of those slow myofibers need to be fully established. Innervation of the newly formed s1s4KO myofibers was also altered as suggested by the absence of α-bungarotoxin labelling revealing the absence of AchR clustering and the up-regulation of *Myogenin* expression, as observed in denervated muscles. Recently, it has been shown that slow myofibers of the TA secreted EphrinA3 molecule to repulse fast motoneurons and favor their slow innervation (Stark et al., 2015). Our transcriptomic analysis revealed an increased expression of EphrinA3 by fetal s1s4KO myofiber, themselves not innervated (Richard et al., 2011), leading to the hypothesis that regenerated s1s4KO myofibers in the bed of the TA may repulse fast motoneurons preventing their innervation.

No homing deficiency after transplantation in adult muscles.

Contrary to what was observed in mutant fetuses, 30 days after transplantation of control and s1s4KO fetal PAX7+ cells in cryodamaged adult TA, we found a similar percentage of PAX7+ cells located in the interstitial space of control and s1s4KO grafts, suggesting that mutant cells have no homing deficiency once they are transplanted in adult muscle. Several hypotheses can be envisaged to explain this result. Because we do not know precisely how the homing process takes place during development, or in adult muscle after cryodamage, we propose that in these two situations PAX7+ cell homing process does not rely on the same mechanisms. Another possibility could be that PAX7+ cells transplanted into cryodamaged muscle do not need to go through homing process; they could be directly located under the basal lamina. Indeed, intravital studies performed during muscle regeneration showed remaining ECM structures around damaged myofibres; these structures are called ghost fibers (Webster et al., 2016). If in our transplantation paradigm, transplanted cells are injected directly inside ghost fibers, they might not need to cross a basal lamina. S1s4KO animals dying at birth, we could not investigate if the increased percentage of interstitial PAX7+ cells

observed in mutant fetuses is only due to a delay in the homing process. If so, we might see homing defects at earlier time-points after transplantation of s1s4KO PAX7+ cells in adult TA. Alternatively, all cell types of s1s4KO fetuses might be lacking *Six1* and *Six4* expression while only PAX7+ cells and myofibers were mutants. It would be interesting to investigate if other cell types, such as muscle resident fibroblasts or motoneurons, participate in the homing process during fetal development, either by directly interacting with PAX7+ cells and myofibers, or secreting molecules that reach them. Nevertheless, neither fetal nor transplanted muscles are innervated, and most PAX7+ cells are under the basal lamina after transplantation, suggesting that the absence of innervation does not prevent PAX7+ cell homing. While the contribution of adult muscle regeneration partners, such as endogenous fibroblasts, FAP, endothelial and inflammatory cells, has been well documented, their potential role during fetal PAX+ cell homing remains to be precisely tested by specific cellular ablation. A recent publication reported that 15 days after Barium Chloride ($BaCl_2$) injury no transplanted cells (fetal or adult) were detected in interstitial position (Tierney and Sacco, 2016), whereas we observed a significant number of PAX7+ cells in the interstitial space between newly formed myofibers 30 days after freeze injury. This might be due to the difference in the injury method; ECM might have been destroyed by the cryodamage procedure contrary to the BaCl2 procedure explaining the increase in number of PAX7+ cells observed in the interstitial space. Alternatively, transplanted cells used in both studies were different; we transplanted FACS-sorted PAX7-nGFP$^+$ cells isolated from back muscles whereas Tierney *et al.* used CD45$^-$CD11b$^-$CD31$^-$Sca1$^-$Itga7$^+$CD34$^+$ cells isolated from hindlimb muscles.

S1s4KO myotubes are less efficient in attracting PAX7+ cells.

S1s4KO myoblasts migrated more efficiently in WT myotube conditioned medium (WT-CM) than in s1s4KO-CM. This suggests that s1s4KO myoblasts are able to migrate and cross a barrier or ECM (Matrigel) but only upon correct attraction signals. S1s4KO myotubes were then less efficient in attracting PAX7+ cells than WT myotubes. Of note, WT myoblasts migrated much less than s1s4KO myoblasts and their migration did not seem to be perturbed by s1s4KO-CM. Cells used in this experiment were extracted from E18.5 back muscles. At this stage, most WT PAX7+ cells were located under the basal lamina and might not express the genes allowing cell migration any more, compared to s1s4KO cells which were mostly interstitial and actively trying to find a way for their homing. Although such genes need to be identified, we did not find evidence of up regulation of already genes knonw to be involved in cell migration in E18.5 s1s4KO cells transcriptomic data. This hypothesis would be in

agreement with a maturation delay of s1s4KO cells compared to HZ or WT PAX7+ cells. Finally, it has been shown that Ephrin molecules have repulsive properties on myoblast migration *in vitro* (Stark et al., 2011); therefore, increased EphrinA3 production by s1s4KO myotubes might be responsible for their decreased efficiency in attracting myoblasts.

Methods

Mice and animal care

Animal experimentation was carried out in strict accordance with the European convention STE 123 and the French national charter on the Ethics of Animal Experimentation. Protocols were approved by the Ethical Committee of Animal Experiments of the Institut Cochin, CNRS UMR 8104, INSERM U1016. *Six1*$^{-/-}$ and *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$ mutant and there littermate control fetuses were obtained by crossing *Six1*$^{-/+}$ (Laclef et al., 2003a; b), *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$ (Grifone et al., 2005) two- to four-month old mice respectively; they were backcrossed on C57BL/6N background. *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$ mice were crossed with *Six5*$^{-/-}$ mice (Klesert et al., 2000) to generate *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Six5*$^{-/-}$ and littermate control fetuses. *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Tg:Pax7*$^{GFP/GFP}$ and *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$*Six5*$^{-/-}$*Tg:Pax7*$^{GFP/GFP}$ mutant and there littermate control fetuses were obtained by crossing *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$*Tg:Pax7*$^{GFP/GFP}$ and *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$*Six5*$^{-/-}$*Tg:Pax7*$^{GFP/GFP}$ two- to four-month old mice respectively; they were backcrossed on C57BL/6N and DBA mixte background (Sambasivan et al., 2009). *Mmp2*$^{-/-}$ and littermate control fetuses were kindly given by Dr. T. Nakashiba with the agreement of Dr. S. Itohara (Itoh et al., 1997). Cxcr4$^{lox/lox}$Pax7$^{CRE/+}$ fetuses and their littermate control were kindky given by Dr. C. Birchmeier. Transplantation experiments were performed on two- to four-month old *Rag2*$^{-/-}$*γc*$^{-/-}$ or *Rag2*$^{-/-}$*γc*$^{-/-}$*Pax7*$^{DTR/+}$ mice (Colucci, 1999; Sambasivan et al., 2011b) . When needed, E18.5 pregnant females received 250µL of a 10mg/mL BrdU solution by intraperitoneal (IP) injection and were sacrificed 2 hours after the pulse for fetus harvesting. To block CXCR4/7 signaling, pregnant females received a daily IP injection of 100µL of a 2.5mg/mL AMD3100 (Sigma-Aldrich ref.A5602) solution from E14.5 to E18.5 and were sacrificed at E18.5 for fetus harvesting.

Fetuses preparation

Fetuses were staged, taking the appearance of the vaginal plug as embryonic day (E) 0.5, harvested 14.5, 16.5 and 18.5 days post fertilization, decapitated and their skin was removed (except for E14.5 fetuses). They were fixed in 4% PFA for 15min (E14.5) or 30min (E16.5 and E18.5) at room temperature and kept in 15% sucrose-PBS at 4°C overnight. Then they

were embedded into OCT and snap frozen in isopentane (–30°C) cooled in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. Transversal trunk 10µm cryostat sliced at the heart level were put on superfrost plus glass slides and kept at -80°C until use.

Immunohistochemistry

Fetuses sections were rehydrated in PBS before antigene retrieval treatment in a pH6 citrate buffer solution at 95°C for 15min plus 20min cooling. They were permeabilized in 0.5% triton X100 for 30min and blocked with 0.5% Triton X100 and 5% horse serum for 3h at room temperature. Primary and secondary antibodies were diluted in the blocking solution and incubated on the sections at 4°C overnight and 1h at room temperature respectively. Transplanted TA sections were rehydrated in PBS, permeabilized in 0.5% Triton X-100, blocked in 1.5% BSA, 15% goat serum and 0.5% Triton X-100 and antibodies were diluted in the blocking solution. CD31 immunostainings required a special protocol: sections were permeabilized with cold -20°C acetone for 10min and air dried 10min, then blocked and incubated with antibodies as explained before. SIX1 immunostaining required an amplification step using a biotinylated secondary antibody. Sections were then incubated with streptavidin peroxidase-coupled for 30min and revealed with 488nm tyramide for 10min (ThermoFisher Alexa Fluor™ 488 Signal-Amplification Kit, ref.A11054). Immuno-stained sections were mounted under a coverslip with Dako fluorescent mounting medium before imaging. Images were taken on an Olympus BX63 upright fluorescent microscope, or on a Yokogawa CSU X1 Spinning Disk coupled with a DMI6000B Leica inverted microscope and acquisitions were made with an ORCA-Flash4.0 LT Hamamatsu camera or a CoolSnapHQ2 camera (Photometrics) respectively, with Metamorph 7 software. Primary myoblast were fixed in 4% PFA for 10min and blocked in 0.5% triton X100 and 5% horse serum for 30min at room temperature. Primary and secondary antibodies were diluted in the blocking solution and incubated on the cells for 1h at room temperature. Cells were mounted under a coverslip in Dako fluorescent mounting medium. Pictures were taken on a DMI6000 Leica inverted microscope and acquisition were made with a Coolsnap HQ2 with Metamorph software. See table 1 for antibody references.

FACS isolation

Flow cytometry analysis were performed at the Cochin Flow Cytometry Facility. Mononucleated Pax7-nGFP^{+} cells were isolated from the back musculature of E14.5 and E18.5 fetuses. After removal of the skin, fetuses were eviscerated, hind and forelimbs were removed as well as pelvis, ventral part of the rib cage, spinal cord and brown adipose tissue of the back. Remaining tissues were cut into small pieces with scissors digested three times

15min at 37°C in a 1% trypsin 1% collagenase I DMEM-F12 solution. Digested tissues were filtered on 70µm cell strainers and cells were centrifuged for 30min at 1800rpm. Pelleted cells were filtered on 30µm cell strainers and kept in polypropylene tube on ice until FACS-sorting. GFP^+ cells were sorted with a BD FACSAria III cell sorter thanks to the BD FACSDIVA Software, collected into fetal calf serum, centrifuged at 2000rpm for 10min and washed twice in PBS.

Microarray analysis

Microarray analysis were performed at the Cochin Genomic Facility on RNA extracted from E14.5 and E18.5 FACS-sorted Pax7-$nGFP^+$ cells or whole back muscles. After validation of RNA quality with the Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit), 50 ng (E18.5 whole back muscles), 2 ng (E15.5 FACS-sorted cells and whole back muscles) or 0.21 ng (E18.5 FACS-sorted cells) of total RNA were reverse-transcribed following the Ovation PicoSL or PicoV2 WTA System (Nugen). Briefly, the resulting double-strand cDNA was used for amplification based on SPIA technology. After purification according to Nugen protocol, 5 µg of single strand DNA was used for generation of Sens Target DNA using Ovation Exon Module kit (Nugen). 2.5 µg of Sens Target DNA were fragmented and labelled with biotin using Encore Biotin Module kit (Nugen). After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, the cDNA was then hybridized to GeneChip® Mouse Gene 1.0 or 2.0 ST (Affymetrix) at 45 °C for 17 h. After overnight hybridization, the ChIPs were washed using the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The scanned images were then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for quality controls. Analysis of some of these metrics and the study of the distribution of raw data show no outlier experiment. Robust Multiarray Average (RMA) normalization was performed using R and normalized data were subjected to statistical tests. Data were analyzed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software and the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) application.

RNA extraction and amplification

RNA extraction from Pax7-$nGFP^+$ FACS-sorted cells was performed using the Qiagen RNeasy microkit directly after isolation. Then, RNA quality was then validated with a Bioanalyzer 2100 and cDNA synthesis and amplification were performed based on SPIA technology mentionned above. RNA extraction from primary myoblast or myotubes and from E14.5 and E18.5 whole back muscles was performed using the TRIzol kit (ThermoFisher) following manufacturer's protocols. Whole back muscles required a tissue lyser lyse step in the Trizol solution. RNAs were treated with DNase I (Turbo DNA-free, Invitrogen) and were

reverse-transcribed with Superscript III kit (Invitrogen) according to manufacturer's instruction. Reverse transcription was performed with 50ng (whole back muscles), 2ng (E15.5 FACS-sorted Pax7-nGFP+ cells) or 0.2ng (E18.5 FACS-sorted Pax7-nGFP+ cells) of total RNA. Quantitative real time PCRs (Light Cycler 480, Roche) were performed using Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) according to the manufacturer's protocols. cDNA was amplified with 40 cycles of 95 ° C for 15 sec, 60 °C for 15 sec, and 72 °C for 15 sec. Gene expression levels were normalized to the expression level of the housekeeping gene Cyclophilin. Oligonucleotides sequences used in this study are listed in table 2.

Transplantation

Rag2$^{-/-}$*γC*$^{-/-}$ and *Rag2*$^{-/-}$*γC*$^{-/-}$*Pax7*$^{DTR/+}$ immunodeficient mice, 2–4 months old, were used as recipients for FACS-sorted fetal Pax7-nGFP^{+} cell transplantation (Colucci, 1999; Sambasivan et al., 2011b). After FACS isolation, myoblast were centrifuged at 2000 rpm for 10min and the pellet was resuspended in sterile 1X PBS at 1,000 cells/µL. Then, mice were anesthetized by an intraperitonial injection (IP) of 80 mg/kg of ketamine hydrochloride and 10 mg/kg xylasine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) as described previously (Silva-Barbosa et al., 2005). Tibialis Anterior (TA) muscles were subjected to three consecutive cycles of freeze/thawing by applying liquid nitrogen cooled metallic rod on the muscle surface, preliminary exposed by opening the skin. Both TA muscles were injected with 15,000 FACS-sorted cells resuspended in 15µL 1X PBS, one TA with *Six1*$^{-/-}$*Six4*$^{-/-}$ cells and the contralateral with *Six1*$^{-/+}$*Six4*$^{-/+}$ cells. Animals were sutured after injection. Analgesia was induced by IP with Buprenorphine (Axience, 0.03 mg/kg) at the end of the surgery. TA muscles were harvested 30 days post-transplantation. For the transplantation in *Rag2*$^{-/-}$*γC*$^{-/-}$*Pax7*$^{DTR/+}$ Diphtheria toxin from Corynebacterium diphtheriae (Sigma Aldrich, D0564) was used for intra-muscular injection 5 hours before cell transplantation at the concentration of 1.5 ng/g of total body mass (weight).

Adulte muscle tissue preparation

Harvested TA muscles were directly fixed in 2% PFA 0.2% Triton X100 for 2h at 4°C to preserve GFP reactivity. Then they were then incubated into 15% sucrose at 4°C overnight, embedded into OCT and snap frozen in isopentane (–30°C) cooled in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. Transplanted TA were entirely cryosectioned into 10µm slices to find the grafted area.

X-gal staining

One section every 400µm of each transplanted TA was kept for X-gal staining to find the grafted area thanks to the Six1-LacZ reporter present in transplanted cells. Sections were stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactopyranoside (X-gal) staining solution (1 mg/ml X-gal, 5 mM K3Fe(CN)6, 5 mM K4Fe(CN)6 and 2 mM MgCl2 in 1X PBS) for 3h at 37°C. Stained sectiones were mounted under a converslip in glycerol gelatin. Images were taken with an Olympus BX63 upright microscope, using the Olympus DP73 high-performance Peltier cooled digital color camera.

Primary myoblast culture

After FACS isolation, cells were seeded on 1% Matrigel in proliferation medium (PM) containing 1:1 DMEM/F12, 20% Fetal Calf Serum (FCS), 1X Ultroser^{TM} G and 1X Anti-Anti. At confluence, cells were trypsinized, centrifuged and re-seeded at 1/3 decreased confluence for amplification. For experiments on proliferating myoblasts, cells were seeded on 1% Matrigel at 20,000 cells/cm^2 in PM and processed 12h later. BrdU pulse were performed at 10µg/mL for 40min at 37°C. For experiments on differentiated myotubes, myoblast were seeded on 1% Matrigel at 40,000 cells/cm2 in PM and 12h later the PM was changed to Differentiation medium (DM) composed of DMEM 1g/L Glucose, 20% horse serum and 1X Anti-Anti. Cells were processed 3 or 6 days later. For proliferation assays, FACS-sorted cells were seeded on 1% Matrigel at 2,500-5,000 cells/cm^2 in PM. A 40min BrdU pulse was performed 48h later prior to cell fixation.

Adhesion assay

For myoblast adhesion assay, 5000 WT or s1s4KO freshly FACS-sorted P0 myoblast were seeded into 24 wells multiwall plates on Matrigel after FACS isolation. After 10h and 48h in PM, myoblasts were trypsinized and the absolute number of cells counted.

Random cell migration assay

To measure random cell migration, 15,000 WT or s1s4KO myoblasts were seeded in a well of an ibidi 8 well plate on matrigel and let to attach overnight in PM. Time-lapse microscopy was used to image one picture every 6 minutes for 6 hours. During imaging, the cells were left in PM and incubated at 37°C with 5% CO_2. Images were taken with a Zeiss Axio Observer.Z1 inverted microscope using the 10X objective; image acquisitions were made with an Orca Flash 4 OLT camera using the Metamorph 7 software. Time-lapse analyses were performed using the Imaris software.

Transwell cell migration assay

For transwell migration assays, 24-multiwell inserts featuring 8µm pores (Corning® fluoroblok cell culture inserts) were coated with 40µL of 1% Matrigel and incubated overnight at 37°C for polymerisation. Next morning, proliferating myoblastes were trypsinized, centrifuged and seeded on the insert at 150,000 cells/insert. Migration well was either filled with DMEM, complemented or not with 0.5µg/mL SDF1 (Cliniscience ref.CSB-AP001171MO), 0.5µg/mL HGF (R&D Systems ref.2207-HG) or with conditioned media from differentiated myotubes. Cells were incubated at 37°C for migration, fixed in 4% PFA for 10min at room temperature and stained with Hoechst (Sigma Aldrich) and Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (ThermoFisher ref.A12379) for 1h at room temperature. Then, fluoroblok insert membranes were then cut of the insert and placed between two coverslips in Fluorescence mounting medium (DAKO) to analyse both sides of the membrane.

Statistical analysis

Two to five replicates were performed in the presented experiments. Mean data are presented with standard deviation. Results were assessed for statistical significance using a Mann-Whitney non parametric significance test when comparing two groups, or a two-ways regular Anova test when comparing more than two groups (Prism software). Significant differences were shown as follows : pvalue < 0.05 = *, pvalue < 0.01 = **, pvalue < 0.001 = ***, pvalue < 0.0001 = ****.

Table 1 : Antibodies used for immunostainings on cryosections

Target	Species	Compagny	Reference	Dilution	Protocol
BrdU	Mouse IgG1	Dako	M0744	1:100	Culture
CD31	Rat IgG	BD Pharmingen	550274	1:100	Acetone
FIBRONECTIN	Rabbit IgG	Sigma Aldrich	F3648	1:100	Fetus / Adult TA
GFP	Goat IgG	Abcam	ab13970	1:200	Adult TA
Ki67	Rabbit IgG	Abcam	ab15580	1:100	Culture
Ki67	Mouse IgG1	BD Pharmingen	550609	1:100	Fetus / Acetone
LAMININ	Rabbit IgG	Sigma Aldrich	L9393	1:200	Fetus
LAMININ	Rat IgG	Santa Cruz	sc-59854	1:200	Adult TA
MF20	Mouse IgG2b	DSHB	-	1:50	Fetus
MY32	Mouse IgG1	Sigma Aldrich	M4276	1:1000	Adult TA
MYH7	Mouse IgG1	Sigma Aldrich	M8421	1:1000	Adult TA
MYOD	Rabbit IgG	Santa Cruz	sc-304	1:100	Culture
MYOGENIN	Mouse IgG1	Santa Cruz	sc-12732	1:100	Fetus
MYOGENIN	Rabbit IgG	Santa Cruz	sc-576	1:100	Culture
PAX7	Mouse IgG1	Santa Cruz	sc-81648	1:100	Fetus / Acetone
PAX7	Ginea Pig IgG	Brohl et al., 2012	-	1:1000	Fetus / Acetone
PH3	Rabbit IgG	Cell Signaling	33775	1:100	Culture
SIX1	Rabbit IgG	Sigma Aldrich	HPA001893	1:1000	Amplification
SIX2	Rabbit IgG	Abcam	ab68908	1:100	Fetus

Table 2 : Oligonucleotide sequences used for RTqPCR analysis

Name	Fwd Primer	Rev Primer
Cxcl12	CTGCATCAGTGACGGTAAACC	CGGGTCAATGCACACTTGTC
Cxcl14	GGCCCAAGATCCGCTACAG	ACCTGGACATGCTCTTGGTG
Cxcr4	ACGGCTGTAGAGCGAGTGTT	AGGGTTCCTTGTTGGAGTCA
Cxcr7	AGGAAGCCCTGAGGTCACTT	GAGTAGTTGCCAGGCTCTGC
Dcx	CTCAACAAGAAAACAGCCC	AGAAATCATGGAGACAGGTG
EfnA3	GGGCCCCAATGTGAAGATCA	AGCGTCATGAGGAAGAAGGC
EfnA4	CCCTTTCAGCCCTGTTCGAT	CTCCTTGCAGCAGACAGACA
EfnB2	TCCAACAAGACGTCCAGAGC	CTGTTGCCATCGGTGCTAGA
EfnB3	AAGGCCTTGAGAGCTTGCAA	CAGGTTTTCGGGGTACAGCT
Fibulin5	GCAGCTTCTCCGAGTTCCTC	TGTGGTTTCGGTGCTCACAT
Fndc3	TGTAATGAAGCTGGGGAAGG	TTTTGGTGCTTTCAGTGCAG
Fsd2	TGGGTCATAGCTCAGAACAGG	TTCTGATTGCCTCGGTTTTT
Gjd4	TGGGATTCCTCATCATCACC	AGCATCCTCAGCAAGACCTC
Hmcn2	GTGTAGAGGTCTTGGCCACC	TGCAAGAATAGTGGCCAGCA
Itga4	GCTGTGGACCTCAATGCAGA	ACTCCCCAAATCTTGCAGCA
Mgp	ACAGGAGAAATGCCAACACC	GCGTTGTAGCCGTAGACCAT
Mmp2	CTGATGGCCCCGATCTACAC	GCAGATCTCCGGAGTGACAG
Mxra8	ATGTATTCGGCGGGTGAACA	GCAGTAGTGATGGTGCAGGT
Myf5	TGAGGGAACAGGTGGAGAAC	AGCTGGACACGGAGCTTTTA
MyoD	TACCCAAGGTGGAGATCCTG	CATCATGCCATCAGAGCAGT
Myogenin	GAAAGTGAATGAGGCCTTCG	ACGATGGACGTAAGGGAGTG
Myostatin	TTCCCAGGACCAGGAGAAGA	CATCGCAGTCAAGCCCAAAG
Pax3	AGCATCGATGGCATCCTGAG	CCAGTTCCTCCAGCTGCTC
Pax7	CTGGATGAGGGCTCAGATGT	GGTTAGCTCCTGCCTGCTTA
Sgcg	AGCTGACCCATTTCAAGACCT	GGGCCTTCACTACTCTGCAA
Six1	TTAAGAACCGGAGGCAAAGA	GGGGGTGAGAACTCCTCTTC
Six2	CACCTCCACAAGAATGAAAGCG	CTCCGCCTCGATGTAGTGC
Six4	CCACGGTTTTTCCCTGACCC	GGTTGCATAGTTAGTGTTGCTGA
Six5	GCCTCTCGCTTACACAGGTC	GGACTCATCCTCCGTAGTGG
Talin	CTCCGATGAAGACCCAAGGA	AGAGCCATCCAACATTCGGA
TnC	CACACACCGCATCAACATCC	GACGACTTCTGCAGCTTGGA

.

Eya3 n'est pas requis pour la régénération musculaire squelettique adulte

Aucune étude n'a été publiée aujourd'hui concernant le rôle des protéines EYA dans les cellules souches du muscle squelettique adulte, bien que les gènes *Eya* soient impliqués dans la myogenèse embryonnaire (Grifone et al., 2007), et que la protéine EYA3 ait été montrée comme importante dans les cellules C2C12 pour moduler l'activité du complexe transcriptionnel SIX (Li et al., 2003). Les protéines SIX, co-facteurs des protéines EYA ont un rôle important au cours de la régénération musculaire, (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Chakroun et al., 2015; Yajima and Kawakami, 2016) et une étude de RNA-seq a montré récemment que les gènes *Eya* étaient exprimés dans les cellules satellites (CS) quiescentes et activées et que *Eya3* et *Eya4* étaient les deux gènes *Eya* les plus exprimés dans ces cellules, avec une augmentation de leur expression dans les CS activées (Charville et al., 2015). Ces résultats publiés suggèrent que les protéines EYA pourraient avoir un rôle dans les CS au cours de la régénération musculaire squelettique, en synergie avec les protéines SIX, ou indépendamment. Nous avons tout d'abord vérifié que les gènes *Eya* étaient exprimés dans le tissu musculaire et dans les cellules PAX7+ sur des ARN extraits d'échantillons fœtaux et avons observé que *Eya4* semblait être le gène le plus exprimé, suivi de *Eya1* et *Eya3* et que *Eya2* avait une expression très faible comparée aux autres gènes *Eya* aussi bien dans les muscles entiers fœtaux que dans les cellules PAX7+ fœtales (Figure 1A). Nous avons donc étudié la réparation du muscles Tibialis antérieur (TA) de souris adultes dépourvues d'expression du gène *Eya3* (Eya3$^{-/-}$). Grâce à l'insertion du gène Lac-Z entre les exons 7 et 8 du gène *Eya3* (provoquant le KO du gène) nous avons pu vérifier l'expression de la β-Galactosidase dans les cellules PAX7+ quiescentes d'un muscle non lésé ou 14 jours après injection de notéxine (NTX14). Nous avons pu observer qu'environ 50% des cellules PAX7+ exprimaient la β-Galactosidase dans ces conditions confirmant l'expression du gène *Eya3* dans ces cellules (Figure B,C). Afin de déterminer si la déplétion de ce gène altérait la régénération musculaire, nous avons réalisé une lésion musculaire du TA de souris adultes en y injectant de la Notéxine et avons prélevé ces muscles 4 (NTX4), 14 (NTX14) et 30 (NTX30) jours après la blessure. Afin de déterminer si l'absence d'EYA3 affectait la prolifération ou l'auto-renouvellement des CS nous avons quantifié le nombre de cellules PAX7+ normalisé par le nombre de myofibres mais nous n'avons pas observé de différences avec les animaux WT. EYA3 n'est donc pas requise pour la prolifération ni l'auto-renouvellement des CS au cours de la régénération musculaire (Figure 1D,E). Afin de déterminer si l'absence d'EYA3 altérait la réparation des myofibres, nous avons quantifié le

nombre de noyaux présents par myofibre, témoignant des évènements de fusion des cellules mononuclées ainsi que l'aire de section (CSA = Cross Sectionnal Area) des myofibres nouvellement formées et n'avons pas observé de différences entre les muscles WT et $EYA3^{-/-}$ (Figure 1F-H). Nous pouvons donc conclure de ces résultats que le gène *Eya3* n'est pas requis pour la régénération musculaire squelettique adulte. De plus, les muscles non lésés $Eya3^{-/-}$ comptent le même nombre de cellules PAX7+/fibres que les muscles WT et semblent avoir des myofibres d'un diamètre comparable à celui des myofibres WT. Ces observations suggèrent que *Eya3* n'est pas non plus requis pour la croissance musculaire postnatale, soit directement soit indirectement.

