

**Université de Limoges**

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

PEIRENE (EA 7500), équipe « Glycosylation et différenciation cellulaire »

Thèse pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

**Julien CHABANAIS**

Le 6 décembre 2019

**Contribution de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1)  
à la différenciation myogénique et à la tumorigenèse colorectale**

Thèse co-dirigée par le Dr. **Agnès GERMOT** et le Pr. **Abderrahman MAFTAH**

**JURY**

**Président du jury**

**Jean-Michel PETIT**, Professeur ; Université de Limoges

**Rapporteurs**

**Caroline CIENIEWSKI-BERNARD**, Maître de Conférences-HDR ; Université de Lille

**Tony LEFEBVRE**, Professeur ; Université de Lille

**Examineurs**

**Christophe GROSSET**, Directeur de Recherche INSERM ; Université de Bordeaux

**Agnès GERMOT**, Maître de Conférences ; Université de Limoges

**Abderrahman MAFTAH**, Professeur ; Université de Limoges











**Dédicace**

À Gogotte



*La simplicité est la sophistication suprême.*

**Léonard De Vinci**



## Remerciements

---

Je voudrais tout d'abord remercier Madame **Caroline CIENIEWSKI-BERNARD**, Maître de Conférences à l'Université de Lille, et Monsieur **Tony LEFEBVRE**, Professeur à l'Université de Lille de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Christophe GROSSET**, Directeur de recherche INSERM à l'Université de Bordeaux qui a bien voulu évaluer ce travail en tant qu'examineur. Je remercie tout particulièrement Monsieur **Jean-Michel PETIT**, Professeur à l'Université de Limoges qui a accepté de présider mon jury de soutenance de thèse. Cela me fait profondément plaisir car c'est sous votre encadrement en stages de Master 1 et 2, que j'ai appris le goût de la recherche, merci pour tout.

J'adresse mes sincères remerciements à mes co-directeurs de thèse, Madame **Agnès GERMOT**, Maître de Conférences à l'Université de Limoges et Monsieur **Abderrahman MAFTAH**, Professeur à l'Université de Limoges pour leur encadrement, leur aide et leur disponibilité au cours de ses trois années.

Je souhaite également vivement remercier Monsieur **Sébastien LEGARDINIER**, Maître de Conférences à l'Université de Limoges pour toutes nos discussions scientifiques, ses conseils avisés et pour tous les moments de complicités que nous avons eu.

Je tiens à remercier Monsieur **Daniel PETIT**, Professeur émérite à l'Université de Limoges, pour ses conseils et nos échanges scientifiques.

Je remercie Monsieur **Vincent GRASSOT**, ancien doctorant de l'Université de Limoges, qui par son encadrement en stage de Master 1 m'a permis d'apprendre la rigueur nécessaire à la bonne réalisation des travaux scientifiques.



Je remercie tous les doctorants avec qui j'ai pu partager ces trois années de thèse pour leur aide et nos discussions.

J'ai une pensée toute particulière pour Monsieur **Florian PENNARUBIA**, ancien doctorant de l'Université de Limoges. On aura bien rigolé et travaillé pendant ces années ! Je te remercie pour nos échanges et l'aide que tu m'as apporté au cours de ma thèse. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ton post-doc et je te dis bien évidemment à bientôt autour d'une bière !

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire PEIRENE que j'ai pu côtoyer pendant toutes ces années depuis le Master 1, et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à ce travail de thèse.

Mes derniers remerciements vont bien-sûr à toi Olivia. Ça y est, c'est fini on a réussi ! Oui je dis « on », parce que cette thèse tu l'as faite avec moi. Au quotidien, à chaque instant j'ai pu compter sur toi dans les bons moments comme dans les mauvais. Le désir de te rendre fière a été pour moi une grande source de motivation.





# Table des matières

---

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>15</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>
<b>Publications et communications</b> .....	<b>19</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>27</b>
<b>Chapitre I. La glycosylation des protéines et notamment la O-fucosylation des domaines EGF-like</b> .....	<b>35</b>
<b>I.1. Les différents types de glycosylation</b> .....	<b>35</b>
I.1.1. La N-glycosylation .....	35
I.1.2. La O-glycosylation .....	41
I.1.3. La C-mannosylation.....	45
I.1.4. La S-glycosylation .....	47
<b>I.2. Les O-glycosylations des domaines EGF-like</b> .....	<b>49</b>
<b>I.3. La O-fucosylation des domaines EGF-like par la Protéine O-fucosyltransférase 1</b> .....	<b>51</b>
I.3.1. Du gène à la protéine POFUT1 .....	53
I.3.2. Localisation de la protéine POFUT1 .....	55
I.3.3. Fonctions biologiques de la protéine POFUT1 .....	57
I.3.4. Rôles biologiques de la O-fucosylation médiée par POFUT1 .....	59
<b>Chapitre II. Implication de la protéine O-fucosyltransférase 1 dans un contexte physiologique : le processus myogénique</b> .....	<b>63</b>
<b>II.1. Le muscle squelettique</b> .....	<b>63</b>
II.1.1. Structure et organisation .....	65
II.1.1. Pathologies associées.....	69
<b>II.2. L'organisation du processus myogénique</b> .....	<b>77</b>
II.2.1. Régulation par les Myogenic Regulatory Factors .....	79
II.2.2. Formation des fibres musculaires au cours du processus myogénique.....	83
<b>II.3. Les voies de signalisation associées au processus myogénique</b> .....	<b>87</b>
II.3.1. La voie de signalisation NOTCH.....	87
II.3.1.1. Les récepteurs NOTCH .....	87
II.3.1.2. Les ligands des récepteurs NOTCH .....	91
II.3.1.3. Activation et fonctionnement de la voie de signalisation.....	95
II.3.1.4. Rôle de la voie NOTCH au cours du processus myogénique.....	97
II.3.2. La voie de signalisation NFATc2/IL4 .....	99
II.3.2.1. La famille des Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) .....	99
II.3.2.2. Structure des protéines NFAT.....	99
II.3.2.3. Activation de la voie de signalisation NFAT .....	101
II.3.2.4. Rôle de la voie de signalisation NFATc2/IL-4 au cours du processus myogénique.....	103
II.3.3. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	105
II.3.3.1. La famille des glycoprotéines WNT.....	107
II.3.3.2. La $\beta$ -caténine .....	111
II.3.3.3. Activation et fonctionnement de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	115



II.3.3.4. Rôle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine au cours du processus myogénique.....	117
II.3.4. Autres voies de signalisation impliquées dans la différenciation myogénique.....	119
<b>II.4. POFUT1 et O-fucosylation dans le processus myogénique.....</b>	<b>121</b>
<b><i>Chapitre III. Implication de la protéine O-fucosyltransférase 1 dans un contexte pathologique : le cancer colorectal.....</i></b>	<b><i>125</i></b>
<b>III.1. Généralités sur le cancer colorectal.....</b>	<b>125</b>
III.1.1. Anatomie du côlon et du rectum .....	125
III.1.2. Développement de la pathologie.....	129
III.1.3. Epidémiologie et étiologie .....	131
III.1.3.1. Incidence et mortalité.....	131
III.1.3.2. Facteurs de risque.....	131
III.1.4. Dépistage et diagnostic.....	139
<b>III.2. Les mécanismes moléculaires associés au processus de carcinogénèse colorectale.....</b>	<b>147</b>
III.2.1. Instabilité chromosomique .....	147
III.2.2. Instabilité microsatellitaire .....	151
III.2.3. Hyperméthylation des îlots CpG .....	153
<b>III.3. Les principales voies de signalisation associées au cancer colorectal .....</b>	<b>155</b>
III.3.1. La voie de signalisation NOTCH.....	155
III.3.2. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	157
III.3.3. Autres voies de signalisation.....	161
<b>III.4. Altérations de la glycosylation associées au processus de cancérogenèse .....</b>	<b>165</b>
III.4.1. Modification de la glycosylation dans le cas du cancer colorectal.....	165
III.4.2. Implication de POFUT1 dans le processus tumoral.....	173
<b><i>Chapitre IV. Objectifs de thèse .....</i></b>	<b><i>177</i></b>
<b><i>Chapitre V. Résultats.....</i></b>	<b><i>183</i></b>
<b>V.1. Article n°1.....</b>	<b>183</b>
<b>V.2. Article n°2.....</b>	<b>219</b>
<b>V.3. Article n°3.....</b>	<b>251</b>
<b><i>Chapitre VI. Discussion générale et perspectives .....</i></b>	<b><i>297</i></b>
<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>327</i></b>



## Liste des abréviations

---

<b>ACTRII:</b> Activin receptor II	<b>CaM:</b> Calmoduline
<b>ADAM:</b> A disintegrin and metalloproteinase	<b>CCN:</b> Cellular communication network factor
<b>ADAMTS-like 1:</b> Protein A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif	<b>Ccna2:</b> Cyclin-A2
<b>ALG:</b> Asparagine-linked glycosylation	<b>CCND1:</b> Cyclin D1
<b>AMP:</b> Adénosine monophosphate	<b>Cdc25c:</b> Cell division cycle 25C
<b>AMR:</b> Armadillo repeat	<b>CDH8:</b> Cadherin-8
<b>ANK:</b> Ankyrin	<b>CDKN1A:</b> Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
<b>APAF1:</b> Apoptotic peptidase activating factor 1	<b>cEGF:</b> complement C1r-like EGF
<b>APC:</b> Adenomatous polyposis coli	<b>CIMP:</b> CpG island methylator phenotype
<b>Asn:</b> Asparagine	<b>CIN:</b> Chromosome instability
<b>ATP:</b> Adénosine triphosphate	<b>CK1:</b> Casein kinase 1
<b>β-TrCP:</b> β-transducin repeat-containing protein	<b>CMD:</b> Congenital muscular dystrophy
<b>β3Gn-T6:</b> β1,3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase 6	<b>CNX:</b> Calnexine
<b>β3GnT:</b> β1-3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase	<b>COL6A:</b> Collagen type IV alpha
<b>β3GnT8:</b> β1,3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase 8	<b>COPII:</b> Coat protein II
<b>β4GalT:</b> β1-4-galactosyltransférase	<b>CoR:</b> Co-repressor
<b>bHLH:</b> Basic helix-loop-helix	<b>CPT2:</b> Carnitine palmitoyltransferase 2
<b>BIRC5:</b> Baculoviral IAP repeat containing 5	<b>CRAC:</b> Ca <sup>2+</sup> release activated Ca <sup>2+</sup> channel
<b>BMD:</b> Becker muscular dystrophy	<b>CCR:</b> Cancer colorectal
<b>BML:</b> Bloom syndrome	<b>CRD:</b> Cystein-rich domain
<b>BMP3:</b> Bone morphogenetic protein 3	<b>CREB:</b> C-AMP response element-binding protein
<b>BRAF:</b> B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	<b>CRT:</b> Calreticulin
<b>C1GalT1:</b> core 1 β1-3-galactosyltransférase	<b>CSC:</b> Cellule souche cancéreuse
<b>C2GnT:</b> core 2 β1-6- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase	<b>CSD:</b> Nucleic acid binding domain
<b>C3GnT:</b> core 3 β1-3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase	<b>CTCK:</b> C-terminal cystine knot-like domain
<b>CACNA1G:</b> Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 G	<b>CTD:</b> C-terminal domain
	<b>Ctnnb1:</b> Catenin (cadherin-associated protein) beta 1
	<b>DAG:</b> Diacylglycérol
	<b>DAGP:</b> Dystrophin-associated glycoprotein
	<b>DCC:</b> Deleted in colorectal carcinoma
	<b>Dkk1:</b> Dickkopf 1
	<b>Dll1:</b> Delta like non-canonical Notch ligand 1



**DLL:** Delta like  
**DMD:** Duchenne muscular dystrophy  
**DNER:** Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor  
**Dol-P:** Dolichol phosphate  
**DOS:** Delta and OSM-11 like  
**DPY19:** Dumpy protein 19  
**DSL:** Delta/Serrate/Lag-2  
**DVL:** Dishvelled  
**DYRK:** Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase  
**EDEM:** Endoplasmic reticulum degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein  
**Efr:** ER GDP-fucose transporter  
**EGF:** Epidermal growth factor  
**EGFL7:** EGF-like domain-containing protein 7  
**EMI:** Emilin domain  
**EMT:** Transition épithélio-mésenchymateuse  
**EOTG:** EGF domain-specific *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase  
**ER:** Endoplasmic reticulum  
**ERAD:** Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation  
**ERGIC-53:** ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein  
**ERK:** Extracellular signal-regulated kinase  
**ERp57:** Endoplasmic reticulum protein 57  
**Fermt2:** Fermitin family homolog 2  
**FIT:** Fecal immunochemical test  
**FKRP:** Fukutin related protein  
**FKTN:** Fukutin  
**FNIII:** Fibronectin type III domain  
**Fuc:** Fucose  
**FUT:** Fucosyltransférase  
**Fz:** Frizzled  
**Gal:** Galactose  
**GalNAc:** *N*-acétylgalactosamine  
**GBM:** Glycosphingolipid-binding motif  
**GDP:** Guanosine diphosphate  
**gFOBT:** Guaiac-based fecal occult blood test

**Glc:** Glucose  
**GlcNAc-P:** *N*-acétylglucosamine-1-phosphate  
**GlcNAc:** *N*-acétylglucosamine  
**GNT-III:** *N*-acétylglucosaminyltransférase III  
**GnT-V:** *N*-acétylglucosaminyltransférase V  
**GPI:** Glycosylphosphatidylinositol  
**GSK3:** Glycogen synthase kinase 3  
**GXYLT:** Glucoside xylosyltransférase  
**HD:** Heterodomain  
**hEGF:** human EGF-like  
**Hes:** Hairy and enhancer of split  
**HEY:** Hairy/enhancer of split related with YRPW motif  
**HNPCC:** Hereditary non polyposis colorectal cancer  
**Hyl:** hydroxylysine  
**IBD:** Inflammatory bowel disease  
**ICAM:** Intercellular adhesion molecule  
**IDH1:** Isocitrate dehydrogenase 1  
**IgCAM:** Immunoglobulin-cell adhesion molecule  
**IGF2:** Insulin-like growth factor 2  
**IGFBP:** Insulin-like growth factor binding protein  
**IGFIIR:** Insulin-like growth factor type II receptor  
**IL-4:** Interleukin 4  
**IL-4R $\alpha$ :** Interleukin 4 receptor  $\alpha$   
**INCa:** Institut national du cancer  
**intEGF:** Intégrines EGF-like  
**IP3:** Inositol-1,4,5-triphosphate  
**IRM:** Imagerie par résonance magnétique  
**ISPD:** Isoprenoid synthase domain-containing protein  
**JAG:** Jagged  
**JAK:** Janus kinase  
**JNK:** Jun N-terminal kinase  
**KDEL:** Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine  
**KLF4:** Kruppel-like factor





**KRAS:** V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog  
**KSS:** Kearns-Sayre syndrome  
**LacNAc:** (poly)-*N*-acétyllactosamine  
**LAMA:** Laminin subunit alpha  
**lamEGF:** Laminin EGF-like  
**LARGE:** Glycosyltransferase-like protein  
**LiCl:** Lithium chloride  
**LNR:** Lin-12/Notch repeats  
**LRP5/6:** Lipoprotein related protein 5/6  
**MAGP:** Microfibril-associated glycoprotein  
**MAML1:** Mastermind-like protein 1  
**Man:** Mannose  
**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase  
**MBD:** Matrix-binding domain  
**MEF2C:** Myocyte enhancer factor 2C  
**MELAS:** Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes  
**MERRF:** Myoclonic epilepsy with ragged red fibers  
**MLH1:** MutL homolog 1  
**MMR:** Mismatch repair  
**MNNL:** Module at *N*-terminal domain of Notch ligands  
**MRF:** Myogenic regulatory factor  
**MSH:** MutS protein homolog  
**MSI:** Microsatellite instability  
**MT-TK:** Mitochondrially encoded tRNA-Lys  
**MT-TL:** Mitochondrially encoded tRNA-Leu  
**mTOR:** Mechanistic target of rapamycin  
**MUC5AC:** Mucin-5AC  
**MUC5B:** Mucin-5B  
**Myf5:** Myogenic factor 5  
**Myf6 (MRF4):** Myogenic factor 6  
**MyHC:** Myosin heavy chain  
**MyoD:** Myoblast determination protein  
**MyoG:** Myogenin  
**NDRG4:** N-Myc downstream-regulated gene 4  
**NECD:** Notch extracellular domain  
**NES:** Nuclear export signal  
**NEUROG1:** Neurogenin-1  
**NFATc:** Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic  
**NHR:** NFAT homology repeat  
**NICD:** Notch intracellular domain  
**NLS:** Nuclear localization signal  
**NRR:** Negative regulatory region  
**NT:** N-terminal  
**NTD:** N-terminal domain  
**NTR:** Netrin-like domain  
**OGA:** *O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminase  
**OGT:** *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase  
**OST:** Oligosaccharyltransferase  
**P:** Phosphate  
**PAF:** Polypose adénomateuse familiale  
**Pax3:** Paired box 3  
**Pax7:** Paired box 7  
**PDI:** Protein disulfide isomerase  
**PDK1:** Phosphoinositide-dependent kinase-1  
**PDZL:** PDZ ligand motif  
**PEST:** Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine  
**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase  
**PIP2:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate  
**PLC- $\gamma$ :** Phospholipase C- $\gamma$   
**POFUT:** Protéine *O*-fucosyltransférase  
**POGLUT:** Protéine *O*-glucosyltransférase  
**POMGNT:** Protein *O*-linked-mannose  $\beta$ -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase  
**POMT:** Protéine *O*-mannosyltransférase  
**PP:** Pyrophosphate  
**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog  
**PYGM:** Phosphorylase glycogen muscle  
**RAD50:** DNA repair protein RAD 50  
**RAM:** RBPj associated molecule  
**RDEF:** Arginine-Aspartate-Glutamate-Phénylalanine  
**RGD:** Integrin-binding motif  
**RHR:** Rel homology region



**RUNX3:** Runt-related transcription factor 3  
**RYK:** Related to tyrosine kinase  
**SCs:** Satellite cells  
**sDNA:** Stool DNA  
**Ser:** Sérine  
**sFRP:** Secreted frizzled-related protein  
**Sia:** Acide sialique  
**Siglec:** Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin  
**sLea:** Sialyl Lewis a  
**sLex:** Sialyl Lewis x  
**SMRT:** Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptor  
**SOCS1:** Suppressor of cytokine signaling protein 1  
**SP:** Signal peptide  
**ST3Gal:**  $\alpha$ 2,3 sialyltransférase  
**ST6Gal:**  $\alpha$ 2,6 sialyltransférase  
**STAT:** Signal transducers and activators of transcription  
**TAD:** Transactivation domain  
**TCF/LEF:** T cell factor/Lymphoid enhancer factor

**TCGA:** The cancer genome atlas  
**TET:** Ten-eleven translocation  
**TGF- $\beta$ :** Transforming growth factor  $\beta$   
**Thr:** Thréonine  
**TMD:** Transmembrane domain  
**TP53:** Tumor protein P53  
**TSC:** Tuberous sclerosis protein  
**TSP-I:** Thrombospondin type 1-like domain  
**TSR:** Thrombospondin type 1 repeat  
**UDP:** Uridine diphosphate  
**UGGT1:** UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1  
**VIP-36:** Vesicular integral-membrane protein 36  
**VWF-C:** von Willebrand factor type C-like domain  
**WD:** Wif Domain  
**WIF1:** Wnt inhibitory factor 1  
**WISP-3:** Wnt-1 inducible signaling pathway protein 3  
**WT:** Wild type  
**XXYL:** Xyloside xylosyltransférase  
**YB-1:** Y-box binding protein 1



## Table des illustrations

---

Figure 1. Représentation schématique simplifiée du processus de <i>N</i> -glycosylation des protéines. ....	34
Figure 2. Les différents types de <i>N</i> -glycanes portés par les protéines. ....	38
Figure 3. Les différents types de <i>O</i> -glycanes de type mucine. ....	40
Figure 4. Les différents types de <i>O</i> -glycanes simples. ....	42
Figure 5. Réaction de <i>C</i> -mannosylation d'une chaîne polypeptidique. ....	44
Figure 6. <i>S</i> -glycosylation de la Sublancine et de la Glycicine F. ....	46
Figure 7. Les différents types de <i>O</i> -glycosylation des domaines EGF-like. ....	48
Figure 8. Mise en évidence de la spécificité des Protéines <i>O</i> -fucosyltransférases 1 et 2 humaines pour leurs substrats. ....	52
Figure 9. Schéma de l'organisation des transcrits du gène POFUT1 humain et murin. .	54
Figure 10. Schéma de l'organisation des protéines POFUT1 humaine et murine. ....	56
Figure 11. La protéine POFUT1 est localisée dans le réticulum endoplasmique. ....	56
Figure 12. Représentation schématique de l'organisation structurale du muscle strié squelettique. ....	64
Figure 13. Structure du sarcomère. ....	66
Figure 14. Le complexe dystrophine-associated glycoprotein (DAGP). ....	72
Figure 15. Expressions temporelles des MRFs (Myogenic Regulatory Factor) au cours du processus myogénique. ....	78
Figure 16. Structure des récepteurs NOTCH chez les Mammifères. ....	86
Figure 17. Les ligands canoniques de la voie de signalisation NOTCH chez les Mammifères. ....	90
Figure 18. Les principaux ligands non canoniques de la voie de signalisation NOTCH chez les vertébrés. ....	92
Figure 19. Activation de la voie canonique de la signalisation NOTCH. ....	94
Figure 20. Structure des membres de la famille NFAT. ....	98
Figure 21. La voie de signalisation NFAT. ....	100
Figure 22. Implication de la voie de signalisation NFATc2/IL-4 dans le processus myogénique. ....	104
Figure 23. Structure cristallographique du complexe XWnt8-Fz8CRD. ....	106
Figure 24. Les antagonistes majeurs des protéines WNT. ....	108
Figure 25. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique. ....	114
Figure 26. L'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au cours du processus myogénique. ....	116
Figure 27. Organisation anatomique du côlon et du rectum. ....	124



<b>Figure 28. Les différentes couches de la paroi intestinale.</b> .....	126
<b>Figure 29. Le développement du cancer colorectal.</b> .....	128
<b>Figure 30. Les différents tests de dépistage du cancer colorectal.</b> .....	138
<b>Figure 31. La voie de signalisation NOTCH contrôle différents aspects du développement tumoral colorectal.</b> .....	154
<b>Figure 32. La signalisation Wnt/<math>\beta</math>-caténine est dérégulée au sein des cancers colorectaux.</b> .....	158
<b>Figure 33. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.</b> .....	160
<b>Figure 34. La voie de signalisation canonique TGF<math>\beta</math>.</b> .....	162
<b>Figure 35. Rôles canoniques et non canoniques du facteur suppresseur de tumeur de p53.</b> .....	164





## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1. La liste des protéines humaines potentiellement modifiées par POFUT1. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tableau 2. Description de la classification TNM.....</b>	<b>144</b>
<b>Tableau 3. Correspondances entre les classifications TNM, Dukes et Astler-Coller.....</b>	<b>146</b>



## Résumé

---

La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) réticulaire, dont le gène est localisé dans la région chromosomique 20q11.21 chez l'Homme, catalyse le transfert d'un fucose qui sera *O*-lié sur la sérine ou la thréonine présente dans la séquence consensus ( $C^2X_4S/TC^3$ ), portée par un domaine EGF-like d'une glycoprotéine membranaire ou sécrétée. Le knockdown de *Pofut1* (Po<sup>-</sup>) dans la lignée myoblastique murines C2C12 conduit à la formation de myotubes allongés et minces, à faible nombre de noyaux ainsi qu'à une sous-expression du marqueur myogénique tardif *Myf6*, suggérant des défauts significatifs dans la fusion secondaire. La signalisation NFATc2/IL-4 est décrite comme la voie principale associée à cette étape. Nous montrons que la moindre expression de *Nfatc2* dans les myotubes Po<sup>-</sup> est corrélée à une baisse de l'IL-4 sécrétée et à une faible quantité de son récepteur (IL-4R $\alpha$ ) présent chez les cellules de réserve qui doivent participer à la fusion avec les myotubes naissants. La neutralisation de l'IL-4R $\alpha$  sur les C2C12 sauvages provoque des défauts d'accrétion myonucléaire, semblables à ceux observés pour les Po<sup>-</sup>. Ainsi, POFUT1 pourrait être un nouveau médiateur de la croissance des myotubes au cours du processus myogénique, notamment par la signalisation NFATc2/IL-4. La glycoprotéine WIF1, cible potentielle de POFUT1, est un antagoniste de la signalisation WNT via sa fixation aux protéines WNT. Cette voie est connue pour être impliquée dans la prolifération et la différenciation des myoblastes. Néanmoins, aucune donnée ne concerne le rôle de WIF1 dans le processus myogénique. Par un apport exogène de WIF1, nous avons montré l'augmentation de la prolifération et l'altération de la différenciation myoblastique des C2C12. Lors de la prolifération, une augmentation de l'expression de *Myf5* et une diminution de *MyoG* sont observées. A 7 jours de différenciation, les myotubes Po<sup>-</sup> ont un diamètre plus petit que les myotubes sauvages et ils sont plus nombreux à avoir un faible nombre de noyaux, traduisant des défauts de fusion. Nous démontrons pour la première fois, l'implication de la protéine WIF1 dans le processus myogénique. Récemment, POFUT1 a aussi été proposé comme nouveau biomarqueur pour certains cancers, mais pas évalué dans le cancer colorectal (CCR). Nous avons donc collecté des données issues de 626 tumeurs et 51 tissus adjacents non tumoraux disponibles dans FireBrowse, celles de lignées cellulaires cancéreuses colorectales et de prélèvements tumoraux provenant du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. Une surexpression de *POFUT1* est observée dès le stade I, majoritairement due à une amplification de la région 20q11.21. Elle est significativement associée aux adénocarcinomes non mucineux et à une localisation rectale. De plus, l'expression de *POFUT1* est corrélée à celles des récepteurs NOTCH ainsi qu'au processus métastatique, probablement par activation de la voie NOTCH. A ce titre, POFUT1 pourrait être considéré comme un nouveau biomarqueur pour le diagnostic du CCR.

**Mots-clés :** POFUT1, cancer colorectal, processus myogénique, voie de signalisation NOTCH, voie de signalisation NFATc2/IL-4, WIF1, voie de signalisation WNT.



## Abstract

---

The ER protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1), whose gene is located at the 20q11.21 chromosomal region in humans, catalyzes *O*-linked fucose addition to serine or threonine present in the consensus sequence (C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>S/TC<sup>3</sup>) carried by EGF-like domain of membrane or secreted glycoprotein. *Pofut1* knockdown (Po<sup>-</sup>) in murine myoblast C2C12 cell line leads to formation of elongated and thin myotubes, with a low number of nuclei and to downexpression of the late myogenic marker *Myf6*, suggesting significant defects in secondary fusion. NFATc2/IL-4 signaling is described as the main pathway associated to this step. We showed that the slightest expression of *Nfatc2* in Po<sup>-</sup> myotubes is correlated with a decrease in IL-4 secretion and a lower quantity of IL-4Rα in reserve cells, which had to fuse with nascent myotubes. IL-4Rα neutralization on wild-type C2C12 causes myonuclear accretion defects, similar to those observed in Po<sup>-</sup>. Then, POFUT1 could be a new mediator of myotube growth during myogenic process, particularly through NFATc2/IL-4 signaling. The glycoprotein WIF1, potential POFUT1 target, is an antagonist of WNT signaling via its binding to WNT proteins. This pathway is involved in proliferation and differentiation of myoblasts. However, no data are available on WIF1 role in the myogenic process. Through exogenous WIF1 treatment, we showed a proliferation increase and a myoblast differentiation impairment in C2C12. During proliferation, increase in *Myf5* and decrease in *MyoG* expressions are observed. At 7 days of differentiation, Po<sup>-</sup> myotubes have a smaller diameter than wild-type ones and are more numerous to have a small number of nuclei, reflecting fusion defects. For the first time, we demonstrate the involvement of WIF1 in the myogenic process. Recently, POFUT1 was proposed to be a new biomarker for several cancers, but not evaluated in colorectal cancer (CRC). We used data from 626 tumors and 51 adjacent non-tumor tissues available at FireBrowse, colorectal cancer cell lines and tumor samples from the Biological Resource Centre of Limoges hospital. A *POFUT1* overexpression is observed from stage I, mainly due to amplification of 20q11.21 region. It is significantly associated to non-mucinous adenocarcinoma and to rectum location. Moreover, *POFUT1* expression is correlated with those of *NOTCH* receptors as well as the metastatic process, probably by activation of the NOTCH pathway. POFUT1 could therefore be considered as a new biomarker for CRC diagnosis.