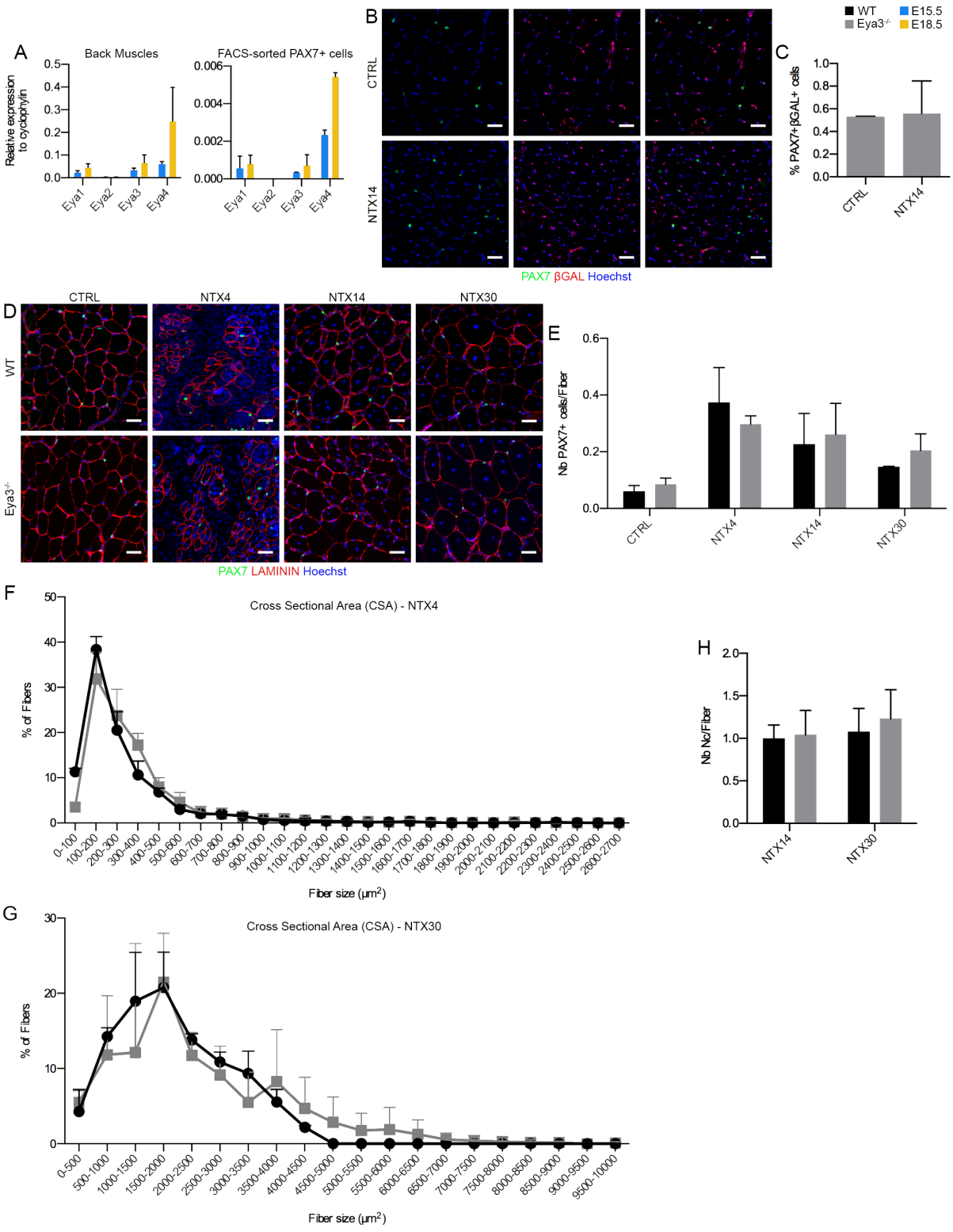


Figure 1 : *Eya3* n'est pas requis pour la régénération musculaire squelettique adulte
A : RTqPCR pour les gènes *Eya* sur des ARNm extraits de cellules PAX7+ WT à E15,5 et E18,5 ou de muscles dorsaux WT prélevés à E15,5 et E18,5. B : Immuno-marquage de PAX7 (vert) et βGAL (rouge) sur des muscles TA 14 jours après injection de Notexin (NTX14) ou muscles TA contralatéraux (CTRL), barre d'échelle = 20µm. C : Quantification du pourcentage de cellules PAX7+βGAL+ sur les mêmes TA CTR et NTX14. D : Immuno-marquage de PAX7 (vert) et LAMININ (rouge) sur des muscles TA CTRL, NTX4, NTX14 et NTX30 issus d'animaux WT et Eya3$^{-/-}$, barre d'échelle = 20µm. E : Quantification du nombre de cellules PAX7+ par fibres sur les mêmes muscles TA CTRL, NTX4, NTX14 et NTX30 issus d'animaux WT et Eya3$^{-/-}$. F,G : Quantification de la répartition de l'aire de section des fibres (Cross Sectional Area, CSA) de muscles TA NTX4 (F) et NTX30 (G) issus d'animaux WT et Eya3$^{-/-}$. H : Quantification du nombre de noyaux (Nuclei, Nc) par fibres de muscles TA NTX14 et NTX30 issus d'animaux WT et Eya3$^{-/-}$. Sur toutes les images, les noyaux sont marqués par du Hoechst (bleu).

Méthodes

Souris et soins aux animaux

L'expérimentation animale a été réalisée en accord avec la convention européenne STE 123 et la chartre nationale Française sur l'éthique et l'expérimentation animale. Les protocoles ont été approuvés par le comité éthique de l'expérimentation animale de l'Institut Cochin, CNRS UMR 8104, INSERM U1016. Nous avons utilisé des animaux Eya3$^{-/-}$ (Söker et al., 2008) et des animaux contrôles C57Bl6/N.

Blessure à la Notexin

Les animaux utilisés pour l'étude de la régénération après blessure à la Notexin étaient âgés de 3 à 5 mois. Avant blessure, les animaux ont été endormis par injection intrapéritonéale de Kétamine-Xylazine à 10mg/mL (REF). La patte postérieur gauche après rasage a reçu une injection de 25µL de Notexin (Latoxan, Ref.L8104), la patte droite étant gardée comme patte contralatérale. Après blessure, les animaux ont reçu une injection sous-cutanée de Buprénorphine à 0,03mg/mL (REF). Les muscles ont été récoltés 4 jours (NTX4), 14 jours (NTX14) ou 30 jours (NTX30) après la blessure, directement congelés en OCT (Tissue-Tek) dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Immuno-marquages

Les muscles congelés ont été coupés au cryostat en sections de 10µm, puis les sections fixées au PFA 4% pendant 10min à température ambiante, perméabilisées au méthanol froid (-20°C) et démasquées avec une solution de citrate à pH6 chauffée à 95°C. Les sections ont ensuite été saturée avec un milieu de saturation comprenant 5% de serum de chèvre, 4% d'albumine sérique bovine et 0,5% de Triton X-100. Les anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans le milieu de saturation (voir table1 des anticorps). Les sections ont été montées sous une lamelle de verre dans du milieu de montage fluorescent. Les images ont été réalisées sur un microscope Olympus BX63 droit à fluorescence avec une caméra ORCA-Flash4.0 LT Hamamatsu controlés par le logiciel Metamorph 7.

PCR quantitative en temps réél

Les ADNc utilisées ont été synthétisé et extraits comme décrit dans Wurmser et al., étude précédente non-soumise. Les PCR quantitative en temps réel ont été réalisées avec un Light Cycler 480 (Roche) en utilisant le kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) en suivant le protocol conseillé par l'entreprise Roche. Les PCR étaient de 40 cycles : 15s à 95°C, 15s à 60 °C, et 15s à 72 °C. Les niveaux d'expression des gènes ont ensuite été normalisés au niveau d'expression de la cyclophiline. Les séquences des oligonucleotides utilisés sont données dans la table 2.

Table 1 : Antibodies used for immunostainings on cryosections

Target	Species	Compagny	Reference	Dilution
PAX7	Mouse IgG1	Santa Cruz	sc-81648	1:100
LAMININ	Rabbit IgG	Sigma Aldrich	L9393	1:200
βGalactosidase	Chicken IgG	Abcam	ab134435	1:100

Table 2 : Oligonucleotide sequences used for RTqPCR analysis

Name	Fwd Primer	Rev Primer
Eya1	GCCGTATCCAGCACACTACA	GGTGTGGAAGGACTGTGGAT
Eya2	CCAGCCAGAGTTCTGAGTCC	GCTGGGGAAGGGTCACTATT
Eya3	CCAGTTCCAGCTTTGGAGTC	CATGTTTTTCCTGGCCTGAT
Eya4	CACAGCCTACTCGCAGACAG	CTGGCTGTGGGGTAGAAAAC

Discussion

Myogenèses hypaxiale, épaxiale et craniofaciale chez les KO composites des gènes *Six*

Les gènes de détermination myogénique *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* sont responsables de l'établissement du destin myogénique au cours des myogenèses hypaxiale, épaxiale et craniofaciale, mais les réseaux de régulation permettant l'induction de leur expression sont différents. En effet, alors que *Pax3, Six1* et *Six4* contrôlent leur expression au cours de la myogenèse hypaxiale, ce n'est pas le cas des myogenèses épaxiale et craniofaciale (Franz et al., 1993; Grifone et al., 2005). Afin de mieux comprendre le rôle des gènes *Six* au cours de la myogenèse, nous avons réalisé des KO composites des différents gènes *Six* exprimés dans le lignage myogénique : *Six1*, *Six2*, *Six4* et *Six5*. Alors que la myogenèse hypaxiale était diminuée chez les s1KO (Laclef et al., 2003a) et complètement abrogée chez les s1s4KO (Grifone et al., 2005), nous avons observé une aggravation du phénotype musculaire au niveau des membres dans les s1s2KO par rapport au s1KO. En effet, seules les masses musculaires dorsales sont présentes dans la partie distale des pattes postérieures, elles sont diminuées en taille et nous n'avons observé aucune musculature dans les pattes antérieures. L'absence de musculature dans les membres des s1s4KO a été décrite en 2005, et il avait été observé que les cellules βGal+ (Six1-LacZ) qui migrent normalement dans les bourgeons de membres étaient reroutées médialement vers l'aorte dorsale chez les embryons s1s4KO (Grifone et al., 2005). Nous avons pu observer que ces cellules exprimaient SRF et αSMA, deux marqueurs du tissu musculaire lisse suggérant que *Six1* et *Six4* soient requis pour l'établissement du destin myogénique squelettique. La myogenèse épaxiale est aussi altérée chez les fœtus s1s4KO où les masses musculaires dorsales sont hypoplasiques (Grifone et al., 2005) et une diminution du nombre de gènes *Six* exprimés aggrave ce phénotype puisque ces masses musculaires sont encore plus atrophiées chez les fœtus s1s2s4KO et s1s4s5KO voir complètement désorganisées chez les fœtus s1s2s4s5KO. Bien que le nombre de cellules progénitrices PAX7+ ne soit pas altéré dans les masses musculaires dorsales des fœtus s1s4KO, la perte d'expression de trois ou quatre gènes *Six* provoque une forte diminution du nombre de cellules PAX7+. De plus, ces cellules semblent avoir perdu leurs propriétés de cellules progénitrices chez les fœtus s1s2s4s5 puisqu'un grand nombre d'entre elles expriment déjà la *Myogénine*, marqueur de l'engagement dans la voie de différentiation myogénique. Enfin, aucun défaut de myogenèse craniofaciale n'avait été observé chez les fœtus s1KO (Laclef et al., 2003a), s4KO (Ozaki et al., 2001a), s1s4KO (Grifone et al., 2005) et s5KO (Personius et al., 2005), et nous n'en avons pas observé non plus chez les fœtus s2KO et s2s5KO. Par contre, nous avons observé une atrophie massive des muscles

craniofaciaux (execpté les EOM) chez les fœtus s1s4s5KO et une absence totale de masses musculaires craniofaciales chez les fœtus s1s2KO. Ces résultats montrent encore une fois que la formation de masses musculaires est proportionnelle à la quantité de protéines SIX produites.

Défaut de myogenèse hypaxiale chez les fœtus KO *Six* et perte du destin myogénique squelettique

Six1 semble être le gène *Six* le plus important pour la myogenèse hypaxiale, puisque les fœtus s1KO (Laclef et al., 2003a) montrent des défauts de formation des muscles des membres et n'ont pas de diaphragme, ce qui n'est pas le cas des fœtus s2KO (Self et al., 2006) et s4KO (Ozaki et al., 2001a). Cependant ces deux derniers semblent en partie compenser l'absence de *Six1* chez les fœtus s1KO puisque le phénotype musculaire des fœtus s1s4KO (Grifone et al., 2005) et s1s2KO est plus important que chez les s1KO. *Six2* et *Six4* sont donc aussi importants au cours de la myogenèse hypaxiale. Bien que *Six2* ne soit pas capable de compenser l'absence de *Six1* et *Six4* compte tenu de l'absence totale de muscles hypaxiaux chez les fœtus s1s4KO, *Six4* pourrait être responsable de la formation des masses musculaires résiduelles dans les membres des fœtus s1s2KO. Etant donné les défauts de migration et de destin des cellules βGal+ (Six1-LacZ) chez les fœtus s1s4KO, il serait intéressant d'étudier la migration de ces cellules chez les fœtus s1s2KO afin de comprendre si l'absence de masse musculaire observée au niveau de la patte antérieure et la seule présence des masses musculaires dorsales des pattes postérieures résultent d'un défaut de migration, de prolifération ou de différentiation des cellules PAX3+. Des expériences d'immunohistochimie nous permettront de suivre les cellules PAX3+ et d'analyser leur trajet de migration et leur état de prolifération (Ki67) ou d'engagement dans le destin myogénique (PAX7, MYF5, MYOD). Nous étudierons aussi l'expression des protéines connues pour être impliquées dans la migration des cellules PAX3+ hypaxiales dans les bourgeons de membres comme c-MET, GAB1 et LBX1. En effet, dans les cellules progénitrices PAX3+ migrant dans les bourgeons de membres PAX3 induit l'expression de *Lbx1* (Mennerich et al., 1998) et de *c-Met* (Daston et al., 1996), récepteur de la molécule de guidage HGF, en réponse de qui c-MET induit la phosphorylation de GAB1 (Weidner et al., 1996). Alors que les embryons KO pour *c-Met* (Bladt et al., 1995), *Pax3* (Franz et al., 1993) ou *Gab1* (Sachs et al., 2000) ne développent aucun muscle hypaxial, certaines masses musculaires se forment chez les embryons KO pour *Lbx1*, et l'étude de ces masses musculaires a permis de mettre en évidence plusieurs voies de migrations des cellules PAX3+ (Gross et al., 2000) : Au niveau des pattes antérieures, les masses ventrales et dorsales sont issues de deux voies de migrations différentes. Une

migration latérale permet la formation des masses dorsales alors que la formation des masses ventrales est précédée d'une migration ventrale puis d'une migration latérale. Au niveau des pattes postérieures, aucune migration ventrale n'est requise, et les cellules progénitrices migrent latéralement jusqu'aux parties dorsales et ventrales des bourgeons de membres. Seules les masses musculaires ne nécessitant pas de migration latérale donc localisées à la bordure des bourgeons de membres se forment chez les embryons KO pour *Lbx1*, suggérant que ce dernier soit important pour la migration latérale des cellules PAX3+ dans les bourgeons de membre (Gross et al., 2000). Le phénotype musculaire des fœtus s1s2KO suggère que *Six1/2* ont des rôles différents de celui de *Lbx1*, qui est donc un bon candidat avec *Six4* pour compenser en partie l'absence de *Six1* et *Six2* et permettre la formation de masses musculaires résiduelles dans les pattes postérieures des embryons s1s2KO. Le destin myogénique squelettique semble aussi altéré en absence des gènes *Six1* et *Six4* car les cellules s1s4KO hypaxiales du dermomyotome adoptent un destin musculaire lisse « par défaut ». Ainsi en fonction du niveau d'activation de ces deux protéines les cellules hypaxiales du dermomyotome pourraient-elles adopter un destin musculaire squelettique ou lisse. Les signaux qui permettraient de contrôler cette activation sont à identifier, mais il est connu que les voies de signalisation Notch et BMP contrôlent ces destins (Ben-Yair, Kacheim, 2008 ; Mayeuf-Louchart/Buckingham, 2014). Ainsi la caractérisation du niveau de NICD et de phosphoSMAD 1/5/8 dans les cellules reroutées pourrait-elle nous apporter un élément de réponse sur les mécanismes mis en jeu.

Absence totale de musculature craniofaciale chez les fœtus s1s2KO

Alors que les simple KO pour les gènes *Six1* et *Six2* n'ont pas de défaut de formation des muscles craniofaciaux, les fœtus s1s2KO montrent une absence totale de musculature craniofaciale à E14,5. Bien que moins drastiques, d'autres KO murins sont aussi caractérisés par une absence de formation de certaines masses musculaires craniofaciales, comme le double KO pour *Capsuline* et *MyoR*, deux gènes codant pour des facteurs de transcriptions bHLH qui contrôlent l'expression de *MyoD* et *Myf5* dans une population de progéniteurs craniofaciaux des 1er et 2ème arcs branchiaux. Ces cellules ne pouvant exprimer MyoD et Myf5 en absence de *Capsuline* et *MyoR*, meurent par apoptose, conduisant à l'absence de formation des muscles masticateurs (Lu et al., 2002). Il serait important d'étudier la survie des progéniteurs craniofaciaux dans les arcs branchiaux des embryons s1s2KO afin de mieux comprendre pourquoi ces embryons ne développent aucune masse musculaire craniofaciale. De manière intéressante, malgré le phénotype sévère des doubles mutants *Capsuline:MyoR* les embryons simple KO de ces deux gènes ne présentent pas non plus de phénotype

craniofacial (Lu et al., 2000, 2002). Plusieurs facteurs de transcription sont ainsi requis pour activer la myogenèse craniofaciale, en fonction des masses musculaires considérées. Ainsi, les muscles branchiomériques requièrent l'expression de *Tbx1* (Kelly et al., 2004) et les muscles extra-oculaire de *Pitx2* (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; L'Honore et al., 2010; Zacharias et al., 2011) pour induire l'expression de *Myf5* et *MyoD*, et permettre la formation de ces masses musculaires. Il serait intéressant d'étudier le patron d'expression de *Capsuline*, *MyoR*, *Tbx1* et *Pitx2* chez les embryons s1s2KO afin de positionner les gènes *Six1* et *Six2* dans le réseau déjà connu des gènes contrôlant la myogenèse craniofaciale. De plus, l'étude de ChiPseq de Chakroun et al. a pu mettre en évidence la liaison de SIX4 sur les prometteurs de *Pitx2* et *Tbx1* dans les cellules myogéniques, suggérant un contrôle direct de l'expression de ces deux gènes par les protéines SIX (Chakroun et al., 2015). Les embryons s1s2KO étant le premier cas d'absence totale de muscles craniofaciaux, autres que les KO MRF, il est probable que ces deux gènes se trouvent en amont de tous les gènes connus requis pour la formation des muscles du crâne.

Une myogenèse épaxiale indépendante des gènes *Six*

Des myogenèses hypaxiale, épaxiale et craniofaciale, la myogenèse épaxiale est de loin la plus coriace. En effet, le seul KO murin qui ait conduit à une absence totale de muscles épaxiaux est le triple KO pour *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* (Kaul et al., 2000; Kassar-Duchossoy et al., 2004). Les KO de *Pax3*, *Pax7* et même le double KO *Pax3*:*Pax7* (Relaix et al., 2005) n'empêchent pas la formation de cellules myogéniques épaxiales. Les voies Shh et Wnt sont aussi connues pour induire l'expression épaxiale de *Myf5*, mais le double KO de *Gli2* et *Gli3 (voie Shh),* et le double KO de *Wnt1* et *Wnt3a* (voie Wnt) montrent tous les deux une myogenèse épaxiale résiduelle (McDermott et al., 2005b; Ikeya and Takada, 1998). Les protéines GLI collaborent avec les facteurs LEF/TCF pour induire l'expression épaxiale de *Myf5* (Borello et al., 2006), mais la « double » invalidation GLI/TCF/LEF n'a jamais été réalisée. Aucun des KO des gènes *Six* ne mène à une absence totale de muscles épaxiaux non plus. En effet, bien que désorganisés et constitués de très peu de myofibres, des muscles épaxiaux résiduels se forment chez les fœtus s1s2s4s5KO chez qui plus aucun gène *Six* ne peut induire l'expression des MRF. Ces KO semblent mener à une perte des propriétés souches des cellules PAX7+ qui expriment des gènes de différentiation tels que *Myogénine*. La mutation des trois sites MEF3 situés dans les séquences régulatrices de l'expression de *MyoD* menant à une absence totale de son expression embryonnaire dans un modèle de souris transgénique, il est probable que la myogenèse épaxiale résiduelle chez les embryons s1s2s4s5KO soit due à l'expression de Myf5, ce que nous vérifierons. De plus, PAX7

contrôle aussi l'expression de *Myf5* dans les CS activées. En effet, la méthylation de PAX7 par l'arginine-methyltransférase CARM1 lui permet de recruter des protéines de modification de la chromatine au promoteur de *Myf5* et d'induire son expression (Kawabe et al., 2012). Il serait donc intéressant de regarder l'expression de CARM1 dans les cellules PAX7+ résiduelles des muscles épaxiaux chez les fœtus s1s2s4s5KO, sachant de plus que l'expression de CARM1 est diminuée de 1,5 fois dans les cellules PAX7+ épaxiales des fœtus s1s4KO à E18,5 (données de transcriptomiques). La diminution de son expression pourrait en effet expliquer la perte des propriétés souches des cellules PAX7+ s1s2s4s5KO. Ainsi, l'activation de l'expression épaxiale de *Myf5* semble contrôlée par plusieurs facteurs : les protéines PAX, SIX, GLI et TCF/LEF, les KO de leurs gènes menant tous à une diminution de la myogenèse épaxiale. Il reste donc à déterminer si un autre facteur inconnu est responsable de l'activation de l'expression des MRF chez ces KO ou si les facteurs connus compensent l'absence d'expression des gènes *Six* chez les animaux KO. Des études *in silico* seraient nécessaires à la caractérisation de facteurs de transcription capables de se lier aux séquences régulatrices des MRF (en particulier le enhancer épaxial de Myf5), couplées à l'étude à grande échelle des protéines exprimées dans les cellules myogéniques épaxiales. En effet, le développement de nouvelles technologies telles que la transcriptomique spatiale pourrait permettre de déterminer les gènes spécifiquement exprimés dans les territoires épaxiaux (Ståhl et al., 2016). Nous proposons donc que chez les animaux s1s2s4s5KO, les protéines PAX, GLI et/ou TCF/LEF soient capables d'induire l'expression des MRF et de permettre la formation de myofibres primaires, mais qu'en l'absence d'expression des gènes *Six*, les propriétés souches des cellules PAX7+ soient perdues et l'engagement de toutes les cellules progénitrices dans la voie de différenciation conduit à un épuisement de cette population de cellule et une absence de myogenèse secondaire.

Contrôle de l'expression de *Pax7* par les protéines SIX

L'absence de *Six1*, *Six2*, *Six4* et *Six5* semble mener à une perte d'expression de *Pax7*. Un contrôle direct de son expression par les protéines SIX reste à démontrer, mais déjà suggéré par les données de ChIPseq (Chakroun et al., 2015) indiquant le recrutement des protéines SIX1/4 sur les régions promotrices de *Pax7* dans les cellules myogéniques. Des expériences de co-transfection transitoire de cellules fibroblastiques s1s2s4s5KO avec des vecteurs d'expression du gène de la Luciférase sous le contrôle des régions régulatrices de *Pax7* et de vecteurs d'expressions des différents cDNA codant pour les protéines SIX nous indiquera si les quatre protéines SIX1, 2 4 et 5 sont capables de moduler l'activité des séquences régulatrices de *Pax7*.

Comportement des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale chez les KO Six1Six4

Les cellules PAX7+ sont à l'origine de la formation des muscles au cours de la régénération musculaire adulte mais aussi au cours de la myogenèse fœtale. A l'état basal, les cellules PAX7+ ou cellules satellites (CS) sont localisées entre la membrane plasmique d'une fibre musculaire et la lame basale qui l'entoure, environnement aussi appelé niche de la CS. Nous avons pu montrer qu'au début de la myogenèse fœtale (E14.5), les cellules PAX7+ sont toutes interstitielles et trouvent le chemin de leur niche progressivement jusqu'à la naissance, procédé aussi appelé nichage. Une partie de ces cellules exprime SIX1 tout au long de la myogenèse fœtale, et nous avons observé une perturbation du nichage des cellules PAX7+ chez les fœtus KO pour *Six1* et *Six4* (s1s4KO), où la majorité des cellules PAX7+ sont toujours interstitielles à E18.5, contrairement aux fœtus WT chez qui à ce stade 90% des cellules PAX7+ sont localisées dans leur niche. Nous n'avons pas observé de défaut de nichage chez les foetus s1KO à E18.5, et n'avons pas pu l'analyser chez les foetus s4KO. Au cours de ce travail nous avons testé quatre anticorps différents contre SIX4, mais aucun ne donnait de résultats satisfaisants, aussi nous n'avons pas encore pu établir le pourcentage de cellules PAX7+ qui expriment SIX4 au cours de la myogenèse fœtale. Ayant étudié un KO constitutif pour les gènes *Six1* et *Six4*, le phénotype observé pourrait être dû à l'absence d'expression de *Six1* et *Six4* dans les cellules PAX7+ elles-mêmes ainsi que dans toutes les autres cellules qui constituent leur environnement, telles que les fibres musculaires ou les fibroblastes du mésenchyme musculaire, les cellules endothéliales ou les motoneurones par exemple. Le transcriptome des muscles du dos entier ou des cellules Pax7-nGFP triées par FACS nous a permis de caractériser l'expression de gènes qui pourraient être impliqués dans le mécanisme du nichage tels que *Mmp2*, *Talin*, *Mgp*, *Hmcn2*, ainsi que quatre gènes codants pour des ephrines, et être sous le contrôle de *Six1* et/ou *Six4* spécifiquement dans les cellules PAX7+ ou dans les myofibres. Nous avons pu mettre en évidence que l'expression de nombreux gènes codants pour des protéines de structure cellulaire, de la matrice extra-cellulaire (MEC) ou des chimiokines était perturbée en absence d'expression de *Six1* et *Six4*, aussi bien dans les cellules PAX7+ que dans les muscles dorsaux, suggérant que *Six1* et *Six4* sont importants pour l'établissement d'un environnement propice à la maturation des cellules PAX7+ fœtales. Après transplantation de cellules PAX7+ fœtales dans un muscle adulte lésé, les cellules PAX7+ s1s4KO sont capables de contribuer à la régénération de ce muscle, mais les myofibres s1s4KO néoformées sont très petites, expriment toutes la myosine de type lent

et ne sont pas innervées contrairement aux myofibres contrôles. Comme les cellules PAX7+ contrôles, la majorité des cellules PAX7+ s1s4KO greffées se trouve dans leur niche un mois après la blessure et sont en nombre équivalent. *Six1* et *Six4* ne sont donc pas indispensables dans ces cellules pour permettre leur multiplication, leur auto-renouvellement et leur entrée en quiescence. Des études in vitro ont confirmé la prolifération normale des cellules s1s4KO et permis d'identifier une altération de la fusion des cellules s1s4KO différenciées. Dans un contexte de transplantation où les cellules PAX7+ s1s4KO transplantées collaborent avec les cellules PAX7+ endogènes, les cellules s1s4KO semblent avoir un avantage de migration au sein du muscle aboutissant à la formation d'un greffon plus volumineux que les cellules contrôles. Cette observation a été confirmée dans un modèle d'attraction *in vitro* où d'une part un milieu conditionné de myotubes WT attire plus efficacement les cellules PAX7+ s1s4KO que le milieu conditionné issu de myotubes s1s4KO et d'autre part les cellules PAX7+ s1s4KO migrent plus efficacement que des cellules PAX7+ WT soumises à un milieu conditionné de myotubes WT. Les protéines SIX1 et SIX4 semblent donc importantes aussi bien au sein des fibres musculaires que des cellules PAX7+ pour favoriser leur maturation et permettre le nichage des cellules PAX7+.

La moitié de la population PAX7+ exprime SIX1 au cours de la myogenèse fœtale

Nous avons observé qu'aussi bien au début (E14.5) qu'à la fin (E18.5) de la myogenèse fœtale, seulement la moitié des cellules PAX7+ exprimait SIX1 au niveau des muscles du dos. Il a cependant été montré que chez l'adulte, toutes les cellules satellites quiescentes et activées exprimaient *Six1* et *Six4* (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012; Chakroun et al., 2015). Entre E18.5 et l'âge adulte, les cellules PAX7+ sont fortement réquisitionnées pour participer à la croissance postnatale, et la majorité d'entre elles finiront par fusionner avec une myofibre étant donné qu'une myofibre d'un muscle de la patte ne compte que 7 à 11 CS associées à leur membrane plasmique. Il serait intéressant d'étudier l'évolution de l'expression de SIX1 et SIX4 dans les cellules PAX7+ au cours de la croissance postnatale afin de déterminer comment et pourquoi une partie seulement des cellules PAX7+ expriment SIX1 à E18,5 alors quelles l'expriment toutes chez l'adulte. Il serait aussi important de comparer le transcriptome des cellules fœtales PAX7+SIX1+ et PAX7+SIX1- afin d'identifier les gènes cibles de SIX1 dans les cellules PAX7+ et de comprendre les conséquences de cette ségrégation. Les résultats décrivant l'expression de SIX1 et SIX4 dans les CS adultes ont été obtenus sur des muscles adultes de la pattes postérieure (EDL et TA), majoritairement constitués de fibres rapides alors que nos observations ont été réalisées sur des muscles dorsaux fœtaux comprenant environ 25% de fibres lentes (données non publiées).

Bien que jamais démontré chez les mammifères, plusieurs populations de myoblastes existent chez le poulet, chacune capable de ne former qu'un seul type de myotube, lent ou rapide (Miller and Stockdale, 1986; Stockdale and Miller, 1987). Etant donné que SIX1 et SIX4 contrôlent l'expression de gènes du métabolisme glycolytique dans les fibres musculaires (Sakakibara et al., 2014; Meng et al., 2013), menant à la spécification des myofibres rapides, il serait intéressant de comparer les propriétés métaboliques des cellules PAX7+SIX1+ et PAX7+SIX1- et leur capacité de générer différents types de myotubes afin de déterminer si une cellule PAX7+ est pré-déterminée à ne donner qu'un seul type de myofibre, et si SIX1 joue un rôle dans ce processus. Il a d'ailleurs déjà été démontré que la population de cellules PAX7+ adulte était constituée de plusieurs sous-populations, en fonction de leur état métabolique (Rocheteau et al., 2012). Des analyses clonales après le tri par FACS des cellules PAX7+ fœtales permettraient d'étudier la nature des chaines lourdes de myosines et des gènes du métabolisme exprimés par les myotubes formés à partir d'une cellule PAX7+ fœtale unique.

L'expression de SIX1 n'influe pas sur la prolifération ni sur la différentiation des cellules PAX7+ fœtales.

Le niveau d'expression de *Pax7* est variable dans la population de CS, et est directement lié à l'état souche de ces cellules, mais nous n'avons pas observé de biais ni dans la prolifération ni dans la différentiation des cellules PAX7+ en fonction de l'expression de SIX1 et SIX4, suggérant que ces protéines ne sont pas impliquées dans le contrôle du destin des cellules PAX7+ épaxiales au cours de la myogenèse fœtale. Chez l'adulte, l'absence d'expression de *Six1* dans les CS n'affecte pas non plus leur prolifération (Le Grand et al., 2012) par contre la surexpression de *Six1* ou de *Six4* bloque la prolifération des myoblastes adultes in vitro (Yajima et al., 2010). A l'inverse, le blocage de l'expression de *Six1* au cours de la myogenèse chez le poisson zèbre bloque la prolifération des cellules PAX7+ (Nord et al., 2013) et son expression ectopique est souvent retrouvée dans certaines tumeurs et tenue responsable de l'induction de l'expression de gènes favorisant l'entrée dans le cycle cellulaire (résumé dans (Christensen et al., 2008)). Tous ces résultats révèlent que suivant le type cellulaire, les gènes *Six* contrôlent l'expression d'un grand nombre de gènes dont l'expression n'est pas toujours compatible (anti- vs pro-prolifératifs), suggérant la participation de co-facteurs différents, et d'états chromatiniens adaptés à la situation dans laquelle se trouvent les cellules. Il semblerait aussi que la dose de protéines SIX présente dans une cellule soit importante pour réguler la prolifération cellulaire, et que cette dose soit finement régulée afin de ne pas dérègler le cycle de vie de la cellule.

Effet de l'absence de *Six1* et *Six4* sur la myogenèse épaxiale

La description des fœtus s1s4KO par Grifone et al., a révélé qu'en l'absence de *Six1* et *Six4*, la myogenèse épaxiale n'était pas abolie, mais que les masses musculaires dorsales étaient atrophiées (Grifone et al., 2005). Il en résulte que le nombre de cellules PAX7+ totale dans les masses dorsales des fœtus s1s4KO est fortement diminué comparé aux fœtus WT. Cependant la répartition de ces cellules entre les fibres musculaires n'est pas altérée compte tenu du nombre de cellules PAX7+/μm^2 équivalent aux fœtus WT. Nous n'avons pas observé de défaut de prolifération des cellules PAX7+ s1s4KO, ni *in vivo* ni *in vitro*, suggérant que l'atrophie musculaire n'est pas due à un défaut de multiplication des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale. In vitro, les cellules s1s4KO semblent cependant avoir un défaut de fusion qui pourrait expliquer la diminution du nombre de myofibres formées. Il sera donc important de quantifier le nombre de noyaux par myofibres *in vivo*, avant et après la myogenèse fœtale, et au cours du processus de régénération après la greffe des cellules PAX7+ dans un muscle adulte endommagé. L'atrophie des masses musculaires dorsales étant déjà présente à E13,5, il est vraisemblable que les défauts observés à E18.5 soit dûs à un défaut plus précoce (Grifone et al., 2005).

Nichage des cellules PAX7+ WT au cours de la myogenèse fœtale

Le nichage des cellules PAX7+ a lieu au cours de la myogenèse fœtale (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005) mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas bien compris. Au cours de la myogenèse embryonnaire, les cellules PAX7+ génèrent des cellules filles qui se différencient pour former des myofibres primaires. Les cellules myogéniques et les cellules de leur environnement telles que les fibroblastes sécrètent des protéines de la MEC qui s'organisent et se déposent autour des myofibres primaires pour former la lame basale (LB). Les cellules myogéniques non différenciées en contact avec ces myofibres sont donc englobées sous la couche de MEC. Nous avons observé qu'à la fin de la myogenèse embryonnaire (E14,5) toutes les cellules PAX7+ se trouvaient dans le milieu interstitiel. Ces cellules n'étaient donc pas en contact avec une myofibre primaire quand la LB s'y est déposée. Les cellules mononucléées présentes sous la lame basale au début de la myogenèse fœtale (E14,5) sont donc des cellules PAX7- (MYF5+, MYOD+ ou MYOG+). Ces cellules sont en contact avec les myofibres primaires via les molécules VLA4/VCAM1 (Rosen et al., 1992). Les myofibres secondaires sont ensuite formées sous la LB, où elles établissent des contacts serrés avec les myofibres primaires (Duxson et al., 1989). Au cours de la myogenèse fœtale, nous avons observé une augmentation progressive du nombre de cellules PAX7+ sous la lame basale. Les myofibres secondaires se formant généralement sous

la lame basale, il convient de proposer que les cellules PAX7+ localisées dans le milieu interstitiel à E14,5 traversent la LB en formation pour former des myofibres secondaires. Il serait néanmoins intéressant de vérifier si des myofibres secondaires se forment indépendamment des myofibres primaires directement dans le milieu interstitiel. Il a déjà été proposé que les progéniteurs myogéniques et les CS soient capables de traverser une lame basale, aussi bien au cours du développement prénatal (Hughes and Blau, 1990), de la régénération musculaire adulte (Kowalski et al., 2016; Sacco et al., 2008; Webster et al., 2016), qu'*in vitro* (Lafreniere et al., 2006) mais aucun évènement de traversée de la lame basale par des cellules PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale n'a jamais été observé *in vivo*. Bien que nos images de microscopie confocale semblent montrer des cellules PAX7+ entrain de traverser la lame basale au cours de la myogenèse fœtale, une imagerie intra-vitale serait nécessaire pour le démontrer. Etant donné qu'aucune cellule PAX7+ ne se trouve en contact avec une myofibre à E14,5, il serait aussi intéressant de tester la capacité des cellules PAX7+ à conserver l'expression de ce dernier lorsqu'elles sont en contact avec une myofibre, en fonction de leur état de maturation. En effet il est possible qu'une cellule PAX7+ à E14,5 ne soit pas capable de conserver l'expression de *Pax7* lorsqu'elle est en contact avec une cellule différenciée, et que cette capacité s'acquiert avec leur maturation au cours de la myogenèse fœtale. Cette hypothèse de maturation, vaut aussi bien pour la cellule PAX7+ que pour les myofibres qui subissent elles aussi une maturation au cours de la myogenèse fœtale, et pourraient envoyer des signaux aux cellules PAX7+, induisant leur différentiation à E14,5 et le maintien de leur état de progéniteur à E18,5. Ainsi, nous proposons qu'au cours de la myogenèse fœtale, les myofibres secrètent des facteurs attirant les cellules PAX7+ qui expriment les récepteurs adéquats pour recevoir le signal, ces cellules traversent la lame basale entourant les rosettes de myofibres pour participer à la génération de myofibres secondaires. Au début de la myogenèse fœtale, les myofibres favorisent la différentiation des cellules PAX7+ qui perdent donc l'expression de *Pax7*. Au fur et à mesure de la maturation des myofibres et des cellules PAX7+, ces dernières sont capables de conserver l'expression de *Pax7*.

Altération du nichage des cellules PAX7+ chez les fœtus s1s4KO

Alors que chez un fœtus WT la majorité des cellules PAX7+ se trouve dans leur niche à E18,5, la plupart des cellules PAX7+ s1s4KO est encore dans le milieu interstitiel à ce stade. Ce phénotype semble spécifique du double KO pour *Six1* et *Six4*, les fœtus s1KO ne présentant pas de défaut de nichage. Nous avons observé que la majorité des cellules PAX7+ épaxiales expriment SIX2, il serait donc intéressant d'étudier la localisation des cellules

PAX7+ au cours de la myogenèse fœtale chez les fœtus s2KO. La perturbation de la voie Notch conduit au même phénotype (Bröhl et al., 2012) mais aucune trace de dérégulation de cette voie n'est apparue dans notre analyse transcriptomique, suggérant que plusieurs voies de signalisation seraient impliquées dans ce mécanisme. La comparaison de nos données transcriptomiques avec celles de diverses études réalisées sur des cellules myogéniques embryonnaires et fœtales (Biressi et al., 2007b; Bröhl et al., 2012; Tierney et al., 2016), suggère un retard de maturation des myofibres et cellules PAX7+ s1s4KO. Les cellules PAX7+ s1s4KO n'ont pas de défaut de migration aléatoire, et sont capables de traverser une couche de matrice extracellulaire dans une chambre de boyden, *in vitro*. De plus, les molécules sécrétées par des myotubes s1s4KO sont moins efficaces pour attirer les myoblastes s1s4KO que les molécules sécrétées par des myotubes WT. Nous proposons donc que le défaut de nichage observé dans les muscles s1s4KO soit dû à un défaut de maturation des myofibres et des cellules PAX7+, qui n'établissent pas l'environnement adéquat pour permettre le nichage des cellules PAX7+. Enfin, les cellules s1s4KO forment moins de cellules de réserve *in vitro* que des cellules WT. Cette observation va dans le sens d'une maturation des cellules PAX7+ WT au cours de la myogenèse fœtale où elles acquièrent la capacité de maintenir l'expression de *Pax7* en présence de cellules différenciées et d'un retard de maturation des cellules PAX7+ s1s4KO. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait comparer la capacité de générer des cellules de réserve entre des cellule WT isolées à E14,5 et à E18,5.

Défauts transcriptomiques des cellules PAX7+ s1s4KO

La comparaison des transcriptomes réalisées sur les ARNm des cellules PAX7+ WT et s1s4KO nous a permis de mettre en évidence des gènes qui pourraient participer au processus de nichage des cellules PAX7+. En effet, l'expression du gène *Mmp2* codant pour une métalloprotéase (MMP) est fortement augmenté au cours de la myogenèse fœtale dans les cellules WT et n'est pas exprimé dans les cellules s1s4KO. Cette protéine pourrait faciliter la traversée de la lame basale, cependant, nous n'avons pas observé de défaut de nichage des cellules PAX7+ dans les muscles dorsaux de fœtus Mmp2KO à E18,5, suggérant que cette MMP n'est pas indispensable au processus de nichage, ou que son absence est compensée par l'expression d'autres MMP. Il serait intéressant d'étudier le nichage des cellules PAX7+ en absence totale de MMP, par exemple par injection de drogues inhibitrices des MMP au cours de la myogenèse fœtale. L'expression d'autres gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire est augmentée au cours de la myogenèse fœtales chez les cellules PAX7+ WT mais pas dans les cellules s1s4KO, tels que *Fibulin5*, *Mgp* ou *Hémicentine2*. Ces protéines

pourraient contribuer à construire un environnement adéquat au nichage des cellules PAX7+, il serait donc intéressant d'étudier le nichage chez des animaux KO pour ces gènes, d'autant plus que l'expression d'*Hémicentine2* est aussi diminuée dans les cellules PAX3+ déficientes pour la voie Notch et ayant aussi un défaut de nichage (Bröhl et al., 2012) et qu'il a été montré récemment que *Mgp* avait un rôle direct sur les cellules myogénique en modulant l'expression de *MyoD*, *Myogénine* et *Myostatine* (Ahmad et al., 2017). Une collaboration en ce sens a été établie avec les laboratoires ayant généré les allèles mutants pour les gènes *Mgp* (Dr. Monzur Murshed, Université McGill, Montréal), *Fib5* (Rolf A. Brekken, Hamon Center for Therapeutic Oncology Research, Texas) et *Hmcn2* (Matthias Hammerschmidt, CECAD, Cologne).

Défauts transcriptomiques des muscles dorsaux s1s4KO

La majorité des ARNm extraits des muscles dorsaux correspondent à des gènes exprimés dans les fibres musculaires, mais il s'agit d'un extrait musculaire total, comprenant aussi les fibroblastes du tissu conjonctif entourant les masses musculaires, des cellules PAX7+, des cellules endothéliales, des cellules de Schwann etc. Le transcriptome nous a permis de mettre en évidence des gènes qui codent pour des protéines qui pourraient être impliquées dans le processus de nichage. L'expression de deux gènes codant pour des protéines de la membrane plasmique *Gjd4* et *Talin* est augmentée dans les muscles WT au cours de la myogenèse fœtale mais pas dans les muscles s1s4KO. La TALIN avait de plus été localisée à l'interface entre la cellules PAX3+ nichée et la myofibre dans des muscles dorsaux WT (Bröhl et al., 2012), mais la diminution de son expression dans les muscles s1s4KO n'est peut-être qu'une conséquence de la diminution du nombre de cellules nichées. Enfin, les muscles s1s4KO surexpriment des molécules de guidage telles que les ephrines EfnA3, EfnA4, EfnB2, EfnB3 qui sont connues pour avoir un effet répulsif, et l'augmentation de leur expression dans les myofibres s1s4KO pourraient perturber le nichage des cellules PAX7+. Ces molécules sont d'ailleurs connues pour repousser les cellules satellites dans des expériences de « stripe assay » démontrant la sensibilité des cellules PAX7+ aux molécules d'ephrines (Stark et al., 2011). Les muscles s1s4KO surexpriment aussi les molécules CXCL12 et CXCL14. CXCL12 (SDF1) est impliquée via sa liaison à ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans l'attraction et la migration des cellules myogéniques (Vasyutina et al., 2005) alors que CXCL14 a été montrée comme pouvant entrer en compétition avec CXCL12, se liant aux mêmes récepteurs, induisant leur internalisation et empêchant la transmission du signal (Tanegashima et al., 2013a). Une augmentation de la production de CXCL14 dans l'environnement des cellules PAX7+ pourrait aussi perturber leur nichage. Nous avons cependant étudié la localisation des cellules

PAX7+ après avoir traité des femelles gestantes au cours de la myogenèse fœtale avec un inhibiteur de la voie CXCR4/SDF1 et n'avons pas vu d'effet sur le nichage des cellules PAX7+, bien que nous n'ayons pas de preuve que la drogue ait bien fonctionné. Nous avons aussi étudié le nichage des cellules PAX7+ dans des muscles dorsaux de fœtus KO pour CXCR4 dans le lignage Pax7 ($CXCR4^{flox/flox}$;Pax7-CRE, collaboration avec C.Birchmeier) et n'avons pas non plus observé de défaut de nichage, laissant penser que cette voie de signalisation n'est pas indispensable pour le processus de nichage. Cependant, le récepteur CXCR7 est toujours actif chez ces animaux ; la voie de signalisation n'est donc pas entièrement éteinte. Il serait intéressant d'utiliser les molécules Ephrines et CXCL14 *in vitro* pour voir si elles ont un effet répulsif sur les cellules fœtales WT, comme il a déjà été montré sur les cellules adultes pour les ephrines, et ainsi confirmer leur rôle éventuel dans le phénotype de nichage observé. Enfin, le transcriptome des muscles dorsaux nous a permis de mettre en évidence des défauts d'expression de nombreux gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire, et nous avons pu observer dans les fœtus s1s2s4s5KO de graves défauts de formation de la lame basale à E14.5, argument en faveur d'une redondance fonctionnelle entre les différents gènes *Six* exprimés dans le lignage myogénique sur la mise en place d'une niche pour les cellules PAX7+.

Défaut de fusion des cellules s1s4KO

Nous avons observé un défaut de fusion des cellules fœtales s1s4KO dans des conditions de différentiation *in vitro*. Ce phénotype n'avait pas été rapporté précédemment, surement parce que les défauts de différentiation sont épistatiques sur ceux de fusions. En effet, la plupart des études des gènes *Six* réalisées sur des cellules PAX7+ ont été réalisées sur des cellules des membres d'origine hypaxiale, alors que nous avons travaillé avec des cellules issues des muscles dorsaux d'origine épaxiale. Alors que les gènes *Six1* et *Six4* contrôlent l'expression des MRF dans les cellules hypaxiales, leur influence dans les cellules épaxiales (et craniofaciales) est moins évident. L'absence des gènes *Six1* et *Six4* entrainant un défaut d'expression des MRF, les cellules hypaxiales ne peuvent s'engager dans la voie myogénique et ce phénotype masque des défauts potentiels de fusion. Les cellules épaxiales n'ayant pas de défaut majeur d'expression des MRF, elles s'engagent dans la voie de différentiation ce qui nous a permis d'observer qu'elles avaient un défaut de fusion qui ne semble pas lié à l'expression de Myogenine. Les gènes *Six1* et *Six4* contrôlent donc surement l'expression de gènes impliqués dans la fusion des cellules différenciées mononucléées. Il serait donc intéressant de déterminer l'expression des gènes connus pour être importants pour la fusion tels que *Myomaker* et *Myomixer* dans les cellules s1s4KO dans des conditions de

différentiation. L'expression de *Myomaker* est diminuée deux fois dans les muscles dorsaux s1s4KO à E15,5 comparée aux muscles WT dans notre transcriptome, donnée qu'il reste à valider par RTqPCR *in vivo* et *in vitro*. D'autres gènes impliqués dans le contact entre cellules mononucléées et myofibres pourraient être impliqués dans ce phénomène tels que le gène codant pour l'intégrine α4 dont l'expression est diminuée chez les cellules PAX7+ s1s4KO à E15,5. Enfin, le défaut de fusion observé *in vitro* est en corrélation avec le phénotype de microfibres observé après transplantation de cellules fœtales (E18,5) dans des TA adultes lésés, mais ce phénotype n'est pas observé dans les muscles dorsaux des fœtus s1s4KO. Cependant, les cellules utilisées pour réaliser les expériences *in vitro* et les transplantations sont issues de muscles dorsaux à E18,5, et ce ne sont pas ces cellules qui ont participé à la formation des myofibres présentes à E18 ,5 mais leurs cellules filles. Il est possible que les cellules PAX7+ à E18,5 soient plus matures que les cellules qui ont généré les myofibres présentent à E18,5 et que le défaut de fusion ne se manifeste que dans les cellules matures : cellules que nous avons utilisées pour les expériences *in vitro* et les transplantations.

Formation de microfibres après transplantations de cellules PAX7+ s1s4KO

Les animaux s1s4KO mourant à la naissance, l'effet de l'absence combinée de ces deux gènes sur la croissance postnatale et sur la régénération musculaire adulte n'a jamais été étudiée. La transplantation de cellules s1s4KO fœtales dans un muscle adulte lésé et déplété de ses cellules satellites endogènes nous a permis d'étudier ce dernier point. Après 30 jours de régénération suivant un cryodommage, les myofibres s1s4KO nouvellement formées sont très atrophiées comparées aux myofibres s1s4HZ. Une diminution de la taille des fibres après régénération avait aussi été observée chez les animaux KO inductibles pour *Six1* dans les cellules PAX7+ (Le Grand et al., 2012) et dans un contexte de diminution de l'expression de *Six4* (Chakroun et al., 2015). Le phénotype bien plus drastique observé lors de notre étude peut s'expliquer par la double invalidation de *Six1* et *Six4*, le phénotype musculaire des fœtus s1s4KO étant plus drastique que celui des fœtus s1KO et s4KO (Ozaki et al., 2001b; Laclef et al., 2003a; Grifone et al., 2005). Dans notre étude, nous avons utilisé le cryodommage pour léser les muscles, technique qui provoque la lyse de toutes les cellules environnant la blessure alors que les études de Le Grand et al., et Chakroun et al., ont utilisé la Cardiotoxine qui ne lyse que les fibres musculaires et une partie de la population des cellules satellites, différence qui pourrait aussi expliquer que notre phénotype d'atrophie soit plus drastique (Hardy et al., 2016). Dans le modèle de Le Grand et al., l'atrophie musculaire est absente si l'inactivation de *Six1* est réalisée 7 jours après la blessure, suggérant que *Six1* est important au début de la régénération. L'étude de l'état de prolifération et de différentiation des cellules transplantées

dans la première semaine de régénération nous permettrait peut-être de comprendre notre phénotype d'atrophie. L'étude de Chakroun et al., avait aussi observé une diminution du nombre de myofibres formées après régénération en absence de Six4, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. En effet le greffon formé par les fibres s1s4KO est de même taille que celui formé par les cellules s1s4HZ, mais constitué d'un très grand nombre de petites fibres. Ces données suggèrent que les cellules s1s4KO n'ont pas de défaut de différentiation mais plutôt un défaut de fusion avec des myofibres déjà formées. Ces résultats contrastent avec les observations faites sur les fœtus à E18.5, où la CSA des myofibres ne semble pas différente chez les animaux WT et s1s4KO et où le nombre de myofibres est très diminué chez les mutants. Mais nos résultats *in vitro* réalisés sur des myoblastes primaires issus de fœtus à E18.5 sont en faveur de cette explication puisque ex vivo l'index de fusion des cellules s1s4KO est diminué par rapport au cellules WT, les cellules s1s4KO formant majoritairement des cellules MYH+ mononuclées. Il serait intéressant de quantifier le nombre de noyaux par myofibres néoformées après transplantation afin de confirmer ce défaut de fusion *in vivo*. Enfin, le nombre de myofibres dans un muscle est déterminé à la naissance après laquelle la croissance musculaire se fait par accrétion de noyaux dans des myofibres existantes ou par synthèse protéique. Nous proposons que ce mécanisme soit lié à la localisation des cellules PAX7+. Ces dernières se trouvant toutes sous la lame basale d'une myofibre, elles ne forment plus de nouvelles fibres et stoppe ainsi l'hyperplasie musculaire. L'absence de *Six1* et *Six4* provoquant une altération du nichage des cellules PAX7+ fœtales, il est possible que la formation d'un grand nombre de petites myofibres après transplantation soit due au fait que les cellules KO mettent plus de temps à trouver le chemin de leur niche que les cellules contrôles et forment de nouvelles fibres au lieu de fusionner avec des myofibres existantes, participant ainsi au phénotype hyperplasique observé. Notons aussi que le gène *Six4* est connu pour contrôler la voie Akt/mTOR (REF), ainsi l'absence de *Six1/4* dans la fibre adulte pourrait aussi conduire à une atrophie des myofibres par sous activation de cette voie de croissance. L'utilisation d'un KO conditionnel pour les deux gènes *Six1* et *Six4* devrait permettre de répondre à ces questions, en effet la réalisation d'expériences de transcriptomique et de Western blot permettant d'étudier la phosphorylation des protéines de la voie Akt/mTOR impliquées dans l'hypertrophie musculaire nécessite des quantités de matériels qui sont difficilement compatibles avec les greffes. De plus, une collaboration en cours avec l'équipe K. Sakamoto à Lausanne devrait permettre de répondre à certaines de ces questions à partir d'extraits de cultures primaires de myotubes WT et s1s4KO.