**Keywords :** POFUT1, colorectal cancer, myogenic process, NOTCH signaling pathway, NFATc2/IL-4 signaling pathway, WIF1, WNT signaling pathway.



## Publications et communications

---

### **Publications:**

#### **Downregulation of POFUT1 impairs secondary myogenic fusion through the NFATc2/IL-4 signaling pathway.**

**Julien Chabanais**<sup>1</sup>, Audrey Der Vartanian<sup>1</sup>, Claire Carrion, Abderrahman Maftah\*, Agnès Germot\*. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 4396; doi:10.3390/ijms20184396 (Impact factor en 2019 : 4.183). <sup>1</sup>co-premiers auteurs ; \*co-derniers auteurs.

#### ***POFUT1* as a promising novel biomarker of colorectal cancer.**

**Julien Chabanais**, François Labrousse, Alain Chaunavel, Agnès Germot, Abderrahman Maftah. *Cancers* 2018, 10, 411; doi:10.3390/cancers10110411 (Impact factor en 2018 : 5.326).

#### **PEI-cellulose nanocrystal hybrids as efficient siRNA delivery agents- Synthesis, physicochemical characterization and *in vitro* evaluation.**

Gautier Mark Arthur Ndong Ntoutoume, Vincent Grassot, Frédérique Brégier, **Julien Chabanais**, Jean-Michel Petit, Robert Granet, Vincent Sol. *Carbohydrate Polymers* 2017, 164, 258-267 (Impact factor en 2017 : 5.158).

Au cours de mon stage de Master 1, j'ai pu contribuer à une étude s'intéressant à la vectorisation de siRNA (small interfering RNA), induisant la mort cellulaire par apoptose, au sein des cellules murines C2C12 par l'intermédiaire de nanoparticules de cellulose. Il a été montré que les nanoparticules de cellulose non couplées aux siRNA ne présentaient pas de cytotoxicité envers les cellules, et que la liaison des siRNA à ce nouveau type de nanoparticules les protège de la dégradation favorisant ainsi leur transport au sein des cellules.





## **Impact of WIF1 on proliferation and differentiation of C2C12 murine myogenic cells.**

**Julien Chabanais**<sup>1</sup>, Florian Pennarubia<sup>1</sup>, Abderrahman Maftah, Agnès Germot\*, Sébastien Legardinier\*. (En préparation). <sup>1</sup>co-premiers auteurs ; \*co-derniers auteurs.

## **Involvement of Siglecs E, 15 and G on proliferation and differentiation of C2C12 murine myogenic cells.**

**Julien Chabanais**, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit. (En préparation).

Dans le cadre d'une étude commencée lors de mon stage de Master 2, je me suis intéressé à l'impact d'une sous-expression des Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin E, 15 et G au cours du processus myogénique. Les Siglecs sont des protéines membranaires interagissant avec les acides sialiques portés par les glycanes et modulant des voies de signalisations sous-jacentes. Nous avons pu observer des résultats différents selon les Siglecs sous-exprimées. En effet, selon les cas, la prolifération cellulaire est impactée (augmentée pour le KD *Siglec G*) et le processus de différenciation est aboli (KD *Siglec 15* et *Siglec G*) ou conduit à la formation de myotubes hypertrophiés (KD *Siglec E*).



## **Communications:**

### **Communications orales:**

#### **La surexpression de POFUT1 dans le cancer colorectal (CCR): un nouveau biomarqueur de diagnostic précoce ?**

**Julien Chabanais**, François Labrousse, Alain Chaunavel, Abderrahman Maftah, Agnès Germot. Ligue contre le cancer, 2<sup>ème</sup> Journée Recherche en Cancérologie, Limoges, 14 Novembre 2019.

#### **POFUT1 overexpression in colorectal cancer: a novel biomarker for an early diagnosis?**

**Julien Chabanais**, François Labrousse, Alain Chaunavel, Abderrahman Maftah, Agnès Germot. The 9th International Conference On Notch Targeting in Cancer. Konnos Bay, Cyprus, June 26-28, 2019.

#### **Rôle de la *O*-fucosylation contrôlée par POFUT1 dans la migration cellulaire.**

**Julien Chabanais**, Agnès Germot, Abderrahman Maftah. Séminaire thématique Sciences Biologiques et Santé, Cussac, 7-9 Mars 2018.

### **Communications écrites:**

#### **POFUT1 overexpression in colorectal cancer: a novel biomarker for an early diagnosis?**

**Julien Chabanais**, François Labrousse, Alain Chaunavel, Abderrahman Maftah, Agnès Germot. The 9th International Conference On Notch Targeting in Cancer. Konnos Bay, Cyprus, 26<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> June 2019.



## **Role of *O*-fucosylation controlled by POFUT1 in cell migration.**

**Julien Chabanais**, Audrey Der Vartanian, Abderrahman Maftah, Agnès Germot. Séminaire thématique Biosanté, Pouligny-Notre-Dame, 9-10 Mars 2017.



## Avant-propos

---

La glycosylation est parmi les modifications post-traductionnelles, celle la plus fréquemment observée chez les protéines sécrétées et membranaires (Spiro, 2002). Elle implique l'attachement covalent de différents sucres à un acide aminé particulier compris ou non dans une séquence peptidique consensus d'une protéine. Selon la nature de la liaison entre le sucre et l'acide aminé, la glycosylation des protéines peut être divisée en quatre grandes catégories : la *N*-glycosylation, la *O*-glycosylation, la *C*-glycosylation et la *S*-glycosylation. Les glycanes participent à de nombreuses fonctions biologiques telles que le repliement, la maturation, l'adressage, et l'activité fonctionnelle des protéines (Varki, 2017). Des altérations de glycosylation nuisent au fonctionnement normal des cellules et des organismes, et peuvent parfois conduire à des situations pathologiques graves telles que le développement et la progression tumorale (Pinho et Reis, 2015).

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Glycosylation et différenciation cellulaire » du laboratoire pluridisciplinaire PEIRENE (EA 7500) de l'Université de Limoges. Cette équipe s'intéresse, depuis plusieurs années, à des glycosyltransférases, en particulier fucosyltransférases (Loriol *et al.*, 2006, 2007 ; Petit *et al.*, 2006 ; Der Vartanian *et al.*, 2015 ; Al Jaam *et al.*, 2016) et sialyltransférases (Teppa *et al.*, 2016 ; Chang *et al.*, 2019), dans le but de mettre en évidence leurs fonctions dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques. Ces dernières années, elle s'est particulièrement intéressée aux rôles de ces enzymes et des modifications glycaniques qu'elles opèrent dans le cadre de la différenciation myogénique et du processus tumoral, notamment dans le cancer colorectal. Mes travaux de thèse se sont répartis selon ces deux axes de recherche. Ils ont porté, d'une part, sur le rôle de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) responsable de la *O*-fucosylation des domaines EGF-like des protéines, au cours de la différenciation myogénique. J'ai particulièrement étudié





l'importance de POFUT1 dans le processus de fusion secondaire, *via* l'étude de la voie NFATc2/IL-4. Une des protéines cibles potentielles de POFUT1 est WIF1 (Wnt inhibitory factor 1), un régulateur de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. J'ai ainsi exploré les conséquences de l'impact de WIF1 sur la prolifération et la différenciation myogénique. D'autre part, étant donné l'importance de la *O*-glycosylation des domaines EGF-like du récepteur NOTCH dans l'activation de sa voie de signalisation et connaissant la dérégulation de cette dernière dans les cas de cancers, je me suis intéressé à l'étude de POFUT1 dans le contexte du cancer colorectal où une surexpression de ce gène liée à l'amplification de la portion chromosomique où il se situe est associée à l'état tumoral (Loo *et al.*, 2013). La protéine *O*-fucosyltransférase 1 catalyse une glycosylation rare, se faisant au sein du réticulum endoplasmique. Il s'agit du transfert d'un *O*-fucose sur un domaine EGF-like correctement repliés, et possédant une séquence consensus spécifique de type C<sup>2</sup>X<sup>4</sup>(S/T)C<sup>3</sup> (où C2 et C3 représentent les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cystéines des 6 cystéines conservées du domaine) (Müller *et al.*, 2014). Chez l'Homme et la souris, il existe moins d'une centaine de protéines cibles contenant une à plusieurs séquences consensus, et seulement une quinzaine ont pu être démontrées comme réellement porteuses de *O*-fucose (Li *et al.*, 2017 ; Schneider *et al.*, 2017). La principale cible connue de POFUT1 est le récepteur NOTCH, qui contient 14 à 20 sites consensus de *O*-fucosylation selon les quatre paralogues humains. La quasi-totalité des 20 sites retrouvés sur le récepteur NOTCH1 sont *O*-fucosylés (Kakuda et Haltiwanger, 2017). L'expression de POFUT1 est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation NOTCH (Okajima et Irvine, 2002 ; Stanley, 2007 ; Der Vartanian *et al.*, 2015). En effet, la *O*-fucosylation correcte du récepteur NOTCH ainsi que l'allongement du *O*-fucose par une *N*-acétylglucosamine prend une place prépondérante dans la capacité du récepteur à interagir avec ses ligands de type DSL (Delta/Serrate/Lag-2) (Kakuda et Haltiwanger, 2017), constituant la première étape de la signalisation. Ceci est renforcé par le fait que le knockout de *Pofut1* chez la souris provoque



une létalité embryonnaire avec des défauts de développement, semblables à ceux observés lors d'une altération de la voie NOTCH (Shi et Stanley, 2003). Ces éléments suggèrent que la O-fucosylation médiée par la protéine POFUT1 est une modification majeure de la signalisation cellulaire impliquant NOTCH, elle-même responsable de nombreux processus physiologiques et dérégulée dans des cas pathologiques. De ce fait, mes travaux de thèse se sont articulés autour d'une thématique physiologique (la différenciation myogénique) et d'une thématique pathologique (le cancer colorectal).

Une étude antérieure initiée au sein de mon équipe d'accueil, lors de la thèse de Mme Audrey Der Vartanian (soutenue en 2015), utilisant la lignée myoblastique murine C2C12 knockdown pour *Pofut1* (Po<sup>-</sup>), a mis en évidence des défauts dans le mécanisme de fusion secondaire des myotubes. Durant ma thèse, j'ai donc poursuivi ces travaux, et me suis plus particulièrement intéressé à la voie de signalisation NFATc2/IL-4 démontrée comme essentielle dans la fusion secondaire myoblastique (Horsley *et al.*, 2001, 2003). L'étude s'est alors orientée vers des approches transcriptionnelles et protéiques, afin d'explorer l'influence de la sous-expression de *Pofut1* dans les cellules C2C12, sur la signalisation NFATc2/IL-4.

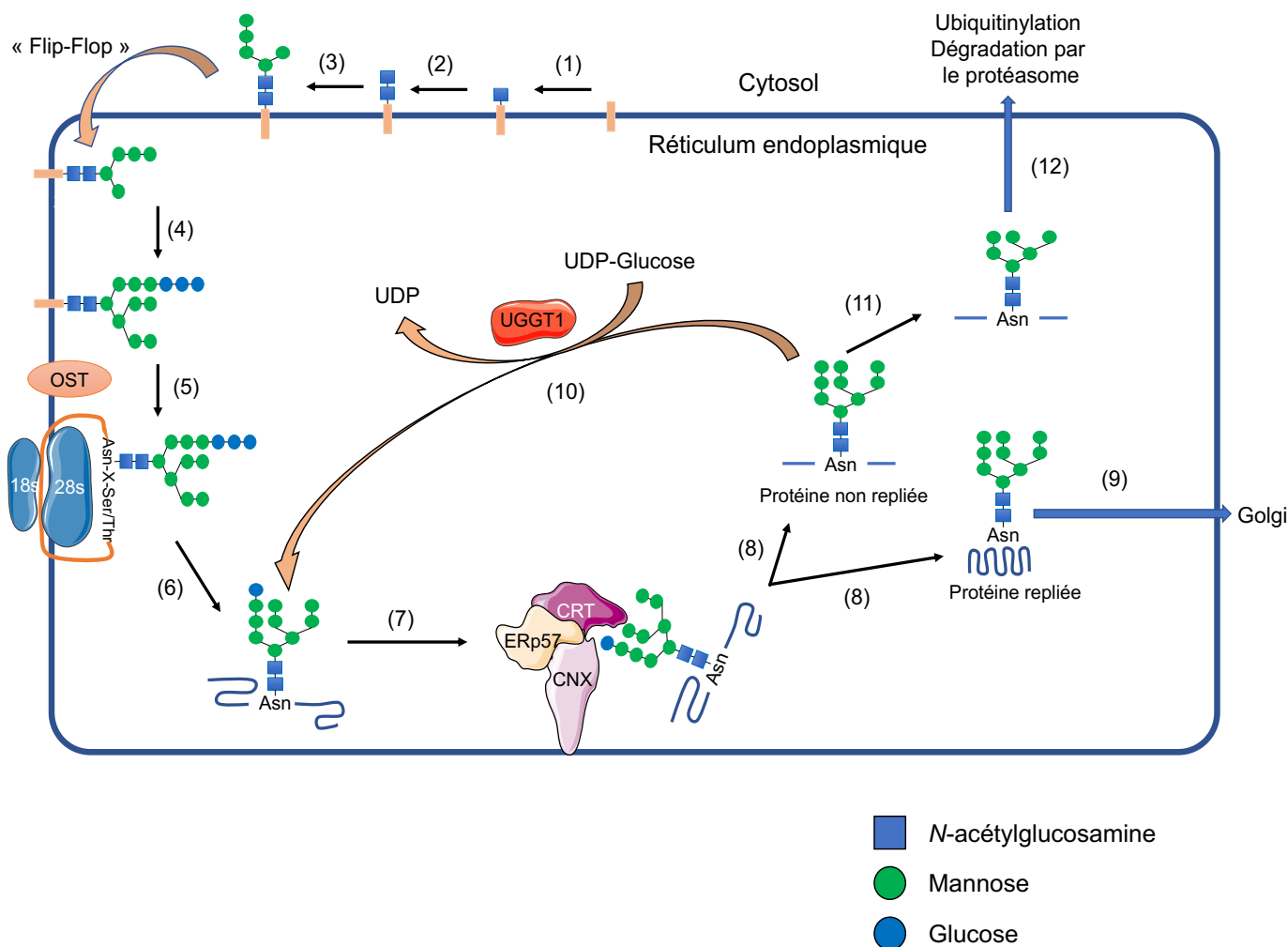
De nombreuses études ont mis en lumière, l'implication de la voie de signalisation WNT dans le développement et la régénération du muscle squelettique (Girardi et Le Grand, 2018). Néanmoins peu d'entre elles se sont intéressées au rôle des inhibiteurs biologiques de cette signalisation dans le contexte myogénique malgré leurs intérêts. En effet, les protéines de la famille Dickkopf (DKK) réduisent la fibrose musculaire des souris *mdx*, utilisées comme modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne (Trensz *et al.*, 2010). Les secreted frizzled-related proteins 1 et 2 (sFRP1 et sFRP2) ont la capacité d'inhiber le processus de différenciation myoblastique conduisant à la formation des myotubes multinucléés (Descamps *et al.*, 2008). Concernant la protéine Wnt inhibitory factor 1 (WIF1), une cible potentielle de POFUT1, aucune étude ne s'est penchée sur son implication dans le processus myogénique. De ce fait,



une partie de mon travail de thèse a consisté à déterminer l'impact de WIF1 sur la prolifération et la différenciation myoblastique. Pour ce faire, les cellules myoblastiques murines C2C12 ont été traitées par du WIF1 recombinant produit au sein du laboratoire et leur capacité proliférative ainsi que le processus de différenciation myogénique ont pu être appréciés par quantification colorimétrique, immunomarquage et suivi l'expression des MRFs (Myogenic Regulatory Factor).

De plus en plus d'études ont mis en avant une association entre les expressions de POFUT1, NOTCH et le développement de différents types de cancers (Ma *et al.*, 2016 ; Wan *et al.*, 2017 ; Dong *et al.*, 2017). L'implication combinée de ces acteurs dans le cancer colorectal, l'un des plus fréquemment diagnostiqué au niveau mondial, n'avait pas encore été explorée. Une part de mon travail de thèse a ainsi été consacré à ce sujet. Pour répondre à ma problématique, j'ai dans un premier temps effectué un travail bioinformatique et d'analyse statistique à partir de la plateforme FireBrowse. Cette partie visait à caractériser l'expression de *POFUT1*, des gènes des récepteurs NOTCH, et de certains gènes cibles de la voie de signalisation, en lien avec des données cliniques. J'ai également exploré les mécanismes pouvant être mis en jeu dans la régulation de l'expression de *POFUT1*. Dans un second temps, j'ai pu valider les résultats obtenus *in silico*, sur des échantillons de tumeurs colorectales provenant du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges et sur des lignées cancéreuses colorectales. Des mesures de l'expression protéique de POFUT1 et la quantification du nombre de copies du gène ont été réalisées sur ces échantillons tumoraux.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats ont permis d'apprécier l'implication de POFUT1 et de l'une de ses potentielles protéines cibles WIF1, dans le processus de différenciation myogénique. Ils ont, dans le cas du cancer colorectal, mis en exergue la surexpression de *POFUT1* indiquant son intérêt potentiel en tant que biomarqueur diagnostique mais aussi comme une nouvelle cible pour la recherche thérapeutique anti-cancéreuse.



**Figure 1. Représentation schématique simplifiée du processus de N-glycosylation des protéines.**

La synthèse du précurseur glycanique débute sur la face cytosolique du RE par la fixation d'une N-acétylglucosamine-1-phosphate sur le dolichol phosphate par l'intermédiaire de la N-acétylglucosaminyl transférase (1). Ce précurseur sera par la suite allongé par l'addition successive d'une N-acétylglucosamine et de cinq mannoses par respectivement des glycosyltransférases (2) et des mannosyltransférases (3). Un mécanisme de « flip-flop » catalysé par la flippase RFT1 oriente le précurseur glycanique dans la lumière du RE. A ce stade, des glycosyltransférases et des mannosyltransférases greffent trois glucoses et quatre mannoses sur le précurseur (4). Si la protéine en cours de synthèse par le ribosome porte la séquence consensus Asn-X-(Ser/Thr) (X, tous les acides aminés sauf la proline), elle pourra alors être N-glycosylée. Pour ce faire, le complexe oligosaccharyltransférase (OST) catalyse le transfert du  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  porté par le précurseur (dolichol pyroP) sur l'asparagine de la séquence consensus de N-glycosylation (5). L'action des  $\alpha$ -glucosidases I et II permet le relargage de la protéine N-glycosylée dans la lumière du RE (6) et sa prise en charge par le complexe ERP57/CRT/CNX qui va promouvoir son repliement (7). Le clivage du dernier glucose par l' $\alpha$ -glucosidase II engendre la libération de la protéine N-glycosylée du complexe de repliement (8). Si la protéine est correctement repliée elle sera démmanosylée, notamment par l'ER mannosidase I, et véhiculée vers l'appareil de Golgi afin d'y être maturée (9). Dans le cas où la protéine n'est pas correctement repliée, celle-ci sera reconnue par l'UGGT1 qui catalysera l'ajout d'un glucose permettant à la protéine mal conformée de repartir dans le processus de repliement (10). Si malgré cela elle n'est toujours pas correctement repliée, elle sera démmanosylée par la famille des EDEMs (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein) (11), prise en charge par le processus ERAD aboutissant à son ubiquitinylation dans le cytosol et sa dégradation par le protéasome (12). (D'après Hüttner et Strasser, 2012).

# Chapitre I. La glycosylation des protéines et notamment la *O*-fucosylation des domaines EGF-like

---

Les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles variées dont la glycosylation. Chez les eucaryotes, 1% du génome code pour des protéines impliquées dans la glycosylation (Lowe et Marth, 2003). Plus de la moitié des protéines retrouvées au sein des systèmes biologiques sont glycosylées et sont majoritairement sécrétées ou portées par la membrane plasmique (Apweiler *et al.*, 1999). Les glycoprotéines peuvent être modifiées par différents types de glycosylation répartis en quatre familles (*N*-glycosylation, *O*-glycosylation, *C*-mannosylation et *S*-glycosylation) selon la nature de la liaison entre le sucre apporté par le donneur activé et l'acide aminé porté par la protéine. De par le fait que la place occupée par les motifs glycaniques puisse représenter jusqu'à 80 % de la masse moléculaire d'une glycoprotéine (Varki et Sharon, 2009), les études portant sur la glycosylation sont en pleine expansion. Plusieurs éléments comme le développement de technologies permettant la détection des glycanes, la diversité de motifs glycaniques observés et l'appréciation des rôles de la glycosylation dans des fonctions biologiques variées, ont permis un développement rapide de cette science à part entière qu'est la glycobiologie.

## I.1. Les différents types de glycosylation

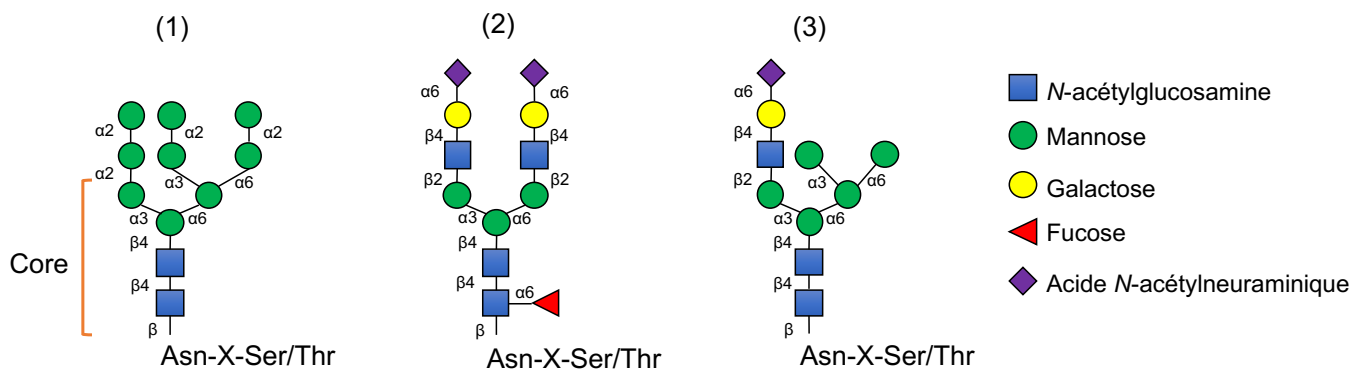
### I.1.1. La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation est le type le plus répandu de glycosylation des protéines (Schwarz et Aebi, 2011). Chez les eucaryotes, plus de la moitié des glycoprotéines sont *N*-glycosylées (Gomord *et al.*, 2010). Ce mécanisme hautement conservé se déroule dans deux compartiments subcellulaires : le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (**Figure 1**). La *N*-glycosylation nécessite la synthèse préalable d'un oligosaccharide sur un support lipidique.





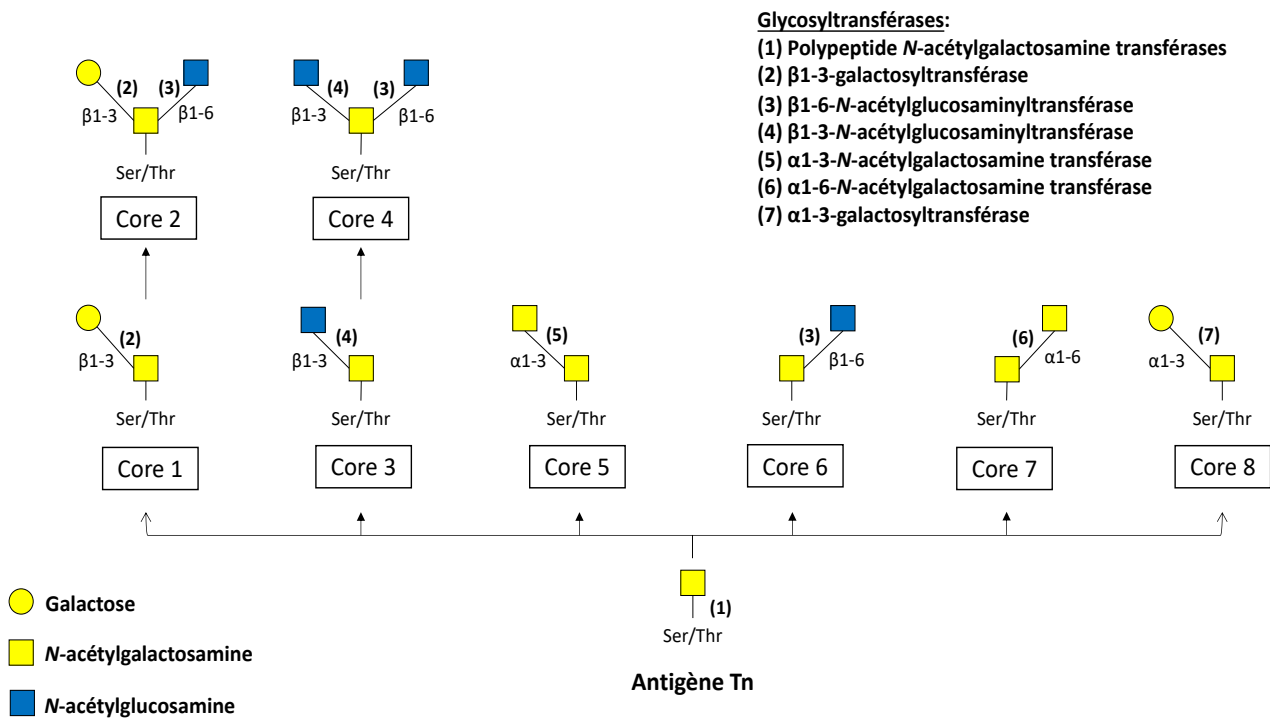
Cette synthèse est initiée, sur la face cytoplasmique du RE, par le greffage d'une *N*-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-P) provenant d'un sucre activé, l'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), sur le précurseur lipidique membranaire le dolichol phosphate (Dol-P) par l'intermédiaire de la *N*-acétylglucosaminyl phosphate transférase. Une seconde GlcNAc est ajoutée par l'intermédiaire de l'UDP-GlcNAc via le complexe enzymatique Alg13/Alg14 pour former le dolichol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>. Cinq mannoses issus de molécules de GDP-mannose sont ensuite ajoutés par une mannosyltransférase pour former un heptasaccharide, le dolichol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>. A ce stade, l'heptasaccharide est basculé en direction de la lumière du RE par un mécanisme de « flip-flop » contrôlé par la flippase RFT1 (Helenius et Aebi, 2002 ; Vishwakarma et Menon, 2005). Puis, l'addition de quatre mannoses et trois glucoses sera catalysée par des mannosyltransférases et des glucosyltransférases pour conduire à la formation du tétradécasaccharide appelé dolichol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> (Burda et Aebi, 1999). Ici, les molécules de mannoses et de glucoses sont issues respectivement du dolichol-P-mannose et du dolichol-P-glucose. La structure glycanique du dolichol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> est transférée « en bloc » par liaison covalente sur l'atome d'azote d'un groupement amide d'une asparagine présente dans la séquence consensus N-X-(S/T) (X étant n'importe quel résidu sauf la proline) (Pan et Elbein, 1990) d'une chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée par l'intermédiaire de l'oligosaccharyltransférase (OST) (Silberstein et Gilmore, 1996). La protéine ainsi glycosylée débute sa maturation dans le réticulum endoplasmique par l'élimination des deux glucoses terminaux par les  $\alpha$ -glucosidases I et II (Hammond *et al.*, 1994) aboutissant à l'oligosaccharide GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>1</sub>. Simultanément, la chaîne peptidique *N*-glycosylée non repliée est libérée par le ribosome dans la lumière du RE pour être prise en charge par deux protéines chaperonnes, la calnexine (CNX) (Ahluwalia *et al.*, 1992) associée à la membrane et la calréticuline (CRT) (Waisman *et al.*, 1985) soluble. Le complexe glycoprotéine-CNX/CRT en s'association avec l'oxydoréductase ERp57 appartenant



**Figure 2. Les différents types de *N*-glycanes portés par les protéines.**

Il existe trois types de *N*-glycanes : les high mannoses (1), les complexes (2) et les hybrides (3). Ils possèdent un « core » pentasaccharidique commun, constitué de deux *N*-acétylglucosamines et de trois mannoses (accolade orange). (D'après Higel *et al.*, 2016).

à la famille des protéines disulfide isoméras (PDI) (Leach *et al.*, 2002) et d'autres facteurs présents dans la lumière du RE vont protéger la glycoprotéine des autres macromolécules en cours de formation afin de promouvoir son repliement (Parodi, 2000). Le dernier glucose est ensuite supprimé par l'action de la glucosidase II formant l'oligosaccharide GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> et le libérant de son interaction avec le complexe CNX/CRT. A ce stade, si un défaut de repliement est détecté, l'UDP-glucose glycoprotéine glycosyltransférase 1 (UGGT1) (Ellgaard et Helenius, 2001) catalysera l'ajout d'un glucose sur la glycoprotéine pour lui permettre de se lier à nouveau avec le complexe CNX/CRT (Caramelo *et al.*, 2004). Il arrive que malgré cela, la glycoprotéine présente toujours des défauts de repliement, si bien que l'action de différentes mannosidases de la famille EDEM (Moremen et Molinari, 2006) vont empêcher l'UGGT1 de regreffer un glucose sur le mannose accepteur et ainsi une nouvelle prise en charge par le complexe CNX/CRT. La glycoprotéine mal repliée sera par l'intermédiaire du complexe ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) transloquée dans le cytosol où elle sera ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Anelli et Sitia, 2008). Si la glycoprotéine est correctement repliée, un mannose sera clivé par l' $\alpha$ -mannosidase réticulaire I formant ainsi le décasaccharide GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> reconnu par des lectines membranaires comme l'ERGIC-53 et VIP-36 (Yamashita *et al.*, 1999). Cette reconnaissance va permettre le transport de la glycoprotéine, via des vésicules de type COPII (Barlowe, 2002), vers l'appareil de Golgi afin de réaliser les différentes étapes de maturation de la glycoprotéine. Au sein de l'appareil de Golgi, le précurseur décasaccharidique va subir des modifications comme l'élimination de mannoses et l'ajout d'autres monosaccharides tels que des *N*-acétylgalactosamines, *N*-acétylglucosamines, galactoses, fucoses ou encore des acides sialiques terminaux. Ces différentes modifications conduisent à la formation de trois grandes classes d'oligosaccharides : les *N*-glycanes de type « high mannose », les *N*-glycanes de type « complexe » et les *N*-glycanes de type « hybride » (**Figure 2**). Il est important de noter qu'une même protéine peut porter les



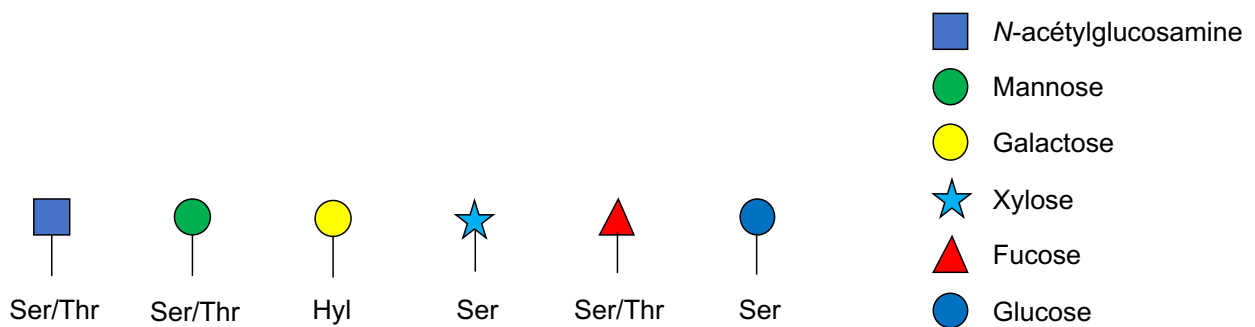
**Figure 3. Les différents types de *O*-glycanes de type mucine.**

La biosynthèse des différents types de *O*-glycanes de type mucine débute par la synthèse d'un précurseur commun qui est l'antigène Tn. Celui-ci résulte de l'addition d'une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) par la ppGalNAcT sur le groupe hydroxyl (-OH) d'une sérine ou d'une thréonine de la chaîne polypeptidique. Ce précurseur sera par la suite allongé par différentes enzymes conduisant à la formation de 8 types de core. (D'après Schedin-Weiss *et al.*, 2014).

trois types de structures saccharidiques citées ci-dessus.

### **I.1.2. La *O*-glycosylation**

La *O*-glycosylation de type mucine est la plus fréquemment observée sur les glycoprotéines membranaires et sécrétées. C'est une modification post-traductionnelle, ayant lieu au sein de l'appareil de Golgi et faisant intervenir une série de réactions séquentielles catalysées par différentes glycosyltransférases (Hang et Bertozzi, 2005). La première d'entre elles est l'ajout d'une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) provenant de l'UDP-GalNAc sur le groupement hydroxyl (-OH) d'un résidu sérine ou thréonine (GalNAc $\alpha$ -S/T) catalysé par une grande famille de polypeptide *N*-acétylgalactosamine transférases (ppGalNAcT). Ce processus conduit à la formation de la structure commune à tous les *O*-glycanes de type mucine appelée antigène Tn qui peut par la suite subir d'autres glycosylations. Il existe huit sous-catégories de *O*-glycanes de type mucine dénommées structures de type core 1 à 8 (**Figure 3**). La structure core 1, qui est la plus observée sur les glycoprotéines et les mucines, correspond à l'ajout d'un galactose lié en  $\beta$ 1-3 à l'antigène Tn (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) catalysé par la core 1  $\beta$ 1-3-galactosyltransférase (C1GalT1 ou T-synthase). L'ajout d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) liée en  $\beta$ 1-6 à la structure core 1, régulé par trois core 2  $\beta$ 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférases (C2GnT 1 à 3) constitue la structure core 2 (GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) retrouvée sur une grande variété de glycoprotéines notamment celles contenues dans le plasma sanguin et sur les mucines des voies respiratoires. Le core 3 correspond au greffage d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) liée en  $\beta$ 1-3 sur l'antigène Tn (GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) par l'intermédiaire d'une core 3  $\beta$ 1-3-*N*-acétylglucosaminyltransférase (C3GnT). Le core 4 est formé par l'ajout d'une *N*-acétylglucosamine liée en  $\beta$ 1-6 sur la *N*-acétylgalactosamine du core 3 catalysé par la core 2  $\beta$ 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférase 2 (GlcNAc $\beta$ 1-6(GlcNAc $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr). Les cores 3 et 4 sont uniquement observés sur les mucines sécrétées par les bronches, le côlon ou encore les glandes salivaires. Ces différentes structures peuvent être

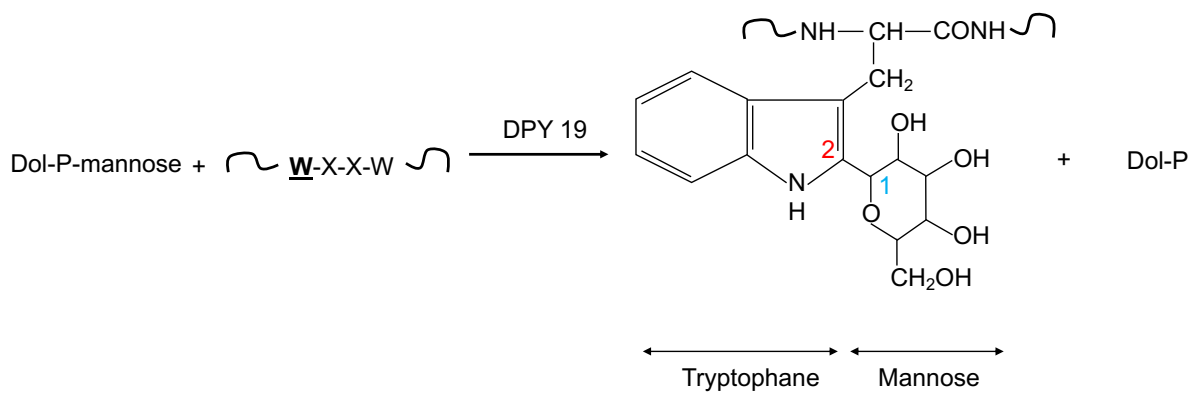


**Figure 4. Les différents types de *O*-glycanes simples.**

En plus des *O*-glycanes de type mucine, on peut observer des *O*-glycanes simples. Ceux-ci correspondent à la fixation de *N*-acétylglucosamine, mannose, galactose, xylose, fucose ou encore glucose *O*-liés sur des résidus sérine, thréonine et également hydroxylysine. (D'après Goettig, 2016).

ensuite allongées par l'action successive des  $\beta$ 1-3-*N*-acétylglucosaminyltransférases ( $\beta$ 3GnT) et  $\beta$ 1-4-galactosyltransférases ( $\beta$ 4GalT) pour former des *O*-glycanes complexes. Les cores 5 à 8 sont aussi formés à partir de l'antigène Tn. La fixation d'une *N*-acétylgalactosamine liée en  $\alpha$ 1-3 par l' $\alpha$ 1-3-*N*-acétylgalactosamine transférase, mise en évidence dans le mucus d'un côlon cancéreux (Kurosaka *et al.*, 1983), forme le core 5 (GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr). La  $\beta$ 1-6-*N*-acétylglucosaminyltransférase décrite dans le tissu ovarien (Yazawa *et al.*, 1986) permet la formation de la structure GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr du core 6. La structure core 7 (GalNAc $\alpha$ 1-6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) décrite dans la glande submaxillaire bovine (Chai *et al.*, 1992) correspond à la fixation en  $\alpha$ 1-6 d'une *N*-acétylgalactosamine par une  $\alpha$ 1-6-*N*-acétylgalactosamine transférase sur le précurseur Tn. Enfin, le core 8 (Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) issu de l'addition d'un galactose lié en  $\alpha$ 1-3 sur l'antigène Tn par une  $\alpha$ 1-3-galactosyltransférase est détecté dans le mucus bronchique humain (van Halbeek *et al.*, 1994). Ces structures glycaniques peuvent également être allongées par des monosaccharides tels que le fucose afin de former des *O*-GalNAc complexes comme les antigènes sanguins ABH et les antigènes Lewis (Brockhausen et Stanley, 2015).

D'autres monosaccharides peuvent mettre en jeu des liaisons *O*-glycosidiques (**Figure 4**). On retrouve notamment les *O*-*N*-acétylglucosamines (*O*-GlcNAc) portées par les protéines cytoplasmiques et membranaires. Deux enzymes sont responsables de la *O*-GlcNAcylation, la protéine *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT) (Haltiwanger *et al.*, 1992) catalyse le transfert du GlcNAc sur des glycoprotéines cytoplasmiques (associées à la régulation structurale du cytosquelette telle que la vinculine par exemple) ou nucléaires (impliquées dans la régulation transcriptionnelle, comme l'ARN polymérase II). La protéine EGF domain-specific *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (EOGT) (Sakaidani *et al.*, 2011) transfère le GlcNAc sur les glycoprotéines membranaires (telles que la famille des récepteurs NOTCH) ou sécrétées (comme le perlacan). Les *O*-mannoses sont notamment présents sur l' $\alpha$ -dystroglycane



**Figure 5. Réaction de C-mannosylation d'une chaîne polypeptidique.**

Au sein du RE, la C-mannosylation correspond au transfert d'un mannose porté par le substrat donneur (Dol-P-mannose) sur un résidu tryptophane présent dans la séquence consensus WXXW. La liaison se fait entre le carbone 1 du mannose (noté en bleu) et le carbone 2 du noyau indole du résidu tryptophane (noté en rouge).

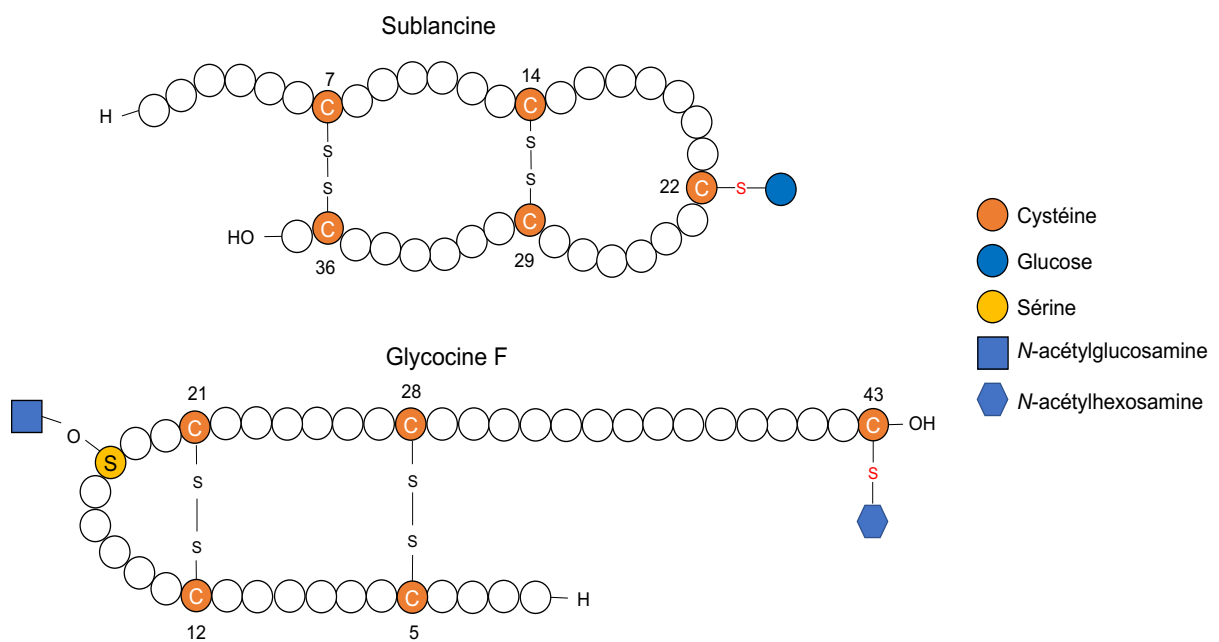


et les *O*-galactoses greffés sur les hydroxylysines sont observés dans les collagènes. Des *O*-xyloses peuvent être fixés sur les acides aminés des chaînes glycaniques des protéoglycanes. Les *O*-fucoses peuvent être portés par les domaines Epidermal growth factor-like (EGF-like) et les répétitions Thrombospondin type-1 (TSR) des protéines (Luo et Haltiwanger, 2006). De plus, on retrouve également sur les répétitions EGF-like des *O*-glucoses.

Les *O*-glycanes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, les *O*-glycanes de types mucine via leur capacité hydrophile participent à la formation de gels aux propriétés antibactériennes (Lagow *et al.*, 1999). La *O*-glycosylation participe également à l'apoptose (Zhu *et al.*, 2001), la stabilité des protéines (Otvos *et al.*, 1995) ou encore les interactions cellule-cellule (Tsuji *et al.*, 2003).

### **I.1.3. La C-mannosylation**

La C-mannosylation ou C-glycosylation est un type de glycosylation rare et relativement peu étudié. Cette modification correspond à la fixation d'un résidu mannose en  $\alpha$ 1-2 sur le carbone C2 d'un noyau indole d'un résidu tryptophane via une liaison carbone-carbone (**Figure 5**) (Hofsteenge *et al.*, 1994 ; de Beer *et al.*, 1995). La liaison d'un C-mannose a été identifiée pour la première fois chez l'Homme au niveau de la RNase 2 présente dans l'urine (Hofsteenge *et al.*, 1994 ; Furmanek et Hofsteenge 2000). Contrairement aux autres types de glycosylation, comme la *N*- et la *O*-glycosylation, le mannose n'est pas allongé, ce qui en fait une modification particulière, toutefois retrouvée sur les protéines de la famille des TSR et sur les récepteurs des cytokines de type I (Taniguchi *et al.*, 2015). Il existe plusieurs séquences cibles de C-mannosylation, mais celle-ci se produit majoritairement sur le premier résidu tryptophane présent dans la séquence consensus **WXXW** (Krieg *et al.*, 1998). Dans les répétitions TSR contenant le motif **WXXWXXWXXC**, la C-mannosylation peut être observée sur un, deux ou les trois résidus tryptophanes (Hofsteenge *et al.*, 1999). L'utilisation de mannoses radiomarqués a permis de démontrer que le précurseur donneur du mannose est le dolichol-P-mannose



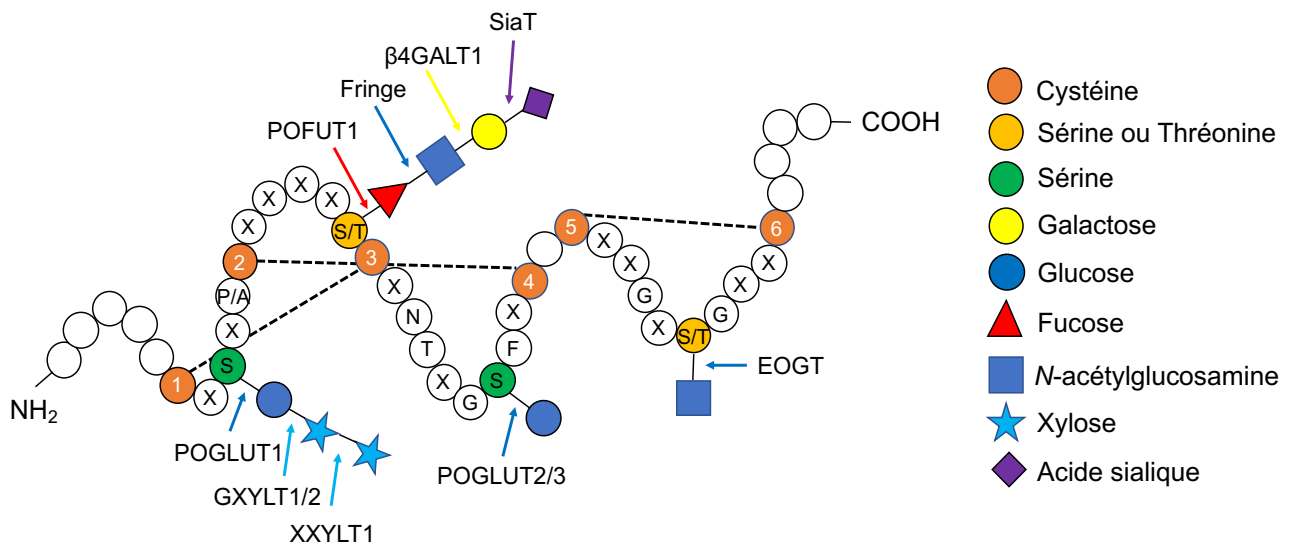
**Figure 6. S-glycosylation de la Sublancine et de la Glycocine F.**

La S-glycosylation de la Sublancine et de la Glycocine F sur, respectivement, leurs cystéines 22 et 43 module leurs activités enzymatiques. Le sucre S-lié retrouvé sur la Sublancine est un glucose, et celui porté par la Glycocine F est une N-acétylhexosamine. (D'après Stepper *et al.*, 2011 ; Oman *et al.*, 2011).

(Doucey *et al.*, 1998), indiquant que la réaction se déroule dans le RE, et que le transfert du mannose sur son substrat accepteur est catalysé par les enzymes de la famille DPY19 (Dumpy Protein 19) (Buettner *et al.*, 2013 ; Shcherbakova *et al.*, 2017). La C-mannosylation est impliquée dans différents processus biologiques comme le repliement, l'adressage ou la maturation des protéines. Des mutations dans le motif WXXW des mucines MUC5AC et MUC5B réduit la sécrétion des sous-domaines CYS (constitué de 110 AA dont 10 résidus cystéine) indiquant que la C-mannosylation participe au repliement ou à la sortie du RE de ces mucines (Perez-Vilar *et al.*, 2004). Un défaut de C-mannosylation induit par la substitution d'un résidu tryptophane par une alanine, conduit à une inhibition de la sécrétion de la protéine A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS-like 1) (Wang *et al.*, 2009).

#### **I.1.4. La S-glycosylation**

La S-glycosylation est une modification post-traductionnelle extrêmement rare des protéines correspondant à la fixation d'un sucre sur l'atome de soufre d'un résidu cystéine. Sa mise en évidence a eu lieu il y a une cinquantaine d'années sur des glycopeptides isolés d'urine et de la membrane des érythrocytes humains (Lote et Weiss, 1971 ; Weiss *et al.*, 1971). Plus récemment, Oman et collaborateurs en 2011 ont démontré que le peptide antimicrobien, la Sublancine, produit par *Bacillus subtilis* 168 est S-glycosylé. Des analyses de chromatographies révèlent que le sucre porté par le résidu cystéine 22 est un glucose. Celui-ci est nécessaire à l'activité antimicrobienne de l'enzyme. Une autre étude réalisée aussi en 2011 par Stepper et collaborateurs a identifié une S-glycosylation sur la Glycocine F sécrétée par *Lactobacillus plantarum* KW30. Ici le sucre porté par la cystéine 43 est une N-acétylhexosamine qui participe à l'activité bactéricide du peptide (**Figure 6**).



**Figure 7. Les différents types de O-glycosylation des domaines EGF-like.**

Les domaines EGF-like peuvent subir des O-glycosylations variées nécessitant le repliement correct de l'EGF-like, les trois ponts disulfures et la présence de séquences consensus spécifiques. POGLUT1 est nécessaire au greffage d'un O-glucose sur la sérine située dans la séquence consensus  $C^1XSX(P/A)C^2$ . Celui-ci peut être allongé par des xyloses greffés par les enzymes GXYL1/2 et XXYL1. POFUT1 permet la fixation d'un O-fucose sur une sérine ou une thréonine localisée dans la séquence consensus  $C^2XXXX(S/T)C^3$ . Ce O-fucose peut être allongé par une N-acétylglucosamine, un galactose et un acide sialique greffés respectivement par les enzymes de la famille Fringe, la  $\beta 4GALT1$  et une sialyltransférase. POGLUT2 et 3 fixent un O-glucose sur une sérine comprise dans la séquence consensus  $C^3XNTXGSFXC^4$ . Enfin, EOGT catalyse l'addition d'une N-acétylglucosamine sur une sérine ou une thréonine présente dans la séquence  $C^5XXGX(S/T)GXXC^6$ . (D'après Takeuchi *et al.*, 2018).

## I.2. Les *O*-glycosylations des domaines EGF-like

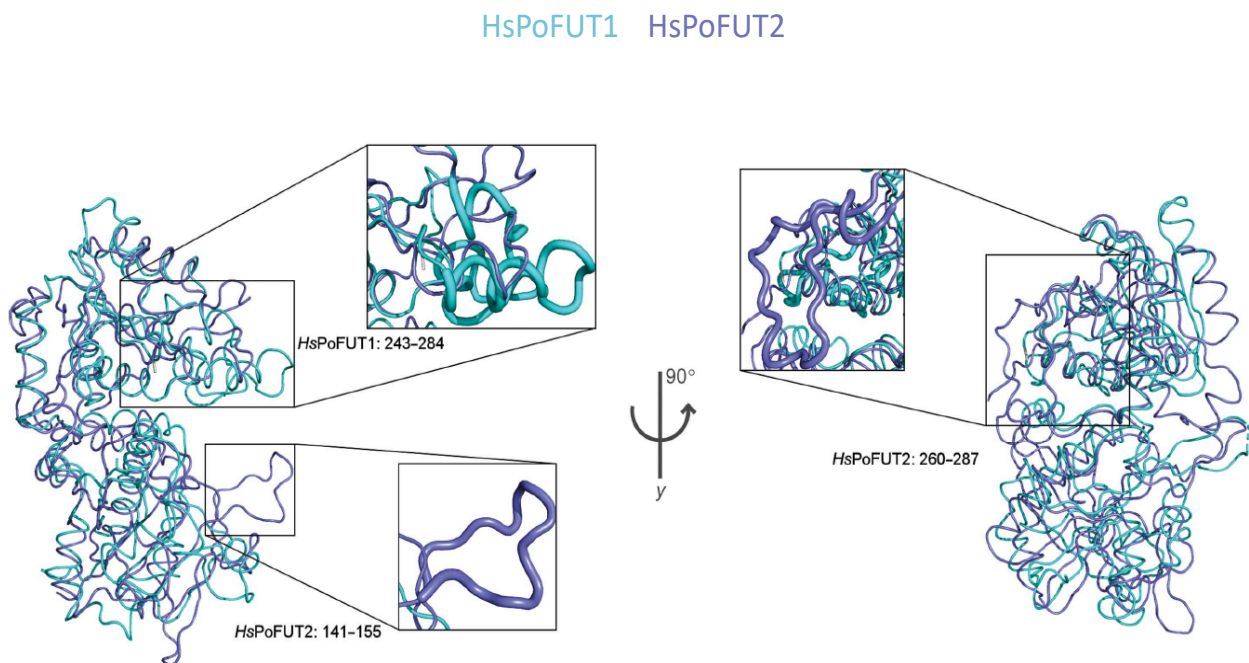
Les domaines Epidermal Growth Factor like (EGF-like domain) ou répétitions EGF contiennent entre 30 et 40 acides aminés caractérisés par six cystéines conservées formant trois ponts disulfures (Campbell et Bork, 1993). Les ponts disulfures participent à la stabilisation du domaine EGF-like en reliant les cystéines 1-3, 2-4 et 5-6. La nomenclature des cystéines est la suivante : C<sup>y</sup>, y étant le numéro de la cystéine présente dans le domaine EGF-like. Il existe plusieurs types de domaine EGF-like classés en deux grandes familles. Les « human EGF-like » (hEGF) et les « complément C1r-like EGF » (cEGF) se différenciant notamment par le nombre de résidus présents entre les cystéines 5 et 6. Les hEGF comportent entre 8 et 9 résidus, tandis que les cEGF présentes plus de 9 résidus (Li *et al.*, 2017). Il existe également dans de rares cas, des domaines EGF-like contenant 8 cystéines. Il s'agit des « laminines EGF-like » (lamEGF) et des « intégrines EGF-like » (intEGF). Pour les lamEGF, les deux cystéines supplémentaires se situent en amont de la C<sup>1</sup> et en aval de la C<sup>6</sup>. Pour les intEGF, celles-ci sont localisées entre les cystéines C<sup>3</sup> et C<sup>4</sup> ainsi qu'en aval de la C<sup>6</sup> (Li *et al.*, 2017). Les domaines EGF-like sont fréquemment retrouvés sur les protéines sécrétées et présentant un domaine extracellulaire. Leur nombre varie selon les protéines pouvant aller d'un seul EGF-like retrouvé dans certains facteurs de coagulation sanguine, à plus de 300 dans la protéine Dumpy chez la drosophile. Ces domaines ont des fonctions biologiques très variées notamment au niveau des interactions protéines-protéines et du trafic des protéines. Par exemple, les domaines EGF-like de la thrombomoduline, qui est un cofacteur prévenant la coagulation, permettent son interaction avec la thrombine et ainsi l'activation de la protéine C (Kurosawa *et al.*, 1988, Suzuki *et al.*, 1989). Le récepteur de la lipoprotéine de faible densité (LDL) possède un domaine EGF-like impliqué dans la régulation de son recyclage (Zhang *et al.*, 2007). Les domaines EGF-like peuvent être modifiés, dans un premier temps par des monosaccharides dans le réticulum endoplasmique (**Figure 7**) (Luo et Haltiwanger, 2005). Du glucose, du fucose et de la *N*-acétyl-



glucosamine peuvent être *O*-liés sur les domaines EGF-like au niveau de sites spécifiques reconnus par des enzymes distinctes. Les protéines *O*-glucosyltransférases 1 à 3 (POGLUT1 à 3) réticulaires permettent l'ajout d'un *O*-glucose sur une sérine, présente dans la séquence consensus C<sup>1</sup>XSX(P/A)C<sup>2</sup> (où X est n'importe quel acide aminé) (POGLUT1) (Acar *et al.*, 2008 ; Takeuchi *et al.*, 2011) ou située dans la séquence consensus C<sup>3</sup>XNTXGSFXC<sup>4</sup> (POGLUT2 et 3) (Takeuchi *et al.*, 2018). Le *O*-glucose peut être allongé par des glycosyltransférases de type II qui sont les glucosides xylosyltransférases 1/2 (GXYLT1/2) golgiennes et la xyloside xylosyltransférase 1 (XXYLT1) réticulaire pour former des trisaccharides Xyl $\alpha$ 1-3Xyl $\alpha$ 1-3Glc (Sethi *et al.*, 2010 ; Sethi *et al.*, 2012). La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) réticulaire catalyse l'ajout d'un *O*-fucose sur un résidu sérine ou thréonine présent dans la séquence consensus C<sup>2</sup>XXXX(S/T)C<sup>3</sup> (Wang *et al.*, 2001 ; Müller *et al.*, 2014). L'action coordonnée des enzymes golgiennes de la famille Fringe (Lunatic, Manic et Radical), de la  $\beta$ 1-4 galactosyltransférase 1 ( $\beta$ 4GALT1) et une sialyltransférase (pour l'heure non déterminée), permettent d'allonger le *O*-fucose pour former un tétrasaccharide Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Fuc (Shao *et al.*, 2003). La *O*-GlcNAc transférase réticulaire spécifique des domaines EGF-like (EOGT) permet l'ajout d'une GlcNAc sur un résidu sérine ou thréonine présent dans la séquence consensus C<sup>5</sup>XXGX(S/T)GXXC<sup>6</sup> (Sakaidani *et al.*, 2011).