Etablissement du typage de fibre et ré-innervation après blessure

Six1 et *Six4* sont impliqués dans l'établissement du métabolisme glycolytique des fibres musculaires ainsi que dans l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines sarcomériques dont les chaines lourdes de myosines rapides. Ainsi, en absence d'expression de *Six1*, toutes les fibres du muscle soléaire sont lentes avec un métabolisme du glucose réduit probablement dû à la diminution de l'expression de TBC1D1 (impliqué dans l'activation de Glut4) et de l'augmentation de Cidea (un inhibiteur de l'AMPK dont l'activité contrôle positivement Glut4), ainsi que de la diminution de l'expression de nombreux gènes du métabolisme oxydatif et glycolytique (Sakakibara et al., 2014) et les masses musculaires dorsales des fœtus s1s4KO ont plus de fibres lentes que des fœtus WT et sont dépourvus de fibres exprimant les gènes de type rapide (Richard et al., 2011). Les myofibres nouvellement formées à partir des cellules PAX7+ s1s4KO transplantées expriment toutes la chaine lourde de myosine lente bien qu'elles se trouvent dans le muscle tibialis antérieur (TA) majoritairement constitué de fibres rapides. La majorité des myofibres formées à partir des cellules s1s4HZ n'expriment d'ailleurs pas la chaine lourde de myosine lente. Il serait intéressant de tester les propriétés métaboliques des myofibres KO sur coupes par immunohistochimie des enzymes des métabolismes oxydatif et glycolytique et par des approches plus fonctionnelles de mesures de l'activité mitochondriale *in vitro*. L'innervation est aussi importante pour contrôler le typage des fibres musculaires. Après une blessure à la cardiotoxine, qui ne lyse pas les motoneurones, l'innervation se remet en place au bout de quelques jours (Grubb et al., 1991). La ré-innervation n'a jamais été étudiée après un cryodommage, qui détruit vraisemblablement les terminaisons nerveuses. Nous avons pu détecter la présence de récepteurs à l'acétylcholine (AchR, détection avec l'α-bungarotoxine) sur les myofibres des greffons formés à partir de cellules s1s4HZ, mais pas dans les greffons formés à partir des cellules s1s4KO. De plus, alors que l'expression de *Myogénine* est généralement éteinte dans un muscle après 30 jours de régénération, l'activation de son expression est retrouvée en cas de dénervation (Merlie et al., 1994). Nous avons pu observer un grand nombre de noyaux MYOG+ dans les greffons s1s4KO mais pas dans les greffons s1s4HZ. Ces observations suggèrent que l'innervation du greffon s1s4KO est altérée, alors qu'elle s'est bien remise en place dans le greffon s1s4HZ. Le TA étant un muscle rapide, ses myofibres sont majoritairement innervées par des motoneurones rapides. L'absence d'innervation observée dans les greffons s1s4KO pourrait s'expliquer par une incapacité des myofibres en absence de *Six1* et *Six4* d'attirer les motoneurones. Une étude récente a mis en évidence que la sécrétion d'EphrinA3 par les fibres musculaires repoussait les motoneurones

rapides (Stark et al., 2015). L'expression de cette molécule est fortement augmentée dans les muscles dorsaux des fœtus s1s4KO, qui ont d'ailleurs un défaut d'innervation (Richard et al., 2011). En plus de contrôler l'expression des gènes de myosine et du métabolisme glycolytique, *Six1* et *Six4* semblent aussi contrôler l'expression de gènes qui permettent à la myofibre d'être innervée. La détection d'EphrinA3 sur les coupes de greffons mutants et contrôle nous renseignera sur l'éventuelle implication de cette protéine dans le défaut d'innervation observé.

Des cellules PAX7+ transplantées sont toujours localisées dans le milieu interstitiel 30 jours après lésion.

Nous n'avons pas observé de différence significative dans le pourcentage de cellules PAX7+ interstitielles entre les cellules s1s4HZ et s1s4KO 30 jours après la blessure du muscle. Cependant, il serait intéressant d'étudier la dynamique du nichage des cellules transplantées au cours de la régénération. En effet, dans un contexte de blessure et transplantation nous ne sommes pas sûrs que les cellules PAX7+ greffées aient recours aux mêmes mécanismes pour se nicher qu'au cours de la myogenèse fœtale. De plus, nous ne connaissons pas non plus les effets du cryodommage sur la MEC, et une étude récente a montré qu'après une blessure à la cardiotoxine la structure de la MEC restait en place formant des fibres fantômes dans lesquelles se reformaient les myofibres lésées (Webster et al., 2016). Dans ce contexte des cellules transplantées n'auraient peur être pas besoin de traverser la lame basale pour reformer les fibres lésées. Il conviendrait donc d'étudier la dynamique de dégradation/réorganisation de la MEC ainsi que la localisation des cellules PAX7+ greffées dans les premiers jours après un cryodommage. De plus, 30 jours après la blessure est peut-être trop tard pour observer d'éventuels défauts transitoires de nichage avec les cellules mutantes. S'il s'avère qu'il n'y a pas de défaut de nichage des cellules PAX7+ s1s4KO dans le paradigme de la transplantation au cours de la régénération, il serait intéressant d'étudier les types cellulaires non musculaires susceptibles de participer au processus de nichage. En effet, après transplantation et régénération, les cellules PAX7+ et les myofibres néoformées sont s1s4KO, mais toutes les cellules de leur environnement telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules inflammatoires, sont du génotype de l'hôte alors que ces types cellulaires sont s1s4KO chez le fœtus. Le nichage pourrait en effet être un procédé impliquant d'autres types cellulaires, les fibroblastes sécrètent des protéines de la MEC et les cellules endothéliales et inflammatoires produisent des molécules d'attraction et de répulsions qui pourraient influer sur le comportement des cellules PAX7+ fœtales. Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément l'expression de *Six1* et *Six4* dans ces types cellulaires et d'étudier l'effet de leur

absence sur le transcriptome de ces cellules. Il n'existe cependant pas dans la littérature de travaux relatant d'éventuels défauts de nichage des cellules PAX7+ au cours de l'embryogenèse chez des fœtus dépourvus de motoneurones, de fibroblastes musculaires ou en absence de vascularisation qui pourraient impliquer ces populations cellulaires dans ce processus spécifique. Notons néanmoins le rôle important de l'activité de contraction de la myofibre sur le comportement des cellules PAX7+ chez l'embryon de poulet (Lima et al., 2016). La majorité des myofibres s1s4KO n'étant pas innervées à E18.5 (Grifone et al., 2005), il serait intéressant d'étudier le nichage des cellules PAX7+ dans un contexte de dénervation mais en présence de *Six1* et *Six4*. Enfin, l'absence d'innervation des greffons mutants suggère que l'innervation n'a pas de rôle majeur dans le nichage des cellules souches myogéniques, puisque l'absence d'innervation n'a pas empêché les cellules PAX7+ de se nicher. L'étude du double KO inductible *Six1Six4* avec différentes CRE recombinase inductibles par le tamoxifen (*Pax7*-CRE, *Rosa*-CRE, *Tcf4*-CRE) nous permettra de trancher sur l'implication éventuelle d'autres types cellulaires dans les défauts de nichage observés. Une publication récente a rapporté que 15 jours après une blessure au chlorure de Barylium (BaCl2) aucune cellule PAX7+ transplantée dans le TA se trouvait en position interstitielle alors que même dans le cas contrôle nous avons observé autour de 20% des cellules transplantées dans le milieu interstitiel à 30 jours. Cependant, nous n'avons pas utilisé la même méthode de blessure musculaire. Le cryodommage étant plus drastique que l'injection de $BaCl_2$, notamment sur les tissus environnant les myofibres (Hardy et al., 2016) il est difficile de comparer les deux études. De plus, les cellules transplantées bien que fœtales dans les deux études ne proviennent pas du même muscle et n'ont pas été isolées de la même manière. Nous avons transplanté des cellules Pax7-nGFP+ triées par FACS et isolées des muscles du dos de fœtus à E18,5 alors que Tierney et al., ont transplanté des cellules $CD45^-$ $CD11b^-CD31^-Sca1^-Itga7^+CD34^+$ triées par FACS et isolées des muscles des pattes postérieures de fœtus à E16,5.

Le milieu conditionné de myotubes s1s4KO n'affecte pas la migration des myoblatses WT

Soumis à l'attraction de milieu conditionné provenant de myotubes WT (MC-WT) les myoblastes s1s4KO migrent plus efficacement que soumis à du MC de myotubes s1s4KO (MC-KO). Ces données suggèrent que les myoblastes s1s4KO sont capables de traverser une couche de protéines de matrice extracellulaire (MEC) et de migrer mais seulement si elles reçoivent les bons signaux. Ainsi, des myotubes s1s4KO semblent moins efficace dans l'attraction des myoblastes s1s4KO que les myotubes WT. Notons que la migration des

myoblastes WT qui est nettement inférieure à celle des myoblastes s1s4KO ne semble pas affectée par le MC-KO. Les myoblastes utilisés ici sont issus de fœtus à E18,5, et à ce stade les cellules PAX7+ WT sont majoritairement localisées sous la lame basale, on peut donc poser l'hypothèse qu'elles n'expriment déjà plus les gènes nécessaires à leur traversée de la lame basale, ce qui expliquerait qu'elles répondent beaucoup moins à du MC-WT que les myoblastes s1s4KO qui eux sont issus de cellules PAX7+ majoritairement interstitielles. Soumis aux bons signaux, les cellules PAX7+ s1s4KO seraient donc capables d'activer l'expression des gènes nécessaires à leur traversée de la lame basale. Il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes sélectionnés suite à notre étude transcriptomique dans ces conditions d'attraction. Si l'expression de certains de ces gènes était induite par le MC-WT chez les myoblastes s1s4KO, nous conclurions que leur expression dans les cellules PAX7+ ne nécessite pas directement les protéines SIX1 et SIX4 dans la cellules PAX7+ mais que leur présence est nécessaire dans la myofibre pour envoyer un signal aux cellules PAX7+. La tendance des myotubes s1s4KO à exprimer un peu plus d'EphA3 que les myotubes WT pourrait participer à la diminution de leur capacité d'attraction des myoblastes. Il a d'ailleurs déjà été montré que la migration de myoblastes pouvait être affectée par les molécules d'éphrines (Stark et al., 2011).

La protéine EYA3 n'est pas requise pour le bon déroulement de la régénération musculaire squelettique

Eya3 faisant partie des gènes *Eya* les plus exprimés dans les cellules musculaires (Charville et al., 2015), ayant un rôle dans la modulation de l'activité du complexe transcriptionnel SIX dans les cellules C2C12 (Li et al, 2003) et étant impliqué dans le réseau de gènes responsable de la formation des muscles de drosophiles (Liu et al., 2009), nous avons étudié la régénération musculaire squelettique chez des animaux Eya3$^{-/-}$. Tous les paramètres analysés au cours de la cinétique de régénération (nombre de cellules PAX7+, taille des fibres ou nombre de noyaux par fibre) se sont montrés identiques entre les animaux Eya3$^{-/-}$ et WT. Il sera important de vérifier par RTqPCR que la construction insérée entre les exons 7 et 8 du gène *Eya3* (Söker et al., 2008) mène bien à sa perte d'expression dans le muscle squelettique, et que nous avons bien étudié un allèle nul du gène *Eya3* dans le lignage musculaire squelettique. D'autres gènes *Eya* étant exprimés dans les cellules musculaires adultes (Charville et al., 2015) il n'est pas impossible que l'absence d'*Eya3* soit compensée par l'expression d'un autre gène *Eya*. En effet, une étude de RNA-seq a montré que l'expression d'*Eya3* et d'*Eya4* était augmentée entre l'état de quiescence et l'état activé des cellules satellites (CS) laissant penser que ces gènes auraient un rôle au cours de la régénération dans ces cellules (Charville et al., 2015). De plus, il a déjà été montré dans le cadre de la myogenèse embryonnaire, que les gènes *Eya* étaient requis au bon déroulement de la formation des muscles squelettiques, le phénotype des embryons Eya1$^{-/-}$Eya2$^{-/-}$ présentant une absence de musculature hypaxiale comme chez les mutants Six1$^{-/-}$Six4$^{-/-}$. Dans cette étude, il a été montré une redondance fonctionnelle entre les gènes *Eya1* et *Eya2*, tous les deux fortement exprimés dans la lèvre hypaxiale du dermomyotome somitique, et importants pour la genèse de progéniteurs musculaires hypaxiaux ; le phénotype musculaire des doubles mutants Eya1$^{-/-}$:Eya2$^{-/-}$ étant plus drastique que celui des simples mutants Eya1$^{-/-}$ ou Eya2$^{-/-}$ (Grifone et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier la régénération des muscles d'animaux KO pour d'autres gènes *Eya* ou chez des KO composites. Nous avons pour cela réalisé des lésions sur les muscles des animaux Eya3$^{-/-}$:Eya1$^{lox/lox}$:Pax7$^{Cre\text{-}ERT2/+}$ et avons analysé leur réparation à plusieurs temps après la blessure. Nous n'avons observé aucun phénotype lors de cette étude. Surpris par ces résultats, nous nous sommes aperçus que la délétion de la séquence floxée située dans le premier exon d'*Eya1* (Xu et al., 2014) ne menait pas à une diminution de la production de la protéine EYA1 (données non présentées), et avons donc laissé de côté cette partie du projet, en alertant les auteurs que leur allèle délété

après activité de la CRE recombinase (données de séquençage d'ADN génomique floxé et délété) conduisait à la production d'un ARNm traductible qui donnait naissance en théorie à une protéine tronquée de seulement quelques acides aminés dans sa partie NH2 terminale. D'après les données de RNAseq publiées en 2015 (Chakroun et al., 2015) et nos données de RTqPCR sur les échantillons fœtaux, le gène *Eya4* est le gène *Eya* le plus exprimé dans les cellules PAX7+ du muscle squelettique. Nous avons donc initié l'étude de la régénération musculaire chez les animaux $Eya4^{lox/lox}Pax7^{Cre\text{-}ERT2/+}$ et avons croisé ces animaux avec les animaux $Eya3^{-/-}$ afin de déterminer le rôle propre d'EYA4, et celui des protéines EYA au cours de la régénération musculaire.

Conclusion

Au cours de ma thèse, j'ai pu étudier le rôle des gènes *Six* et *Eya* au cours des myogenèses prénatale (épaxiale, hypaxiale et craniofaciale) et posntnatale (régénération).

Nous avons observé un rôle jusqu'à présent inconnu pour les protéines SIX. En effet, en plus de leur implication au cours de la myogenèse hypaxiale, les gènes *Six* sont aussi importants pour les myogenèse craniofaciale et épaxiale. En effet, *Six1* et *Six2* sont requis pour la formation des muscles de la tête et l'étude du double KO pour *Six1* et *Six2* a permis de mettre en évidence un rôle inconnu de *Six2* dans la myogenèse hypaxiale. Des cellules musculaires épaxiales sont présentes même en absence de tous les gènes *Six* myogéniques, mais les cellules progénitrices perdent leur potentiel souche. De plus, *Six1* et *Six4* sont aussi requis pour permettre le nichage des cellules progénitrices épaxiales et la maturation des muscles épaxiaux. Notre étude révèle aussi un rôle de *Six1* et *Six4* dans les cellules progénitrices fœtales qui en leur absence ont un défaut de fusion et forment des myofibres atrophiées après transplantation dans un muscle adulte blessé. Ces myofibres ont aussi un défaut d'innervation laissant penser que *Six1* et *Six4* agissent aussi sur l'environnement musculaire des cellules myogéniques adultes. Enfin, bien que *Six1* soit requis pour le bon déroulement de la régénération musculaire adulte, et que les protéines SIX aient besoin de leurs co-facteurs EYA pour induire l'expression de leurs gènes cibles, la perte d'expression d'*Eya3* ne conduit à aucun défaut de régénération musculaire. La compensation fonctionnelle des gènes d'une même famille rend difficile l'étude de leur rôle au cours de processus biologiques et l'étude de KO composites des protéines EYA permettra de mieux comprendre leurs rôles, dépendant et indépendant des gènes *Six* au cours de la régénération musculaire.

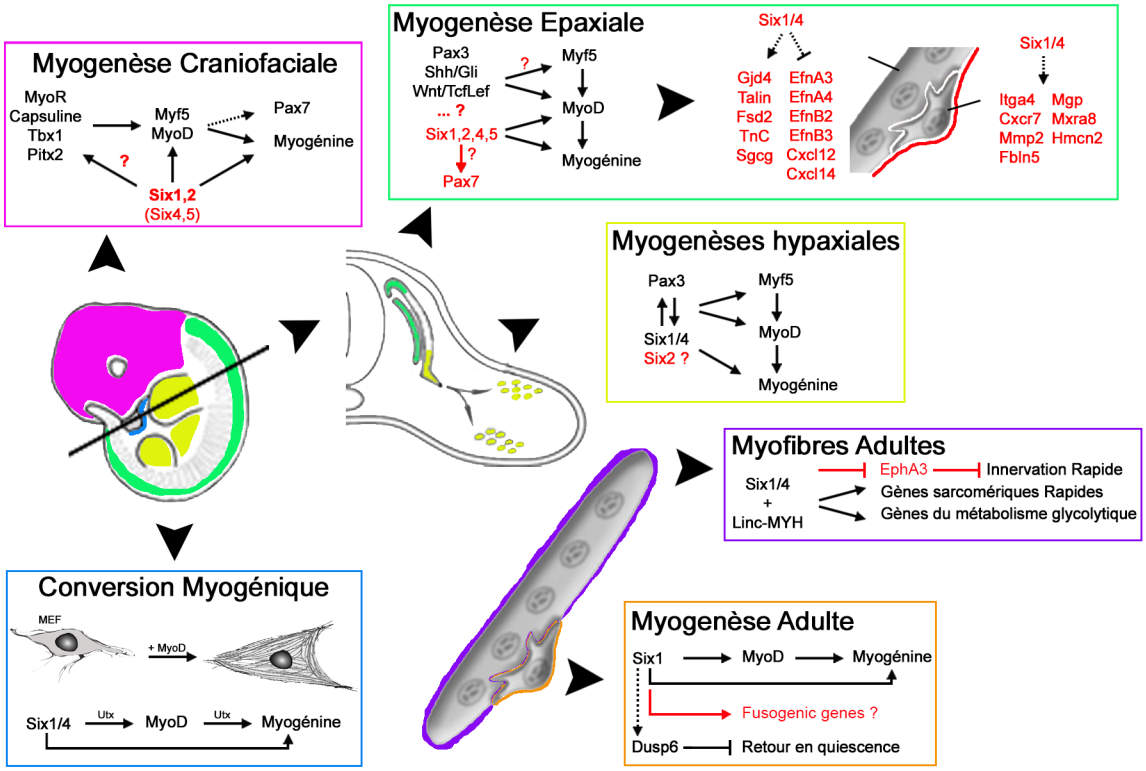


Figure 19 : Les gènes Six et les myogenèses - Actualisation-

Annexes

Publications

Articles publiés au cours de ma thèse et auxquels j'ai participé.

Article 1 :

Six1 homeoprotein drives myofiber type IIA specialization in soleus muscles.

Cette étude a été publiée en 2016 dans le journal *Skeletal Muscle* . Elle a été principalement portée par Iori Sakakibara, post-docorant dans l'équipe. J'ai pu continuer les expériences nécessaires à la publication de cette étude après son départ de l'équipe. Cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle de Six1 dans la spécialisation des myofibres de type IIA dans le muscle soléaire, dans lesquelles Six1 s'accumule préférentiellement où il contrôle l'expression de nombreux gènes sarcomériques de contraction rapide en particulier le gène *Myh2*, de gènes du métabolisme glycolytique et de protéines impliquées dans l'homéostasie du calcium intracellulaire comme la Parvalbumine.

Article 2 :

LSD1 Controls Timely MyoD Expression via MyoD Core Enhancer Transcription.

Cette étude a été publiée en 2017 dans le journal *Cell Reports*. Elle a été menée par Isabella Scionti, étudiante en thèse dans l'équipe de Laurent Schaeffer à Lyon avec qui nous avons pu collaborer afin de mettre en culture des myoblastes primaires issus des bourgeons de membres d'embryons WT à E13.5. Ces cellules ont permis de valider la diminution drastique de l'expression de *MyoD* après transfection de ces cellules avec un lentivirus portant un ARNsh dirigé contre *Lsd1*. La publication a pu mettre en évidence le rôle de l'histone déméthylase LSD1 dans l'induction de l'expression de *MyoD* au cours de la différentiation myogénique.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version.

Posters

Au cours de ma thèse j'ai pu participer à plusieurs congrès français ou internationaux auxquels j'ai eu la chance de présenter mes résultats sous la forme de posters.

Poster 1 : Congrès de la Société Française de Myologie (SFM), Novembre 2013, Lyon, France.

Poster 2 : Congrès FASEB, Satellite Muscle Stem Cells, Juillet 2014, Denver, Colorado, Etats-Unis.
Ce poster m'a permis de remporter une mention honorable du jury ainsi que le prix des participants de la meilleure présentation de poster.

Poster 3 : Summer School, Stem Cell Niche, Septembre 2015, Hydra, Grèce.

Poster 4 : Congrès Stem Cell Niche, Mai 2016, Copenhague, Danemark.

Poster 5 : Journées des jeunes chercheurs de l'Association Française contre les Myopathies (AFM) qui finance ma quatrième année de thèse, Juin 2017, Paris, France.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version.

Médiation scientifique

Dans le cadre du comité de promotion des sciences de l'Institut Cochin, j'ai pu participer à la réalisation d'une Bande Dessinée destinée au public de la fête de la science 2016. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Juliette Chaverot pour les dessins et sous la supervision de Laurence Bénit, responsable de la médiation scientifique à l'Institut Cochin. Nous avons pu travailler sur la vie des cellules souches musculaires chez des patients sains et atteints d'une myopathie.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version.

Bibliographie

Abdelhak, S., V. Kalatzis, R. Heilig, S. Compain, D. Samson, C. Vincent, D. Weil, C. Cruaud, I. Sahly, M. Leibovici, M. Bitner-Glindzicz, M. Francis, D. Lacombe, J. Vigneron, R. Charachon, K. Boven, P. Bedbeder, N. Van Regemorter, J. Weissenbach, and C. Petit. 1997. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* 15:157–164. doi:10.1038/ng0297-157.

Abduelmula, A., R. Huang, Q. Pu, H. Tamamura, G. Morosan-Puopolo, and B. Brand-Saberi. 2016. SDF-1 controls the muscle and blood vessel formation of the somite. *Int. J. Dev. Biol.* 60:29–38. doi:10.1387/ijdb.150132rh.

Abou-Khalil, R., F. Le Grand, G. Pallafacchina, S. Valable, F.-J. Authier, M.A. Rudnicki, R.K. Gherardi, S. Germain, F. Chretien, A. Sotiropoulos, P. Lafuste, D. Montarras, and B. Chazaud. 2009. Autocrine and Paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 Signaling Promotes Muscle Satellite Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 5:298–309. doi:10.1016/j.stem.2009.06.001.

Adams, G.R., S.A. McCue, P.W. Bodell, M. Zeng, and K.M. Baldwin. 2000. Effects of spaceflight and thyroid deficiency on hindlimb development. I. Muscle mass and IGF-I expression. *J. Appl. Physiol.* 88:894–903.

Ahmad, S., A.T. Jan, M.H. Baig, E.J. Lee, and I. Choi. 2017. Matrix gla protein: An extracellular matrix protein regulates myostatin expression in the muscle developmental program. *Life Sci.* 172:55–63. doi:10.1016/j.lfs.2016.12.011.

Ahmed, M., E.Y.M. Wong, J. Sun, J. Xu, F. Wang, and P.X. Xu. 2012a. Eya1-Six1 Interaction Is Sufficient to Induce Hair Cell Fate in the Cochlea by Activating Atoh1 Expression in Cooperation with Sox2. *Dev. Cell*. 22:377–390. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.006.

Ahmed, M., J. Xu, and P.-X. Xu. 2012b. EYA1 and SIX1 drive the neuronal developmental program in cooperation with the SWI/SNF chromatin-remodeling complex and SOX2 in the mammalian inner ear. *Development*. 139:1965–1977. doi:10.1242/dev.071670.

Alameddine, H., D. Hantai, M. Dehaupas, and M. Fardeau. 1991. Role of persisting basement membrane in the from of myofibres originating cell grafts in the rat. *Neuromuscul. Disord.* 1:143–152.

Alexakis, C., T. Partridge, and G. Bou-Gharios. 2007. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293:C661–C669. doi:10.1152/ajpcell.00061.2007.

Alfaro, L.A.S., S.A. Dick, A.L. Siegel, A.S. Anonuevo, K.M. McNagny, L.A. Megeney,

D.D.W. Cornelison, and F.M. V Rossi. 2011. CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 29:2030–2041. doi:10.1002/stem.759.

Amthor, H., B. Christ, and K. Patel. 1999. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development*. 126:1041–53.

Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl. 2011. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 138:3593–3612. doi:10.1242/dev.063610.

De Angelis, L., L. Berghella, M. Coletta, L. Lattanzi, M. Zanchi, M.G. Cusella-De Angelis, C. Ponzetto, and G. Cossu. 1999. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* 147:869–877. doi:10.1083/jcb.147.4.869.

Applebaum, M., R. Ben-Yair, and C. Kalcheim. 2014. Segregation of striated and smooth muscle lineages by a Notch-dependent regulatory network. *BMC Biol.* 12:53. doi:10.1186/PREACCEPT-5975531631281105.

Atkins, M., Y. Jiang, L. Sansores-Garcia, B. Jusiak, G. Halder, and G. Mardon. 2013. Dynamic Rewiring of the Drosophila Retinal Determination Network Switches Its Function from Selector to Differentiation. *PLoS Genet.* 9. doi:10.1371/journal.pgen.1003731.

Aulehla, A., and O. Pourquié. 2006. On periodicity and directionality of somitogenesis. *Anat. Embryol. (Berl)*. 211 Suppl:3–8. doi:10.1007/s00429-006-0124-y.

Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W.G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J.C.R. Jones, H.K. Kleinman, M.P. Marinkovich, G.R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J.H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J.R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L.M. Sorokin, J.F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. Von Der Mark, U.M. Wewer, Y. Yamada, and P.D. Yurchenco. 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24:326–332. doi:10.1016/j.matbio.2005.05.006.

Bajanca, F., M. Luz, M.J. Duxson, and S. Thorsteinsdóttir. 2004. Integrins in the mouse myotome: Developmental changes and differences between the epaxial and hypaxial lineage. *Dev. Dyn.* 231:402–415. doi:10.1002/dvdy.20136.

Bajanca, F., M. Luz, K. Raymond, G.G. Martins, A. Sonnenberg, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, and S. Thorsteinsdóttir. 2006. Integrin a6B1-laminin interactions regulate

early myotome formation in the mouse embryo. *Development*. 133:1635–1644. doi:10.1242/dev.02336.

Bajanca, F., and S. Thorsteinsdottir. 2002. Integrin expression patterns during early limb muscle development in the mouse. *Mech Dev*. 119 Suppl:S131-4. doi:S0925477303001059 [pii].

Bajard, L., F. Relaix, M. Lagha, D. Rocancourt, P. Daubas, and M.E. Buckingham. 2006. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev.* 20:2450–2464. doi:10.1101/gad.382806.

Barany, M. 1967. ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. *J. Gen. Physiol.* 50:197–218. doi:10.1085/jgp.50.6.197.

Behbakht, K., L. Qamar, C.S. Aldridge, R.D. Coletta, S.A. Davidson, A. Thorburn, and H.L. Ford. 2007. Six1 overexpression in ovarian carcinoma causes resistance to TRAIL-mediated apoptosis and is associated with poor survival. *Cancer Res.* 67:3036–3042. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3755.

Ben-Yair, R., and C. Kalcheim. 2005. Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development*. 132:689–701. doi:10.1242/dev.01617.

Ben-Yair, R., and C. Kalcheim. 2008. Notch and bone morphogenetic protein differentially act on dermomyotome cells to generate endothelium, smooth, and striated muscle. *J. Cell Biol.* 180:607–618. doi:10.1083/jcb.200707206.

Bentzinger, C.F., P. Barzaghi, S. Lin, and M. a Ruegg. 2005. Overexpression of mini-agrin in skeletal muscle increases muscle integrity and regenerative capacity in laminin-alpha2-deficient mice. *FASEB J.* 19:934–942. doi:10.1096/fj.04-3376com.

Bentzinger, C.F., Y.X. Wang, N.A. Dumont, and M.A. Rudnicki. 2013a. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 14:1062–72. doi:10.1038/embor.2013.182.

Bentzinger, C.F., Y.X. Wang, J. Von Maltzahn, V.D. Soleimani, H. Yin, and M.A. Rudnicki. 2013b. Fibronectin Regulates Wnt7a Signaling and Satellite Cell Expansion. *Stem Cell*. 12:75–87. doi:10.1016/j.stem.2012.09.015.

Bergstrom, D.A., and S.J. Tapscott. 2001. Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor . 21:2404–2412. doi:10.1128/MCB.21.7.2404.

Bertini, E., and G. Pepe. 2002. Collagen type VI and related disorders: Bethlem myopathy

and Ullrich scleroatonic muscular dystrophy. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 6:193–198. doi:10.1053/ejpn.2002.0593.

Bertolessi, M., L. Linta, T. Seufferlein, A. Kleger, and S. Liebau. 2015. A Fresh Look on T-Box Factor Action in Early Embryogenesis (T-Box Factors in Early Development). *Stem Cells Dev.* 0:150615114653008. doi:10.1089/scd.2015.0102.

Bhattacharyya, S., and M. Bronner-Fraser. 2004. Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14:520–526. doi:10.1016/j.gde.2004.08.002.

Bi, P., A. Ramirez-Martinez, H. Li, J. Cannavino, J.R. McAnally, J.M. Shelton, E. Sánchez-Ortiz, R. Bassel-Duby, and E.N. Olson. 2017. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science (80-.).* 356:323–327. doi:10.1126/science.aam9361.

Biressi, S., G. Messina, P. Collombat, E. Tagliafico, S. Monteverde, L. Benedetti, M.G. Cusella De Angelis, A. Mansouri, S. Ferrari, S. Tajbakhsh, V. Broccoli, and G. Cossu. 2008. The homeobox gene Arx is a novel positive regulator of embryonic myogenesis. *Cell Death Differ.* 15:94–104. doi:10.1038/sj.cdd.4402230.

Biressi, S., M. Molinaro, and G. Cossu. 2007a. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 308:281–93. doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.006.

Biressi, S., E. Tagliafico, G. Lamorte, S. Monteverde, E. Tenedini, E. Roncaglia, S. Ferrari, S. Ferrari, M.G. Cusella-De Angelis, S. Tajbakhsh, and G. Cossu. 2007b. Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells. *Dev. Biol.* 304:633–651. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.016.

Bischoff, R. 1990. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development*. 109:943–952.

Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev. Dyn.* 208:505–515. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199704)208:4<505::AID-AJA6>3.0.CO;2-M.

Bjornson, C.R.R., T.H. Cheung, L. Liu, P. V. Tripathi, K.M. Steeper, and T.A. Rando. 2012. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*. 30:232–242. doi:10.1002/stem.773.

Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 376:768–771. doi:10.1038/376768a0.

Blanco-Bose, W.E., and H.M. Blau. 2001. Laminin-induced change in conformation of

preexisting alpha7beta1 integrin signals secondary myofiber formation. *Dev. Biol.* 233:148–60. doi:10.1006/dbio.2001.0177.

Bloch-Gallego, E. 2015. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:1029–1043. doi:10.1007/s00018-014-1768-z.

Bober, E., T. Franz, H.H. Arnold, P. Gruss, and P. Tremblay. 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*. 120:603–612.

Bonini, N.M., W.M. Leiserson, and S. Benzer. 1993. The eyes absent gene: Genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye. *Cell*. 72:379–395. doi:10.1016/0092-8674(93)90115-7.

Bonnin, M.A., C. Laclef, R. Blaise, S. Eloy-Trinquet, F. Relaix, P. Maire, and D. Duprez. 2005. Six1 is not involved in limb tendon development, but is expressed in limb connective tissue under Shh regulation. *Mech. Dev.* 122:573–585. doi:10.1016/j.mod.2004.11.005.

Borello, U., B. Berarducci, P. Murphy, L. Bajard, V. Buffa, S. Piccolo, M.E. Buckingham, and G. Cossu. 2006. The Wnt/B-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development*. 133:3723–3732. doi:10.1242/dev.02517.

Borue, X., and D.M. Noden. 2004. Normal and aberrant craniofacial myogenesis by grafted trunk somitic and segmental plate mesoderm. *Development*. 131:3967–3980. doi:10.1242/dev.01276.

Borycki, A.G., B. Brunk, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, C. Chiang, and C.P. Emerson. 1999. Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development*. 126:4053–63.

Boucher, C.A., S.K. King, N. Carey, R. Krahe, C.L. Winchester, S. Rahman, T. Creavin, P. Mehji, M.E.S. Bailey, F.L. Chartier, S.D. Brown, M.J. Siciliano, and K.J. Johnson. 1995. A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CPG Island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)n repeat. *Hum. Mol. Genet.* 4:1919–1925. doi:10.1093/hmg/4.10.1919.

Boucher, C. a, N. Carey, Y.H. Edwards, M.J. Siciliano, and K.J. Johnson. 1996. Cloning of the human SIX1 gene and its assignment to chromosome 14. *Genomics*. 33:140–142. doi:10.1006/geno.1996.0172.

Bowman, W. 1840. On the Minute Structure and Movements of Voluntary Muscle. *Philos. Trans. R. Soc. London*. 130:457–501. doi:10.1098/rstl.1840.0022.

Brack, A.S., I.M. Conboy, M.J. Conboy, J. Shen, and T. a Rando. 2008a. A temporal switch

from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*. 2:50–9. doi:10.1016/j.stem.2007.10.006.

Brack, A.S., I.M. Conboy, M.J. Conboy, J. Shen, and T. a Rando. 2008b. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*. 2:50–9. doi:10.1016/j.stem.2007.10.006.

Braghetta, P., A. Ferrari, C. Fabbro, D. Bizzotto, D. Volpin, P. Bonaldo, and G.M. Bressan. 2008. An enhancer required for transcription of the Col6a1 gene in muscle connective tissue is induced by signals released from muscle cells. *Exp. Cell Res.* 314:3508–3518. doi:10.1016/j.yexcr.2008.08.006.

Brand-Saberi, B., V. Krenn, M. Grim, and B. Christ. 1993. Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations. *Anat. Embryol. (Berl).* 187:17–26. doi:10.1007/BF00208193.

Brand-Saberi, B., T.S. Müller, J. Wilting, B. Christ, and C. Birchmeier. 1996. Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev. Biol.* 179:303–8. doi:10.1006/dbio.1996.0260.

Braun, T., and H. Arnold. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. 14.

Braun, T., E. Bober, M. a Rudnicki, R. Jaenisch, and H.H. Arnold. 1994. MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development*. 120:3083–3092. doi:10.1091/mbc.E08.

Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, and H.H. Arnold. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8:701–709.

Braun, T., M.A. Rudnicki, H.H. Arnold, and R. Jaenisch. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*. 71:369–382. doi:10.1016/0092-8674(92)90507-9.

Brent, A.E., R. Schweitzer, and C.J. Tabin. 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*. 113:235–248. doi:10.1016/S0092-8674(03)00268-X.

Brodbeck, S., B. Besenbeck, and C. Englert. 2004. The transcription factor Six2 activates expression of the Gdnf gene as well as its own promoter. *Mech. Dev.* 121:1211–1222. doi:10.1016/j.mod.2004.05.019.

Bröhl, D., E. Vasyutina, M.T. Czajkowski, J. Griger, C. Rassek, H.-P. Rahn, B. Purfürst, H. Wende, and C. Birchmeier. 2012. Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals. *Dev. Cell*. 23:469–81.

doi:10.1016/j.devcel.2012.07.014.

Buckingham, M. 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:440–8.

Buckingham, M., and A. Mayeuf. 2012. Skeletal muscle development. 2. First Edit. Elsevier Inc. 749-762 pp.

Buckingham, M., and F. Relaix. 2015. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 44:115–125. doi:10.1016/j.semcdb.2015.09.017.

Buller, A.J., J.C. Eccles, and R.M. Eccles. 1960. Interactions between motoneurones and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol.* 150:417–439. doi:10.1113/jphysiol.1960.sp006395.

Butler-Browne, G., L. Bugaisky, S. Cuénoud, K. Schwartz, and R. Whalen. 1982. Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. *Nature*. 299:830–833.

Cachaço, A.S., C.S. Pereira, R.G. Pardal, F. Bajanca, and S. Thorsteinsdóttir. 2005. Integrin Repertoire on Myogenic Cells Changes During the Course of Primary Myogenesis in the Mouse. *Dev. Dyn.* 232:1069–1078. doi:10.1002/dvdy.20280.

Cantini, M., E. Giurisato, C. Radu, S. Tiozzo, F. Pampinella, D. Senigaglia, G. Zaniolo, F. Mazzoleni, and L. Vitiello. 2002. Macrophage-secreted myogenic factors: A promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol. Sci.* 23:189–194. doi:10.1007/s100720200060.

Cao, Y., Z. Yao, D. Sarkar, M. Lawrence, G.J. Sanchez, M.H. Parker, K.L. MacQuarrie, J. Davison, M.T. Morgan, W.L. Ruzzo, R.C. Gentleman, and S.J. Tapscott. 2010. Genome-wide MyoD Binding in Skeletal Muscle Cells: A Potential for Broad Cellular Reprogramming. *Dev. Cell*. 18:662–674. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.014.

Carl, M., F. Loosli, and J. Wittbrodt. 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development*. 129:4057–4063.

Chakkalakal, J. V., J. Christensen, W. Xiang, M.T. Tierney, F.S. Boscolo, A. Sacco, and A.S. Brack. 2014. Early forming label-retaining muscle stem cells require p27kip1 for maintenance of the primitive state. *Development*. 141:1649–1659. doi:10.1242/dev.100842.

Chakkalakal, J. V., H. Nishimune, J.L. Ruas, B.M. Spiegelman, and J.R. Sanes. 2010. Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. *Development*. 137:3489–3499. doi:10.1242/dev.053348.

Chakroun, I., D. Yang, J. Girgis, A. Gunasekharan, H. Phenix, M. Kærn, and A. Blais. 2015.

Genome-wide association between Six4, MyoD, and the histone demethylase Utx during myogenesis. *FASEB J.* 29:4738–4755. doi:10.1096/fj.15-277053.

Charville, G.W., T.H. Cheung, B. Yoo, P.J. Santos, G.K. Lee, J.B. Shrager, and T.A. Rando. 2015. Ex vivo expansion and in vivo self-renewal of human muscle stem cells. *Stem Cell Reports*. 5:621–632. doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.004.

Chen, A.E., D.D. Ginty, and C.-M. Fan. 2005. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*. 433:317–322. doi:10.1038/nature03126.

Chen, B., E.H. Kim, and P.X. Xu. 2009. Initiation of olfactory placode development and neurogenesis is blocked in mice lacking both Six1 and Six4. *Dev. Biol.* 326:75–85. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.039.

Chen, C., J.M. Fingerhut, and Y.M. Yamashita. 2016. The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 43:1–6. doi:10.1016/j.ceb.2016.06.001.

Chen, R., M. Amoui, Z. Zhang, and G. Mardon. 1997. Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in Drosophila. *Cell*. 91:893–903. doi:10.1016/S0092-8674(00)80481-X.

Cheyette, B.N.R., P.J. Green, K. Martin, H. Garren, V. Hartenstein, and S.L. Zipursky. 1994. The drosophila sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron*. 12:977–996. doi:10.1016/0896-6273(94)90308-5.

Chiu, A.Y., and J.R. Sanes. 1984. Development of Basal Lamina in Synaptic and Extrasynaptic Portions of Embryonic Rat Muscle. *Dev. Biol.* 103:456–467.

Christ, B., H.J. Jacob, and M. Jacob. 1977. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol. (Berl).* 150:171–186. doi:10.1007/BF00316649.

Christensen, K.L., A.N. Patrick, E.L. McCoy, and H.L. Ford. 2008. The six family of homeobox genes in development and cancer. *Adv. Cancer Res.* 101:93–126. doi:10.1016/S0065-230X(08)00405-3.

Christov, C., F. Chretien, R. Abou-khalil, G. Bassez, G. Vallet, F.-J. Authier, Y. Bassaglia, V. Shinin, S. Tajbakhsh, B. Chazaud, and R.K. Gherardi. 2007. Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells : Close Neighbors and Privileged Partners. *Mol. Biol. Cell*. 18:1397–1409. doi:10.1091/mbc.E06.

Cinnamon, Y., R. Ben-Yair, and C. Kalcheim. 2006. Differential effects of N-cadherin-mediated adhesion on the development of myotomal waves. *Development*. 133:1101–

1112. doi:10.1242/dev.02291.

Cinnamon, Y., N. Kahane, and C. Kalcheim. 1999. Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. *Development*. 126:4305–4315.

Clark, D.D., M.R. Gorman, M. Hatori, J.D. Meadows, S. Panda, and P.L. Mellon. 2013. Aberrant Development of the Suprachiasmatic Nucleus and Circadian Rhythms in Mice Lacking the Homeodomain Protein Six6. *J. Biol. Rhythms*. 28:15–25. doi:10.1177/0748730412468084.

Clark, I.B.N., J. Boyd, G. Hamilton, D.J. Finnegan, and A.P. Jarman. 2006. D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the Drosophila mesoderm. *Dev. Biol.* 294:220–231. doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.044.

Coletta, R.D., E.L. McCoy, V. Burns, K. Kawakami, J.L. McManaman, J.J. Wysolmerski, and H.L. Ford. 2010. Characterization of the Six1 homeobox gene in normal mammary gland morphogenesis. *BMC Dev. Biol.* 10:4. doi:10.1186/1471-213X-10-4.

Collins, C. a, I. Olsen, P.S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T. a Partridge, and J.E. Morgan. 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 122:289–301. doi:10.1016/j.cell.2005.05.010.

Colucci, F. 1999. Dissecting NK cell development using a novel alymphoid mouse model: investigating the role of the c-abl proto-oncogene in murine NK cell differentiation. *J. Immunol.* 162:2761–2765.

Conboy, I.M., M.J. Conboy, A.J. Wagers, E.R. Girma, I.L. Weissman, and T. a Rando. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 433:760–764. doi:10.1038/nature03260.

Conboy, I.M., and T.A. Rando. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell*. 3:397–409. doi:10.1016/S1534-5807(02)00254-X.

Conboy, M.J., A.O. Karasov, and T.A. Rando. 2007. High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol.* 5:1120–1126. doi:10.1371/journal.pbio.0050102.

Condon, K., L. Silberstein, H.M. Blau, and W.J. Thompson. 1990. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.* 138:256–74. doi:0012-1606(90)90196-P [pii].

Cook, P.J., B.G. Ju, F. Telese, X. Wang, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2009. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*.

458:591–6. doi:10.1038/nature07849.

Cossu, G., and M. Molinaro. 1987. Chapter 9 Cell Heterogeneity in The Myogenic Lineage. *Recent Adv. Mamm. Dev.* Volume 23:185–208. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60625-0.

Covault, J., and J.R. Sanes. 1986. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 102:716–730. doi:10.1083/jcb.102.3.716.

Crist, C.G., D. Montarras, and M. Buckingham. 2012. 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*. 11:118–26. doi:10.1016/j.stem.2012.03.011.

Curtiss, J., M. Burnett, and M. Mlodzik. 2007. distal antenna and distal antenna-related function in the retinal determination network during eye development in Drosophila. *Dev. Biol.* 306:685–702. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.006.

Cusella De Angelis, M.G., S. Molinari, A. Le Donne, M. Coletta, E. Vivarelli, M. Bouche, M. Molinaro Ferrari, S., and G. Cossu. 1994. Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF-beta: a possible regulatory mechanism of skelatal muscle histogenesis. *Development*. 120:925–933.

Czajkowski, M.T., C. Rassek, D.C. Lenhard, D. Bröhl, and C. Birchmeier. 2014. Divergent and conserved roles of Dll1 signaling in development of craniofacial and trunk muscle. *Dev. Biol.* 395:307–316. doi:10.1016/j.ydbio.2014.09.005.

Czerny, T., G. Halder, U. Kloter, A. Souabni, W.J. Gehring, and M. Busslinger. 1999. Twin of eyeless, a second Pax-6 gene of Drosophila, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol. Cell*. 3:297–307. doi:10.1016/S1097-2765(00)80457-8.

Dahl, E., H. Koseki, and R. Balling. 1997. Pax genes and organogenesis. *BioEssays*. 19:755–765. doi:10.1002/bies.950190905.

Daston, G., E. Lamar, M. Olivier, and M. Goulding. 1996. Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. 1027:1017–1027.

Daubas, P., and M.E. Buckingham. 2013. Direct molecular regulation of the myogenic determination gene Myf5 by Pax3, with modulation by Six1/4 factors, is exemplified by the -111 kb-Myf5 enhancer. *Dev. Biol.* 376:236–44. doi:10.1016/j.ydbio.2013.01.028.

Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 51:987–1000. doi:10.1016/0092-8674(87)90585-X.

Davis, T.L., and I. Rebay. 2017. Master regulators in development: Views from the Drosophila retinal determination and mammalian pluripotency gene networks. *Dev. Biol.* 421:93–107. doi:10.1016/j.ydbio.2016.12.005.

Delfini, M.C., M. De La Celle, J. Gros, O. Serralbo, I. Marics, M. Seux, M. Scaal, and C. Marcelle. 2009. The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAIL1 pathway. *Dev. Biol.* 333:229–237. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.544.

Dellavalle, a, G. Maroli, D. Covarello, E. Azzoni, a Innocenzi, L. Perani, S. Antonini, R. Sambasivan, S. Brunelli, S. Tajbakhsh, and G. Cossu. 2011. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* 2:499. doi:10.1038/ncomms1508.

DeNardi, C., S. Ausoni, P. Moretti, L. Gorza, M. Velleca, M. Buckingham, and S. Schiaffino. 1993. Type 2X-Myosin Heavy Chain Is Coded by a Muscle. *J. Cell Biol.* 123:823–835.

Denetclaw, W.F., and C.P. Ordahl. 2000. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development*. 127:893–905.

Dennis, M.J., L. Ziskind-Conhaim, and A.J. Harris. 1981. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev. Biol.* 81:266–279. doi:10.1016/0012-1606(81)90290-6.

Deries, M., R. Schweitzer, and M.J. Duxson. 2010. Developmental fate of the mammalian myotome. *Dev. Dyn.* 239:2898–910. doi:10.1002/dvdy.22425.

Desplan, C. 1997. Eye development: Governed by a dictator or a junta? *Cell*. 91:861–864. doi:10.1016/S0092-8674(00)80475-4.

Dietrich, S., F. Abou-Rebyeh, H. Brohmann, F. Bladt, E. Sonnenberg-Riethmacher, T. Yamaai, a Lumsden, B. Brand-Saberi, and C. Birchmeier. 1999. The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development*. 126:1621–1629.

Diogo, R., R.G. Kelly, L. Christiaen, M. Levine, J.M. Ziermann, J.L. Molnar, D.M. Noden, and E. Tzahor. 2015. A new heart for a new head in vertebrate cardiopharyngeal evolution. *Nature*. 520:466–473. doi:10.1038/nature14435.

Dobi, K.C., V.K. Schulman, and M.K. Baylies. 2015. Specification of the somatic musculature in Drosophila. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4:357–375. doi:10.1002/wdev.182.Specification.

Draeger, A., A.G. Weeds, and R.B. Fitzsimons. 1987. Primary, Secondary and Tertiary Myotubes in Developing Skeletal Muscle: A New Approach to the Analysis of Human Myogenesis. *J. Neurol. Sci.* 81:19–43.

Duan, H., C. Zhang, J. Chen, H. Sink, E. Frei, and M. Noll. 2007. A key role of Pox meso in

somatic myogenesis of Drosophila. *Development*. 134:3985–3997. doi:10.1242/dev.008821.

Duband, J.L., S. Dufour, K. Hatta, M. Takeichi, G.M. Edelman, and J.P. Thiery. 1987. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J. Cell Biol.* 104:1361–1374. doi:10.1083/jcb.104.5.1361.

Dumont, N.A., Y.X. Wang, J. von Maltzahn, A. Pasut, C.F. Bentzinger, C.E. Brun, and M.A. Rudnicki. 2015a. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* 21:1455–1463. doi:10.1038/nm.3990.

Dumont, N.A., Y.X. Wang, and M.A. Rudnicki. 2015b. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *compagny Biol.* 142:1572–1581.

Durbeej, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res.* 339:259–268. doi:10.1007/s00441-009-0838-2.

Duxson, M.J., and Y. Usson. 1989. Cellular insertion of primary and secondary myotubes in embryonic rat muscles. *Development*. 107:243–51.

Duxson, M.J., Y. Usson, and a J. Harris. 1989. The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development*. 107:743–750.

El-Hashash, A.H.K., D. Al Alam, G. Turcatel, O. Rogers, X. Li, S. Bellusci, and D. Warburton. 2011a. Six1 transcription factor is critical for coordination of epithelial, mesenchymal and vascular morphogenesis in the mammalian lung. *Dev. Biol.* 353:242–58. doi:10.1016/j.ydbio.2011.02.031.

El-Hashash, A.H.K., G. Turcatel, D. Al Alam, S. Buckley, H. Tokumitsu, S. Bellusci, and D. Warburton. 2011b. Eya1 controls cell polarity, spindle orientation, cell fate and Notch signaling in distal embryonic lung epithelium. *Development*. 138:1395–407. doi:10.1242/dev.058479.

Epstein, D.J., M. Vekemans, and P. Gros. 1991. splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell*. 67:767–774. doi:10.1016/0092-8674(91)90071-6.

Esteve, P., and P. Bovolenta. 1999. cSix4, a member of the six gene family of transcription factors, is expressed during placode and somite development. *Mech. Dev.* 85:161–165. doi:10.1016/S0925-4773(99)00079-9.

Ferrari, G., M.G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science (80-.).* 279:1528–1530. doi:10.1126/science.279.5356.1528.

Filippin, L.I., A.J. Moreira, N.P. Marroni, and R.M. Xavier. 2009. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 21:157–163.

doi:10.1016/j.niox.2009.08.002.

Fladby, T., and J.K. Jansen. 1990. Development of homogeneous fast and slow motor units in the neonatal mouse soleus muscle. *Development*. 109:723–32.

Ford, H.L. 1998. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol. Int.* 22:397–400. doi:10.1006/cbir.1998.0329.

Franz, T. 1997. The Splotch (Sp1H) and Splotch-delayed (Spd) alleles : differential phenotypic effects on neural crest and limb musculature. *Anat. Embryol. (Berl).* 187:371–377.

Franz, T., R. Kothary, M.A.H. Surani, Z. Halata, and M. Grim. 1993. The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat. Embryol. (Berl).* 187:153–160. doi:10.1007/BF00171747.

Fry, C.S., T.J. Kirby, K. Kosmac, J.J. McCarthy, and C.A. Peterson. 2016. Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Stem Cell*. 1–14. doi:10.1016/j.stem.2016.09.010.

Fujimoto, Y., S. Tanaka, Y. Yamaguchi, H. Kobayashi, S. Kuroki, M. Tachibana, M. Shinomura, Y. Kanai, K. ichirou Morohashi, K. Kawakami, and R. Nishinakamura. 2013. Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev. Cell*. 26:416–430. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.018.

Fukada, S., A. Uezumi, M. Ikemoto, S. Masuda, M. Segawa, N. Tanimura, H. Yamamoto, Y. Miyagoe-Suzuki, and S. Takeda. 2007. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells*. 25:2448–59. doi:10.1634/stemcells.2007-0019.

Gage, P.J., H. Suh, and S.A. Camper. 1999. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*. 126:4643–51.

Gallardo, M.E., J. Lopez-Rios, I. Fernaud-Espinosa, B. Granadino, R. Sanz, C. Ramos, C. Ayuso, M.J. Seller, H.G. Brunner, P. Bovolenta, and S. Rodríguez de Córdoba. 1999. Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizygosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics*. 61:82–91. doi:10.1006/geno.1999.5916.

Gambke, B., G.E. Lyons, J. Haselgrove, A.M. Kelly, and N.A. Rubinstein. 1983. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.* 156:335–339. doi:10.1016/0014-5793(83)80524-9.

Garcez, R.C., N.M. Le Douarin, and S.E. Creuzet. 2014. Combinatorial activity of Six1-2-4 genes in cephalic neural crest cells controls craniofacial and brain development. *Cell.*

Mol. Life Sci. 71:2149–64. doi:10.1007/s00018-013-1477-z.

Gawlik, K.I., M. Åkerlund, V. Carmignac, H. Elamaa, and M. Durbeej. 2010. Distinct roles for laminin globular domains in laminin α1 chain mediated rescue of murine laminin α2 chain deficiency. *PLoS One*. 5. doi:10.1371/journal.pone.0011549.

Gawlik, K.I., U. Mayer, K. Blomberg, A. Sonnenberg, P. Ekblom, and M. Durbeej. 2006. Laminin α1 chain mediated reduction of laminin α2 chain deficient muscular dystrophy involves integrin α7β1 and dystroglycan. *FEBS Lett.* 580:1759–1765. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.027.

Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner. 2003. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1531–1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002.

Geng, X., C. Speirs, O. Lagutin, A. Inbal, W. Liu, L. Solnica-Krezel, Y. Jeong, D.J. Epstein, and G. Oliver. 2008. Haploinsufficiency of Six3 Fails to Activate Sonic hedgehog Expression in the Ventral Forebrain and Causes Holoprosencephaly. *Dev. Cell*. 15:236–247. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.003.

Gibson, M.C., and E. Schultz. 1982. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat. Rec.* 202:329–337. doi:10.1002/ar.1092020305.

Gilbert, P.M., K.L. Havenstrite, K.E.G. Magnusson, a Sacco, N. a Leonardi, P. Kraft, N.K. Nguyen, S. Thrun, M.P. Lutolf, and H.M. Blau. 2010. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 329:1078–81. doi:10.1126/science.1191035.

Giordani, J., L. Bajard, J. Demignon, P. Daubas, M. Buckingham, and P. Maire. 2007. Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:11310–5. doi:10.1073/pnas.0611299104.

Gokhin, D.S., S.R. Ward, S.N. Bremner, and R.L. Lieber. 2008. Quantitative analysis of neonatal skeletal muscle functional improvement in the mouse. *J. Exp. Biol.* 211:837–843. doi:10.1242/jeb.014340.

Goodell, B.M.A., K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, and R.C. Mulligan. 1996. Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo. *J. Exp. Med.* 183:1797–1806.

Goulding, M., A. Lumsden, and a J. Paquette. 1994. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development*. 120:957–971.

Goulding, M.D., G. Chalepakis, U. Deutsch, J.R. Erselius, and P. Gruss. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10:1135–

47.

Le Grand, F., R. Grifone, P. Mourikis, C. Houbron, C. Gigaud, J. Pujol, M. Maillet, G. Pagès, M. Rudnicki, S. Tajbakhsh, and P. Maire. 2012. Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 198:815–32. doi:10.1083/jcb.201201050.

Le Grand, F., A.E. Jones, V. Seale, A. Scimè, and M. a Rudnicki. 2009. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*. 4:535–47. doi:10.1016/j.stem.2009.03.013.

Grefte, S., S. Vullinghs, A.M. Kuijpers-Jagtman, R. Torensma, and J.W. Von den Hoff. 2012. Matrigel , but not collagen I , maintains the differentiation capacity of muscle derived cells in vitro. *Biomed. Mater.* 7:1–11. doi:10.1088/1748-6041/7/5/055004.

Grifone, R., J. Demignon, J. Giordani, C. Niro, E. Souil, F. Bertin, C. Laclef, P.-X. Xu, and P. Maire. 2007. Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 302:602–16. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.059.

Grifone, R., J. Demignon, C. Houbron, E. Souil, C. Niro, M.J. Seller, G. Hamard, and P. Maire. 2005. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development*. 132:2235–49. doi:10.1242/dev.01773.