### **I.3. La *O*-fucosylation des domaines EGF-like par la Protéine *O*-fucosyltransférase 1**

La *O*-fucosylation des protéines est une modification post-traductionnelle rare. Il s'agit de la liaison covalente d'un fucose, issu du sucre donneur activé, le GDP-fucose, sur un résidu sérine ou thréonine. Ce type de glycosylation a été pour la première fois mis en évidence sur un glycopeptique isolé dans l'urine humaine (Hallgren *et al.*, 1975). La *O*-fucosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique. Elle se fait sur les répétitions Epidermal Growth Factor-like (EGF-like) contenant la séquence consensus C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(S/T)C<sup>3</sup> (Müller *et al.*, 2014) ou sur les répétitions Thrombospondine de type 1 (TSR) porteuses de la séquence consensus C<sup>2</sup>X<sub>2</sub>(S/T)C<sup>3</sup>X<sub>2</sub>G



**Figure 8. Mise en évidence de la spécificité des Protéines *O*-fucosyltransférases 1 et 2 humaines pour leurs substrats.**

La superposition des apoformes (formes libres non liées au substrat) humaines de POFUT1 (en bleu clair) et POFUT2 (en violet) permet de mettre en évidence deux boucles observées seulement chez *HsPoFUT2*. La boucle 141-155 est impliquée dans la liaison spécifique aux TSRs au détriment des domaines EGF-like. La boucle 260-287 située en C-terminal de *HsPoFUT2* ne présente pas de fonction catalytique. Inversement, la boucle 243-284 retrouvée chez *HsPoFUT1* renforce sa spécificité de liaison vis-à-vis des domaines EGF-like. (Lira-Navarrete *et al.*, 2018).

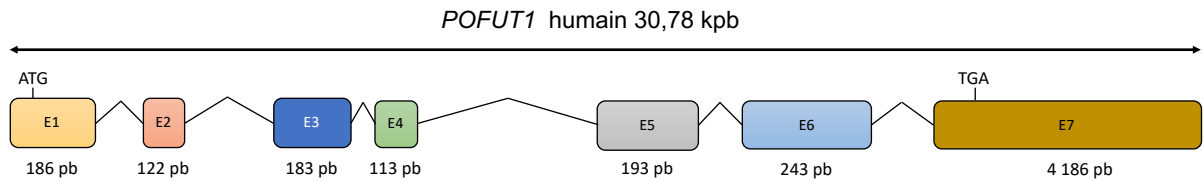


(Ricketts *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007). Ces modifications sont principalement retrouvées au sein des métazoaires (Loriol *et al.*, 2006 ; Vasudevan et Haltiwanger, 2014 ; Haltom et Jafar-Nejad, 2015). L'addition du *O*-fucose sur les domaines EGF-like et TSR est catalysée respectivement par les Protéines *O*-fucosyltransférases 1 et 2 (POFUT1 et POFUT2) (Wang *et al.*, 1996 ; Luo *et al.*, 2006). Ces enzymes présentent une forte spécificité vis-à-vis de leurs substrats accepteurs notamment due à la structure tridimensionnelle de ceux-ci et à la conformation de la zone de liaison des *O*-fucosyltransférases à leurs cibles (**Figure 8**) (Valero-Gonzalez *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2017). Chez l'Homme et la souris, moins d'une centaine de protéines cibles de POFUT1 contenant des répétitions EGF-like porteuses de la séquence consensus ont été identifiées (Rampal *et al.*, 2007 ; Schneider *et al.*, 2017). Concernant POFUT2, plus d'une cinquantaine de protéines cibles contenant des répétitions TSR porteuses de la séquence consensus ont été décrites (Du *et al.*, 2010 ; Leonhard-Melief et Haltiwanger, 2010). Parmi elles, la thrombospondine 1 (Hofsteenge *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 2006), la properdine (Gonzalez de Peredo *et al.*, 2002) et la F-spondine (Gonzalez de Peredo *et al.*, 2002) ont été démontrées comme étant *O*-fucosylées par POFUT2. Dans la suite de l'exposé bibliographique, seule la *O*-fucosylation des domaines EGF-like médiée par POFUT1 sera détaillée.

### **I.3.1. Du gène à la protéine POFUT1**

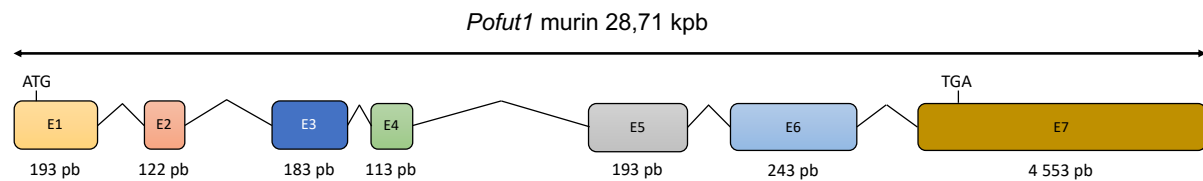
Chez l'Homme le gène *POFUT1*, long de 30,78 kpb, se situe dans la région chromosomique 20q11.21 (Wang *et al.*, 2001). Chez la souris, le gène *Pofut1*, long de 28,71 kpb, est localisé sur le chromosome 2 (**Figure 9**). Le pourcentage d'identité entre ces deux espèces concernant POFUT1 est de 90,4% (Wang *et al.*, 2001). Chez l'Homme, l'épissage alternatif engendre cinq variants transcriptionnels (base de données Ensembl) mais seulement deux codent une protéine : la forme normale de 388 acides aminés (transcrit 1) et une protéine tronquée en C-terminale, de 194 acides aminées (transcrit 2) (Wang *et al.*, 2001 ; Luo et

**A.**



Transcrit	Taille du transcrit (pb)	Taille de la protéine (acides aminés)
1	5 226	388
2	1 507	194
3	959	-
4	768	-
5	493	-

**B.**



Transcrit	Taille du transcrit (pb)	Taille de la protéine (acides aminés)
1	5 600	393
2	4 833	298
3	4 143	297
4	1 688	352
5	1 385	353
6	1 135	-
7	839	-
8	2 413	-

} Taille prédictive

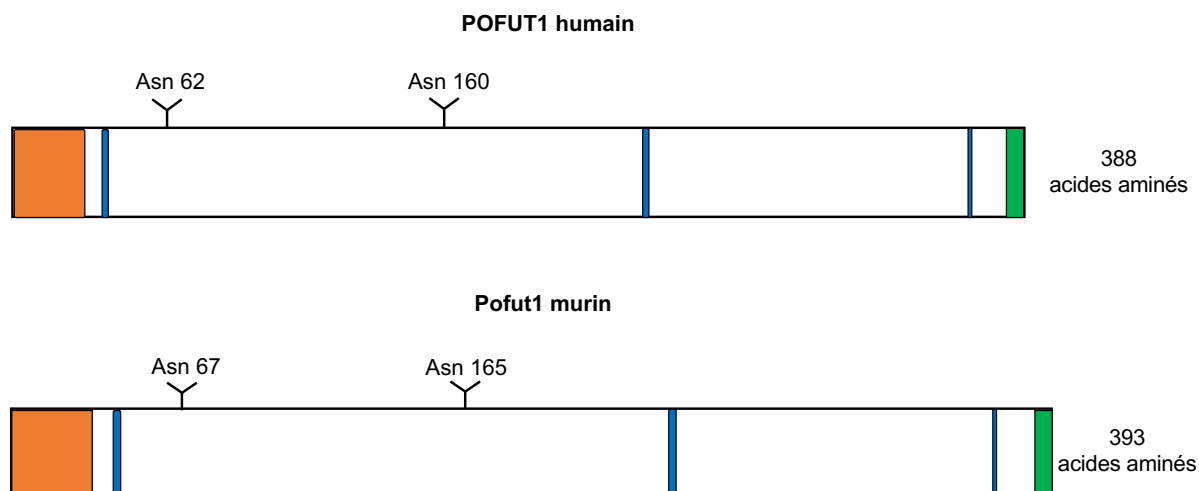
**Figure 9. Schéma de l'organisation des transcrits du gène POFUT1 humain et murin.**

Chez les deux espèces, les transcrits majoritaires (transcrits 1) du gène *POFUT1* sont constitués de sept exons et de six introns. Suite à l'épissage alternatif quatre et sept transcrits de tailles variables peuvent être produits chez l'Homme (A.) et la souris (B.).

Haltiwanger, 2005). Chez la souris, huit variants transcriptionnels sont référencés (base de données Ensembl). Le transcrit majoritaire conduit à la production d'une protéine de 393 acides aminés (transcrit 1), quatre transcrits codent pour des protéines tronquées de 353 à 297 acides aminés (transcrits 2 à 5) et trois transcrits semblent ne pas coder de protéines (transcrits 6 à 8). L'organisation structurale de l'enzyme POFUT1 humaine et murine met en évidence la présence d'un peptide signal d'adressage au RE, de deux sites de *N*-glycosylation, de trois domaines de fixation du GDP-fucose et d'une séquence terminale RDEF (KDEL-like) de rétention dans le RE (**Figure 10**). L'étude des sites de *N*-glycosylation portés par l'enzyme Pofut1 bovine montre que le premier site de *N*-glycosylation occupé, N65 (homologue de N62 humain et N67 murin), est impliqué dans son repliement et sa solubilité. Le second site N163 (homologue de N160 humain et N164 murin) participe à son activité enzymatique (Loriol *et al.*, 2007).

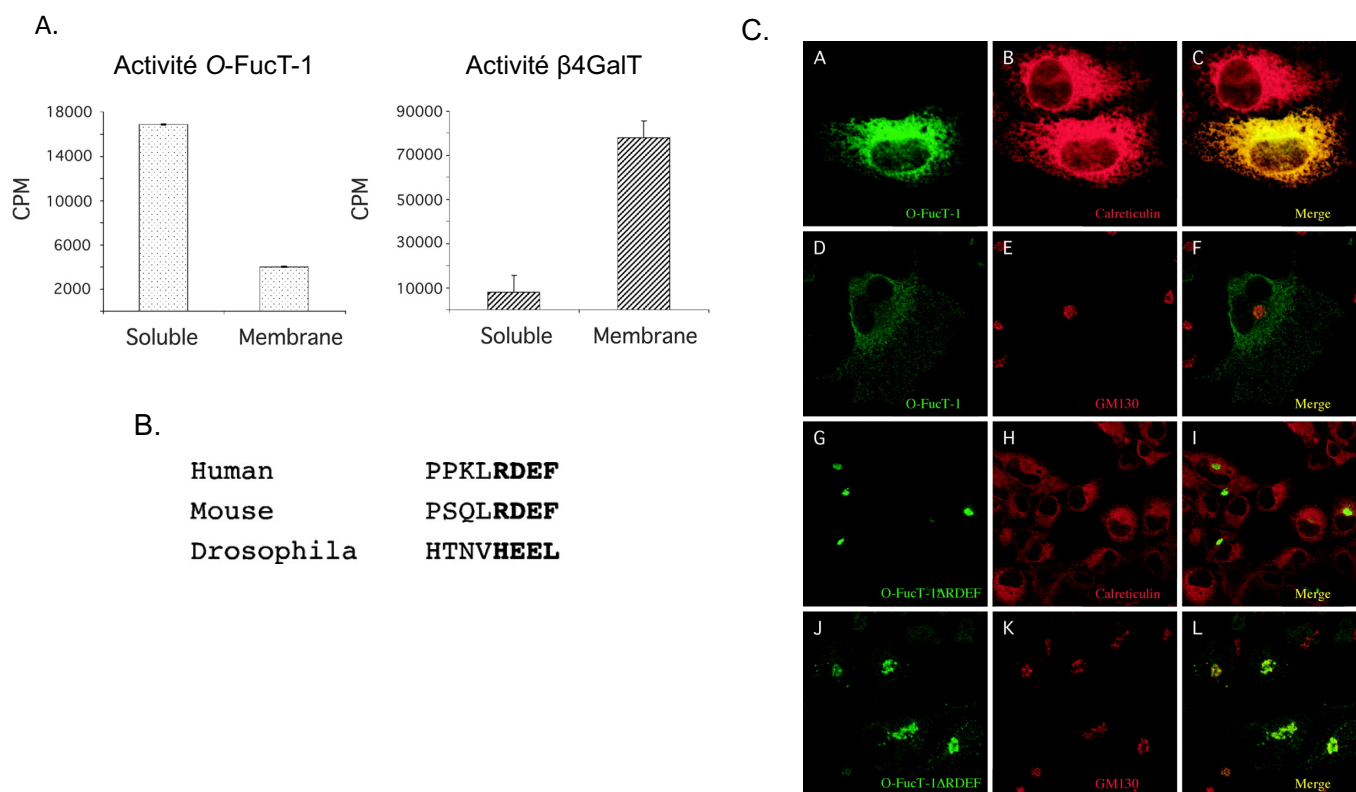
### **I.3.2. Localisation de la protéine POFUT1**

Un travail réalisé par Luo et Haltiwanger en 2005 s'est intéressé à la localisation de POFUT1. Après sonication des cellules COS1, les auteurs montrent que l'activité de l'enzyme est retrouvée dans la fraction soluble. Jusqu'alors, toutes les fucosyltransférases connues, responsables de la fucosylation proximale ou terminale des *N*-glycanes étaient localisées dans l'appareil de Golgi où est également situé le transporteur du GDP-fucose, le slc35c1 (Hirschberg *et al.*, 1998 ; Milland *et al.*, 2001 ; Becker et Lowe, 2003). Le fractionnement de microsomes isolés de foie de rat sur un gradient de sucrose montre que POFUT1 co-fractionne avec la glucose-6-phosphatase qui est un marqueur du RE. Par contre, l'enzyme ne co-fractionne pas avec le marqueur golgien utilisé, la  $\beta$ 1-4 galactosyltransférase (**Figure 11 A.**). Cette rétention réticulaire semble s'expliquer par la présence d'un motif KDEL-like (RDEF) retrouvée chez la souris et l'Homme, et HEEL chez *Drosophila melanogaster* (**Figure 11 B.**) (Murshid et Presley, 2004). Afin de valider cette hypothèse concernant la localisation subcellu-



**Figure 10. Schéma de l'organisation des protéines POFUT1 humaine et murine.**

La traduction des transcrits majoritaires de *POFUT1* humain et murin conduit à la formation, respectivement, de protéines constituées de 388 et 393 acides aminés. Celles-ci possèdent une organisation structurale commune. Elles présentent un peptide signal d'adressage au RE (en orange) de 26 acides aminés chez l'Homme et de 30 acides aminés chez la souris, trois domaines impliqués dans la liaison avec le GDP-fucose (en bleu), une séquence RDEF (de type KDEL) de rétention dans le RE (en vert) et également deux sites de *N*-glycosylation localisés sur les asparagines 62/160 chez l'Homme et 67/165 chez la souris.



**Figure 11. La protéine POFUT1 est localisée dans le réticulum endoplasmique.**

Le fractionnement après sonication des cellules COS1 montre que l'activité enzymatique de *O*-FucT1 (= POFUT1) est présente dans la fraction soluble tandis que celle de la β4GalT (marqueur golgien) se situe, comme attendu, dans la fraction membranaire (A.). La séquence de rétention dans le RE, de type KDEL-like est entre autres retrouvée chez l'Homme, la souris et la drosophile (B.) Des co-marquages (C.) mettent en évidence, que la protéine *O*-fucT1 co-localise avec la calréticuline (marqueur du RE) et non avec la GM130 (marqueur golgien). La délétion (Δ) du motif RDEF conduit à la perte de la co-localisation de la protéine *O*-fucT1 avec la calréticuline. (Luo et Haltiwanger, 2005).

laire de l'enzyme, des cellules COS1 ont été transfectées par des plasmides, contenant soit toute la partie codante du gène *POFUT1* soit cette même partie sans la portion codant le signal de rétention au RE (**Figure 11 C.**). Dans le premier cas, POFUT1 co-localise avec la calréticuline (marqueur réticulaire) et non avec une protéine de la matrice du cis-Golgi, GM130. L'absence du domaine RDEF conduit à une redistribution de POFUT1. Celle-ci est faiblement détectée dans le cytoplasme car majoritairement sécrétée au détriment de sa localisation réticulaire. Le domaine RDEF est bien une séquence KDEL-like nécessaire à la localisation réticulaire de l'enzyme POFUT1. Ces résultats, mis en relation avec le fait que la synthèse du GDP-fucose prend place dans le cytoplasme, suggèrent la présence de mécanismes de transport depuis le Golgi permettant l'acheminement du GDP-fucose vers le RE où POFUT1 exerce son activité *O*-fucosyltransférase. Un transporteur du GDP-fucose spécifique de RE, nommé Efr (ER GDP-fucose transporter), a été identifié chez la drosophile (Ishikawa *et al.*, 2010) mais son orthologue chez l'Homme est un transporteur golgien de l'UDP-xylose et de l'UDP-*N*-acétylglucosamine (Ashikov *et al.*, 2005). De ce fait, l'identification du transporteur du GDP-fucose dans le RE chez les mammifères reste à déterminer.

### **I.3.3. Fonctions biologiques de la protéine POFUT1**

Dans le réticulum endoplasmique, la protéine POFUT1 est caractérisée par une activité de transfert d'un fucose qui sera *O*-lié par une liaison covalente sur le groupement hydroxyl d'un résidu sérine ou thréonine retrouvé dans la séquence consensus C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(**S/T**)C<sup>3</sup> portée par les domaines EGF-like (Wang *et al.*, 1996). Chez l'Homme, 87 protéines cibles potentielles de POFUT1 (**Tableau 1**) (Schneider *et al.*, 2017) sont connues, ce nombre est de 75 chez la souris (données non publiées). Cependant, la présence d'un *O*-fucose sur un domaine EGF-like n'a été démontrée que sur une quinzaine de protéines cibles (Li *et al.*, 2017 ; Schneider *et al.*, 2017).

Un rôle de protéine chaperonne a été attribué à OFUT1 dans une étude réalisée chez *Drosophila melanogaster* (Okajima *et al.*, 2005). Le knockdown de *Ofut1* (orthologue de

**Tableau 1. La liste des protéines humaines potentiellement modifiées par POFUT1.**

Chez l'Homme, il existe 87 protéines comportant au moins un domaine EGF-like porteur de la séquence consensus de *O*-fucosylation C<sup>2</sup>-X-X-X-X-(S/T)-C<sup>3</sup> et pouvant donc être potentiellement modifiées par POFUT1. Parmi ces protéines, 13 ont été démontrées comme porteuses d'un fucose *O*-lié (en bleu et orange) et participant à l'activité fonctionnelle pour 2 d'entre elles (orange). (D'après Schneider *et al.*, 2017).

Gène	Protéine	Gène	Protéine
AGRIN	Agrin	LTBP2	latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
ATRAID	All-trans retinoic acid-induced differentiation	MEGF6	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6
CELSR1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	MEGF8	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8
CELSR2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	MEGF10	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10
CELSR3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	MEGF11	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 11
CD93	Complement component C1q receptor	MMRN1	Multimerin-1
CD97	CD97 antigen	NCAN	Neurocan core protein
CFC1	Cryptic protein	NELL1	Protein kinase C-binding protein NELL1
CFC1B	Cryptic family protein 1B	NID2	Nidogen-2
CNTNAP5	Contactin-associated protein-like 5	NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
CRB1	Protein crumbs homolog 1	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 1
CRB2	Protein crumbs homolog 2	NOTCH2NL	Notch homolog 2 N-terminal-like protein
CSPG2	Versican core protein	NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
CUBN	Cubilin	NOTCH4	Neurogenic locus notch homolog protein 4
DLK1	Protein delta homolog 1	PEAR1	Platelet endothelial aggregation receptor 1
DLK2	Protein delta homolog 2	PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
DLL1	Delta-like protein 1	PGCB	Brevican core protein
DLL3	Delta-like protein 2	PROC	Vitamin K-dependent protein C
DLL4	Delta-like protein 4	PROZ	Vitamin K-dependent protein Z
DNER	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor	RAMP	Regeneration-associated muscle protease homolog
EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	RELN	Reelin
EGF	Pro-epidermal growth factor	SLIT1	Slit homolog 1 protein
EGFL7	Epidermal growth factor-like protein 7	SLIT2	Slit homolog 2 protein
EGFLAM	Pikachurin	SLIT3	Slit homolog 3 protein
EMR1	Adhesion G protein-couplet receptor E1	SNED1	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1
EMR2	Adhesion G protein-couplet receptor E2	SREC2	Scavenger receptor class F member 2
EYS	Protein eyes shut homolog	STAB1	Stabilin-1
FA7	Coagulation factor VII	STAB2	Stabilin-2
FA9	Coagulation factor IX	SUSD1	Sushi domain-containing protein 1
FA12	Coagulation factor XII	SVEP1	Polydom protein
FAT1	Protocadherin Fat 1	TEN1	Teneurin-1
FAT2	Protocadherin Fat 2	TEN2	Teneurin-2
FAT3	Protocadherin Fat 3	TEN4	Teneurin-4
FAT4	Protocadherin Fat 4	TIE1	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1
FBLN1	Fibulin-1	TPA	Tissue-type plasminogen activator
FBLN7	Fibulin-7	TSP3	Thrombospondin-3
FBN2	Fibrillin-2	UMOD	Uromodulin
FBN3	Fibrillin-3	UMODL1	Uromodulin-like 1
HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	UROK	Urokinase-type plasminogen activator
HGFAC	Hepatocyte growth factor activator	VASN	Vasorin
JAG1	Protein Jagged-1	VWDE	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein
JAG2	Protein Jagged-2	VWA2	AMACO
LRP1	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1	WIF1	Wnt inhibitory factor 1
LRP1B	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B		

*POFUT1*) provoque l'accumulation dans le RE du récepteur NOTCH et de ce fait une diminution de sa présence à la membrane plasmique. L'expression dans ce modèle d'une forme inactive de l'enzyme (mutation R240A) restaure partiellement l'adressage membranaire de NOTCH, suggérant que sa fonction de chaperonne est indépendante de son activité fucosyltransférase. Cependant, la fonction chaperonne attribuée à Pofut1 reste controversée notamment chez les Mammifères. En effet, des études récentes montrent que l'inactivation du gène *Pofut1* chez la souris ou des lignées cellulaires, réduit l'adressage membranaire de NOTCH1 (Ajima *et al.*, 2017 ; Takeuchi *et al.*, 2017). Une étude antérieure montre toutefois que dans les cellules ES murines, POFUT1 n'est pas requis pour la présence de NOTCH à la membrane, mais est nécessaire à son interaction avec les ligands (Stahl *et al.*, 2008).

#### **I.3.4. Rôles biologiques de la *O*-fucosylation médiée par POFUT1**

La *O*-fucosylation, contrôlée par POFUT1, module les interactions possibles entre les partenaires protéiques. Ceci est notamment le cas entre le récepteur NOTCH et ses ligands (DLL1 à 4 et JAG1 et 2). En effet, des expériences de co-cristallisation montrent que le *O*-fucose porté par l'EGF12 du récepteur NOTCH1 est en contact direct avec les ligands DLL4 (Luca *et al.*, 2015) et JAG1 (Luca *et al.*, 2017). Le co-cristal NOTCH1-JAG1 révèle également une interaction entre le *O*-fucose greffé sur l'EGF8 de NOTCH1 et la chaîne latérale de l'asparagine 248 du ligand JAG1. La substitution sur les EGF8 et 12 de NOTCH1 de l'asparagine porteuse du *O*-fucose, par des résidus thréonine ou valine réduit à la fois l'interaction entre DLL1/JAG1 et le récepteur NOTCH1 mais aussi l'activité du récepteur. De plus, la perte du *O*-fucose sur l'EGF12 de NOTCH1, impacte plus particulièrement sa liaison avec DLL1 par rapport à JAG1 (Kakuda et Haltiwanger, 2017). Des souris homozygotes porteuses de la substitution du résidu thréonine par une alanine sur l'EGF12 de NOTCH1 présentent des retards de croissance ainsi que des défauts de développement des cellules T (Ge et Stanley, 2008). Ces résultats démontrent l'importance majeure des *O*-fucoses portés par le





récepteur NOTCH1 dans son activité et sa capacité de liaison à ses ligands. Le knockout de *Pofut1* chez la souris provoque une létalité embryonnaire avec des défauts de somitogenèse, cardiogenèse, vasculogenèse et neurogenèse semblables à ceux observés lors d'une altération de la voie NOTCH (Shi et Stanley, 2003). Ceci renforce l'impact de la *O*-fucosylation contrôlée par POFUT1 sur la voie de signalisation NOTCH. De plus, l'ajout des *O*-fucoses sur les domaines EGF-like de NOTCH et ses ligands, permet leur allongement par les enzymes de la famille Fringe, ce qui augmente l'affinité de NOTCH pour ses ligands JAGGED1 et DLL1 (Taylor *et al.*, 2014). Il est également connu que la *O*-fucosylation de la protéine Agrine impacte son activité synaptogénique en modulant sa capacité d'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine au cours du développement neuromusculaire (Kim *et al.*, 2008).