Grifone, R., C. Laclef, F. Spitz, J. Demignon, J. Guidotti, K. Kawakami, P. Xu, R. Kelly, J. Basil, D. Daegelen, J. Concordet, S. Lopez, B.J. Petrof, and P. Maire. 2004. Six1 and Eya1 Expression Can Reprogram Adult Muscle from the Slow-Twitch Phenotype into the Fast-Twitch Phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 24:6253–6267. doi:10.1128/MCB.24.14.6253.

Gros, J., M. Manceau, V. Thomé, and C. Marcelle. 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*. 435:954–8. doi:10.1038/nature03572.

Gros, J., M. Scaal, and C. Marcelle. 2004. A two-Step mechanism for myotome formation in chick. *Dev. Cell*. 6:875–882. doi:10.1016/j.devcel.2004.05.006.

Gros, J., O. Serralbo, and C. Marcelle. 2009. WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature*. 457:589–593. doi:10.1038/nature07564.

Gross, M.K., L. Moran-Rivard, T. Velasquez, M.N. Nakatsu, K. Jagla, and M. Goulding. 2000. Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development*. 127:413–424. doi:10603357.

Grounds, M.D. 2008. Complexity of extracellular matrix and skeletal muscle regeneration.

Skelet. Muscle Repair Regen. 269–301. doi:10.1007/978-1-4020-6768-6.

Grubb, B.D., J.B. Harris, and I.S. Schofield. 1991. Neuromuscular transmission at newly formed neuromuscular junctions in the regenerating soleus muscle of the rat. *J. Physiol.* 441:405–421. doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018758.

Günther, S., J. Kim, S. Kostin, C. Lepper, C.M. Fan, and T. Braun. 2013. Myf5-Positive Satellite Cells Contribute to Pax7-Dependent Long-Term Maintenance of Adult Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 590–601. doi:10.1016/j.stem.2013.07.016.

Guo, K., J. Wang, V. Andrés, R.C. Smith, and K. Walsh. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15:3823–9.

Gurevich, D.B., D.B. Gurevich, P.D. Nguyen, A.L. Siegel, O. V Ehrlich, C. Sonntag, M. Jennifer, N. Phan, S. Berger, D. Ratnayake, L. Hersey, J. Berger, H. Verkade, E. Thomas, and P.D. Currie. 2016. Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo. 9969. doi:10.1126/science.aad9969.

Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401:390–394. doi:10.1038/43919.

Halder, G., P. Callaerts, S. Flister, U. Walldorf, U. Kloter, and W.J. Gehring. 1998. Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. *Development*. 125:2181–2191.

Halder, G., P. Callaerts, and W. Gehring. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science (80-.).* 267:1788–1792. doi:10.1126/science.7892602.

Halperin-Barlev, O., and C. Kalcheim. 2011. Sclerotome-derived Slit1 drives directional migration and differentiation of Robo2-expressing pioneer myoblasts. *Development*. 138:2935–45. doi:10.1242/dev.065714.

Hardy, D., A. Besnard, M. Latil, G. Jouvion, D. Briand, C. Thépenier, Q. Pascal, A. Guguin, B. Gayraud-Morel, J.-M. Cavaillon, S. Tajbakhsh, P. Rocheteau, and F. Chrétien. 2016. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One*. 11:e0147198. doi:10.1371/journal.pone.0147198.

Harel, I., Y. Maezawa, R. Avraham, A. Rinon, H.-Y. Ma, J.W. Cross, N. Leviatan, J. Hegesh, A. Roy, J. Jacob-Hirsch, G. Rechavi, J. Carvajal, S. Tole, C. Kioussi, S. Quaggin, and E. Tzahor. 2012. Pharyngeal mesoderm regulatory network controls cardiac and head muscle morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:18839–18844.

doi:10.1073/pnas.1208690109.

Harel, I., E. Nathan, L. Tirosh-Finkel, H. Zigdon, N. Guimarães-Camboa, S.M. Evans, and E. Tzahor. 2009. Distinct Origins and Genetic Programs of Head Muscle Satellite Cells. *Dev. Cell*. 16:822–832. doi:10.1016/j.devcel.2009.05.007.

Harris, A.J., M.J. Duxson, R.B. Fttzsimons, and F. Rieger. 1989. Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development*. 784:771–784.

Hasson, P., A. DeLaurier, M. Bennett, E. Grigorieva, L.A. Naiche, V.E. Papaioannou, T.J. Mohun, and M.P.O. Logan. 2010. Tbx4 and Tbx5 Acting in Connective Tissue Are Required for Limb Muscle and Tendon Patterning. *Dev. Cell*. 18:148–156. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.013.

Hasty, P., A. Bradley, J.H. Morris, D.G. Edmondson, J.M. Venuti, E.N. Olson, and W.H. Klein. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 364:501–506.

He, G., S. Tavella, K.P. Hanley, M. Self, G. Oliver, R. Grifone, N. Hanley, C. Ward, and N. Bobola. 2010. Inactivation of Six2 in mouse identifies a novel genetic mechanism controlling development and growth of the cranial base. *Dev. Biol.* 344:720–730. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.509.

Heanue, T. a, R. Reshef, R.J. Davis, G. Mardon, G. Oliver, S. Tomarev, a B. Lassar, and C.J. Tabin. 1999. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev.* 13:3231–43.

Heath, S.K., S. Carne, C. Hoyle, K.J. Johnson, and D.J. Wells. 1997. Characterisation of expression of mDMAHP, a homeodomain-encoding gene at the murine DM locus. *Hum. Mol. Genet.* 6:651–657. doi:10.1093/hmg/6.5.651.

Heymann, S., M. Koudrova, H.-H. Arnold, M. Köster, and T. Braun. 1996. Regulation and Function of SF/HGF during Migration of Limb Muscle Precursor Cells in Chicken. *Dev. Biol.* 180:566–578. doi:10.1006/dbio.1996.0329.

Hirsinger, E., D. Duprez, C. Jouve, P. Malapert, J. Cooke, and O. Pourquie. 1997. Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development*. 124:4605–4614.

Hisaoka, M., S. Okamoto, K. Yokoyama, and H. Hashimoto. 2004. Coexpression of NOR1 and SIX3 proteins in extraskeletal myxoid chondrosarcomas without detectable NR4A3 fusion genes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 152:101–107.

doi:10.1016/j.cancergencyto.2003.11.011.

Ho, A.T. Van, S. Hayashi, D. Bröhl, F. Auradé, R. Rattenbach, and F. Relaix. 2011. Neural Crest Cell Lineage Restricts Skeletal Muscle Progenitor Cell Differentiation through Neuregulin1-ErbB3 Signaling. *Dev. Cell*. 21:273–287. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.019.

Hollnagel, A., C. Grund, W.W. Franke, and H. Arnold. 2002. The Cell Adhesion Molecule M-Cadherin Is Not Essential for Muscle Development and Regeneration. *Am. Soc. Microbiol.* 22:4760–4770. doi:10.1128/MCB.22.13.4760.

Hoskins, B.E., C.H. Cramer, D. Silvius, D. Zou, R.M. Raymond, D.J. Orten, W.J. Kimberling, R.J.H. Smith, D. Weil, C. Petit, E.A. Otto, P.-X. Xu, and F. Hildebrandt. 2007. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 80:800–4. doi:10.1086/513322.

Hu, S., A. Mamedova, and R.S. Hegde. 2008. DNA-binding and regulation mechanisms of the SIX family of retinal determination proteins. *Biochemistry*. 47:3586–3594. doi:10.1021/bi702186s.

Hughes, S.M., and H.M. Blau. 1990. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature*. 345:350–353. doi:10.1038/345350a0.

Hunter, D.D., V. Shah, J.P. Merlie, and J.R. Sanes. 1989. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*. 338:229–34. doi:10.1038/338229a0.

Hurren, B., J.J.P. Collins, M.J. Duxson, and M. Deries. 2015. First neuromuscular contact correlates with onset of primary myogenesis in rat and mouse limb muscles. *PLoS One*. 10:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0133811.

Hutcheson, D.A., J. Zhao, A. Merrell, M. Haldar, and G. Kardon. 2009. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for B-catenin. *Genes Dev.* 23:997–1013. doi:10.1101/gad.1769009.

Hynes, R.O. 2002. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins. 110:673–687.

Ikeda, K., and K. Kawakami. 1995. DNA Binding through Distinct Domains of Zinc-Finger-Homeodomain Protein AREB6 has Different Effects on Gene Transcription. *Eur. J. Biochem.* 233:73–82. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.073_1.x.

Ikeda, K., Y. Watanabe, H. Ohto, and K. Kawakami. 2002. Molecular interaction and synergistic activation of a promoter by Six, Eya, and Dach proteins mediated through

CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 22:6759–6766. doi:10.1128/MCB.22.19.6759-6766.2002.

Ikeya, M., and S. Takada. 1998. Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development*. 125:4969–4976.

Irintchev, A., M. Zeschnigk, A. Starzinski-Powitz, and A. Wernig. 1994. Expression Pattern of M-Cadherin in Normal , Denervated , and Regenerating Mouse Muscles. *Dev. Dyn.* 199:326–337.

Itoh, T., I. Toshio, H. Gomi, N. Shinobu, T. Suzuki, and S. Itohara. 1997. Unaltered Secretion of NL -Amyloid Precursor Protein in Gelatinase A (Matrix Metalloproteinase 2) -deficient Mice *. *J. biolo*. 272:22389–22392.

Jansen, J.K.S., and T. Fladby. 1990. The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Prog. Neurobiol.* 34:39–90. doi:10.1016/0301-0082(90)90025-C.

Jarman, A.P., E.H. Grell, L. Ackerman, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1994. Atonal is the proneural gene for Drosophila photoreceptors. *Nature*. 369:398–400. doi:10.1038/369398a0.

Jean, D., G. Bernier, and P. Gruss. 1999. Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev.* 84:31–40. doi:10.1016/S0925-4773(99)00068-4.

Jemc, J., and I. Rebay. 2007. The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 76:513–38. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.164916.

Jerome, L.A., and V.E. Papaioannou. 2001. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* 27:286–91. doi:10.1038/85845.

Joe, A.W., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M.A. Rudnicki, and F.M. Rossi. 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 12:153–163. doi:10.1038/ncb2015.

Jones, L.D., and A.J. Wagers. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:11–21. doi:10.1038/nrm2319.

Jory, A., I. Le Roux, B. Gayraud-Morel, P. Rocheteau, M. Cohen-Tannoudji, A. Cumano, and S. Tajbakhsh. 2009. Numb promotes an increase in skeletal muscle progenitor cells in the embryonic somite. *Stem Cells*. 27:2769–80. doi:10.1002/stem.220.

Jostes, B., C. Walther, and P. Gruss. 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* 33:27–37. doi:10.1016/0925-4773(90)90132-6.

Kablar, B., K. Krastel, C. Ying, a Asakura, S.J. Tapscott, and M. a Rudnicki. 1997. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*. 124:4729–38.

Kahane, N., Y. Cinnamon, and C. Kalcheim. 1998. The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo. *Mech. Dev.* 74:59–73. doi:10.1016/S0925-4773(98)00066-5.

Kahane, N., V. Ribes, A. Kicheva, J. Briscoe, and C. Kalcheim. 2013. The transition from differentiation to growth during dermomyotome-derived myogenesis depends on temporally restricted hedgehog signaling. *Development*. 140:1740–50. doi:10.1242/dev.092726.

Kalcheim, C., Y. Cinnamon, and N. Kahane. 1999. Myotome formation: A multistage process. *Cell Tissue Res.* 296:161–173. doi:10.1007/s004410051277.

Kalhovde, J.M., R. Jerkovic, I. Sefland, C. Cordonnier, E. Calabria, S. Schiaffino, and T. Lømo. 2005. "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J. Physiol.* 562:847–57. doi:10.1113/jphysiol.2004.073684.

Kanisicak, O., J.J. Mendez, S. Yamamoto, M. Yamamoto, and D.J. Goldhamer. 2009. Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev. Biol.* 332:131–41. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.554.

Kanning, K.C., A. Kaplan, and C.E. Henderson. 2010. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 33:409–440. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135722.

Kardon, G., B.D. Harfe, and C.J. Tabin. 2003. A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning. *Dev. Cell*. 5:937–944. doi:10.1016/S1534-5807(03)00360-5.

Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, D. Gomes, D. Rocancourt, M. Buckingham, V. Shinin, and S. Tajbakhsh. 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature*. 431:466–471. doi:10.1038/nature02924.Published.

Kassar-Duchossoy, L., E. Giacone, B. Gayraud-morel, A. Jory, D. Gomès, and S. Tajbakhsh. 2005. Pax3 / Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19:1426–1431. doi:10.1101/gad.345505.

Kaul, A., M. Köster, H. Neuhaus, and T. Braun. 2000. Myf-5 Revisited. *Cell*. 102:17–19. doi:10.1016/S0092-8674(00)00006-4.

Kawabe, Y.I., Y.X. Wang, I.W. McKinnell, M.T. Bedford, and M.A. Rudnicki. 2012. Carm1

regulates Pax7 transcriptional activity through MLL1/2 recruitment during asymmetric satellite stem cell divisions. *Cell Stem Cell*. 11:333–345. doi:10.1016/j.stem.2012.07.001.

Kawakami, K., H. Ohto, K. Ikeda, and R.G. Roeder. 1996a. Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of Drosophila sine oculis gene product, and implication in development. *Nucleic Acids Res.* 24:303–10.

Kawakami, K., H. Ohto, T. Takizawa, and T. Saito. 1996b. Identification and expression of six family genes in mouse retina. *FEBS Lett.* 393:259–263.

Kawakami, K., S. Sato, H. Ozaki, and K. Ikeda. 2000. Six family genes-structure and function as transcription factors and their roles in development [In Process Citation]. *Bioessays*. 22:616–626. doi:10.1002/1521-1878(200007)22:7<616::AID-BIES4>3.0.CO;2-R.

Kelly, A.M. 1978. Perisynaptic Satellite Cells in the Developing and Mature Rat Soleus Muscle. *Anat. Rec.* 190:891–903. doi:10.1002/ar.1091900409.

Kelly, A.M., and S.I. Zacks. 1969. The histogenesis of rat intercostal muscle. *J. Cell Biol.* 42:135–153. doi:10.1083/jcb.42.1.135.

Kelly, R.G., L.A. Jerome-Majewska, and V.E. Papaioannou. 2004. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiometric myogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 13:2829–2840. doi:10.1093/hmg/ddh304.

Kenyon, K.L., D.J. Li, C. Clouser, S. Tran, and F. Pignoni. 2005. Fly SIX-type homeodomain proteins Sine oculis and Optix partner with different cofactors during eye development. *Dev. Dyn.* 234:497–504. doi:10.1002/dvdy.20442.

Khan, J., M.L. Bittner, L.H. Saal, U. Teichmann, D.O. Azorsa, G.C. Gooden, W.J. Pavan, J.M. Trent, and P.S. Meltzer. 1999. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:13264–13269. doi:10.1073/pnas.96.23.13264.

Kherif, S., C. Lafuma, M. Dehaupas, S. Lachkar, J.G. Fournier, M. Verdière-Sahuqué, M. Fardeau, and H.S. Alameddine. 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* 205:158–170. doi:10.1006/dbio.1998.9107.

Kim, J.-H., G.-C. Han, J.-Y. Seo, I. Park, W. Park, H.-W. Jeong, S.H. Lee, S. Bae, J. Seong, M.-K. Yum, S.-H. Hann, Y.-G. Kwon, D. Seo, M.H. Choi, and Y.-Y. Kong. 2016. Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. *Nat. Cell Biol.* 18:930–40. doi:10.1038/ncb3401.

Kirby, R.J., G.M. Hamilton, D.J. Finnegan, K.J. Johnson, and A.P. Jarman. 2001. Drosophila

homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, SIX5, is required for muscle and gonad development. *Curr. Biol.* 11:1044–1049. doi:10.1016/S0960-9822(01)00319-0.

Kitamura, K., H. Miura, S. Miyagawa-Tomita, M. Yanazawa, Y. Katoh-Fukui, R. Suzuki, H. Ohuchi, A. Suehiro, Y. Motegi, Y. Nakahara, S. Kondo, and M. Yokoyama. 1999. Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development*. 126:5749–58. doi:10.1007/bf02401419.

Klesert, T.R., D.H. Cho, J.I. Clark, J. Maylie, J. Adelman, L. Snider, E.C. Yuen, P. Soriano, and S.J. Tapscott. 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 25:105–109. doi:10.1038/75490.

Klesert, T.R., A.D. Otten, T.D. Bird, and S.J. Tapscott. 1997. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat. Genet.* 16:402–406. doi:10.1038/ng0897-402.

Knudsen, K.A., and A.F. Horwitz. 1977. Tandem events in myoblast fusion. *Dev. Biol.* 58:328–338. doi:10.1016/0012-1606(77)90095-1.

Kobayashi, A., M.T. Valerius, J.W. Mugford, T.J. Carroll, M. Self, G. Oliver, and A.P. McMahon. 2008. Six2 Defines and Regulates a Multipotent Self-Renewing Nephron Progenitor Population throughout Mammalian Kidney Development. *Cell Stem Cell*. 3:169–181. doi:10.1016/j.stem.2008.05.020.

Kobayashi, H., K. Kawakami, M. Asashima, and R. Nishinakamura. 2007. Six1 and Six4 are essential for Gdnf expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while Six1 deficiency alone causes mesonephric-tubule defects. *Mech. Dev.* 124:290–303. doi:10.1016/j.mod.2007.01.002.

Konishi, Y., K. Ikeda, Y. Iwakura, and K. Kawakami. 2006. Six1 and Six4 promote survival of sensory neurons during early trigeminal gangliogenesis. *Brain Res.* 1116:93–102. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.103.

Kottlors, M., and J. Kirschner. 2010. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res.* 340:541–548. doi:10.1007/s00441-010-0976-6.

Kowalski, K., A. Kołodziejczyk, M.H. Sikorska, J. Płaczkiewicz, P. Cichosz, M. Kowalewska, W. Streminska, K. Janczyk-Ilach, M. Koblowska, A. Fogtman, R. Iwanicka-Nowicka, M.A. Ciemerych, and E. Brzoska. 2016. Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of Sdf-1/Cxcr4 and Sdf-1/Cxcr7 axis. *Cell Adh. Migr.* 0:0. doi:10.1080/19336918.2016.1227911.

Krauss, R.S., G.A. Joseph, and A.J. Goel. 2017. Keep Your Friends Close : Cell – Cell

Contact and Skeletal Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9:1–16.

Kuang, S., K. Kuroda, F. Le Grand, and M. a Rudnicki. 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. 129:999–1010. doi:10.1016/j.cell.2007.03.044.

Kumar, J.P. 2009. The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:565–83. doi:10.1007/s00018-008-8335-4.

Kumar, J.P. 2010. Retinal determination the beginning of eye development. 93. Elsevier Inc. 1-28 pp.

Kuschel, R., Z. Yablonka-Reuveni, and A. Bornemann. 1999. Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *J Histochem Cytochem*. 47:1375–1384. doi:10.1177/002215549904701104.

Kutejova, E., B. Engist, M. Self, G. Oliver, P. Kirilenko, and N. Bobola. 2008. Six2 functions redundantly immediately downstream of Hoxa2. *Development*. 135:1463–1470. doi:10.1242/dev.017624.

L'Honore, A., J.-F. Ouimette, M. Lavertu-Jolin, and J. Drouin. 2010. Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis. *Development*. 137:3847–3856. doi:10.1242/dev.053421.

LaBarge, M.A., and H.M. Blau. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 111:589–601. doi:10.1016/S0092-8674(02)01078-4.

Laclef, C., G. Hamard, J. Demignon, E. Souil, C. Houbron, and P. Maire. 2003a. Altered myogenesis in Six1-deficient mice. *Development*. 130:2239–2252. doi:10.1242/dev.00440.

Laclef, C., E. Souil, J. Demignon, and P. Maire. 2003b. Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six1 deficient mice. *Mech. Dev.* 120:669–679. doi:10.1016/S0925-4773(03)00065-0.

Laflamme, C., C. Filion, J.A. Bridge, M. Ladanyi, M.B. Goldring, and Y. Labelle. 2003. The homeotic protein Six3 is a coactivator of the nuclear receptor NOR-1 and a corepressor of the fusion protein EWS/NOR-1 in human extraskeletal myxoid chondrosarcomas. *Cancer Res.* 63:449–454.

Lafreniere, J.F., P. Mills, M. Bouchentouf, and J.P. Tremblay. 2006. Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* 312:1127–1141. doi:10.1016/j.yexcr.2006.01.002.

Lagutin, O. V., C.C. Zhu, D. Kobayashi, J. Topczewski, K. Shimamura, L. Puelles, H.R.C. Russell, P.J. McKinnon, L. Solnica-Krezel, and G. Oliver. 2003. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* 17:368–379. doi:10.1101/gad.1059403.

Larder, R., D.D. Clark, N.L.G. Miller, and P.L. Mellon. 2011. Hypothalamic Dysregulation and Infertility in Mice Lacking the Homeodomain Protein Six6. *J. Neurosci.* 31:426–438. doi:10.1523/JNEUROSCI.1688-10.2011.

Lassar Paterson, B.M., Weintraub, H., A.B. 1986. Transfection of a DNA locus that mediate the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 47:649–656.

Latil, M., P. Rocheteau, L. Châtre, S. Sanulli, S. Mémet, M. Ricchetti, S. Tajbakhsh, and F. Chrétien. 2012. Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat. Commun.* 3:903. doi:10.1038/ncomms1890.

Lee, J.K., J.H. Cho, W.S. Hwang, Y.D. Lee, D.S. Reu, and H. Suh-Kim. 2000a. Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system. *Dev. Dyn.* 217:361–367. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200004)217:4<361::AID-DVDY3>3.0.CO;2-8.

Lee, J.Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, a Usas, C. Gates, P. Robbins, a Wernig, and J. Huard. 2000b. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J. Cell Biol.* 150:1085–100.

Leivo, I., A. Vaheri, R. Timpl, and J. Wartiovaara. 1980. Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 76:100–114. doi:10.1016/0012-1606(80)90365-6.

Lepper, C., and C.M. Fan. 2010. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. 48:424–436. doi:10.1002/dvg.20630.

Lepper, C., T. a Partridge, and C.-M. Fan. 2011. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*. 138:3639–46. doi:10.1242/dev.067595.

Li, C.-M., M. Guo, A. Borczuk, C. a Powell, M. Wei, H.M. Thaker, R. Friedman, U. Klein, and B. Tycko. 2002a. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am. J. Pathol.* 160:2181–2190. doi:10.1016/S0002-9440(10)61166-2.

Li, H.S., J.M. Yang, R.D. Jacobson, D. Pasko, and O. Sundin. 1994. Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev Biol*. 162:181–194. doi:10.1006/dbio.1994.1077.

Li, X., K. a Oghi, J. Zhang, A. Krones, K.T. Bush, C.K. Glass, S.K. Nigam, A.K. Aggarwal, R. Maas, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld. 2003. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*. 426:247–54. doi:10.1038/nature02083.

Li, X., V. Perissi, F. Liu, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld. 2002b. Tissue-Specific Regulation of Retinal and Pituitary Precursor Cell Proliferation. *Science (80-.).* 297:1180–1184. doi:10.1126/science.1073263.

Lima, J.E., M.-A. Bonnin, C. Birchmeier, and D. Duprez. 2016. Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. *Elife*. 513–516. doi:10.1007/s11548-012-0737-y.

Linker, C., C. Lesbros, J. Gros, L. Burrus, A. Rawls, and C. Marcelle. 2005. Beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Development*. 132:3895–3905. doi:10.1242/dev.01961.

Liu, N., G.A. Garry, S. Li, S. Bezprozvannaya, E. Sanchez-ortiz, B. Chen, J.M. Shelton, P. Jaichander, R. Bassel-duby, and E.N. Olson. 2017. A Twist2-dependent progenitor cell contributes to adult skeletal muscle. doi:10.1038/ncb3477.

Liu, W., and A. Cvekl. 2017. Six3 in a small population of progenitors at E8.5 is required for neuroretinal specification via regulating cell signaling and survival in mice. *Dev. Biol.* 1–12. doi:10.1016/j.ydbio.2017.05.026.

Liu, W., O. Lagutin, E. Swindell, M. Jamrich, and G. Oliver. 2010a. Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate. *October*. 120. doi:10.1172/JCI43219DS1.

Liu, Y., I. Chakroun, D. Yang, E. Horner, J. Liang, A. Aziz, A. Chu, Y. De Repentigny, F.J. Dilworth, R. Kothary, and A. Blais. 2013. Six1 Regulates MyoD Expression in Adult Muscle Progenitor Cells. *PLoS One*. 8. doi:10.1371/journal.pone.0067762.

Liu, Y., A. Chu, I. Chakroun, U. Islam, and A. Blais. 2010b. Cooperation between myogenic regulatory factors and SIX family transcription factors is important for myoblast differentiation. *Nucleic Acids Res.* 38:6857–6871. doi:10.1093/nar/gkq585.

Liu, Y.H., J.S. Jakobsen, G. Valentin, I. Amarantos, D.T. Gilmour, and E.E.M. Furlong. 2009. A Systematic Analysis of Tinman Function Reveals Eya and JAK-STAT Signaling as Essential Regulators of Muscle Development. *Dev. Cell*. 16:280–291. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.006.

Loosli, F., S. Winkler, and J. Wittbrodt. 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13:649–654. doi:10.1101/gad.13.6.649.

Lopez-Rios, J. 2003. Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family. *Development*. 130:185–195. doi:10.1242/dev.00185.

Lopez-Rios, J., M.E. Gallardo, S. Rodriguez De Cordoba, and P. Bovolenta. 1999. Six9 (Optx2), a new member of the Six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mech. Dev.* 83:155–159. doi:10.1016/S0925-4773(99)00017-9.

Lu, A., J.H. Cummins, J.B. Pollett, B. Cao, B. Sun, M.A. Rudnicki, and J. Huard. 2008. Isolation of myogenic progenitor populations from Pax7-deficient skeletal muscle based on adhesion characteristics. *Gene Ther.* 15:1116–1125. doi:10.1038/gt.2008.86.

Lu, J., P. Chang, J. a Richardson, L. Gan, H. Weiler, and E.N. Olson. 2000. The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:9525–9530. doi:10.1073/pnas.97.17.9525.

Lu, J., R. Webb, J. a Richardson, and E.N. Olson. 1999. MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:552–557. doi:10.1073/pnas.96.2.552.

Lu, J.R., R. Bassel-Duby, A. Hawkins, P. Chang, R. Valdez, H. Wu, L. Gan, J.M. Shelton, J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2002. Control of facial muscle development by MyoR and capsulin. *Science (80-.).* 298:2378–2381. doi:10.1126/science.1078273.

Lund, D.K., and D.D.W. Cornelison. 2013. Enter the matrix: Shape, signal and superhighway. *FEBS J.* 280:4089–4099. doi:10.1111/febs.12171.

Luo, D., V.M. Renault, and T.A. Rando. 2005. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:612–622. doi:10.1016/j.semcdb.2005.07.002.

Luque, E., J. Peña, P. Martin, I. Jimena, and R. Vaamonde. 1995. Capillary Supply During Development of Individual Regenerating Muscle Fibers. *Anat. Histol. Embryol.* 24:87–89. doi:10.1111/j.1439-0264.1995.tb00016.x.

Ma, Q., L. Sommer, P. Cserjesi, and D.J. Anderson. 1997. Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.* 17:3644–52.

Manavathi, B., S. Peng, S.K. Rayala, A.H. Talukder, M.H. Wang, R.-A. Wang, S. Balasenthil, N. Agarwal, L.J. Frishman, and R. Kumar. 2007. Repression of Six3 by a corepressor regulates rhodopsin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:13128–33. doi:10.1073/pnas.0705878104.