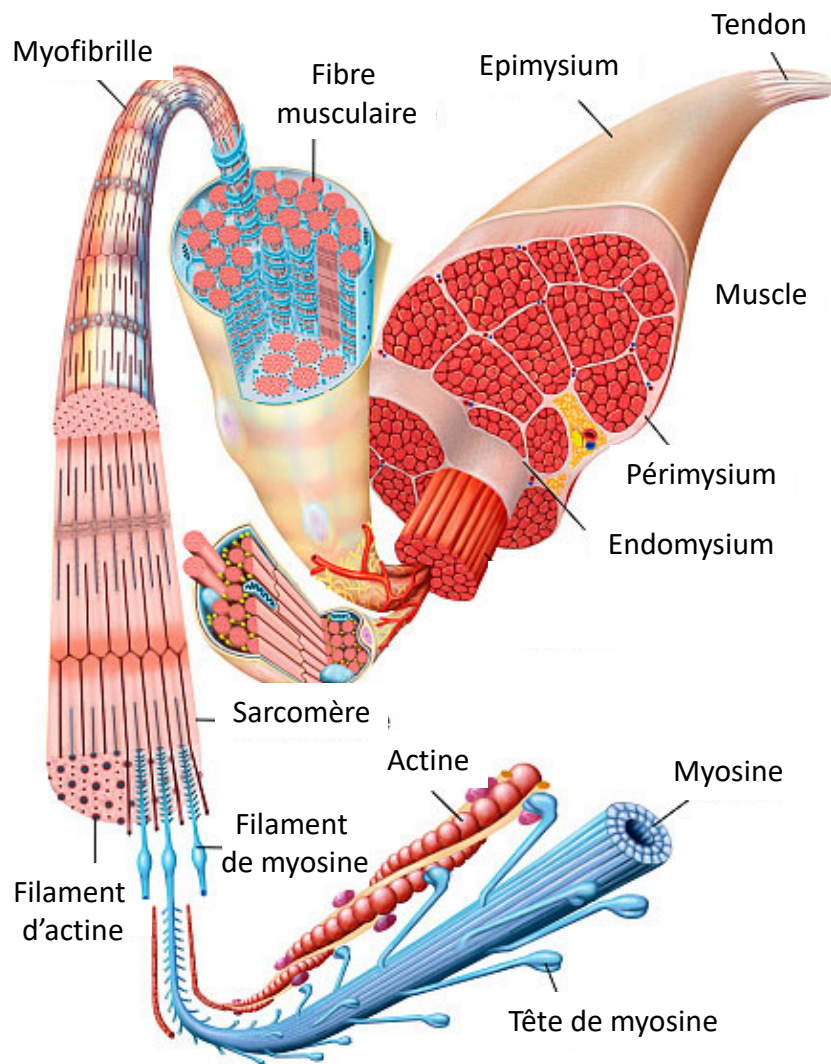
## **Chapitre II. Implication de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 dans un contexte physiologique : le processus myogénique**

---

Le tissu musculaire est caractérisé par des propriétés de mouvements. En effet, les cellules musculaires sont capables de se contracter en réponse à une stimulation nerveuse. Les tissus musculaires de notre corps ont été classés en trois catégories selon leurs structures et leurs fonctions : le tissu musculaire squelettique (biceps, triceps...) formé de cellules multinucléées, le tissu musculaire cardiaque (cœur) et le tissu musculaire lisse (parois de l'estomac, des intestins...), tous deux constitués de cellules mononucléées. Certains muscles ont une contraction dite volontaire, contrôlée consciemment et dépendante du système nerveux central, comme ceux présents dans les membres supérieurs permettant de feuilleter ce manuscrit. D'autres sont à contraction dite involontaire, dépendante du système nerveux végétatif, comme ceux de notre appareil digestif. Dans la suite de cet exposé bibliographique, je ne traiterai que du tissu musculaire squelettique.

### **II.1. Le muscle squelettique**

Le muscle squelettique représente près de 40% de la masse corporelle. C'est un tissu hautement organisé qui converti l'énergie chimique en énergie physique. En moyenne, celui-ci est composé d'eau (environ 75%), de protéines (environ 20%), de glucides (environ 5%), de graisses, et d'autres substances telles que des sels minéraux (calcium, sodium, potassium...). Sa masse est dépendante de la balance entre synthèse et dégradation protéiques. Ces processus sont sous l'influence de différents facteurs comme la nutrition, les hormones ou encore l'activité physique. Le tissu musculaire squelettique est attaché aux os et sa contraction rend possible la locomotion, les expressions faciales et tout autre mouvement volontaire du corps. De plus, il fournit au corps de la chaleur par l'intermédiaire de sa contraction et participe ainsi à l'homéostasie thermique. Le muscle squelettique a la capacité de se régénérer suite à de petites



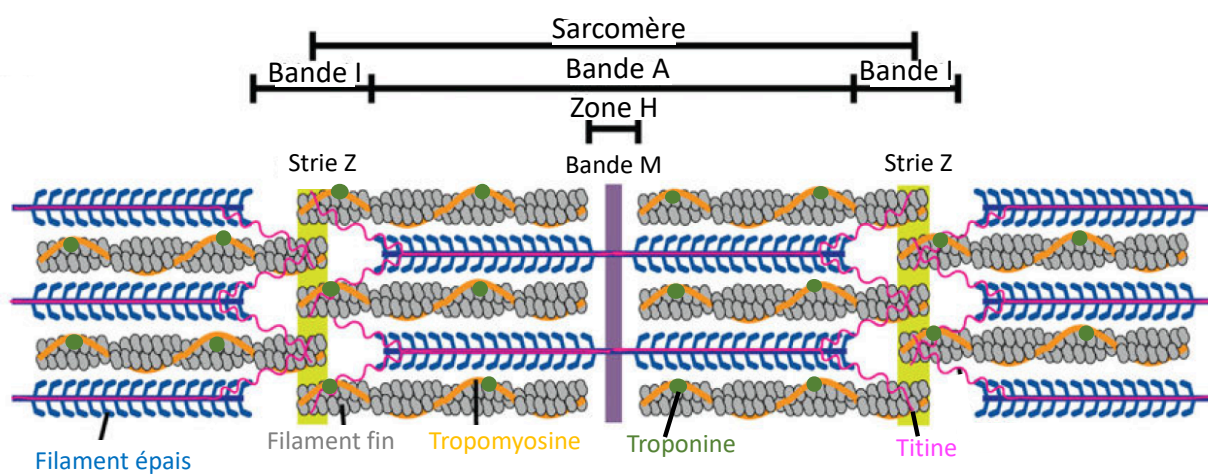
**Figure 12. Représentation schématisique de l'organisation structurale du muscle strié squelettique.**

(D'après Frank Geisler, MediDesign).

déchirures occasionnées accidentellement par de l'exercice physique ou bien lors de l'activité quotidienne. Ce phénomène est rendu possible grâce à la présence de cellules « souches » résiduelles localisées à la périphérie des fibres musculaires nommées cellules souches satellites (SCs). Suite à une lésion, ces cellules activées prolifèrent et fusionnent afin de réparer les fibres musculaires lésées (Dumont *et al.*, 2015).

### **II.1.1. Structure et organisation**

Chaque muscle squelettique comprend trois couches de tissu conjonctif participant au soutien et compartimentant les fibres musculaires (**Figure 12**). Chaque muscle est recouvert par un tissu conjonctif fibreux dense et irrégulier appelé épimysium, correspondant à l'aponévrose du muscle, qui lui permet de se contracter tout en assurant son intégrité structurelle. Il assure également la séparation du muscle squelettique vis-à-vis des tissus et organes adjacents. Des ensembles de fibres musculaires sont organisés en faisceaux individuels, appelés fascicules, et bordés du pérимыsium. Cette structure permet un mouvement spécifique, par l'action du système nerveux central, en stimulant un fascicule précis du muscle. Au sein d'un fascicule, les fibres musculaires sont enfermées dans une fine couche de collagène appelée endomysium. Celui-ci contient les nutriments fournis par la circulation sanguine et nécessaires au soutien de la fibre musculaire. Le muscle est également parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses permettant respectivement l'oxygénation et la fonction motrice de chaque fibre musculaire. Les fibres musculaires sont polynucléées, possédant un diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et une longueur pouvant aller jusqu'à 30 cm (Bouisset et Maton, 1995). La fibre musculaire est bordée par une membrane nommée sarcolemme présentant des invaginations tubulaires réparties tout le long de la fibre. Au sein des fibres musculaires, on retrouve les myofibrilles constituant l'essentiel du cytosquelette musculaire et présentant une alternance de bandes sombres, larges, riches en filaments épais de myosine (bandes A ou Anisotropes) et de bandes claires, étroites, riches en filaments fins d'actine (bandes I ou isotro-



**Figure 13. Structure du sarcomère.**

Représentation schématique d'un sarcomère illustrant les trois principaux systèmes de filaments : filaments fins à base d'actine (gris), de tropomyosine (orange) et de troponine (vert), filaments épais à base de myosine (bleu) et titine (rose). Les limites latérales du sarcomère sont les stries Z. La bande I entoure la strie Z et est une région où les filaments fins ne sont pas superposés aux filaments épais. La zone de la strie Z contient des filaments fins et des filaments épais. La bande M se situe dans la zone H, où les filaments épais ne se croisent pas avec les filaments fins. (D'après Henderson *et al.*, 2017)

pes) donnant l'aspect strié au muscle squelettique (**Figure 13**). La myosine de type II ( $\approx 500$  kDa), celle observée dans les muscles, est une protéine dimérique constituée de deux chaînes lourdes ( $\approx 200$  kDa chacune) présentent sous différents isoformes selon la vitesse de contraction des fibres musculaires, et de deux chaînes légères ( $\approx 20$  kDa chacune). Les fibres lentes expriment les chaînes lourdes de myosine de type I (MyHC-I) tandis que les fibres rapides expriment les chaînes lourdes de myosine de type II (MyHC-II). L'actine (42 kDa) est une protéine globulaire présente sous six isoformes chez les Mammifères (trois isoformes  $\alpha$  retrouvées dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses ; deux isoformes  $\gamma$  présentes dans le muscle lisse entérique et les tissus non musculaires ; une isoforme  $\beta$  non musculaire). La bande A est divisée en deux par la bande H (de l'allemand Heller, « plus pâle ») où se trouve en son centre la ligne M (de l'allemand Mittel, « centre »). La bande I est séparée en son centre par la strie Z (de l'allemand Zwischen, « entre »), et la zone comprise en deux stries Z constitue le sarcomère, d'une longueur d'environ  $2 \mu\text{m}$ , qui est l'unité fonctionnelle contractile du muscle (Craig et Padron, 2004). La titine est une protéine structurale (la plus grande connue chez l'Homme, 3 816 kDa) liée aux filaments épais et permettant d'assurer l'élasticité du sarcomère (Trinick, 1996). Outre les filaments d'actine et de myosine, le sarcomère contient des protéines nécessaires à la contraction musculaire. Parmi elles, la tropomyosine (dont 40 isoformes, de 28 à 43 kDa, sont connues chez les Mammifères principalement dû à l'épissage alternatif des gènes les codant) est constituée de deux chaînes en hélices  $\alpha$  s'enroulant autour de l'actine. On retrouve également le complexe hétérotrimérique formé de la troponine C (18 kDa, se liant avec le calcium), la troponine I (21 kDa, interagissant avec l'actine) et la troponine T (31 kDa, se fixant à la tropomyosine). Ces protéines régulatrices participent à la contraction musculaire en contrôlant la fixation entre les filaments épais et fins en fonction de la concentration calcique (Zot et Potter, 1987). En absence de calcium, la tropomyosine empêche la fixation des têtes de myosine à l'actine. Lorsque la concentration en calcium augmente, la fixation de celui-ci sur la





troponine C va progressivement diminuer les affinités de la troponine I pour l'actine et de la troponine T pour la tropomyosine. Cela induit un changement conformationnel provoquant le déplacement de la tropomyosine et rendant ainsi disponibles les sites de liaison entre l'actine et la myosine. Finalement, l'hydrolyse de molécules d'ATP par la myosine permet aux filaments fins de glisser sur les filaments épais provoquant la contraction musculaire.

### **II.1.1. Pathologies associées**

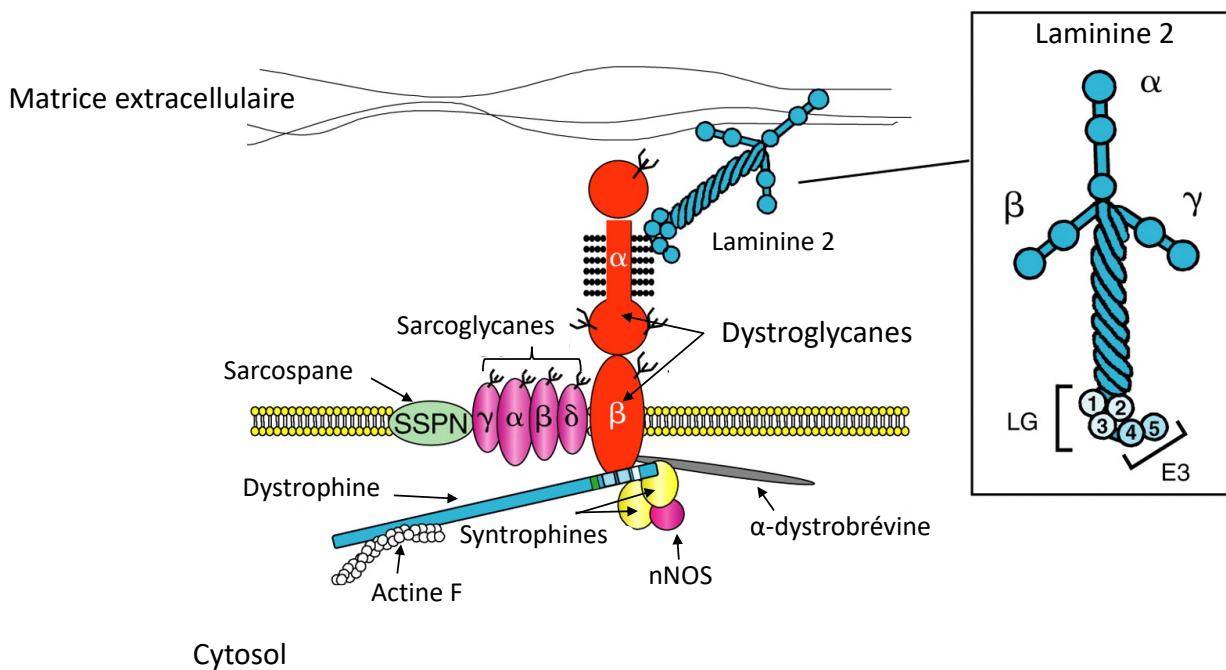
Les pathologies musculaires sont classées en deux grandes familles : les myopathies d'origine génétique et les myopathies acquises. Le premier groupe peut être subdivisé en quatre sous parties : les dystrophies musculaires, les myopathies congénitales, les myopathies mitochondriales et les myopathies métaboliques. Le second groupe se décline en trois sous-familles : les myopathies inflammatoires, les myopathies toxiques et les myopathies associées à des affections systémiques. Dans la suite de l'exposé bibliographique, je ne détaillerai que les myopathies génétiques car celles-ci sont en lien avec le processus de myogenèse.

Les dystrophies musculaires se manifestent par une altération des fibres musculaires, provoquant une faiblesse progressive et une dégénérescence des muscles squelettiques contrôlant les mouvements (Wicklund, 2013 ; Guiraud *et al.*, 2015). Parmi elles, on retrouve les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) touchant respectivement 1 individu sur 5 000 et 1 individu sur 20 000 à travers le monde (Mendell et Lloyd-Puryear, 2013 ; Moat *et al.*, 2013). Elles résultent de mutations héréditaires ou spontanées du gène de la dystrophine porté par le chromosome X affectant donc des garçons dans la quasi-totalité des cas. La dystrophine est impliquée dans le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire dans les fibres musculaires (Kamdar et Garry, 2016). Ces mutations peuvent être des insertions, des délétions ou encore des mutations ponctuelles. Dans la majorité des cas une délétion d'un ou plusieurs exons du gène *DMD* est observée (Flanigan *et al.*, 2009 ; Tuffery-Giraud *et al.*, 2009). A la naissance, les patients atteints de la DMD ne présentent pas de signes cliniques per-



ceptifs. Ceux-ci sont détectés vers l'âge de 4-5 ans et permettent de poser le diagnostic (Mendell *et al.*, 2012 ; Guiraud *et al.*, 2015 ; Robinson-Hamm et Gersbach, 2016). Petit à petit, les muscles se détériorent provoquant des problèmes de locomotion durant l'enfance jusqu'à l'incapacité de se mouvoir (Bello *et al.*, 2016). Des altérations des fonctions respiratoires (Guiraud *et al.*, 2015) et une cardiomyopathie (Viollet *et al.*, 2012) apparaissent au cours de l'adolescence, provoquant un décès prématuré vers l'âge de 30 ans. La dystrophie musculaire de Becker (BMD) se manifeste plus tardivement, en moyenne vers les 12 ans. La locomotion est perturbée vers l'âge de 30 ans et le début des atteintes cardiaques est variable, si bien que l'espérance de vie des patients atteints de BMD est plus longue que celle de ceux présentant une DMD (Finsterer et Stöllberger, 2008 ; Flanigan, 2014). Les différences phénotypiques observées entre ces deux maladies s'expliquent par le niveau d'atteinte du gène *DMD*, long de 2 300 kb, codant la dystrophine (400 kDa). Dans le cas de la DMD, les mutations altèrent le cadre de lecture aboutissant à une petite protéine tronquée ou à l'absence totale de celle-ci (Koenig *et al.*, 1987 ; Blonden *et al.*, 1989). Dans le cas de la BMD, les mutations ne touchent pas le cadre de lecture mais génèrent une dystrophine fonctionnellement limitée conduisant à un phénotype plus léger comparativement à celui de la DMD (Monaco *et al.*, 1988 ; Koenig *et al.*, 1989).

Les myopathies congénitales (CMD) désignent un groupe de maladies cliniquement, génétiquement et histologiquement hétérogènes affectant le tissu musculaire. Il s'agit de la seconde forme de dystrophie musculaire la plus observée après la dystrophie musculaire de Duchenne (Muntoni et Voit, 2004). La majorité des altérations génétiques à l'origine de ces myopathies touchent des protéines situées à l'interface entre la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. Les dystroglycanopathies, ainsi que les mutations touchant le collagène VI et la laminine  $\alpha 2$  sont les formes les plus courantes des CMD (Matsumoto *et al.*, 2005 ; Clement *et al.*, 2012). Les mutations retrouvées au niveau des gènes *COL6A 1* à 3 sont la cause



**Figure 14. Le complexe dystrophine-associated glycoprotein (DAGP).**

La dystrophine se lie à l'actine F cytosquelettique et s'associe à plusieurs protéines du complexe DAGP, qui forme une liaison mécanique entre le cytosquelette actinique et la matrice extracellulaire. Le DAGP stabilise ainsi la membrane cellulaire. (D'après Barressi et Campbell, 2006).

des myopathies d'Ullrich et de Bethlem. Ces gènes codent pour les chaînes  $\alpha$  du collagène VI qui est un composant de la matrice extracellulaire, associé à la lame basale. Les mutations portées par le gène *LAMA2*, codant pour la chaîne lourde  $\alpha 2$  de la laminine-211 (auparavant nommée mérosine) provoque une myopathie dite mérosine-déficiente. La laminine est le partenaire extracellulaire majeur de l' $\alpha$ -dystroglycane situé dans la matrice extracellulaire. L' $\alpha$ -dystroglycane est un constituant du complexe DAGP (dystrophin-associated glycoprotein) (**Figure 14**) permettant la liaison de la dystrophine à la matrice extracellulaire (Lapidos *et al.*, 2004). Afin d'accomplir sa fonction à la membrane plasmique, l' $\alpha$ -dystroglycane porte un glycoépitope spécifique. A ce jour, plus d'une douzaine de gènes (notamment les gènes *ISPD*, *POMT1/2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* et *LARGE1*) codant pour des glycosyltransférases ou des protéines impliquées dans la glycosylation de l' $\alpha$ -dystroglycane ont été identifiés. Les défauts de glycosylation déstabilisent les relations entre l' $\alpha$ -dystroglycane et les protéines extracellulaires, conduisant à ce que l'on appelle des dystroglycanopathies associées à toute une variété de maladies cliniquement et génétiquement très différentes comme le syndrome de Walker Warburg ou la dystrophie de Fukuyama (Moore et Winder, 2012 ; Jae *et al.*, 2013).

Les myopathies mitochondriales désignent un petit groupe de myopathies, résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial dû à des mutations de l'ADN mitochondrial. Les pathologies qui lui sont liées incluent l'épilepsie myoclonique associée à la myopathie des fibres rouges en haillons (MERRF) (Hammans *et al.*, 1993), le syndrome de Kearns-Sayre (KSS) (Moraes *et al.*, 1989) et l'encéphalomyopathie mitochondriale, avec acidose lactique et épisodes déficitaires neurologiques (MELAS) (Hirano *et al.*, 1992). Les patients atteints de MERRF, présentent une myoclonie (brève contraction involontaire d'un muscle ou d'un groupe de muscles), suivie de crises d'épilepsie généralisées, d'ataxie (problème de coordination des mouvements), de faiblesses musculaires et de démence (DiMauro et Hirano, 2015). Dans plus de 80% des cas, une transition d'une adénosine à une guanine en position 8344 du gène mitochondrial *MT-TK*



codant pour l'ARNt se liant à la L-lysine (tRNA<sup>Lys</sup>) est observée. Le syndrome de Kearns-Sayre a été décrit en 1958 par Thomas P. Kearns et George Pomeroy Sayre, et se manifeste avant l'âge de 20 ans par une chute involontaire de la paupière supérieure appelée ptosis, due à une faiblesse du muscle releveur de la paupière. Celle-ci est induite par la présence de délétions de grandes tailles retrouvées au niveau de l'ADN mitochondrial. Les délétions sont en général non héréditaires, mais se produisent spontanément dans les cellules germinales ou au cours du développement embryonnaire (Mehndiratta *et al.*, 2002). Elles touchent des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, comme ceux codant pour la cytochrome c oxydase, nécessaire à la production d'énergie (Chomyn *et al.*, 1991 ; Oldfors *et al.*, 1992). Le syndrome MELAS est l'un des troubles mitochondriaux héréditaires les plus fréquents, décrit pour la première fois en 1984 (Pavlakakis *et al.*, 1984). Il se manifeste chez l'enfant ou le jeune adulte par des céphalées et des vomissements s'accompagnant de déficits moteurs dus à une faiblesse musculaire. Dans plus de 80% des cas, cette maladie est induite par la transition d'une adénine en guanine à la position 3243 du gène mitochondrial *MT-TL1* codant pour l'ARNt se liant à la Leucine (tRNA<sup>Leu</sup>) (Goto *et al.*, 1990). Cette mutation engendre une diminution de la synthèse protéique affectant notamment les enzymes des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Sproule et Kaufmann, 2008 ; El-Hattab *et al.*, 2001). Il en résulte une diminution de la production d'énergie sous forme d'ATP (King *et al.*, 1992 ; Chomyn *et al.*, 2000).

Les myopathies métaboliques sont des troubles génétiques du muscle squelettique, impactant majoritairement les enzymes impliquées dans le métabolisme intermédiaire du glucose et des acides gras. La première myopathie métabolique décrite était une maladie touchant le stockage du glycogène, nommée maladie de McArdle détectée chez un enfant souffrant de crampes induites par l'exercice (McArdle, 1951). Ce trouble est dû à une mutation génétique du gène *PYGM* codant pour l'isoforme de la myophosphorylase spécifique du muscle

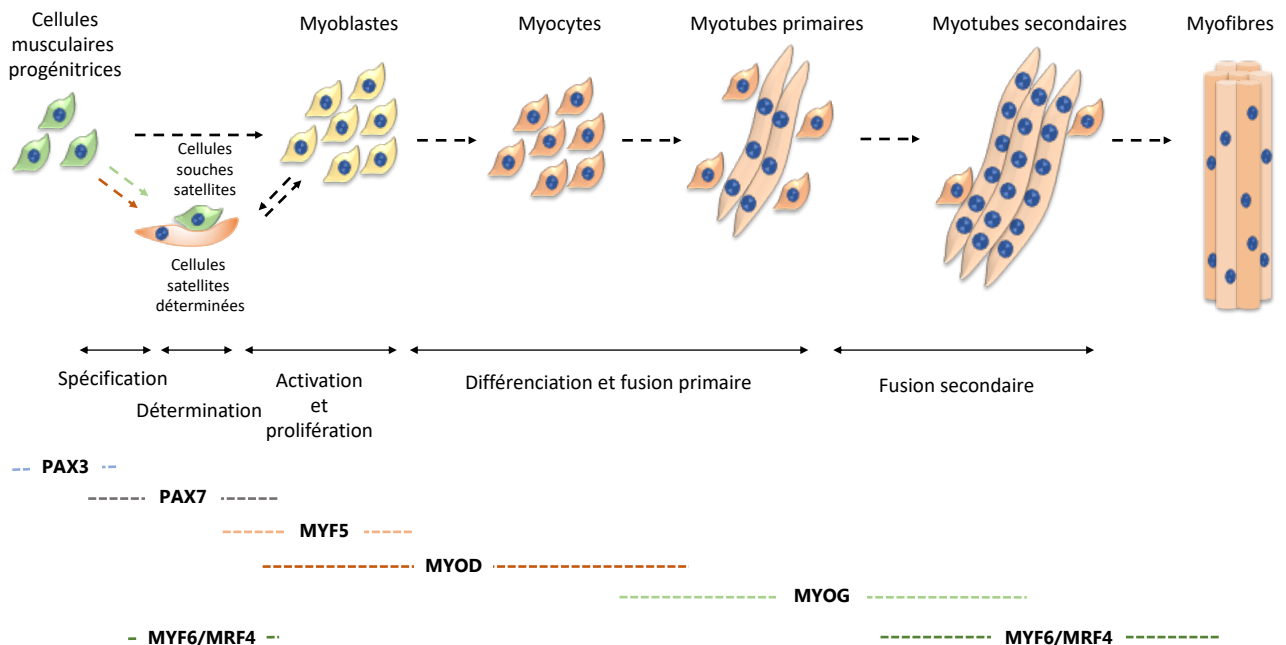




squelettique. La myophosphorylase participe à la glycogénolyse et catalyse la conversion du glycogène en glucose 1-phosphate. En son absence, la production de l'énergie à partir de la glycolyse est interrompue favorisant l'apparition de crampes dès les premières secondes d'effort. Les altérations touchant le métabolisme des acides gras sont des troubles génétiques affectant le transport des acides gras libres (déficiency en carnitine palmitoyltransférase II) et leur oxydation (déficiency en acyl-Coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaînes très longues). Diverses mutations dans le gène *CPT2* codant la carnitine palmitoyltransférase II déstabilisent cette protéine. Ceci a pour conséquence la non conversion des acides gras en énergie par oxydation (Berardo *et al.*, 2010), pouvant aboutir à une rhabdomyolyse (Sigauke *et al.*, 2003). La dégradation des acides gras à chaînes très longues, issus de l'alimentation et des graisses stockées dans le corps, est réalisée par l'acyl-coenzyme A déshydrogénase au sein des mitochondries. Cette enzyme est codée par le gène nucléaire *ACADVL* sujet à des mutations autosomiques récessives, aboutissant à une insuffisance enzymatique. En effet, les acides gras ne sont pas convertis en énergie, ce qui provoque une rhabdomyolyse intermittente, des crampes musculaires et une intolérance à l'effort (Leslie *et al.*, 2009).

## **II.2. L'organisation du processus myogénique**

Les fibres musculaires squelettiques forment un syncytium issu de la fusion des myoblastes au cours du développement embryonnaire. Chez l'adulte, le processus myogénique est activé suite à des lésions musculaires. Au niveau cellulaire, cela se traduit par l'activation des cellules satellites, leur différenciation et pour certaines la fusion avec les myotubes. *In vitro*, le processus myogénique peut être mimé grâce à l'utilisation de cellules myoblastiques. Ceci permet d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu au cours du processus myogénique. Par l'intermédiaire d'une privation de sérum dans le milieu de culture, les myoblastes en prolifération vont se différencier en myocytes qui vont pour une partie d'entre eux s'aligner et fusionner pour former des myotubes multinucléés. Cette étape est nommée



**Figure 15. Expressions temporelles des MRFs (Myogenic Regulatory Factor) au cours du processus myogénique.**

Le processus myogénique débute par la spécification des cellules progénitrices musculaires, exprimant PAX3 et PAX7, conduisant à la formation d'un pool de cellules satellites, caractérisées par l'expression de PAX7 et par une première vague de MYF6/MRF4. Une partie d'entre elles va ensuite subir une étape de détermination pour former des cellules satellites déterminées. Puis ces dernières sont activées et prolifèrent par l'induction de MYF5 et MYOD avant de se différencier en myocytes au sein desquels l'expression de MYF5 diminue. Les myocytes vont, pour une partie d'entre eux, fusionner les uns avec les autres sous l'effet de MYOG pour former les myotubes primaires. Dès lors, une population myocytaire (cellules de réserve) participe à la croissance des myotubes pré-existants en fusionnant avec eux sous l'induction de MYOG et de la seconde vague de MYF6/MRF4. Ceci aboutit à la formation des myotubes secondaires impliqués ultérieurement dans l'élaboration des fibres musculaires. Au cours du processus de différenciation myogénique, des cellules souches satellites restent à l'état quiescent et participeront à la croissance post-natale des muscles suite à leur activation (D'après Bentzinger *et al.*, 2012 ; Sambasivan *et al.*, 2013).

fusion primaire. Les cellules ne fusionnant pas sont dites cellules de réserve et restent dans un état indifférencié. La seconde phase du processus, appelée fusion secondaire, est caractérisée par l'entrée en différenciation de cellules de réserve qui vont fusionner avec les myotubes préexistants participant dès lors à leur croissance.