Mansouri, A., A. Stoykova, M. Torres, and P. Gruss. 1996. Dysgenesis of cephalic neural

crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development*. 122:831–8.

Marcelle, C., M.R. Stark, and M. Bronner-Fraser. 1997. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development*. 124:3955–3963.

Maroto, M., R. Reshef, a E. Münsterberg, S. Koester, M. Goulding, and a B. Lassar. 1997. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell*. 89:139–148. doi:10.1016/S0092-8674(00)80190-7.

Marti, M., C. Pardo, L. Mulero, L. Miquel-serra, B. Kuebler, C. Morera, A. Miguel, and C. Rodrigues. 2009. M-cadherin-mediated intercellular interactions activate satellite cell division. *J. Cell Sci.* doi:10.1242/jcs.123562.

Martins, G.G., P. Rifes, R. Amaândio, G. Rodrigues, I. Palmeirim, and S. Thorsteinsdóttir. 2009. Dynamic 3D cell rearrangements guided by a fibronectin matrix underlie somitogenesis. *PLoS One*. 4. doi:10.1371/journal.pone.0007429.

Massari, M.E., and C. Murre. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20:429–440. doi:10.1128/MCB.20.2.429-440.2000.

Mathew, S.J., J.M. Hansen, A.J. Merrell, M.M. Murphy, J. a Lawson, D. a Hutcheson, M.S. Hansen, M. Angus-Hill, and G. Kardon. 2011. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development*. 138:371–384. doi:10.1242/dev.057463.

Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:493–5.

Mayeuf-Louchart, A., M. Lagha, A. Danckaert, D. Rocancourt, F. Relaix, S.D. Vincent, and M. Buckingham. 2014. Notch regulation of myogenic versus endothelial fates of cells that migrate from the somite to the limb. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:8844–8849. doi:10.1073/pnas.1407606111.

Mayeuf-Louchart, A., D. Montarras, C. Bodin, T. Kume, S.D. Vincent, and M. Buckingham. 2016. Endothelial cell specification in the somite is compromised in Pax3-positive progenitors of Foxc1/2 conditional mutants, with loss of forelimb myogenesis. *Development*. 143:872–879. doi:10.1242/dev.128017.

McDermott, A., M. Gustafsson, T. Elsam, C.-C. Hui, C.P. Emerson, and A.-G. Borycki. 2005a. Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development*. 132:345–57. doi:10.1242/dev.01537.

McDermott, A., M. Gustafsson, T. Elsam, C.-C. Hui, C.P. Emerson, and A.-G. Borycki. 2005b. Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development*. 132:345–57. doi:10.1242/dev.01537.

Meng, Z.-X., S. Li, L. Wang, H.J. Ko, Y. Lee, D.Y. Jung, M. Okutsu, Z. Yan, J.K. Kim, and

J.D. Lin. 2013. Baf60c drives glycolytic metabolism in the muscle and improves systemic glucose homeostasis through Deptor-mediated Akt activation. *Nat. Med.* 19:640–645. doi:10.1038/nm.3144.

Mennerich, D., K. Schäfer, and T. Braun. 1998. Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech. Dev.* 73:147–158. doi:10.1016/S0925-4773(98)00046-X.

Merlie, J.P., J. Mudd, T.C. Cheng, and E.N. Olson. 1994. Myogenin and acetylcholine receptor α gene promoters mediate transcriptional regulation in response to motor innervation. *J. Biol. Chem.* 269:2461–2467.

Messina, G., S. Biressi, S. Monteverde, A. Magli, M. Cassano, L. Perani, E. Roncaglia, E. Tagliafico, L. Starnes, C.E. Campbell, M. Grossi, D.J. Goldhamer, R.M. Gronostajski, and G. Cossu. 2010. Nfix regulates fetal-specific transcription in developing skeletal muscle. *Cell*. 140:554–66. doi:10.1016/j.cell.2010.01.027.

Michailovici, I., T. Eigler, and E. Tzahor. 2015. Craniofacial Muscle Development. 115. 1st ed. Elsevier Inc. 3-30 pp.

Millay, D.P., J.R. O'Rourke, L.B. Sutherland, S. Bezprozvannaya, J.M. Shelton, R. Bassel-Duby, and E.N. Olson. 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature*. 499:301–5. doi:10.1038/nature12343.

Miller, J.B., and F.E. Stockdale. 1986. Developmental origins of skeletal muscle fibers: clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:3860–3864. doi:10.1073/pnas.83.11.3860.

Milner, L.D., V.F. Rafuse, and L.T. Landmesser. 1998. Selective fasciculation and divergent pathfinding decisions of embryonic chick motor axons projecting to fast and slow muscle regions. *J. Neurosci.* 18:3297–3313.

Minasi, M.G., M. Riminucci, L. De Angelis, U. Borello, B. Berarducci, A. Innocenzi, A. Caprioli, D. Sirabella, M. Baiocchi, R. De Maria, R. Boratto, T. Jaffredo, V. Broccoli, P. Bianco, and G. Cossu. 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 129:2773–2783. doi:10.1098/rstb.2000.0631.

Mitchell, K.J., A. Pannérec, B. Cadot, A. Parlakian, V. Besson, E.R. Gomes, G. Marazzi, and D. a Sassoon. 2010. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 12:257–66. doi:10.1038/ncb2025.

Montarras, D., A. L'Honoré, and M. Buckingham. 2013. Lying low but ready for action: The

quiescent muscle satellite cell. *FEBS J.* 280:4036–4050. doi:10.1111/febs.12372.

Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, and M. Buckingham. 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 309:2064–7. doi:10.1126/science.1114758.

Moody, S.A., and A.-S. LaMantia. 2015. Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. 111. 1st ed. Elsevier Inc. 301-50 pp.

Morillo, S. a, L.R. Braid, E.M. Verheyen, and I. Rebay. 2012. Nemo phosphorylates Eyes absent and enhances output from the Eya-Sine oculis transcriptional complex during Drosophila retinal determination. *Dev. Biol.* 365:267–76. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.030.

Moss, F.P., and C.P. Leblond. 1970. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J. Cell Biol.* 459–462.

Mourikis, P., S. Gopalakrishnan, R. Sambasivan, and S. Tajbakhsh. 2012a. Cell-autonomous Notch activity maintains the temporal specification potential of skeletal muscle stem cells. *Development*. 139:4536–48. doi:10.1242/dev.084756.

Mourikis, P., R. Sambasivan, D. Castel, P. Rocheteau, V. Bizzarro, and S. Tajbakhsh. 2012b. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells*. 30:243–252. doi:10.1002/stem.775.

Muller, D., P. Cherukuri, K. Henningfeld, C.H. Poh, L. Wittler, P. Grote, O. Schluter, J. Schmidt, J. Laborda, S.R. Bauer, R.M. Brownstone, and T. Marquardt. 2014. Dlk1 Promotes a Fast Motor Neuron Biophysical Signature Required for Peak Force Execution. *Science (80-.).* 343:1264–1266. doi:10.1126/science.1246448.

Murphy, M.M., A.C. Keefe, J.A. Lawson, S.D. Flygare, M. Yandell, and G. Kardon. 2014. Transiently active wnt/b-catenin signaling is not required but must be silenced for stem cell function during muscle regeneration. *Stem Cell Reports*. 3:475–488. doi:10.1016/j.stemcr.2014.06.019.

Murphy, M.M., J.A. Lawson, S.J. Mathew, D.A. Hutcheson, and G. Kardon. 2011. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 138:3625–37. doi:10.1242/dev.064162.

Nabeshima, Y., K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, I. Nonaka, and Y. Nabeshima. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*. 364:532–5. doi:10.1038/364532a0.

Nassari, S., D. Duprez, and C. Fournier-Thibault. 2017. Non-myogenic Contribution to Muscle Development and Homeostasis: The Role of Connective Tissues. *Front. Cell*

Dev. Biol. 5:1–17. doi:10.3389/fcell.2017.00022.

Ng, K.T., K. Man, C.K. Sun, T.K. Lee, R.T. Poon, C.-M. Lo, and S.-T. Fan. 2006. Clinicopathological significance of homeoprotein Six1 in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*. 95:1050–5. doi:10.1038/sj.bjc.6603399.

Niimi, T., M. Seimiya, U. Kloter, S. Flister, and W.J. Gehring. 1999. Direct regulatory interaction of the eyeless protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in Drosophila. *Development*. 126:2253–60.

Niiya, A., H. Otho, K. Kawakami, and A. Masasuke. 1998. Localization of Six4 / AREC3 in the Developing Mouse Retina ; Implications in Mammalian Retinal Development †. *Exp. Eye Res.* 67:699–707.

Niro, C., J. Demignon, S. Vincent, Y. Liu, J. Giordani, N. Sgarioto, M. Favier, I. Guillet-Deniau, A. Blais, and P. Maire. 2010. Six1 and Six4 gene expression is necessary to activate the fast-type muscle gene program in the mouse primary myotome. *Dev. Biol.* 338:168–82. doi:10.1016/j.ydbio.2009.11.031.

Nishimura, T., K. Nakamura, Y. Kishioka, Y. Kato-Mori, J.I. Wakamatsu, and A. Hattori. 2008. Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 29:37–44. doi:10.1007/s10974-008-9140-2.

Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi, and J. Rossant. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 123:917–929. doi:10.1016/j.cell.2005.08.040.

Noden, D.M. 1986. Patterning of avian craniofacial muscles. *Dev. Biol.* 116:347–356. doi:10.1016/0012-1606(86)90138-7.

Noden, D.M., R. Marcucio, A.G. Borycki, and C.P. Emerson. 1999. Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev. Dyn.* 216:96–112. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<96::AID-DVDY2>3.0.CO;2-6.

Noden, D.M., and P.A. Trainor. 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J. Anat.* 207:575–601. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00473.x.

Nogueira, J.M., K. Hawrot, C. Sharpe, A. Noble, W. Wood, E.C. Jorge, D.J. Goldhamer, G. Kardon, and S. Dietrich. 2015. The emergence of Pax7-expressing muscle stem cells during vertebrate head muscle development. *Front. Aging Neurosci.* 7:62. doi:10.3389/fnagi.2015.00062.

Nord, H., L. Nygård Skalman, and J. von Hofsten. 2013. Six1 regulates proliferation of Pax7-

positive muscle progenitors in zebrafish. *J. Cell Sci.* 126:1868–80. doi:10.1242/jcs.119917.

Nunes, A.M., R.D. Wuebbles, A. Sarathy, T.M. Fontelonga, M. Deries, D.J. Burkin, and S. Thorsteinsdóttir. 2017. Impaired fetal muscle development and JAK-STAT activation mark disease onset and progression in a mouse model for merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 0:1–16. doi:10.1093/hmg/ddx083.

Ohto, H., S. Kamada, K. Tago, H. Ozaki, and S. Sato. 1999. Cooperation of Six and Eya in Activation of Their Target Genes through Nuclear Translocation of Eya Cooperation of Six and Eya in Activation of Their Target Genes through Nuclear Translocation of Eya. *Mol. Cell. Biol.* 19:6815–6824.

Ohto, H., T. Takizawa, T. Saito, M. Kobayashi, K. Ikeda, and K. Kawakami. 1998. Tissue and developmental distribution of Six family gene products. *Int. J. Dev. Biol.* 42:141–148.

Olguin, H.C., Z. Yang, S.J. Tapscott, and B.B. Olwin. 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J. Cell Biol.* 177:769–779. doi:10.1083/jcb.200608122.

Oliver, G., A. Mailhos, R. Wehr, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and P. Gruss. 1995a. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development*. 121:4045–4055.

Oliver, G., R. Wehr, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, B.N. Cheyette, V. Hartenstein, S.L. Zipursky, and P. Gruss. 1995b. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*. 121:693–705.

Oliver, G., R. Wehr, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, B.N.R. Cheyette, V. Hartenstein, S.L. Zipursky, and P. Gruss. 1994. Homeobox genes and connective tissue patterning. 705:693–705.

Olson, E.N., H.H. Arnold, P.W.J. Rigby, and B.J. Wold. 1996. Know your neighbors: Three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*. 85:1–4. doi:10.1016/S0092-8674(00)81073-9.

Ontell, M., D. Bourke, and D. Hughes. 1988. Cytoarchitecture of the Fetal Murine Soleus Muscle. *Am. J. Anat.* 278:267–278.

Ontell, M., and K. Kozeka. 1984a. The Organogenesis of Murine Striated Muscle : A Cytoarchitectural Study. *Am. J. Anat.* 148:133–148.

Ontell, M., and K. Kozeka. 1984b. Organogenesis of the Mouse Extensor Digitorum Logus

Muscle : A Quantitative Study. *Am. J. Anat.* 161:149–161.

Ordahl, C.P., and N.M. Le Douarin. 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*. 114:339–53.

Otto, A., C. Schmidt, G. Luke, S. Allen, P. Valasek, F. Muntoni, D. Lawrence-Watt, and K. Patel. 2008. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell Sci.* 121:2939–2950. doi:10.1242/jcs.026534.

Oustanina, S., G. Hause, and T. Braun. 2004. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23:3430–9. doi:10.1038/sj.emboj.7600346.

Ozaki, H., Y. Watanabe, K. Takahashi, K. Kitamura, A. Tanaka, K. Urase, T. Momoi, K. Sudo, J. Sakagami, M. Asano, Y. Iwakura, and K. Kawakami. 2001a. Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol.* 21:3343–50. doi:10.1128/MCB.21.10.3343-3350.2001.

Ozaki, H., Y. Watanabe, K. Takahashi, K. Kitamura, A. Tanaka, K. Urase, T. Momoi, K. Sudo, J. Sakagami, M. Asano, Y. Iwakura, and K. Kawakami. 2001b. Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol.* 21:3343–50. doi:10.1128/MCB.21.10.3343-3350.2001.

Pallafacchina, G., S. François, B. Regnault, B. Czarny, V. Dive, A. Cumano, D. Montarras, and M. Buckingham. 2010. 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.* 4:77–91. doi:10.1016/j.scr.2009.10.003.

Pannérec, A., L. Formicola, V. Besson, G. Marazzi, and D.A. Sassoon. 2013. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development*. doi:10.1242/dev.089326.

Pappu, K.S., E.J. Ostrin, B.W. Middlebrooks, B.T. Sili, R. Chen, M.R. Atkins, R. Gibbs, and G. Mardon. 2005. Dual regulation and redundant function of two eye-specific enhancers of the Drosophila retinal determination gene dachshund. *Development*. 132:2895–2905. doi:10.1242/dev.01869.

Parisi, a., F. Lacour, L. Giordani, S. Colnot, P. Maire, and F. Le Grand. 2015. APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair. *J. Cell Biol.* 210:717–726. doi:10.1083/jcb.201501053.

Park, J.S., W. Ma, L.L. O'Brien, E. Chung, J.J. Guo, J.G. Cheng, M.T. Valerius, J.A. McMahon, W.H. Wong, and A.P. McMahon. 2012. Six2 and Wnt Regulate Self-Renewal and Commitment of Nephron Progenitors through Shared Gene Regulatory

Networks. *Dev. Cell*. 23:637–651. doi:10.1016/j.devcel.2012.07.008.

Parmacek, M.S., H.S. Ip, F. Jung, T. Shen, J.F. Martin, A.J. Vora, E.N. Olson, and J.M. Leiden. 1994. A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 14:1870–1885. doi:10.1128/MCB.14.3.1870.Updated.

Partridge, T., and J. Sloper. 1977. A host contribution to the regeneration of muscle graft. *J. Neurol. Sci.* 33:425–435.

Patapoutian, A., J.K. Yoon, J.H. Miner, S. Wang, K. Stark, and B. Wold. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development*. 121:3347–58.

Patrick, A.N., J.H. Cabrera, A.L. Smith, X.S. Chen, H.L. Ford, and R. Zhao. 2013. Structure-Function Analyses of the Human SIX1-EYA2 Complex Reveal Insights into Metastasis and BOR Syndrome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:447–453. doi:10.1530/ERC-14-0411.Persistent.

Patrick, A.N., B.J. Schiemann, K. Yang, R. Zhao, and H.L. Ford. 2009. Biochemical and functional characterization of six SIX1 Branchio-oto-renal syndrome mutations. *J. Biol. Chem.* 284:20781–20790. doi:10.1074/jbc.M109.016832.

Pauli, T., M. Seimiya, J. Blanco, and W.J. Gehring. 2005. Identification of functional sine oculis motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the eyeless enhancer and in the signalling gene hedgehog. *Development*. 132:2771–2782. doi:10.1242/dev.01841.

Pavlath, G.K., and H.M. Blau. 1986. Expression of muscle genes in heterokaryons depends on gene dosage. *J. Cell Biol.* 102:124–130. doi:10.1083/jcb.102.1.124.

Peng, H., and J. Huard. 2004. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl. Immunol.* 12:311–319. doi:10.1016/j.trim.2003.12.009.

Personius, K.E., J. Nautiyal, and S. Reddy. 2005. Myotonia and muscle contractile properties in mice with SIX5 deficiency. *Muscle and Nerve*. 31:503–505. doi:10.1002/mus.20239.

Peterson, K.J., and E.H. Davidson. 2000. Regulatory evolution and the origin of the bilaterians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4430–4433. doi:10.1073/pnas.97.9.4430.

Pieper, M., G.W. Eagleson, W. Wosniok, and G. Schlosser. 2011. Origin and segregation of cranial placodes in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 360:257–275. doi:10.1016/j.ydbio.2011.09.024.

Pignoni, F., B. Hu, K.H. Zavitz, J. Xiao, P.A. Garrity, and S.L. Zipursky. 1997. The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development. *Cell*. 91:881–891. doi:10.1016/S0092-8674(00)80480-8.

Pinney, D.F., S.H. Pearson-White, S.F. Konieczny, K.E. Latham, and C.P. Emerson. 1988. Myogenic lineage determination and differentiation: Evidence for a regulatory gene pathway. *Cell*. 53:781–793. doi:10.1016/0092-8674(88)90095-5.

Pouget, C., K. Pottin, and T. Jaffredo. 2008. Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo. *Dev. Biol.* 315:437–447. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.045.

Pourquié, O., C.M. Fan, M. Coltey, E. Hirsinger, Y. Watanabe, C. Bréant, P. Francis-West, P. Brickell, M. Tessier-Lavigne, and N.M. Le Douarin. 1996. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: A role for BMP4. *Cell*. 84:461–471. doi:10.1016/S0092-8674(00)81291-X.

Pozzi, A., P.D. Yurchenco, and R. V. Iozzo. 2016. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* 57–58:1–11. doi:10.1016/j.matbio.2016.12.009.

Punzo, C., M. Seimiya, S. Flister, W.J. Gehring, and S. Plaza. 2002. Differential interactions of eyeless and twin of eyeless with the sine oculis enhancer. *Development*. 129:625–34.

Qu-Petersen, Z., B. Deasy, R. Jankowski, M. Ikezawa, J. Cummins, R. Pruchnic, J. Mytinger, B. Cao, C. Gates, A. Wernig, and J. Huard. 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice. *J. Cell Biol.* 157:851–864. doi:10.1083/jcb.200108150.

Rafuse, V.F., L.D. Milner, and L.T. Landmesser. 1996. Selective innervation of fast and slow muscle regions during early chick neuromuscular development. *J. Neurosci.* 16:6864–77.

Ratajczak, M.Z., M. Majka, M. Kucia, J. Darkula, Z. Pietrzkowski, S.C. Peiper, and A. Janowska-Wieczorek. 2003. Expression of Functional CXCR4 by Muscle Satellite Cells and Secretion of SDF-1 by Muscle-Derived Fibroblasts is Associated with the Presence of Both Muscle Progenitors in Bone Marrow and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Muscles. *Stem Cells*. 21:363–371. doi:10.1634/stemcells.21-3-363.

Rauch, T., H. Li, X. Wu, and G.P. Pfeifer. 2006. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res.* 66:7939–7947. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1888.

Rawls, A., J.H. Morris, M. Rudnicki, T. Braun, H.-H. Arnold, W.H. Klein, and E.N. Olson. 1995. Myogenin's Functions Do Not Overlap with Those of MyoD or Myf-5 during Mouse Embryogenesis. *Dev. Biol.* 172:37–50. doi:10.1006/dbio.1995.0004.

Rawls, A., M.R. Valdez, W. Zhang, J. Richardson, W.H. Klein, and E.N. Olson. 1998. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development*. 125:2349–58.

Reichenberger, K.J., R.D. Coletta, A.P. Schulte, M. Varella-Garcia, and H.L. Ford. 2005. Gene amplification is a mechanism of Six1 overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* 65:2668–2675. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4286.

Relaix, F., J. Demignon, C. Laclef, J. Pujol, M. Santolini, C. Niro, M. Lagha, D. Rocancourt, M. Buckingham, and P. Maire. 2013. Six homeoproteins directly activate myod expression in the gene regulatory networks that control early myogenesis. *PLoS Genet.* 9:e1003425. doi:10.1371/journal.pgen.1003425.

Relaix, F., D. Montarras, S. Zaffran, B. Gayraud-Morel, D. Rocancourt, S. Tajbakhsh, A. Mansouri, A. Cumano, and M. Buckingham. 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* 172:91–102. doi:10.1083/jcb.200508044.

Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri, and M. Buckingham. 2004. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 18:1088–1105. doi:10.1101/gad.301004.

Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri, and M. Buckingham. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 435:948–53. doi:10.1038/nature03594.

Rhodes, S.J., and S.F. Konieczny. 1989. Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3:2050–2061. doi:10.1101/gad.3.12b.2050.

Richard, A.-F., J. Demignon, I. Sakakibara, J. Pujol, M. Favier, L. Strochlic, F. Le Grand, N. Sgarioto, A. Guernec, A. Schmitt, N. Cagnard, R. Huang, C. Legay, I. Guillet-Deniau, and P. Maire. 2011. Genesis of muscle fiber-type diversity during mouse embryogenesis relies on Six1 and Six4 gene expression. *Dev. Biol.* 359:303–20. doi:10.1016/j.ydbio.2011.08.010.

Rinon, A., S. Lazar, H. Marshall, S. Buchmann-Moller, A. Neufeld, H. Elhanany-Tamir, M.M. Taketo, L. Sommer, R. Krumlauf, and E. Tzahor. 2007. Cranial neural crest cells regulate head muscle patterning and differentiation during vertebrate embryogenesis. *Development*. 134:3065–3075. doi:10.1242/dev.002501.

Rios, A.C., O. Serralbo, D. Salgado, and C. Marcelle. 2011. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature*. 473:532–535. doi:10.1038/nature09970.

Rocheteau, P., B. Gayraud-Morel, I. Siegl-Cachedenier, M. a Blasco, and S. Tajbakhsh. 2012. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands

after cell division. *Cell*. 148:112–25. doi:10.1016/j.cell.2011.11.049.

Rooney, J.E., P.B. Gurpur, Z. Yablonka-Reuveni, and D.J. Burkin. 2009. Laminin-111 restores regenerative capacity in a mouse model for alpha7 integrin congenital myopathy. *Am. J. Pathol.* 174:256–64. doi:10.2353/ajpath.2009.080522.

Rosen, G.D., J.R. Sanes, R. LaChance, J.M. Cunningham, J. Roman, and D.C. Dean. 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell*. 69:1107–1119. doi:10.1016/0092-8674(92)90633-N.

Rozo, M., L. Li, and C. Fan. 2016. Targeting β1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat. Med.* 1–11. doi:10.1031/4116.

Rudnicki, M.A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*. 71:383–390. doi:10.1016/0092-8674(92)90508-A.

Rudnicki, M.A., P.N.J. Schnegelsberg, R.H. Stead, T. Braun, H.H. Arnold, and R. Jaenisch. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. 75:1351–1359. doi:10.1016/0092-8674(93)90621-V.

Rudolf, A., E. Schirwis, L. Giordani, A. Parisi, C. Lepper, M.M. Taketo, and F. Le Grand. 2016. B-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* 15:1277–1290. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.022.

Ruf, R.G., P.-X. Xu, D. Silvius, E.A. Otto, F. Beekmann, U.T. Muerb, S. Kumar, T.J. Neuhaus, M.J. Kemper, R.M.J. Raymond, P.D. Brophy, J. Berkman, M. Gattas, V. Hyland, E.-M. Ruf, C. Schwartz, E.H. Chang, R.J.H. Smith, C.A. Stratakis, D. Weil, C. Petit, and F. Hildebrandt. 2004. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:8090–8095. doi:10.1073/pnas.0308475101.

Rutishauser, U., M. Grumet, and G.M. Edelman. 1983. Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture. *J. Cell Biol.* 97:145–152.

Sacco, A., R. Doyonnas, P. Kraft, S. Vitorovic, and H.M. Blau. 2008. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*. 456:502–6. doi:10.1038/nature07384.

Sachs, M., H. Brohmann, D. Zechner, T. M??ller, J. H??lsken, I. Walther, U. Schaeper, C. Birchmeier, and W. Birchmeier. 2000. Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J. Cell Biol.* 150:1375–1384. doi:10.1083/jcb.150.6.1375.

Sacks, L.D., G.M. Cann, W. Nikovits, S. Conlon, N.R. Espinoza, and F.E. Stockdale. 2003.

Regulation of myosin expression during myotome formation. *Development*. 130:3391–402. doi:10.1242/dev.00541.

Saclier, M., H. Yacoub-Youssef, A.L. Mackey, L. Arnold, H. Ardjoune, M. Magnan, F. Sailhan, J. Chelly, G.K. Pavlath, R. Mounier, M. Kjaer, and B. Chazaud. 2013. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 31:384–396. doi:10.1002/stem.1288.

Saga, Y., S. Miyagawa-Tomita, A. Takagi, S. Kitajima, J. Miyazaki, and T. Inoue. 1999. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*. 126:3437–3447.

Sakai, H., T. Sato, H. Sakurai, T. Yamamoto, K. Hanaoka, D. Montarras, and A. Sehara-Fujisawa. 2013. Fetal skeletal muscle progenitors have regenerative capacity after intramuscular engraftment in dystrophin deficient mice. *PLoS One*. 8:e63016. doi:10.1371/journal.pone.0063016.

Sakakibara, I., M. Santolini, A. Ferry, V. Hakim, and M. Pascal. 2014. Six Homeoproteins and a Iinc-RNA at the Fast MYH Locus Lock Fast Myofiber Terminal Phenotype. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004386.

Sakakibara, I., M. Wurmser, M. Dos Santos, M. Santolini, S. Ducommun, R. Davaze, A. Guernec, K. Sakamoto, and P. Maire. 2016. Six1 homeoprotein drives myofiber type IIA specialization in soleus muscle. *Skelet. Muscle*. 6:30. doi:10.1186/s13395-016-0102-x.

Salminen, M., S. López, P. Maire, a Kahn, and D. Daegelen. 1996. Fast-muscle-specific DNA-protein interactions occurring in vivo at the human aldolase A M promoter are necessary for correct promoter activity in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 16:76–85.

Sambasivan, R., G. Comai, I. Le Roux, D. Gomès, J. Konge, G. Dumas, C. Cimper, and S. Tajbakhsh. 2013. Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene Mrf4. *Dev. Biol.* 381:241–255. doi:10.1016/j.ydbio.2013.04.018.

Sambasivan, R., B. Gayraud-Morel, G. Dumas, C. Cimper, S. Paisant, R.G. Kelly, and S. Tajbakhsh. 2009. Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates. *Dev. Cell*. 16:810–821. doi:10.1016/j.devcel.2009.05.008.

Sambasivan, R., S. Kuratani, and S. Tajbakhsh. 2011a. An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles. *Development*. 138:2401–2415. doi:10.1242/dev.040972.