### II.2.1. Régulation par les Myogenic Regulatory Factors

En 1987, des études d'hybridation à partir de banques d'ADNc de myoblastes ont permis de mettre en évidence le facteur hélice-boucle-hélice (HLH) MYOD. Celui-ci a la capacité d'induire la transformation de certains types cellulaires, comme les fibroblastes, en des cellules capables de fusionner en myotubes (Davis *et al.*, 1987). Par la suite, trois autres facteurs myogéniques de type hélice-boucle-hélice ont été identifiés ainsi que leur capacité à induire eux aussi des phénotypes myoblastiques à des cellules non musculaires. Il s'agit de MYF5, de la myogénine (MYOG) et de MRF4 (également appelé MYF6) (Braun *et al.*, 1989 ; Wright *et al.*, 1989 ; Rhodes et Konieczny, 1989). Ces différents facteurs myogéniques sont exprimés selon un profil bien défini au cours du processus myogénique (**Figure 15**) (Bentzinger *et al.*, 2012).

Les MRFs forment à eux seuls une sous-famille de protéines HLH (de type II) et leur expression est restreinte au tissu musculaire squelettique (Massari et Murre, 2000). Les MRFs possèdent chacun trois domaines structuraux présentant une forte homologie. Le premier est un domaine basique relié à une région de type hélice-boucle-hélice formant ainsi le domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH). Il est notamment retrouvé chez les métazoaires (Massari et Murre, 2000 ; Jones, 2004) et contribue à l'activation du processus myogénique (Ozerniuk et Miuge, 2012). En effet, la portion basique permet la liaison à l'ADN tandis que la partie HLH est requise pour l'hétérodimérisation avec des protéines E reconnaissant la séquence suivante « CANNGT » des boîtes E (E-box) retrouvées dans les régions promotrices des gènes myogéniques (Massari et Murre, 2000). A l'extrémité N-terminale du domaine bHLH, se



trouve une région riche en cystéine/histidine et proche de sa région C-terminale, est présent un domaine riche en sérine/thréonine. Ces derniers participent à la régulation de la transcription des gènes cibles.

MYF5 est le premier MRF exprimé au cours du développement embryonnaire (E8 chez la souris). Son expression augmente de façon transitoire dans le mésoderme paraxial puis conjointement avec les autres MRFs lors de la formation du myotome (à E10,5 chez la souris) (Ott *et al.*, 1991 ; Buckingham, 1992). Par la suite, la caractérisation des rôles joués par les différents MRFs a été réalisée par des expériences de knockout (KO) chez la souris. Un KO de *Myf5* conduit à un retard du processus de myogenèse embryonnaire, débutant dès lors que l'expression de *MyoD* est initiée (Braun *et al.*, 1992). Le KO de *MyoD* provoque une expression prolongée de *Myf5* qui, dans une condition sauvage, voit son expression diminuer lorsque celle de *MyoD* débute (Rudnicki *et al.*, 1992). Le double KO *Myf5/MyoD* induit une absence de développement du muscle squelettique, mettant en avant l'importance des facteurs *Myf5* et *MyoD* au cours de la myogenèse (Rudnicki *et al.*, 1993). L'absence de la population cellulaire *Myf5*<sup>+</sup>, induite par de la toxine diphtérique, montre que *Myf5* n'est pas exprimé par tous les myoblastes au cours de la formation du myotome. En effet, le processus myogénique est totalement accompli par la population cellulaire *MyoD*<sup>+</sup> (Gensch *et al.*, 2008 ; Haldar *et al.*, 2008). Ces résultats mettent en exergue le fait que deux populations cellulaires différentes (*Myf5*<sup>+</sup> et *MyoD*<sup>+</sup>) participent à la myogenèse. Des mutations alléliques impactant *Myf5* affectent également l'expression du gène *Mrf4* voisin. De plus, un *Mrf4* fonctionnel restaure certains aspects du phénotype embryonnaire du double mutant *Myf5/MyoD* (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). Le KO de *MyoG* provoque une diminution de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la myosine et *Mrf4*, mais n'affecte pas celle de *MyoD* (Hasty *et al.*, 1993). Cela s'accompagne d'une augmentation du nombre de myoblastes indifférenciés ainsi que d'une diminution du nombre de myofibres. Ces différentes expériences permettent de



classer les MRFs en deux familles selon leurs implications durant le processus myogénique. D'un côté MYF5 et MYOD induisent la détermination myogénique, tandis que MYOG et MRF4 participent à l'étape de différenciation.

### **II.2.2. Formation des fibres musculaires au cours du processus myogénique**

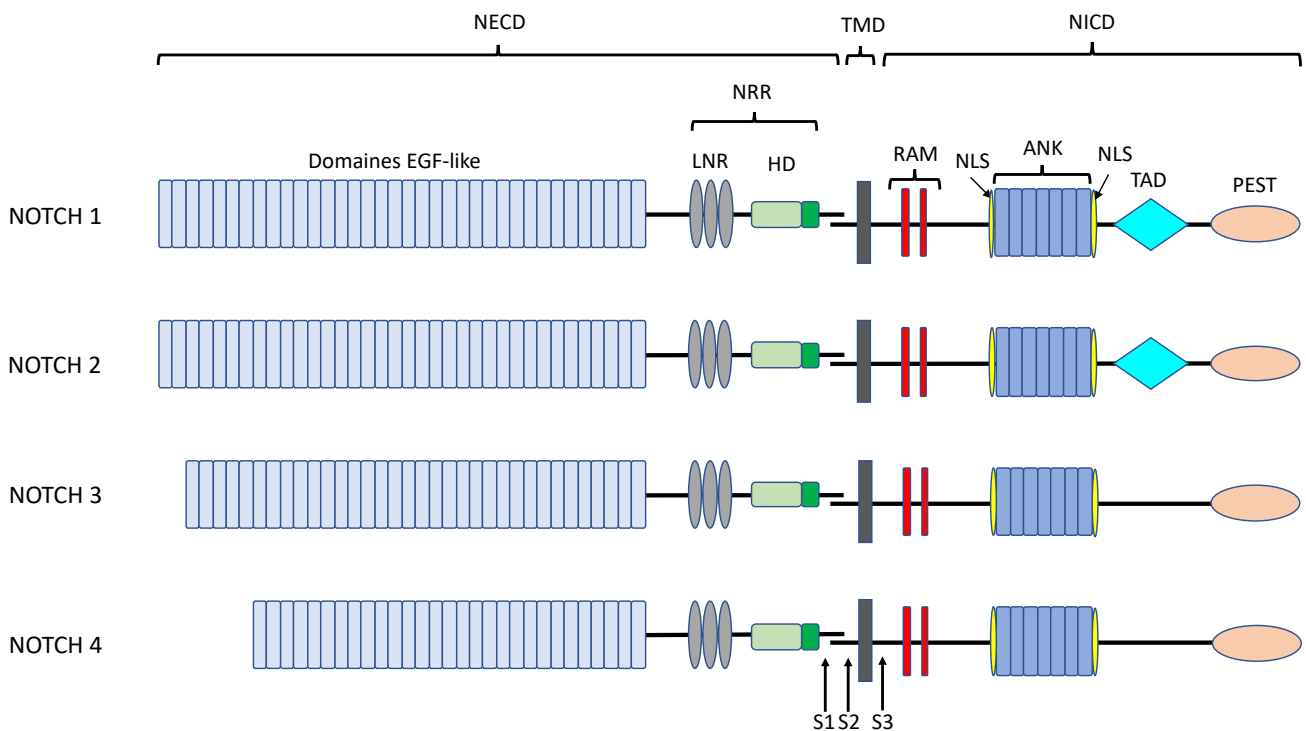
Les fibres musculaires ou myofibres sont les unités contractiles des muscles squelettiques (Sciote et Morris, 2000). La formation de nouvelles fibres correspond au processus myogénique, au cours duquel les cellules souches multipotentes sont converties en cellules musculaires. Les fibres musculaires se forment au stade prénatal (entre E10,5 et E12,5 chez la souris) et de ce fait il est crucial de comprendre les différents événements se déroulant à ce stade car ils impactent le développement et la croissance post-natale du muscle (Dauncey et Gilmour, 1996). Le processus myogénique prénatal peut être subdivisé en myogenèse primaire et secondaire. La myogenèse primaire se déroule principalement au stade embryonnaire, lorsque les fibres musculaires primaires apparaissent (E11 chez la souris). La myogenèse secondaire se produit au stade fœtal (entre E14,5 et E17,5 chez la souris) et conduit à la formation de fibres musculaires secondaires. Ces deux types de fibres musculaires sont issues des cellules souches mésenchymateuses (Bailey *et al.*, 2001). Le processus myogénique prénatal est sous le contrôle de différentes protéines régulatrices comme les protéines paired box, PAX3 et PAX7 (Maroto *et al.*, 1997 ; Hyatt *et al.*, 2008). Les expressions de *Pax3* et *Pax7* dans les cellules souches mésenchymateuses activent l'expression des facteurs de régulation myogénique (Bailey *et al.*, 2001), induisant la différenciation myogénique (Amthor *et al.*, 1999). MYF5 et MYOD activent la détermination des cellules précurseurs myogéniques multipotentes en myoblastes (Roth *et al.*, 2003). Dans un 1<sup>er</sup> temps, les cellules précurseurs myogéniques et les myoblastes prolifèrent pour constituer un pool cellulaire conséquent. Suite à des stimuli environnementaux (telle que la concentration en facteurs de croissance), les myoblastes s'alignent, fusionnement et se différencient en fibres musculaires immatures





nommées myotubes (Du *et al.*, 2010). Étant donné que seul un nombre limité de myofibres primaires se forment au stade embryonnaire, l'impact de la myogenèse primaire sur la taille et le nombre des fibres musculaires formées est mineur (Du *et al.*, 2010). La phase critique du développement du tissu musculaire squelettique est le stade fœtal, où la croissance des fibres musculaires s'effectue. Cette seconde vague de myogenèse, est appelée myogenèse secondaire. Elle correspond à la fusion des myoblastes fœtaux mais également à leur fusion avec les fibres musculaires issues de la myogenèse primaire embryonnaire pour former des fibres secondaires (Messina et Cossu, 2009). Le nombre de fibres musculaire formées dépend du nombre de cellules précurseurs myogéniques disponibles ; la prolifération de ces dernières dépendant de la disponibilité en nutriments (Yan *et al.*, 2013).

L'augmentation de la taille des fibres musculaires au stade post-natal repose majoritairement sur les cellules satellites musculaires associées à la synthèse protéique. Les cellules satellites forment une population hétérogène de cellules souches myogéniques postnatales situées entre le sarcolemme et la lame basale (Shefer *et al.*, 2006 ; Der Vartanian *et al.*, 2019). Les cellules satellites sont des cellules mononucléées quiescentes car bloquées en phase G0 du cycle cellulaire. Après activation par divers stimuli physiologiques externes liés à la croissance, les cellules satellites subissent une phase de divisions asymétriques. Une partie des cellules filles reconstitue le pool initial tandis que le reste se différencie en myoblastes. Ceux-ci fusionnent avec les fibres musculaires existantes pour augmenter la taille des fibres et le nombre de noyaux présents dans ces dernières. La majorité des noyaux d'une fibre musculaire adulte sont issus des cellules satellites (Allen *et al.*, 1979). Des études relativement récentes laissent penser qu'une partie des cellules satellites sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires comme les adipocytes, les fibroblastes (Tong *et al.*, 2008) et en cellules capables d'effectuer de la régénération musculaire telles que les cellules PICs (PW11<sup>+</sup>/Pax7<sup>-</sup> interstitial cells) (Schmidt *et al.*, 2019).



**Figure 16. Structure des récepteurs NOTCH chez les Mammifères.**

Chez les Mammifères, il existe quatre récepteurs NOTCH qui diffèrent par le nombre de domaines EGF-like (29 à 36) portés par la partie extracellulaire (NECD). Ces domaines sont suivis par une région régulatrice négative (NRR), constituée de répétitions riches en cystéines (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation (HD) où se situe le site de clivage S1. Juste avant le domaine transmembranaire (TMD) se trouve le site de clivage S2 qui est la cible de métalloprotéases ADAM. Dans la partie intracellulaire (NICD), nous retrouvons le site de clivage S3, cible de la  $\gamma$ -sécrétase. On observe également, un domaine RAM suivi de sept répétitions ankyrines (ANK) flanquées par des séquences de localisation nucléaire (NLS) et un motif PEST. Les récepteurs NOTCH1 et 2 possèdent en plus dans leurs parties intracellulaires, un domaine de transactivation (TAD). (D'après Arruga *et al.*, 2018).

## II.3. Les voies de signalisation associées au processus myogénique

### II.3.1. La voie de signalisation NOTCH

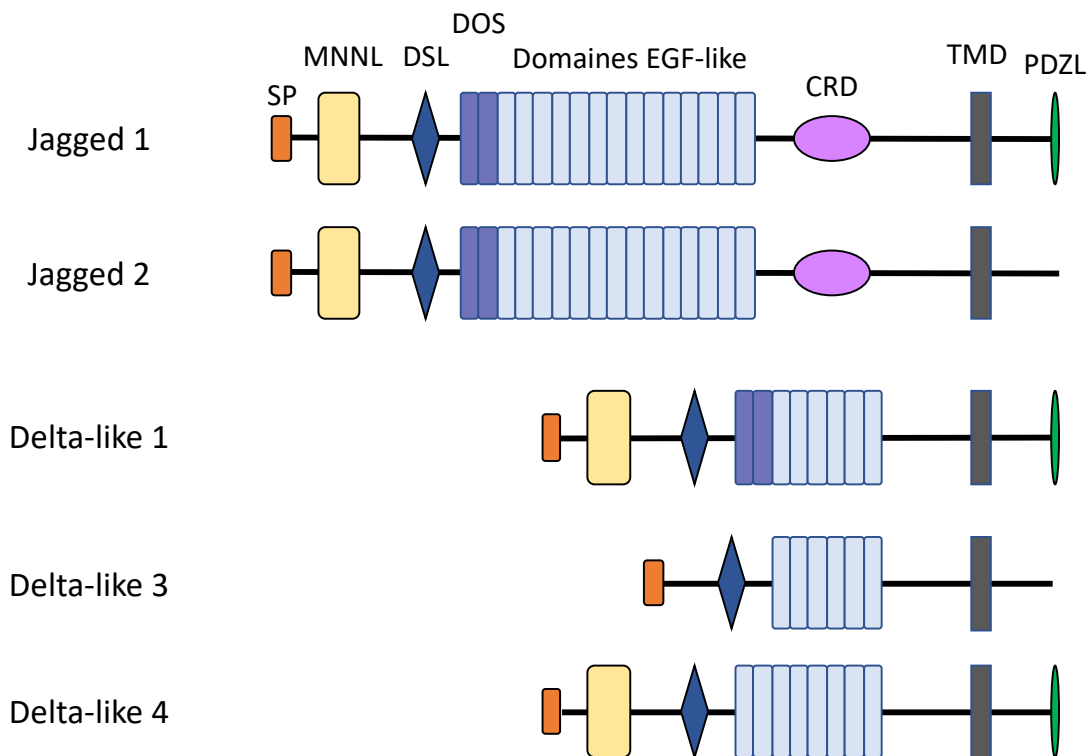
La signalisation NOTCH est une voie régulatrice majeure du développement et de la régénération musculaire. Le récepteur NOTCH doit son nom au phénotype causé par une mutation chez la drosophile et conduisant à la formation d'ailes dites « notched » (« entaillée ») (Mohr, 1919). C'est seulement dans les années 1980 que le locus *Notch* a été cloné et caractérisé chez la drosophile (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1983). Celui-ci code pour une protéine à un seul domaine transmembranaire (Wharton *et al.*, 1985) interagissant comme récepteur, avec principalement les ligands canoniques, Delta/Serrate chez *Drosophila melanogaster* et Delta/Jagged chez les vertébrés, portés par les cellules voisines (Vässin *et al.*, 1987 ; Fehon *et al.*, 1990 ; Fleming *et al.*, 1990). Il a été rapidement conclu que ces interactions assuraient les communications cellule-cellule aboutissant à l'initiation d'une cascade de signalisation interne à la cellule réceptrice. Il est maintenant clair que la signalisation NOTCH joue un rôle primordial dans de nombreux processus au cours du développement des métazoaires et dans les tissus adultes, tels que la détermination du destin cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999 ; Miele et Osborne, 1999).

#### II.3.1.1. Les récepteurs NOTCH

Les récepteurs NOTCH font partie de la famille des protéines transmembranaires de type I (**Figure 16**). Ils sont constitués d'une partie extracellulaire particulièrement glycosylée nommée NECD (Notch ExtraCellular Domain) reliée de façon non covalente à une partie intracellulaire appelée NICD (Notch IntraCellular Domain). Chez les Mammifères il existe quatre récepteurs NOTCH paralogues (NOTCH 1 à 4). Le domaine extracellulaire contient, selon les paralogues, entre 29 et 36 domaines EGF-like dont certains sont impliqués dans l'interaction avec le ligand. Par exemple chez la drosophile, les interactions activatrices de type



*trans*, où le ligand est porté par une cellule voisine, sont médiées par les domaines EGF-like 11 et 12. Les interactions inhibitrices de type *cis*, où le ligand et le récepteur sont co-exprimés par la même cellule, sont régulées par les domaines EGF-like 24 à 29 (de Celis et Bray, 2000). La majorité des domaines EGF-like sont impliqués dans la liaison du calcium participant ainsi à la capacité de liaison du récepteur avec son ligand (Raya *et al.*, 2004 ; Cordle *et al.*, 2008). Les répétitions EGF-like sont suivies par une région de régulation négative (NRR) constituée de trois régions Lin12-Notch riches en cystéines (LNR) et par une région hydrophobe requise pour l'hétérodimérisation (HD) du récepteur. En absence de ligand, la région NRR empêche les ADAM métalloprotéases membranaires (ADAM17/TACE, ADAM10) d'accéder au site de clivage protéolytique S2 (Brou *et al.*, 2000 ; Hartmann *et al.*, 2002 ; Sanchez-Irizarry *et al.*, 2004). La structure cristallographique de NOTCH2 humain montre que le domaine LNR recouvre le domaine HD comme le chapeau d'un champignon et protège ainsi le site de clivage S2 avant l'initiation de la signalisation (Gordon *et al.*, 2007). Le domaine transmembranaire (TMD) se termine par un signal « translocation stop » composé de 3 à 4 résidus Arginine/Lysine. Ce domaine contient également le site de clivage S3 ciblé par la  $\gamma$ -sécrétase inclut au niveau de la membrane plasmique, libérant le domaine intracellulaire de NOTCH (NICD) (Fortini 2002). Le NICD est constitué d'une région RAM (RBP-JK association module) de 12 à 20 acides aminés localisée autour du motif conservé WxP (Lubman *et al.*, 2007). A proximité de la région RAM se trouve sept répétitions ankyrines (ANK domain) bordées par deux séquences de localisation nucléaires (Lubman *et al.*, 2004). RAM et ANK sont impliqués dans l'interaction avec les facteurs de transcription CSL, (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) (Tamura *et al.*, 1995). Les répétitions ankyrines d'un domaine de transactivation (TAD) plus ou moins définis et divergent. Ce dernier est absent pour NOTCH 3 et 4 chez les Mammifères. Finalement, l'extrémité C-terminale de NOTCH contient un motif PEST conservé, riche en proline/acide glutamine/sérine/thréonine et impliqué dans la stabilité et la dégradation du NICD



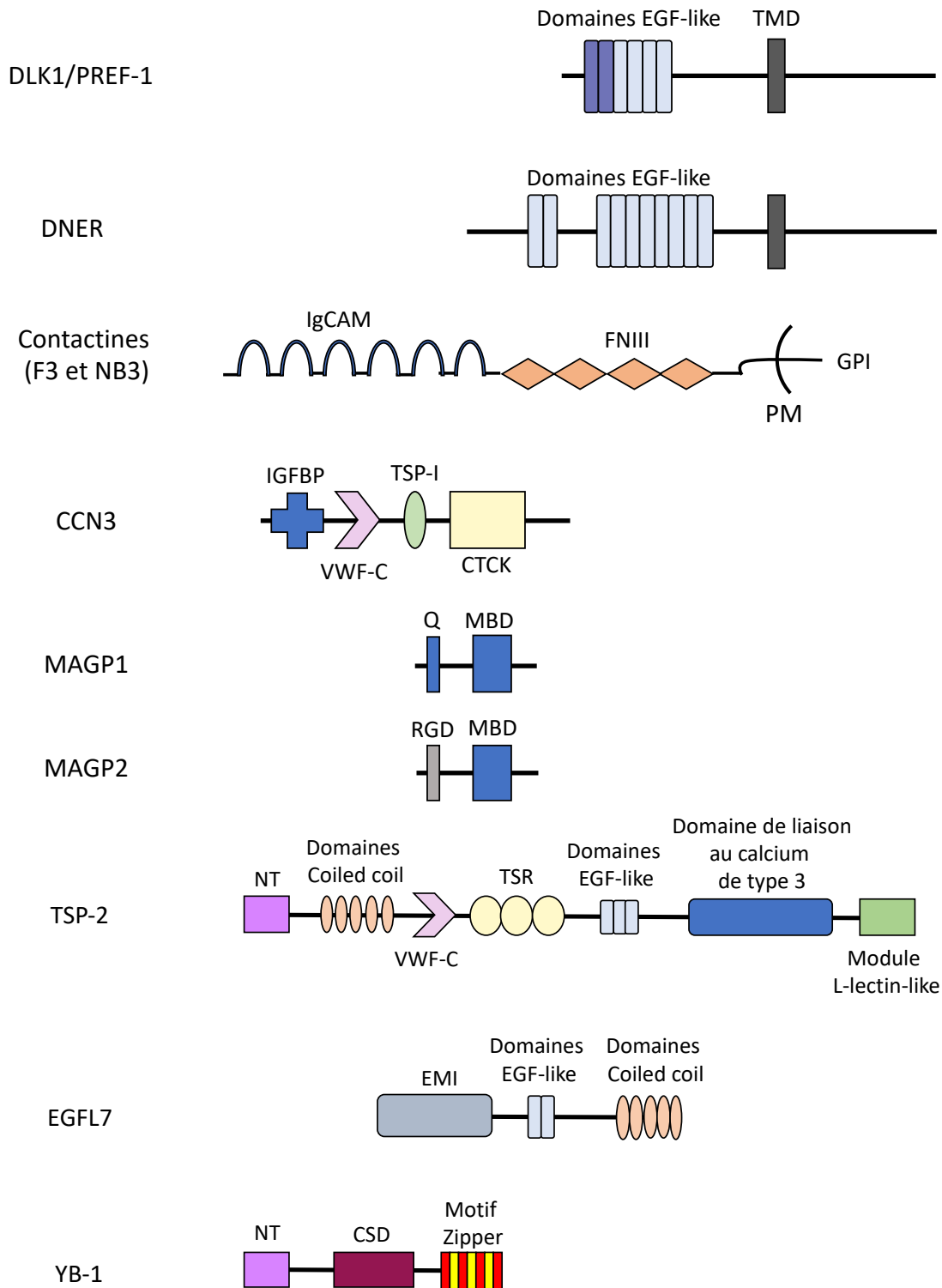
**Figure 17. Les ligands canoniques de la voie de signalisation NOTCH chez les Mammifères.**

Les ligands canoniques de la voie de signalisation NOTCH sont des protéines transmembranaires de type I classées en deux catégories : la famille Jagged et la famille Delta-like. Ces protéines sont constituées de différents domaines. SP: Signal Peptide; MNNL: Module at N-terminal domain of Notch Ligands; DSL: Delta, Serrate and Lag-2 domain; DOS: Delta and OSM-11 like proteins domain; Domaine EGF-like; CRD: Cystein-Rich Domain; TMD: TransMembrane Domain; PDZL: PDZ (Domain present in PSD-95, Dlg and ZO-1/2) Ligand motif. (D'après Arruga *et al.*, 2018).

(Sriuanpong *et al.*, 2002).

### II.3.1.2. Les ligands des récepteurs NOTCH

Majoritairement, la voie de signalisation canonique de NOTCH est induite par des protéines transmembranaires de type I de la famille DSL (Delta, Serrate et Lag2) caractérisées par la présence d'un domaine DSL (**Figure 17**) (Henderson *et al.*, 1994 ; Tax *et al.*, 1994). Chez les Mammifères, les ligands DSL ont été classés en deux catégories, Serrate-like (Jagged1 et Jagged2) et Delta-like (Dll1, Dll3 et Dll4), en se basant sur leurs homologies avec les ligands Serrate et Delta retrouvés chez la drosophile (Kopan et Ilagan, 2009). Les ligands DSL possèdent une structure commune composée d'un domaine N-terminal suivi d'un domaine DSL et de répétitions variables d'EGF-like en tandem, impliquées ou non dans la liaison avec le calcium. Le domaine N-terminal peut être subdivisé en deux régions selon le contenu en cystéines : le domaine N-terminal 1 riche en cystéine et le domaine N-terminal 2 pauvre en cystéine (Parks *et al.*, 2006). Chez *Drosophila melanogaster*, il a été démontré que le domaine N-terminal 2 possédait un motif de liaison au glycosphingolipide (GBM) favorisant l'interaction ligand-membrane plasmique et l'endocytose du ligand (Hamel *et al.*, 2010). Il a été démontré chez la souris que le domaine DSL, dérivé d'une répétition EGF-like, est nécessaire mais non suffisant à l'interaction avec le récepteur NOTCH (Shimizu *et al.*, 1999). Un motif conservé appelé DOS (Delta and OSM-11-like protein) a été identifié au sein des deux premières répétitions EGF-like de Jagged1, 2 et Dll1. Il est impliqué dans des phénomènes de coopération avec le domaine DSL (Komatsu *et al.*, 2008). Les protéines Jagged possèdent une région riche en cystéine (CRD), non retrouvée chez les protéines Delta-like, ayant une homologie partielle avec le facteur von Willebrand de type C (Vitt *et al.*, 2001). Les domaines intracellulaires des différents ligands ne possèdent pas d'homologie de séquence particulière. Cependant, on peut noter que certains ligands possèdent des résidus lysines et un motif PDZL (PSD-95/Dlg/ZO-1 ligand) impliqués respectivement dans la signalisation du ligand et les inte-

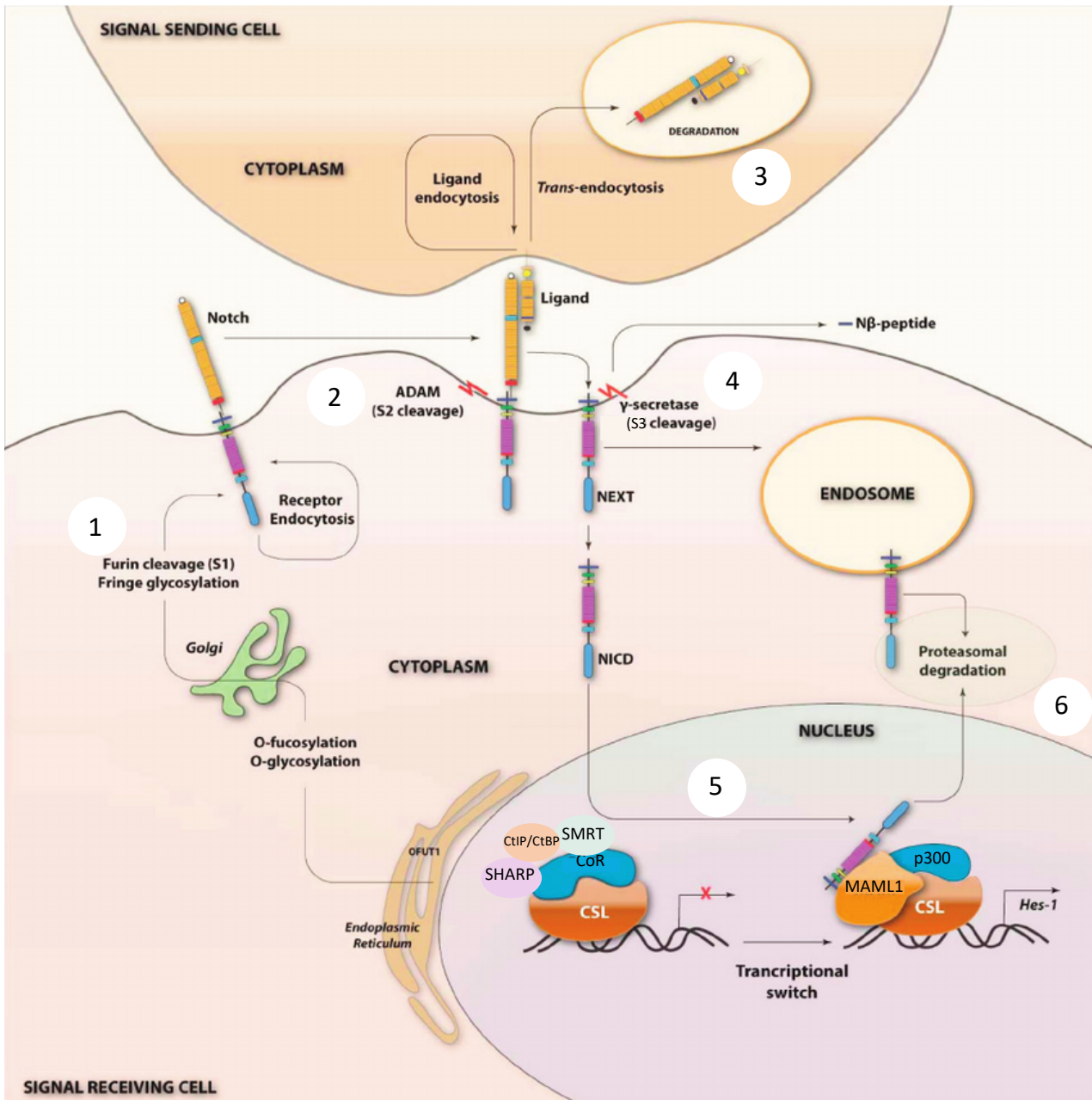


**Figure 18. Les principaux ligands non canoniques de la voie de signalisation NOTCH chez les vertébrés.**

Il existe des ligands non canoniques de la voie de signalisation NOTCH. Ceux-ci présentent des structures variées et peuvent être transmembranaires (DLK1/PREF-1, DNER), liés à la membrane par une ancre GPI (Contactines F3 et NB3) ou encore être sécrétés dans le milieu extracellulaire (CCN3, MAGP1, MAGP2, TSP-2, EGFL7, YB-1). TMD : TransMembrane Domain; PM : Plasma membrane; IgCAM : Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecule; FNIII : FibroNectin type III domain; GPI : GlycosylPhosphatidyInositol; IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein-like domain; VWF-C : Von Willebrand Factor type c-like domain; TSP-I : ThromboSPondin type 1-like domain; CTCK : C-Terminal Cysteine Knot-like domain; Q : Glutamine rich domain; MBD : Matrix-Binding Domain; RGD : Integrin-binding motif; NT : N-Terminal domain; TSR : ThromboSPondin type 1 Repeat; EMI : Emilin domain; CSD : Cold Shock Domain nucleic acid binding domain. (D'après D'Souza *et al.*, 2010).



ractions avec le cytosquelette (Harris et Lim, 2001 ; Pintar *et al.*, 2007). Il existe également des ligands induisant l'activation de la voie dite non canonique de NOTCH (**Figure 18**). C'est le cas de la protéine Delta-like 1 (DLK1) qui a été la première décrite chez l'Homme (Smas et Sul, 1993 ; Laborda *et al.*, 1993). Bien que ne possédant pas de domaine DSL, cette protéine est structurellement similaire aux protéines Delta-like. DLK1 est clivée par les ADAM métalloprotéases et régule négativement la voie de signalisation NOTCH (Ross *et al.*, 2004 ; Wang et Sul, 2006). Plus récemment, il a été démontré que DLK1 possède un domaine DOS suggérant que cette protéine peut également activer la voie de NOTCH (Komatsu *et al.*, 2008). La protéine DNER (Delta/Notch-like EGF-related receptor) ne présente pas de domaine DSL mais contient dans sa partie extracellulaire des domaines EGF-like (Eiraku *et al.*, 2002). DNER induit des changements morphologiques dans les cellules gliales, par l'intermédiaire d'interactions *trans* avec le récepteur NOTCH conduisant à l'activation de la signalisation (Eiraku *et al.*, 2005). Il existe également des ligands non canoniques à ancre GPI tels que F3/contactin1 et NB3/contactin6 induisant la différenciation des oligodendrocytes *via* l'activation de la signalisation NOTCH (Hu *et al.*, 2003 ; Cui *et al.*, 2004). Chez les vertébrés, des ligands non canoniques sont sécrétés. La protéine CCN3 (Connective tissue growth factor/Cysteine-rich 61/Nephroblastoma overexpressed gene family member) semble activer la voie de signalisation NOTCH de façon autocrine (Sakamoto *et al.*, 2002 ; Gupta *et al.*, 2007 ; Minamizato *et al.*, 2007). Les glycoprotéines associées aux microfibrilles, MAGP-1 et MAGP-2 peuvent interagir avec le récepteur NOTCH et provoquer le clivage du NICD par la  $\gamma$ -sécrétase (Miyamoto *et al.*, 2006). MAGP-2 peut également réprimer la signalisation NOTCH dans certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales (Albig *et al.*, 2008). La thrombospondine 2 (TSP-2) accentue la signalisation induite par le récepteur NOTCH3 en se fixant sur celui-ci (Meng *et al.*, 2009). Des expériences réalisées sur des lignées cellulaires rénales humaines, montrent que la protéine Y-box 1 (YB-1) peut se fixer sur NOTCH3 et modu-



**Figure 19. Activation de la voie canonique de la signalisation NOTCH.**

Au sein de l'appareil de Golgi, le récepteur NOTCH subit un premier clivage protéolytique S1 par la protéase Furine-like (1). Puis le récepteur NOTCH est adressé à la membrane plasmique où il peut interagir avec un ligand porté par la membrane plasmique d'une cellule voisine (2). Cette interaction provoque le second clivage S2, réalisé par les métalloprotéases ADAM10 et ADAM17/TACE formant un récepteur NOTCH tronqué de sa partie extracellulaire NECD. Le complexe NECD/Ligand est trans-endocyté pour être dégradé au sein de la cellule émettrice (3). Consécutivement, la  $\gamma$ -sécrétase effectue le troisième clivage S3 (4) générant la relargage du NICD qui va être transloqué dans le noyau (5) pour exercer son activité transcriptionnelle au niveau de ses gènes cibles. L'entrée du NICD dans le noyau provoque le déplacement du complexe de co-répression formé par les protéines SHARP, SMRT, CoR et CtIP/CtBP et l'assemblage du complexe de co-activation constitué des protéines p300 et MAML1. L'arrêt de la voie NOTCH est induite par l'ubiquitination du NICD et sa dégradation par le protéasome. (D'après Yavropoulou et Yovos, 2014).

ler l'expression de ses gènes cibles (Rauen *et al.*, 2009). Enfin, la protéine EGFL7 (Epidermal Growth Factor-Like domain 7) peut interagir avec différents domaines EGF-like incluant les sites de liaison DSL des récepteurs NOTCH humains. Ceci a pour conséquence de contrecarrer la signalisation NOTCH induite par JAGGED1 au cours du processus d'autorenouveau des cellules souches neurales (Schmidt *et al.*, 2009).

### II.3.1.3. Activation et fonctionnement de la voie de signalisation

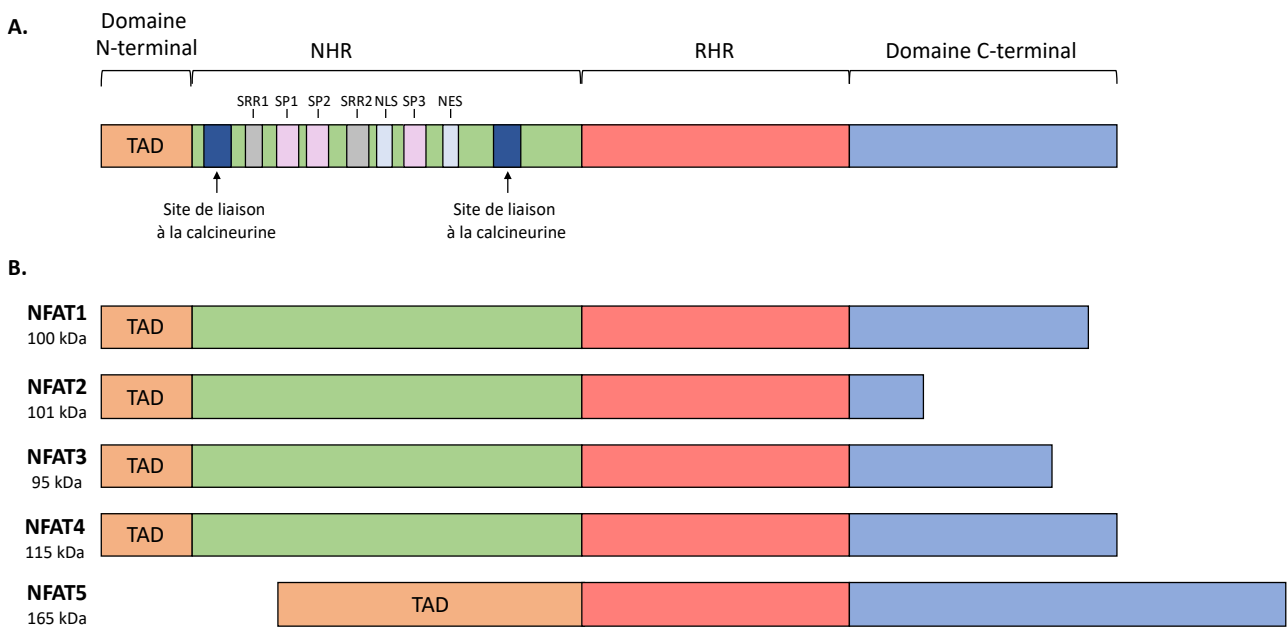
La voie de signalisation NOTCH est activée suite à trois clivages protéolytiques séquentiels (**Figure 19**) (Kopan et Ilagan, 2009). Le premier (S1) a lieu dans la partie extracellulaire de NOTCH (NECD) au niveau du domaine NRR. Ce clivage constitutif s'effectue lors du passage de la protéine au sein de l'appareil de Golgi, par une protéase Furine-like (Logeat *et al.*, 1998). Lorsqu'un ligand porté par une cellule voisine entre en contact avec le récepteur, qui a été adressé à la membrane plasmique et est désormais transmembranaire, il provoque le second clivage (S2) de la partie extracellulaire du récepteur par les métalloprotéases membranaires ADAM10 et ADAM17/TACE (Brou *et al.*, 2000). Puis un troisième clivage (S3) est réalisé par le complexe membranaire  $\gamma$ -sécrétase qui comprend l'activité catalytique de présénilines (Struhl et Greenwald, 1999). Ces clivages ont pour conséquence la libération de la partie intracellulaire du récepteur NOTCH appelée NICD, dans le cytoplasme de la cellule réceptrice. Le complexe constitué de la partie extracellulaire du récepteur NOTCH en contact avec le ligand est par la suite endocyté pour être recyclé. Le NICD libéré dans le cytoplasme de la cellule réceptrice, va ensuite se diriger vers le noyau, car il possède un peptide signal de localisation nucléaire (NLS), où il accomplira sa fonction de facteur de transcription. Des embryons de souris mutants homozygotes pour le site de clivage S3 du récepteur NOTCH1 présentent un phénotype identique aux mutants KO NOTCH1 (Huppert *et al.*, 2000). Ceci suggère que le clivage du NICD nécessaire à sa translocation dans le noyau est un événement indispensable au bon fonctionnement de la voie de signalisation.



Une fois dans le noyau, le NICD s'associe avec la protéine CSL, également nommée RBPj, capable de se lier aux promoteurs des gènes cibles de NOTCH. En absence du NICD, la protéine CSL est liée à un complexe de co-répression constitué des protéine N-CoR, SMRT, SHARP et CtIP/CtBP (Kao *et al.*, 1998 ; Barolo *et al.*, 2002 ; Oswald *et al.*, 2002, 2005) inhibant la transcription des gènes cibles de NOTCH. En présence du NICD, celui-ci se fixe à la protéine CSL induisant la substitution du complexe de co-répression par un complexe de co-activation composé des protéines Mastermind-like (MAML) et CBP/p300 (Fryer *et al.*, 2002) ce qui aura pour conséquence la transcription des gènes cibles de NOTCH.

#### **II.3.1.4. Rôle de la voie NOTCH au cours du processus myogénique**

Différentes études ont permis de conclure que la voie de signalisation NOTCH joue un rôle prépondérant dans la régulation du processus myogénique. La surexpression du ligand *Dll1* chez des embryons de poulet induit un arrêt de la différenciation des cellules précurseurs des muscles, accompagnée d'une sous-expression de *MyoD* (Delfini *et al.*, 2000). Dans les cellules myoblastiques murines C2C12, l'activation constitutive de la voie NOTCH par DLL1 favorise la transcription du gène cible *Hes1* par l'intermédiaire du complexe de co-activation. Ceci aboutit à une diminution de l'expression de *MyoD* et de la différenciation myogénique (Kuroda *et al.*, 1999). Néanmoins, un travail également effectué sur les C2C12 montre que l'inhibition de la différenciation peut également être observée en absence de la séquence d'interaction avec CBF1 porté par le NICD. Dans cette situation, le niveau transcriptionnel de *MyoD* n'est cependant pas affecté, suggérant que l'activité antagoniste de NOTCH sur MYOD nécessite la présence de CBF1 (Nofziger *et al.*, 1999). Une autre étude suggère que le NICD pourrait se fixer directement, *via* ses répétitions ankyrines, au facteur de transcription MEF2C l'empêchant ainsi de se fixer sur les régions promotrices de ses gènes myogéniques cibles et d'induire la différenciation (Wilson-Rawls *et al.*, 1999). Dans les embryons de souris, la signalisation NOTCH est essentielle au maintien des cellules PAX7+ dans un état prolifératif (Schuster-



**Figure 20. Structure des membres de la famille NFAT.**

Les protéines de la famille NFAT possèdent une structure similaire formée d'un domaine N-terminal de transactivation (TAD), un domaine d'homologie (NHR), excepté pour NFAT5, où se trouve les sites de liaison à la calcineurine, des motifs riches en sérine (SP, SRR), une séquence d'importation nucléaire (NLS) et une séquence d'exportation nucléaire (NES). On retrouve également, une région similaire au domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription Rel (RHR) et un domaine C-terminal (A). Chez l'Homme, les membres de la famille NFAT diffèrent les uns des autres notamment par la taille de leur partie C-terminale mais également par l'absence du NHR pour le NFAT5 (B). (D'après Shou *et al.*, 2015 ; Lee *et al.*, 2019).

Gossler *et al.*, 2007, Vasyutina *et al.*, 2007). Chez l'adulte, l'activité de la voie NOTCH est nécessaire au maintien des cellules satellites dans un état quiescent pendant l'homéostasie (Bjornson *et al.*, 2012 ; Mourikis *et al.*, 2012). Le knockdown de *Pofut1* dans les cellules myoblastiques murines C2C12 conduit à une forte baisse de l'activation de la voie NOTCH provoquant une diminution de la population cellulaire indifférenciée PAX7<sup>+</sup>/MYOD<sup>-</sup> associée à une entrée précoce dans le processus myogénique (Der Vartanian *et al.*, 2015).

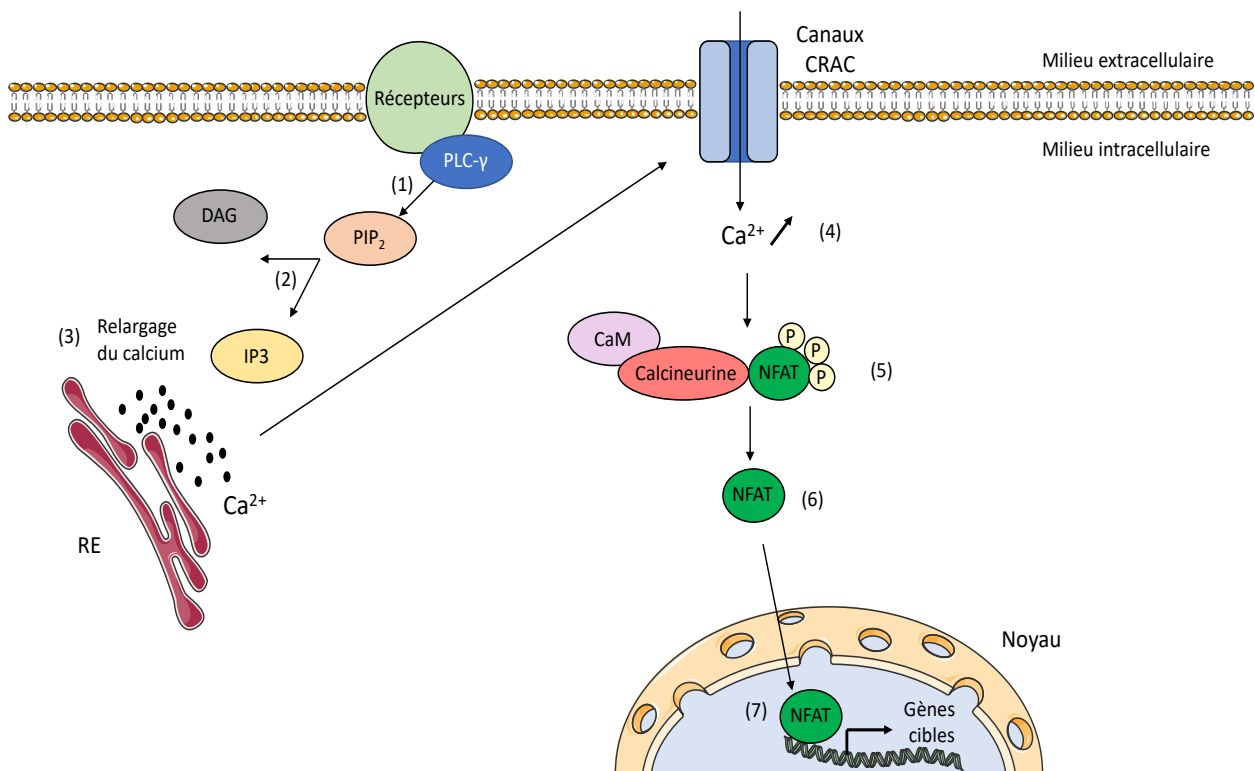
### **II.3.2. La voie de signalisation NFATc2/IL4**

#### **II.3.2.1. La famille des Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)**

A l'origine, les protéines NFAT ont été identifiées dans les cellules immunitaires comme des facteurs nucléaires capables d'induire la transcription de l'interleukine 2, IL-2 (Shaw *et al.*, 1998). La caractérisation de ces protéines a révélé que ces facteurs de transcription sont impliqués dans différents processus biologiques prenant place dans une grande variété de cellules telles que les chondrocytes, les adipocytes ou les cellules pancréatiques (Ho *et al.*, 1998 ; Ranger *et al.*, 2000 ; Buchholz *et al.*, 2006). La famille NFAT est constituée de cinq membres : NFAT1 (NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFAT ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3) présents chez les vertébrés et NFAT5 présent chez les métazoaires (Graef *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2013). Les protéines NFAT1 à 4 sont régulées par le calcium (Rao *et al.*, 1997 ; Hogan *et al.*, 2003) et NFAT5 est dépendant du stress osmotique (Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999).

#### **II.3.2.2. Structure des protéines NFAT**

Les protéines NFATs (**Figure 20**) possèdent un domaine N-terminal de transactivation (TAD). Les protéines NFAT1 à 4 possèdent un domaine conservé appelé Rel homology region (RHR) du fait de sa similarité structurale avec le domaine de liaison à l'ADN des facteurs de



**Figure 21. La voie de signalisation NFAT.**

La stimulation des récepteurs couplés à la PLC- $\gamma$  (phospholipase C- $\gamma$ ) conduit à l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) (1) en DAG (Diacylglycérol) et IP<sub>3</sub> (inositol1,4,5 triphosphate) (2), induisant le relargage du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (3). Il en résulte l'ouverture des canaux calciques CRAC favorisant l'entrée et l'augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique (4). Ceci est le signal permettant la formation du complexe calmoduline (CaM)/Calcineurine, qui va rentrer en contact avec le NFAT phosphorylé (5). Cette interaction provoque la déphosphorylation du NFAT (6) qui est ensuite transloqué dans le noyau où il se fixe sur les promoteurs de ses gènes cibles (7).



transcription Rel (Chen *et al.*, 1998). Elles sont également composées d'une région moins conservée nommée NFAT homology region (NHR) comportant en autres des sites de liaison à la calcineurine (Luo *et al.*, 1996). De plus, le NHR contient des domaines riches en sérines (motifs SRR et SP) pouvant être phosphorylées par différentes kinases de façon réversible suite à la fixation de la calcineurine, modulant ainsi la localisation cytoplasmique ou nucléaire du NFAT et donc l'activité transcriptionnelle. Lorsqu'il y a déphosphorylation des sérines, le signal NLS localisé dans le NHR est démasqué, induisant la translocation nucléaire de la protéine (Luo *et al.*, 1996). La re-phosphorylation des sérines du NHR masque le NLS et expose le signal NES (Nuclear Export Signal), lui aussi intégré au domaine NHR, ce qui a pour conséquence la translocation de la protéine vers le cytoplasme et l'inactivation de la signalisation jusqu'à une nouvelle stimulation (Okamura *et al.*, 2000). Quant à NFAT5, il présente une structure distincte et ne contient pas de site de liaison à la calcineurine, du fait de l'absence du domaine NHR (Macian, 2005).

### II.3.2.3. Activation de la voie de signalisation NFAT

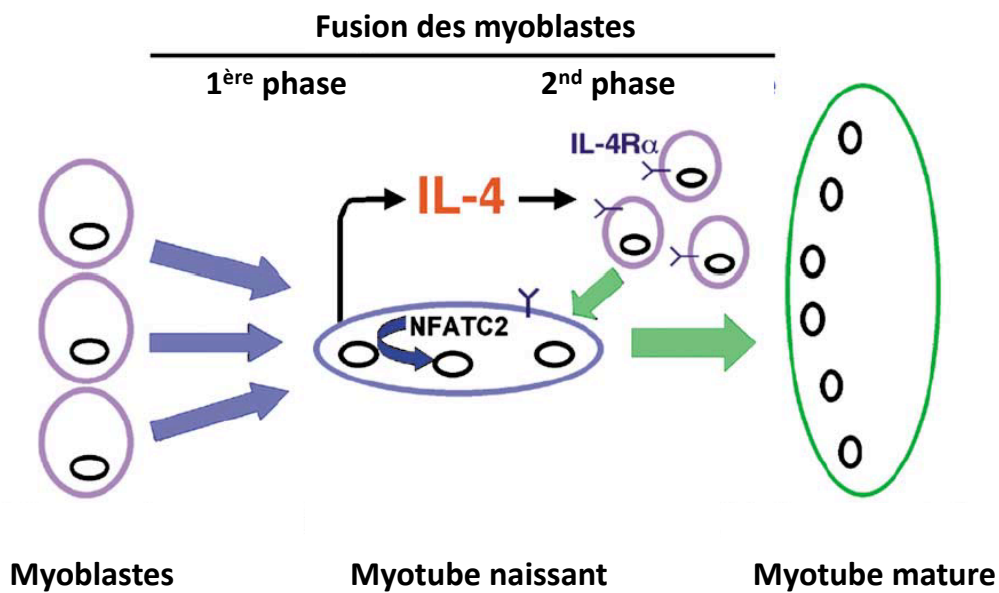
Lorsque la signalisation NFAT est inactive, les protéines NFAT résident dans le cytoplasme dans un état hautement phosphorylé par l'action des kinases NFAT constitutives. La stimulation des récepteurs membranaires liés à la signalisation calcique, provoque l'activation de la phospholipase C- $\gamma$  qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en inositol-1,4,5-triphosphates (IP3) et en diacylglycérol (**Figure 21**). L'IP3 induit la libération du calcium stocké dans les compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, permettant ainsi l'ouverture des canaux calciques CRAC membranaires et favorisant l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Il en résulte la formation du complexe calcium/calmoduline participant à la déphosphorylation par la calcineurine. Cette phosphatase dépendante du calcium va déphosphoryler les protéines NFATs qui pourront être transloquées dans le noyau pour induire la transcription de leurs gènes cibles. La diminution de



l'activation de la calcineurine conduit à la re-phosphorylation des protéines NFATs et à leur adressage vers le cytoplasme. Différentes kinases, telles que la casein kinase 1 (CK1), la glycogen synthase kinase 3 (GSK3), la p38 MAP kinase ou encore la c-Jun N-terminal kinase (JNK) sont capables de phosphoryler les protéines NFATs induisant leur exportation nucléaire par le masquage de la séquence NLS via un changement conformationnel, et contrecarrant ainsi leur activité transcriptionnelle (Beals *et al.*, 1997 ; Chow *et al.*, 1997 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Gomez del Arco *et al.*, 2000 ; Okamura *et al.*, 2004). En 2006, une kinase à double spécificité nommée DYRK est décrite comme une kinase clé régulant la phosphorylation de motifs distincts riches en sérines (SRR et SP) portés par les protéines NFATs (Arron *et al.*, 2006 ; Gwack *et al.*, 2006). DYRK phosphoryle le motif SP-3 enclenchant la phosphorylation des domaines riches en sérines tels que SRR-1 et SP-2 par la CK1 et la GSK3, facilitant l'inactivation des protéines NFATs par phosphorylation (Gwack *et al.*, 2006). Enfin, la sumoylation qui est une modification post-transcriptionnelle consistant en la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur une lysine acceptrice d'une protéine cible peut augmenter la transcription des gènes cibles de protéines NFATs en promouvant leur rétention nucléaire (Terui *et al.*, 2004).