Sambasivan, R., R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, H. Guenou, B. Malissen, S. Tajbakhsh, and A. Galy. 2011b. Pax7-expressing

satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 138:3647–56. doi:10.1242/dev.067587.

Sanderson, R.D., J.M. Fitch, T.R. Linsenmayer, and R. Mayne. 1986. Fibroblasts Promote the Formation of a Continuous Basal Lamina during Myogenesis In Vitro. 102:740–747.

Sanes, J.R., and J.W. Lichtman. 1999. Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:389–442. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.389.

Santolini, M., I. Sakakibara, M. Gauthier, F. Ribas-Aulinas, H. Takahashi, T. Sawasaki, V. Mouly, J.-P. Concordet, P.-A. Defossez, V. Hakim, and P. Maire. 2016. MyoD reprogramming requires Six1 and Six4 homeoproteins: genome-wide *cis* -regulatory module analysis. *Nucleic Acids Res.* gkw512. doi:10.1093/nar/gkw512.

Sarkar, P.S., B. Appukuttan, J. Han, Y. Ito, C. Ai, W. Tsai, Y. Chai, J.T. Stout, and S. Reddy. 2000. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat. Genet.* 25:110–4. doi:10.1038/75500.

Sarkar, P.S., S. Paul, J. Han, and S. Reddy. 2004. Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 13:1421–1431. doi:10.1093/hmg/ddh161.

Sasaki, T., R. Giltay, U. Talts, R. Timpl, and J.F. Talts. 2002. Expression and Distribution of Laminin α1 and α2 Chains in Embryonic and Adult Mouse Tissues: An Immunochemical Approach. *Exp. Cell Res.* 275:185–199. doi:10.1006/excr.2002.5499.

Schedl, A., A. Ross, M. Lee, D. Engelkamp, P. Rashbass, V. Van Heyningen, and N.D. Hastie. 1996. Influence of PAX6 gene dosage on development: Overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell*. 86:71–82. doi:10.1016/S0092-8674(00)80078-1.

Schiaffino, S., K.A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw, and M. Sandri. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280:4294–4314. doi:10.1111/febs.12253.

Schiaffino, S., and C. Reggiani. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 91:1447–531. doi:10.1152/physrev.00031.2010.

Schienda, J., K. a Engleka, S. Jun, M.S. Hansen, J. a Epstein, C.J. Tabin, L.M. Kunkel, and G. Kardon. 2006. Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:945–950. doi:10.1073/pnas.0510164103.

Schmalbruch, H., and D.M. Lewis. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve*. 23:617–626. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(200004)23:4<617::AID-MUS22>3.0.CO;2-Y.

Schultz, E. 1996. Satellite Cell Proliferative Compartments in Growing Skeletal Muscles.

Dev. Biol. 175:84–94. doi:10.1006/dbio.1996.0097.

Schultz, E., D.L. Jaryszak, and C.R. Valliere. 1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve*. 8:217–222. doi:10.1002/mus.880080307.

Scott, M.P., J.W. Tamkun, and G.W. Hartzell. 1989. The structure and function of the homeodomain. *BBA - Rev. Cancer*. 989:25–48. doi:10.1016/0304-419X(89)90033-4.

Seale, P., A. Asakura, and M. a Rudnicki. 2001. The potential of muscle stem cells. *Dev. Cell*. 1:333–342. doi:10.1016/S1534-5807(01)00049-1.

Seale, P., L. a Sabourin, a Girgis-Gabardo, a Mansouri, P. Gruss, and M. a Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 102:777–86.

Seenundun, S., S. Rampalli, Q.-C. Liu, A. Aziz, C. Palii, S. Hong, A. Blais, M. Brand, K. Ge, and F.J. Dilworth. 2010. UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J.* 29:1401–1411. doi:10.1038/emboj.2010.37.

Seimiya, M., and W.J. Gehring. 2000. The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development*. 127:1879–1886.

Self, M., O. V Lagutin, B. Bowling, J. Hendrix, Y. Cai, G.R. Dressler, and G. Oliver. 2006. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J.* 25:5214–28. doi:10.1038/sj.emboj.7601381.

Seo, H.C., J. Curtiss, M. Mlodzik, and A. Fjose. 1999. Six class homeobox genes in Drosophila belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech. Dev.* 83:127–139. doi:10.1016/S0925-4773(99)00045-3.

Seo, H.C., Ø. Drivenes, S. Ellingsen, and A. Fjose. 1998a. Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia. *Mech. Dev.* 73:45–57. doi:10.1016/S0925-4773(98)00028-8.

Seo, H.C., Ø. Drivenes, S. Ellingsen, and A. Fjose. 1998b. Transient expression of a novel Six3-related zebrafish gene during gastrulation and eye formation. *Gene*. 216:39–46. doi:10.1016/S0378-1119(98)00328-X.

Seo, H.C., Ø. Drivenes, and A. Fjose. 1998c. A zebrafish Six4 homologue with early expression in head mesoderm. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1442:427–431. doi:10.1016/S0167-4781(98)00193-6.

Shafiq, S.A., M.A. Gorycki, and A. Mauro. 1968. Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat. *J. Anat.* 103:135–41.

Shea, K.L., W. Xiang, V.S. LaPorta, J.D. Licht, C. Keller, M.A. Basson, and A.S. Brack. 2010. Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle

Stem Cell Pool during Regeneration. *Cell Stem Cell*. 6:117–129. doi:10.1016/j.stem.2009.12.015.

Shen, W., and G. Mardon. 1997. Ectopic eye development in Drosophila induced by directed dachshund expression. *Development*. 124:45–52.

Shinin, V., B. Gayraud-Morel, D. Gomès, and S. Tajbakhsh. 2006. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 8:677–87. doi:10.1038/ncb1425.

Smith, C. a, K.M. Lau, Z. Rahmani, S.E. Dho, G. Brothers, Y.M. She, D.M. Berry, E. Bonneil, P. Thibault, F. Schweisguth, R. Le Borgne, and C.J. McGlade. 2007. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 26:468–80. doi:10.1038/sj.emboj.7601495.

Smith, C.K., M.J. Janney, and R.E. Allen. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Physiol.* 159:379–385. doi:10.1002/jcp.1041590222.

Söker, T., C. Dalke, O. Puk, T. Floss, L. Becker, I. Bolle, J. Favor, W. Hans, S.M. Hölter, M. Horsch, M. Kallnik, E. Kling, C. Moerth, A. Schrewe, C. Stigloher, S. Topp, V. Gailus-Durner, B. Naton, J. Beckers, H. Fuchs, B. Ivandic, T. Klopstock, H. Schulz, E. Wolf, W. Wurst, L. Bally-Cuif, M.H. de Angelis, and J. Graw. 2008. Pleiotropic effects in Eya3 knockout mice. *BMC Dev. Biol.* 8:118. doi:10.1186/1471-213X-8-118.

Soulier, J., E. Clappier, J.M. Cayuela, A. Regnault, M. García-Peydró, H. Dombret, A. Baruchel, M.L. Toribio, and F. Sigaux. 2005. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*. 106:274–286. doi:10.1182/blood-2004-10-3900.

Soulintzi, N., and N. Zagris. 2007. Spatial and temporal expression of perlecan in the early chick embryo. *Cells Tissues Organs*. 186:243–256. doi:10.1159/000107948.

Spitz, F., J. Demignon, a Porteu, a Kahn, J.P. Concordet, D. Daegelen, and P. Maire. 1998. Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14220–5.

Ståhl, P.L., F. Salmén, S. Vickovic, A. Lundmark, J.F. Navarro, J. Magnusson, S. Giacomello, M. Asp, J.O. Westholm, M. Huss, A. Mollbrink, S. Linnarsson, S. Codeluppi, Å. Borg, F. Pontén, P.I. Costea, P. Sahlén, J. Mulder, O. Bergmann, J. Lundeberg, and J. Frisén. 2016. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science (80-.).* 353:78–82.

doi:10.1126/science.aaf2403.

Stark, D.A., N.J. Coffey, H.R. Pancoast, L.L. Arnold, J.P.D. Walker, J. Vall??e, R. Robitaille, M.L. Garcia, and D.D.W. Cornelison. 2015. Ephrin-A3 promotes and maintains slow muscle fiber identity during postnatal development and reinnervation. *J. Cell Biol.* 211:1077–1091. doi:10.1083/jcb.201502036.

Stark, D. a, R.M. Karvas, A.L. Siegel, and D.D.W. Cornelison. 2011. Eph/ephrin interactions modulate muscle satellite cell motility and patterning. *Development*. 138:5279–89. doi:10.1242/dev.068411.

Steinhardt, R., G. Bi, and J. Alderton. 1994. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science (80-.).* 263:390–393. doi:10.1126/science.7904084.

Stockdale, F.E., and J.B. Miller. 1987. The Cellular Basis of Myosin Heavy Chain lsoform Expression during Development of Avian Skeletal Muscles. *Dev. Biol.* 9:1–9.

Sun, Y., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1998. Transcriptional regulation of atonal during development of the Drosophila peripheral nervous system. *Development*. 125:3731–3740.

Suzuki, Y., K. Ikeda, and K. Kawakami. 2010. Regulatory role of Six1 in the development of taste papillae. *Cell Tissue Res.* 339:513–525. doi:10.1007/s00441-009-0917-4.

Suzuki, Y., K. Ikeda, and K. Kawakami. 2011. Development of gustatory papillae in the absence of Six1 and Six4. *J. Anat.* 219:710–721. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01435.x.

Swartz, M.E., J. Eberhart, E.B. Pasquale, and C.E. Krull. 2001. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development*. 128:4669–4680.

Taglietti, V., G. Maroli, S. Cermenati, G. Cossu, M. Beltrame, G. Messina, V. Taglietti, G. Maroli, S. Cermenati, S. Monteverde, A. Ferrante, and G. Rossi. 2016. Nfix Induces a Switch in Sox6 Transcriptional Activity to Regulate MyHC-I Expression in Fetal Muscle Article Nfix Induces a Switch in Sox6 Transcriptional Activity to Regulate MyHC-I Expression in Fetal Muscle. *CellReports*. 17:2354–2366. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.082.

Tajbakhsh, S., U. Borello, E. Vivarelli, R. Kelly, J. Papkoff, D. Duprez, M.E. Buckingham, and G. Cossu. 1998. 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*. 125:4155–62.

Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, and M. Buckingham. 1996. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature*.

384:266–270. doi:10.1038/384266a0.

Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, G. Cossu, and M. Buckingham. 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*. 89:127–138. doi:10.1016/S0092-8674(00)80189-0.

Tanegashima, K., K. Suzuki, Y. Nakayama, K. Tsuji, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. 2013a. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett.* 587:1731–1735. doi:10.1016/j.febslet.2013.04.046.

Tanegashima, K., K. Tsuji, K. Suzuki, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. 2013b. Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors. *FEBS Lett.* 587:3770–3775. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.017.

Tatsumi, R., Y. Sankoda, J.E. Anderson, Y. Sato, W. Mizunoya, N. Shimizu, T. Suzuki, M. Yamada, R.P. Rhoads, Y. Ikeuchi, and R.E. Allen. 2009. Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation. *AJP Cell Physiol.* 297:C238–C252. doi:10.1152/ajpcell.00161.2009.

Tatsumi, R., T. Suzuki, M.-K.Q. Do, Y. Ohya, J.E. Anderson, A. Shibata, M. Kawaguchi, S. Ohya, H. Ohtsubo, W. Mizunoya, S. Sawano, Y. Komiya, R. Ichitsubo, K. Ojima, S. Nishimatsu, T. Nohno, Y. Ohsawa, Y. Sunada, M. Nakamura, M. Furuse, Y. Ikeuchi, T. Nishimura, T. Yagi, and R.E. Allen. 2017. Slow-Myofiber Commitment by Semaphorin 3A Secreted from Myogenic Stem Cells. *Stem Cells*. 1–26. doi:10.1002/stem.2639.

Thomas, K., A.J. Engler, and G.A. Meyer. 2015. Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connect. Tissue Res.* 56:1–8. doi:10.3109/03008207.2014.947369.

Thorsteinsdóttir, S., M. Deries, A.S. Cachaço, and F. Bajanca. 2011. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 354:191–207. doi:10.1016/j.ydbio.2011.03.015.

Tidball, J.G., and S.A. Villalta. 2010. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298:R1173-87. doi:10.1152/ajpregu.00735.2009.

Tierney, M., H. Timothy, A. Gromova, F.B. Sesillo, D. Sala, C. Spenlé, G. Orend, and A. Sacco. 2016. Autonomous Extracellular Matrix Remodeling Controls a Progressive Adaptation in Muscle Stem Cell Regenerative Capacity during Development. *Cell Rep.* 14:1940–1952. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.072.

Tierney, M.T., and A. Sacco. 2016. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends Cell Biol.* xx:1–11. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.004.

Tomé, F., T. Evangelista, A. Leclerc, Y. Sunada, E. Manole, B. Estournet, A. Barois, K.P. Campbell, and M. Fardeau. 1994. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 317:351–357.

Torrente, Y., M. Belicchi, M. Sampaolesi, F. Pisati, M. Meregalli, G. D'Antona, R. Tonlorenzi, L. Porretti, M. Gavina, K. Mamchaoui, M.A. Pellegrino, D. Furling, V. Mouly, G.S. Butler-Browne, R. Bottinelli, G. Cossu, and N. Bresolin. 2004. Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 114:182–195. doi:10.1172/JCI200420325.

Toy, J., and O.H. Sundin. 1999. Expression of the optx2 homeobox gene during mouse development. *Mech. Dev.* 83:183–6. doi:10.1016/S0925-4773(99)00049-0.

Tozer, S., M.-A. Bonnin, F. Relaix, S. Di Savino, P. García-Villalba, P. Coumailleau, and D. Duprez. 2007. Involvement of vessels and PDGFB in muscle splitting during chick limb development. *Development*. 134:2579–2591. doi:10.1242/dev.02867.

Treisman, J.E. 2013. Retinal differentiation in Drosophila. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2:545–557. doi:10.1002/wdev.100.

Tremblay, P., and P. Gruss. 1994. Pax : Genes for mice and men. *Pharmacol. Ther.* 61:205–226.

Trensz, F., S. Haroun, A. Cloutier, M. V. Richter, and G. Grenier. 2010. A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway. *AJP Cell Physiol.* 299:C939–C947. doi:10.1152/ajpcell.00253.2010.

Troy, A., A.B. Cadwallader, Y. Fedorov, K. Tyner, K.K. Tanaka, and B.B. Olwin. 2012. Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38α/β MAPK. *Cell Stem Cell*. 11:541–53. doi:10.1016/j.stem.2012.05.025.

Tzahor, E., H. Kempf, R.C. Mootoosamy, A.C. Poon, A. Abzhanov, C.J. Tabin, S. Dietrich, and A.B. Lassar. 2003. Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes Dev.* 17:3087–3099. doi:10.1101/gad.1154103.

Uezumi, A., S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, and K. Tsuchida. 2010. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 12:143–152. doi:10.1038/ncb2014.

Urciuolo, A., M. Quarta, V. Morbidoni, F. Gattazzo, S. Molon, P. Grumati, F. Montemurro, F.S. Tedesco, B. Blaauw, G. Cossu, G. Vozzi, T.A. Rando, and P. Bonaldo. 2013. Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat. Commun.*

4:1964. doi:10.1038/ncomms2964.

Ustanina, S., J. Carvajal, P. Rigby, and T. Braun. 2007. The Myogenic Factor Myf5 Supports Efficient Skeletal Muscle Regeneration by Enabling Transient Myoblast Amplification. *Stem Cells*. 25:2006–2016. doi:10.1634/stemcells.2006-0736.

Valdez, M.R., J.A. Richardson, W.H. Klein, and E.N. Olson. 2000. Failure of Myf5 to Support Myogenic Differentiation without Myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev. Biol.* 219:287–298. doi:10.1006/dbio.2000.9621.

Vasyutina, E., J. Stebler, B. Brand-Saberi, S. Schulz, E. Raz, and C. Birchmeier. 2005. CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev.* 19:2187–2198. doi:10.1101/gad.346205.

Venters, S.J., and C.P. Ordahl. 2005. Asymmetric cell divisions are concentrated in the dermomyotome dorsomedial lip during epaxial primary myotome morphogenesis. *Anat. Embryol. (Berl)*. 209:449–460. doi:10.1007/s00429-005-0461-2.

VENUTI, J.M., J.H. MORRIS, J.L. VIVIAN, E.N. OLSON, and W.H. KLEIN. 1995. Myogenin Is Required, for Late But Not Early Aspects of Myogenesis During Mouse Development. *J. Cell Biol.* 128:563–576. doi:10.1083/jcb.128.4.563.

Wakimoto, H., C.T. Maguire, M.C. Sherwood, M.M. Vargas, P.S. Sarkar, J. Han, S. Reddy, and C.I. Berul. 2002. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 7:127–135. doi:10.1023/A:1020881520353.

Wan, F., X. Miao, I. Quraishi, V. Kennedy, K.E. Creek, and L. Pirisi. 2008. Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: A comparison between an in vitro cell model and cervical cancer. *Int. J. Cancer*. 123:32–40. doi:10.1002/ijc.23463.

Wang, Y., P.N.J. Schnegelsberg, J. Dausman, and R. Jaenisch. 1996. Funtionnal redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature*. 823–825.

Weasner, B., C. Salzer, and J.P. Kumar. 2007. Sine oculis, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation. *Dev. Biol.* 303:756–771. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.040.

Weber, S., J.C. Taylor, P. Winyard, K.F. Baker, J. Sullivan-Brown, R. Schild, T. Knüppel, A.M. Zurowska, A. Caldas-Alfonso, M. Litwin, S. Emre, G.M. Ghiggeri, A. Bakkaloglu, O. Mehls, C. Antignac, E. Network, F. Schaefer, and R.D. Burdine. 2008. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19:891–903. doi:10.1681/ASN.2006111282.

Webster, M.T., U. Manor, J. Lippincott-Schwartz, and C.M. Fan. 2016. Intravital Imaging

Reveals Ghost Fibers as Architectural Units Guiding Myogenic Progenitors during Regeneration. *Cell Stem Cell*. 18:243–252. doi:10.1016/j.stem.2015.11.005.

Weidner, K.M., S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens, and W. Birchmeier. 1996. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*. 384:173–176. doi:10.1038/384173a0.

Wen, Y., P. Bi, W. Liu, A. Asakura, C. Keller, and S. Kuang. 2012. Constitutive Notch Activation Upregulates Pax7 and Promotes the Self-Renewal of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Mol. Cell. Biol.* 32:2300–2311. doi:10.1128/MCB.06753-11.

Whalen, R.G., J.B. Harris, G.S. Butler-Browne, and S. Sesodia. 1990. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev. Biol.* 141:24–40. doi:10.1016/0012-1606(90)90099-5.

White, N.K., P.H. Bonner, D.R.A.E. Nelson, and S.D. Hauschka. 1975. Clonal Analysis of Vertebrate Myogenesis. *Dev. Biol.* 346361:346–361.

White, R.B., A.-S. Biérinx, V.F. Gnocchi, and P.S. Zammit. 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev. Biol.* 10:21. doi:10.1186/1471-213X-10-21.

Williams, B. a, and C.P. Ordahl. 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*. 120:785–796.

Wilson-Rawls, J., C.R. Hurt, S.M. Parsons, and A. Rawls. 1999. Differential regulation of epaxial and hypaxial muscle development by paraxis. *Development*. 126:5217–5229.

Winchester, C., S. Robertson, T. MacLeod, K. Johnson, and M. Thomas. 2000. Expression of a homeobox gene (SIX5) in borderline ovarian tumours. *J. Clin. Pathol.* 53:212–217. doi:10.1136/jcp.53.3.212.

Wozniak, A.C., O. Pilipowicz, Z. Yablonka-Reuveni, S. Greenway, S. Craven, E. Scott, and J.E. Anderson. 2003. C-Met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers. *J. Histochem. Cytochem.* 51:1437–45. doi:10.1177/002215540305101104.

Wright, W.E., D.A. Sassoon, and V.K. Lin. 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*. 56:607–617. doi:10.1016/0092-8674(89)90583-7.

Xiong, W., N.M. Dabbouseh, and I. Rebay. 2009. Interactions with the Abelson Tyrosine Kinase Reveal Compartmentalization of Eyes Absent Function between Nucleus and Cytoplasm. *Dev. Cell*. 16:271–279. doi:10.1016/j.devcel.2008.12.005.

Xu, J., E.Y.M. Wong, C. Cheng, J. Li, M.T.K. Sharkar, C.Y. Xu, B. Chen, J. Sun, D. Jing,

and P.X. Xu. 2014. Eya1 interacts with Six2 and Myc to regulate expansion of the nephron progenitor pool during nephrogenesis. *Dev. Cell*. 31:434–447. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.015.

Xu, P.-X. 2013. The EYA-SO/SIX complex in development and disease. *Pediatr. Nephrol.* 28:843–54. doi:10.1007/s00467-012-2246-1.

Xu, P.-X., W. Zheng, L. Huang, P. Maire, C. Laclef, and D. Silvius. 2003. Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development*. 130:3085–3094. doi:10.1242/dev.00536.

Xu, P.X., J. Cheng, J.A. Epstein, and R.L. Maas. 1997a. Mouse Eya genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:11974–9. doi:10.1073/pnas.94.22.11974.

Xu, P.X., I. Woo, H. Her, D.R. Beier, and R.L. Maas. 1997b. Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development*. 124:219–231.

Yajima, H., and K. Kawakami. 2016. Low *Six4* and *Six5* gene dosage improves dystrophic phenotype and prolongs life span of mdx mice. *Dev. Growth Differ.* 1–16. doi:10.1111/dgd.12290.

Yajima, H., N. Motohashi, Y. Ono, S. Sato, K. Ikeda, S. Masuda, E. Yada, H. Kanesaki, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, and K. Kawakami. 2010. Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp. Cell Res.* 316:2932–44. doi:10.1016/j.yexcr.2010.08.001.

Yajima, H., M. Suzuki, H. Ochi, K. Ikeda, S. Sato, K. Yamamura, H. Ogino, N. Ueno, and K. Kawakami. 2014. Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biol.* 12:40. doi:10.1186/1741-7007-12-40.

Yang, X., S. Arber, C. William, L. Li, Y. Tanabe, T.M. Jessell, C. Birchmeier, and S.J. Burden. 2001. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*. 30:399–410. doi:10.1016/S0896-6273(01)00287-2.

Yao, C.C., B.L. Ziober, R.M. Squillace, and R.H. Kramer. 1996. Alpha7 integrin mediates cell adhesion and migration on specific laminin isoforms1. *J.Biol.Chem.* 271:25598–25603.

Yennek, S., M. Burute, M. Théry, and S. Tajbakhsh. 2014. Cell adhesion geometry regulates non-random DNA segregation and asymmetric cell fates in mouse skeletal muscle stem

cells. *Cell Rep.* 7:961–70. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.016.

Yin, H., F. Price, and M. a Rudnicki. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93:23–67. doi:10.1152/physrev.00043.2011.

Young, A.P., R. Nagarajan, and G.D. Longmore. 2003. Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene*. 22:7209–7217. doi:10.1038/sj.onc.1206804.

Yu, Y., J. Khan, C. Khanna, L. Helman, P.S. Meltzer, and G. Merlino. 2004. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat. Med.* 10:175–181. doi:10.1038/nm966.

Yumoto, N., N. Kim, and S.J. Burden. 2012. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*. 489:438–42. doi:10.1038/nature11348.

Yvernogeau, L., G. Auda-Boucher, and J. Fontaine-Perus. 2012. Limb bud colonization by somite-derived angioblasts is a crucial step for myoblast emigration. *Development*. 139:277–287. doi:10.1242/dev.067678.

Zacharias, A.L., M. Lewandoski, M.A. Rudnicki, and P.J. Gage. 2011. Pitx2 is an upstream activator of extraocular myogenesis and survival. *Dev. Biol.* 349:395–405. doi:10.1016/j.ydbio.2010.10.028.

Zagris, N., V. Stavridis, and A.E. Chung. 1993. Appearance and distribution of entactin in the early chick embryo. *Differentiation*. 54:67–71. doi:10.1111/j.1432-0436.1993.tb00709.x.

Zalc, A., S. Hayashi, F. Auradé, D. Bröhl, T. Chang, D. Mademtzoglou, P. Mourikis, Z. Yao, Y. Cao, C. Birchmeier, and F. Relaix. 2014. Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors regulates skeletal muscle growth arrest. *Development*. 141:2780–90. doi:10.1242/dev.110155.

Zappelli, F., D. Willems, S. Osada, S. Ohno, W.C. Wetsel, M. Molinaro, G. Cossu, and M. Bouché. 1996. The inhibition of differentiation caused by TGFbeta in fetal myoblasts is dependent upon selective expression of PKCtheta: a possible molecular basis for myoblast diversification during limb histogenesis. *Dev. Biol.* 180:156–64. doi:S0012160696902924 [pii].

Zeschnigk, M., D. Kozian, C. Kuch, M. Schmoll, and A. Starzinski-powitz. 1995. Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J. Cell Sci.* 108:2973–2981.

Zhang, T., S. Ranade, C.Q. Cai, C. Clouser, and F. Pignoni. 2006. Direct control of neurogenesis by selector factors in the fly eye: regulation of atonal by Ey and So.

Development. 133:4881–9. doi:10.1242/dev.02669.

Zhang, W., R.R. Behringer, and E.N.O. L. 1995. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. 1388–1399.

Zhou, Z., J. Wang, C. Guo, W. Chang, J. Zhuang, P. Zhu, and X. Li. 2017. Temporally Distinct Six2 -Positive Second Heart Field Progenitors Regulate Mammalian Heart Development and Disease Article Temporally Distinct Six2 -Positive Second Heart Field Progenitors Regulate Mammalian Heart Development and Disease. *CellReports*. 18:1019–1032. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.002.

Zhu, C.C., M. a Dyer, M. Uchikawa, H. Kondoh, O. V Lagutin, and G. Oliver. 2002. Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development*. 129:2835–49.

Zhu, Z., and J.B. Miller. 1997. MRF4 can substitute for myogenin during early stages of myogenesis. *Dev. Dyn.* 209:233–241. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199706)209:2<233::AID-AJA9>3.0.CO;2-J.

Zou, D., C. Erickson, E.H. Kim, D. Jin, B. Fritzsch, and P.X. Xu. 2008a. Eya1 gene dosage critically affects the development of sensory epithelia in the mammalian inner ear. *Hum. Mol. Genet.* 17:3340–3356. doi:10.1093/hmg/ddn229.

Zou, D., D. Silvius, B. Fritzsch, and P.-X. Xu. 2004. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development*. 131:5561–72. doi:10.1242/dev.01437.

Zou, K., M. De Lisio, H.D. Huntsman, Y. Pincu, Z. Mahmassani, M. Miller, D. Olatunbosun, T. Jensen, and M.D. Boppart. 2014. Laminin-111 Improves Skeletal Muscle Stem Cell Quantity and Function Following Eccentric Exercise. *Stem Cells Transl. Med.* 1013–1022. doi:10.5966/sctm.2013-0122.

Zou, Y., R.-Z. Zhang, P. Sabatelli, M.-L. Chu, and C.G. Bönnemann. 2008b. Muscle Interstitial Fibroblasts Are the Main Source of Collagen VI Synthesis in Skeletal Muscle: Implications for Congenital Muscular Dystrophy Types Ullrich and Bethlem. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67:144–154. doi:10.1097/nen.0b013e3181634ef7.

Zuber, M.E., M. Perron, A. Philpott, A. Bang, and W.A. Harris. 1999. Giant eyes in Xenopus laevis by overexpression of XOptx2. *Cell*. 98:341–352. doi:10.1016/S0092-8674(00)81963-7.