#### **II.3.2.4. Rôle de la voie de signalisation NFATc2/IL-4 au cours du processus myogénique**

Bien que les protéines NFATs soient impliquées dans la transcription de gènes régulant la prolifération et la différenciation de divers types cellulaires (Horsley et Pavlath, 2002 ; Wu *et al.*, 2007), peu d'études s'intéressent à la voie de signalisation NFATc2/IL-4 dans le contexte myogénique. Dans un travail réalisé par Horsley et collaborateurs en 2001, l'induction en différenciation de cultures primaires de myoblastes issues de souris KO pour le gène *Nfatc2*, conduit à la formation de petits myotubes avec un faible nombre de noyaux. La surexpression de *Nfatc2* dans les myoblastes *Nfatc2*<sup>-/-</sup>, permet le retour à un phénotype sauvage. Les souris



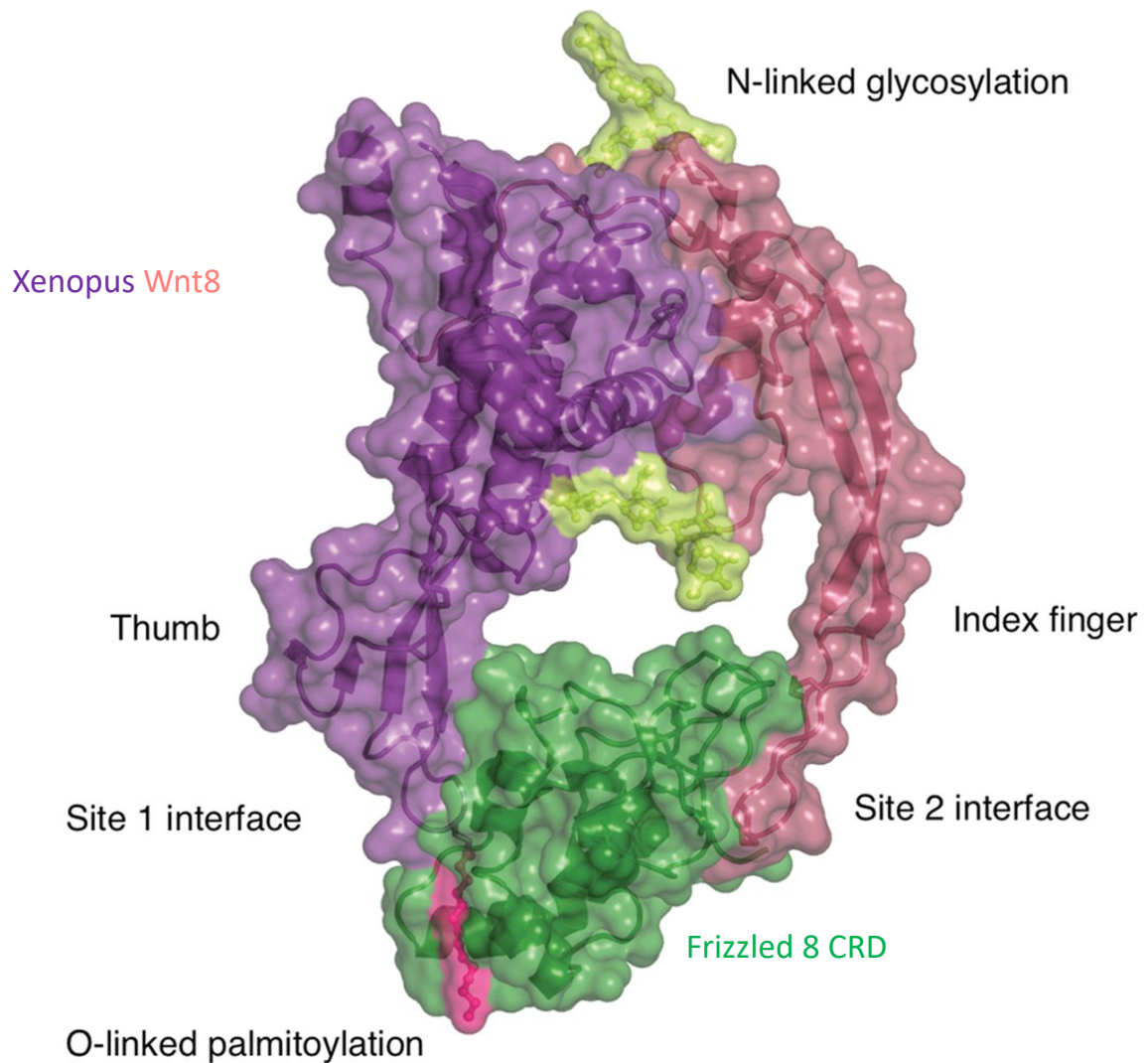
**Figure 22. Implication de la voie de signalisation NFATc2/IL-4 dans le processus myogénique.**

Au cours de la première phase de la fusion myoblastique, des myoblastes différenciés fusionnent ensemble pour former un myotube naissant. Sous le contrôle du facteur de transcription NFATc2, la sécrétion de l'interleukine 4 (IL-4) par les myotubes naissants, permet le recrutement des cellules de réserve environnantes exprimant à leur surface le récepteur à l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ). Cette seconde phase de fusion est nécessaire à la croissance des myotubes. (Horsley *et al.*, 2003).

*Nfatc2*<sup>-/-</sup> présentent à la fois une diminution de la masse musculaire squelettique et de la taille des myofibres, sans toutefois en affecter le nombre. Ces observations suggèrent que le NFATc2 joue un rôle prépondérant dans la seconde phase du processus de fusion myogénique. Un des mécanismes par lequel NFATc2 peut contrôler la fusion myoblastique est sa capacité à induire la production de l'interleukine 4 (IL-4), dont le gène porte dans sa région promotrice des sites de fixation pour le NFATc2, par les myotubes naissants (**Figure 22**) (Horsley *et al.*, 2003). L'IL-4 peut interagir avec un récepteur membranaire de type I formé des sous unités IL4-R $\alpha$  et  $\gamma$ c, ainsi qu'avec un récepteur membranaire de type II constitué des sous unités IL4-R $\alpha$  et IL13-R $\alpha$  (Ul-Haq *et al.*, 2016). Ces deux récepteurs ont en commun la sous-unité IL4-R $\alpha$  et de ce fait l'expression du récepteur à l'IL-4 est caractérisée selon l'expression de cette sous-unité. Tandis que l'expression du récepteur à l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) reste inchangée dans toutes les cellules musculaires au cours du processus myogénique, la production de l'IL-4 augmente suite à l'entrée en différenciation des cellules, sous la dépendance du NFATc2. Les souris KO pour l'*Il4* ou l'*Il4-ra* ont des myofibres de diamètre inférieur à celui des souris sauvages mais équivalent à celui observé chez les souris *Nfatc2*<sup>-/-</sup>. Les mécanismes par lesquels l'IL-4 induit la fusion secondaire restent à préciser. Cependant, compte tenu de l'implication de l'IL-4 dans la fusion des macrophages entre eux pour former des cellules multinucléées (Kitazawa *et al.*, 1995), cette interleukine pourrait participer à la fusion secondaire par un mécanisme de chimiotactisme (Lind *et al.*, 1995), mais également en induisant la production de molécules d'adhésion cellulaire telles que les ICAM (InterCellular Adhesion Molecule) (Marino *et al.*, 2001).

### II.3.3. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

Les glycoprotéines WNT (Wingless-type MMTV integration site) sont des ligands sécrétés régulant différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la division asymétrique ou encore le devenir cellulaire (Moon *et al.*, 2002 ; Borello *et al.*, 2006).



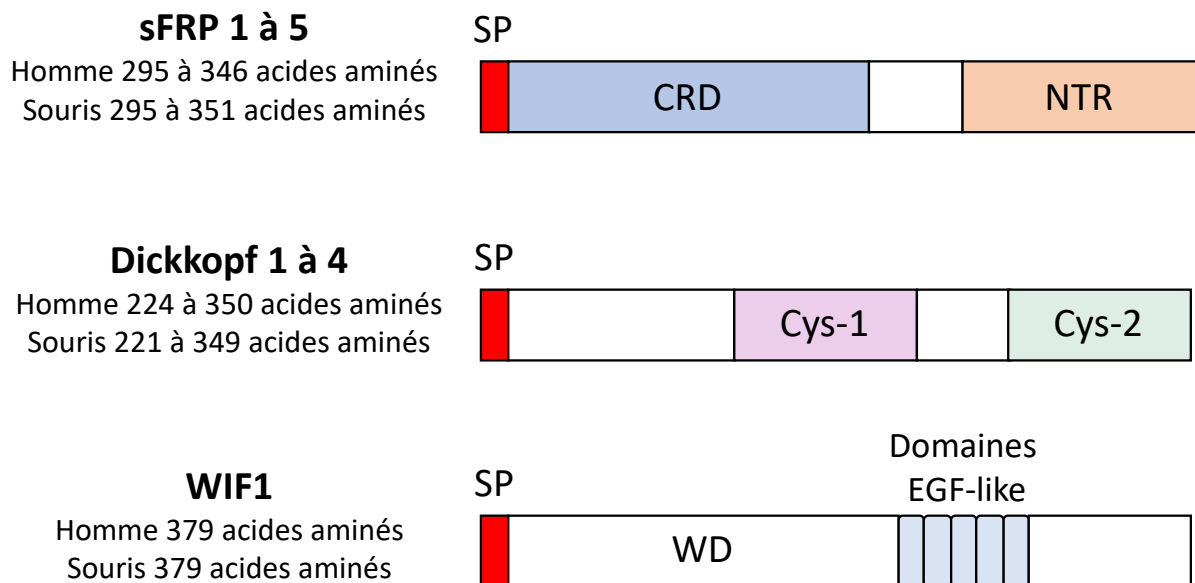
**Figure 23. Structure cristallographique du complexe XWnt8-Fz8CRD.**

Wnt8 de *xenopus* (violet/rose) possède une structure ressemblant à un pouce (Thumb) et un index (Index finger) saisissant par leurs extrémités (sites 1 et 2), la protéine Frizzled8-CRD murine (en vert). Le domaine N-terminal (NTD) et le domaine C-terminal (CTD) sont respectivement colorés en violet et en rouge. Le rôle de la *N*-glycosylation du NTD est peu connu mais elle pourrait participer à la sécrétion des protéines WNT dans le milieu extracellulaire. La présence d'acide palmitoléique au niveau du site d'interaction 1 et d'acides aminés hydrophobes dans la région du site d'interaction 2 favorisent la formation du complexe XWnt8-Fz8-CRD. (D'après Janda et Garcia 2015).

L'initiation de ces processus fait suite à la fixation des protéines WNT sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G, appelés Frizzled (Fz) associés au co-récepteur LRP (LDL-Related Protein). La voie de signalisation la plus connue faisant intervenir les protéines WNT est nommée voie canonique. Elle implique notamment la stabilisation et la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau. Celle-ci se complexe avec des membres de la famille des facteurs de transcription TCF/LEF pour activer des gènes cibles. En absence des WNT, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée provoquant par la suite sa dégradation par le protéasome.

### II.3.3.1. La famille des glycoprotéines WNT

Depuis l'identification du premier gène codant pour une protéine WNT appelé *int-1* (Nusse et Varmus, 1982), différentes études ont montré l'impact de cette famille de glycoprotéines dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la division asymétrique ou encore le devenir cellulaire (Moon *et al.*, 2002 ; Borello *et al.*, 2006). À ce jour, 19 gènes codant pour les protéines WNT ont été identifiés chez les Mammifères (Miller, 2002). Ce sont des protéines d'environ 350-400 acides aminés, riches en cystéines conservées entre les espèces (MacDonald *et al.*, 2009) participant via la présence de ponts disulfures à la structure secondaire. Malgré l'importance physiologique de la signalisation WNT, la caractérisation des glycoprotéines WNT fut lente en raison des difficultés inhérentes à la purification de la forme native de celles-ci (Willert et Nusse, 2012). Cependant, la co-expression de la protéine Wnt8 du xénope avec le domaine de liaison riche en cystéines (CRD) du récepteur Frizzled (Fz) 8 murin a permis, par cristallisation, la description structurale des protéines WNT (**Figure 23**) (Janda *et al.*, 2012). Celles-ci sont constituées d'un large domaine N-terminal (NTD) ou D1 et d'un domaine C-terminal (CTD) ou D2. Le NTD est composé d'un cluster d'hélices  $\alpha$  avec dix résidus cystéines formant cinq ponts disulfures. Elles possèdent également dans leur partie N-terminale, un peptide signal de sécrétion. Le CTD est quant à lui formé de deux feuillets  $\beta$  maintenus par six ponts disulfures. Une fois produites, des vésicules



**Figure 24. Les antagonistes majeurs des protéines WNT.**

Les protéines sFRP possèdent un domaine CRD (Cystein-rich domain) comme le récepteur Frizzled (Fz), leur permettant d'entrer en compétition avec lui au moment de la liaison avec les protéines WNT. Elles sont également composées d'un domaine NTR (Netrin-like domain) impliqué dans les liaisons aux HSPGs. Les protéines Dickkopf sont constituées de deux domaines incluant 10 résidus cystéines conservés, Cys-1 et Cys-2. Ces domaines rentrent en interaction avec le co-récepteur LRP5/6. La protéine WIF1 via son domaine WIF (WD) se fixe aux protéines WNT empêchant leur liaison aux récepteurs Frizzled et l'activation de la voie de signalisation. Elle entre aussi en compétition avec l'interaction des WNT à des récepteurs à tyrosine kinase (famille RYK). (D'après Kawano et Kypta, 2003).



lipoprotéiques sont chargées de transporter les protéines WNT dans l'espace intercellulaire où elles exercent leur activité (Panakova *et al.*, 2005 ; Neumann *et al.*, 2009). Les ligands WNT restent associés à la matrice extracellulaire notamment par l'intermédiaire des héparanes sulfates (Reichsman *et al.*, 1996 ; Binari *et al.*, 1997). Dans un premier temps, la famille WNT a pu être divisée en deux groupes sur la base de leur capacité à induire des changements morphologiques sur les cellules mammaires épithéliales murines C57MG (Wong *et al.*, 1994). D'un côté, le groupe induisant de forts changements (WNT1, WNT2, WNT3 et WNT3a) et de l'autre, le groupe provoquant peu ou pas de variations morphologiques (WNT4, WNT5a, WNT5b, WNT6, WNT7a et WNT7b) (Shimizu *et al.*, 1997). Dans un second temps, le groupe de protéines WNT transformantes a été associé à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine canonique tandis que celui des protéines WNT peu ou pas transformantes a été uni à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine non canonique. La mécanique d'action autocrine et paracrine des ligands WNT peut être inhibée par l'action de protéines régulatrices de la voie WNT. Parmi les protéines inhibitrices de cette signalisation, on retrouve notamment les secreted Frizzled-related proteins (sFRFs), les Dickkopf proteins (DKKs) et Wnt-inhibitory factor 1 (WIF1) (**Figure 24**). Chez l'Homme et la souris, la famille sFRP est composée de cinq glycoprotéines sécrétées possédant un domaine riche en cystéine (CRD) présentant jusqu'à 50% de similarité avec le CRD des récepteurs Frizzled. Les sFRP peuvent interagir avec les protéines WNT empêchant ainsi leur fixation aux récepteurs Frizzled ou bien former un complexe d'inhibition avec les récepteurs Frizzled (Bafico *et al.*, 1999). Les protéines DKKs, quant à elles, bloquent la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine en se fixant sur le co-récepteur LRP5/6 (Lipoprotein related protein 5/6) et l'isole ainsi du complexe d'activation (Kawano et Kypta, 2003 ; Malinauskas et Jones, 2014). La protéine WIF1 a été pour la première fois décrite comme un régulateur négatif des voies canonique et non canonique WNT en 1999 (Hsieh *et al.*, 1999). Cette protéine est constituée d'un peptide signal N-terminal, d'un domaine WIF conservé (WD), de cinq domaines EGF-like



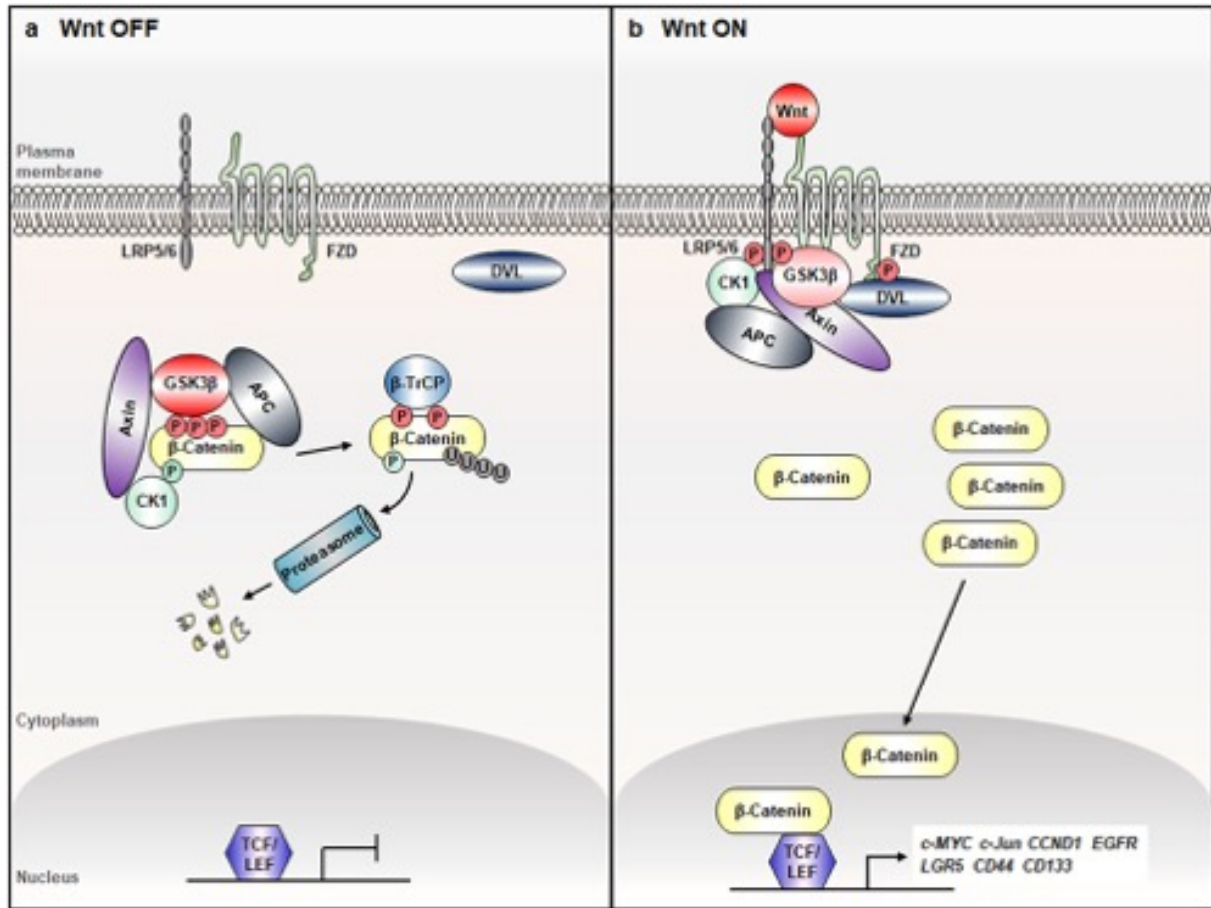
de type hEGF et d'une queue C-terminale hydrophile. Les domaines EGF-like peuvent se fixer aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) renforçant ainsi l'interaction entre WIF1 et les ligands WNT (Avanesov *et al.*, 2012). Dans le domaine WD, une zone de liaison aux phospholipides a été identifiée permettant l'interaction avec les protéines WNT palmitoylées (Malinauskas *et al.*, 2011). De plus, les récepteurs à tyrosine kinase de la famille RYK, impliqués dans la signalisation WNT, contiennent également un domaine WIF suggérant que la protéine WIF1 pourrait entrer en compétition avec ces récepteurs pour fixer les protéines WNT (Kawano et Kypa, 2003 ; Malinauskas et Jones 2014).

### II.3.3.2. La $\beta$ -caténine

La  $\beta$ -caténine a été découverte à la fin des années 80. L'équipe dirigée par Rolf Kemler a caractérisé la  $\beta$ -caténine en compagnie de deux autres molécules, l' $\alpha$ -caténine et la  $\gamma$ -caténine, comme étant des protéines associées à la E-cadhérine qui est un acteur clé de l'adhésion dépendante du calcium (Vestweber et Kemler, 1984). Elles ont été nommées caténines (du latin *catena* signifiant chaîne) en raison de leur rôle dans l'ancrage des cadhérines aux structures du cytosquelette (Ozawa *et al.*, 1989). La signalisation dépendante de la  $\beta$ -caténine a, quant à elle, été étudiée quelques années auparavant via son orthologue chez la drosophile appelé Armadillo (Wieschaus *et al.*, 1984). Il s'avère que des embryons mutants pour *Armadillo* arborent une segmentation altérée, semblable à ceux présentant une mutation nulle pour *Wingless* (de l'anglais « sans ailes ») codant une glycoprotéine homologue des représentants de la famille WNT (Wieschaus et Riggleman, 1987). Une analyse épistatique a permis de démontrer que le rôle d'Armadillo dans la segmentation embryonnaire est régulé par *Wingless* (Riggleman *et al.*, 1990). Cette étude a permis d'approfondir plus en détail les mécanismes régulant la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (*Wingless/Armadillo*), comme notamment le rôle stabilisateur de la kinase *Shaggy/ZestWhite3* (GSK3 chez les vertébrés) sur *Armadillo* (Siegfried *et al.*, 1994). Enfin, dans les années 90, différentes études ont mis en lumière que la fonction nucléaire de la



$\beta$ -caténine/Armadillo est médiée par les facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor) (Behrens *et al.*, 1996 ; Huber *et al.*, 1996 ; Molenaar *et al.*, 1996 ; Brunner *et al.*, 1997 ; van de Wetering *et al.*, 1997). Les propriétés de signalisation de la  $\beta$ -caténine s'expliquent de par sa composition structurale. Chez l'Homme, la  $\beta$ -caténine est une protéine de 781 acides aminés comportant un domaine central composé de 12 répétitions dites « non parfaites » du motif Armadillo (R1 à R12) flanquées par des domaines N-terminal et C-terminal. Le premier porte un site de liaison pour l' $\alpha$ -caténine et des sites de phosphorylation par la GSK3 $\beta$  et CSK-1 reconnues par les protéines ubiquitine-ligases ( $\beta$ -TrCP) responsable de la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Xu et Kimelman, 2007). A l'extrémité proximale du domaine C-terminal se trouve une hélice conservée (Hélice-C) jouant un rôle majeur dans le recrutement des co-activateurs transcriptionnels, et par conséquent dans l'activation des gènes cibles des protéines WNT (Xing *et al.*, 2008). Les répétitions Armadillo (AMR) R5 à R10 forment le site de liaison aux TCF, aux cadhérines membranaires mais également à la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) régulateur cytoplasmique de la concentration en  $\beta$ -caténine. Les répétitions AMR R3 et R4 constituent un site de fixation pour les TCF, l'APC ainsi que pour l'Axine (Xu et Kimelman, 2007). Les membres de la famille des TCF interagissent donc avec les répétitions AMR R3 à R10 et ancrent la  $\beta$ -caténine au niveau de promoteurs transcriptionnels spécifiques (Xing *et al.*, 2008). De plus, les répétitions R1 et R11 jusqu'à la partie C-terminale de la  $\beta$ -caténine sont impliquées dans la transactivation des gènes cibles des glycoprotéines WNT (Xing *et al.*, 2008). Les domaines N- et C-terminaux, chargés négativement, participent à la flexibilité structurale de la  $\beta$ -caténine (Xu et Kimelman, 2007). Ils jouent également un rôle de chaperons intramoléculaires des répétitions Armadillo augmentant leur spécificité de liaison tout en prévenant leur agrégation (Xing *et al.*, 2008).



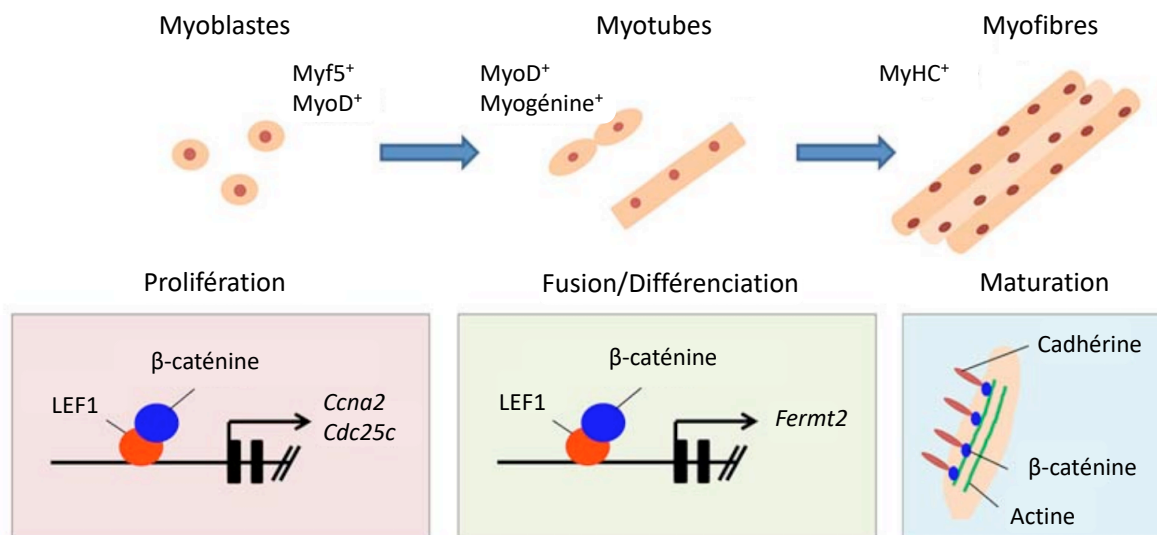
**Figure 25. La voie de signalisation Wnt/β-caténine canonique.**

En absence de fixation d'un ligand WNT, les protéines APC (adenomatous polyposis coli) et Axine sont recrutées pour former le complexe de dégradation de la β-caténine. Les protéines CK1α (casein kinase 1 α) et GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) vont phosphoryler la β-caténine. Cela induit le recrutement de la β-TrCP (β-transducin repeat-containing protein) qui va ubiquitinyler la β-caténine et engendrera sa dégradation par le protéasome. La β-caténine ne peut donc pas se fixer sur les TCF/LEF nucléaires et induire l'expression des gènes cibles. En présence d'un ligand WNT, l'Axine s'associe avec la partie intracellulaire du co-récepteur LRP5/6 (lipoprotein receptor-related protein 5/6) et la protéine DVL (Dishevelled); cette dernière se fixe au récepteur FZD (Frizzled), provoquant la dissociation du complexe de dégradation de la β-caténine. On observe ainsi une augmentation de la quantité de β-caténine cytoplasmique. Celle-ci sera transloquée dans le noyau où elle se fixera au complexe TCF/LEF induisant la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. (Jeong *et al.*, 2018).

### II.3.3.3. Activation et fonctionnement de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

Lorsque la voie de signalisation associée aux protéines WNT fait intervenir la  $\beta$ -caténine, elle est dite canonique (**Figure 25**). Parallèlement, la voie de signalisation impliquant les protéines WNT indépendamment de la  $\beta$ -caténine est dite non canonique. Celle-ci peut être induite par le flux de calcium ou les Rho GTPases (Kühl *et al.*, 2000 ; Habas *et al.*, 2001). La suite de l'exposé se focalisera sur la description de la voie canonique.

En absence de WNT lié à son récepteur Frizzled (Fz), la  $\beta$ -caténine est la cible d'un complexe multiprotéique de dégradation, formé du suppresseur de tumeur APC, de l'Axine et de la glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Miller et Moon, 1996 ; Willert et Nusse, 1998). La GSK3 $\beta$  et la casein kinase CK1 $\alpha$  vont phosphoryler les résidus sérines et thréonines de la  $\beta$ -caténine (Rubinfeld *et al.*, 1996) qui sera alors reconnue par la protéine  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat containing E3 ubiquitine protein ligase) induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997). Lorsque le ligand WNT se fixe à son récepteur Frizzled associé au co-récepteur LRP5/6, l'activité kinase du complexe de dégradation est inhibée, favorisant la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. Ce mécanisme implique le recrutement de l'Axine au niveau de la membrane plasmique et d'une protéine de liaison à l'Axine nommée Dishevelled (DVL) (Wharton, 2003 ; Itoh *et al.*, 2005). L'accumulation de la  $\beta$ -caténine cytosolique provoque sa translocation dans le noyau, où elle interagit avec la partie N-terminale des protéines de liaison à l'ADN TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhanced factor) (Behrens *et al.*, 1996 ; Molenaar *et al.*, 1996 ; van de Wetering *et al.*, 1997). Cette interaction active la fonction transcriptionnelle des TCF/LEF, qui étaient jusqu'alors réprimée par leur interaction avec la protéine Groucho (Daniels et Weis, 2005).



**Figure 26. L'implication de la voie Wnt/β-caténine au cours du processus myogénique.**

La voie Wnt/β-caténine régule la phase de prolifération des myoblastes en modulant l'expression des gènes *Ccna2* et *Cdc25c* impliqués dans le cycle cellulaire. Elle gouverne également la phase de fusion/différenciation en permettant l'expression du gène *Fermt2* codant pour une protéine de la matrice extracellulaire. La β-caténine, en association avec la cadhérine et l'actine forment un complexe indispensable à la maturation des myofibres. (D'après Suzuki *et al.*, 2015).



#### II.3.3.4. Rôle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine au cours du processus myogénique

Différentes études montrent que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle crucial au cours du processus myogénique (**Figure 26**). Les souris *Ctnnb1*<sup>-/-</sup> (gène codant la  $\beta$ -caténine) déficientes pour la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine meurent au stade embryonnaire E8.5 avec une forte nécrose cellulaire (Haegel *et al.*, 1995). Au cours de la myogenèse axiale, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est cruciale pour la formation du dermomyotome et du myotome (Ikeya et Takada, 1998 ; Linker *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2004 ; Hutcheson *et al.*, 2009). Les ligands WNT sont capables de réguler positivement le nombre de progéniteurs exprimant *Pax3* et *Pax7* au sein du dermomyotome (Galli *et al.*, 2004 ; Otto *et al.*, 2006). Les souris présentant un KO conditionnel du gène de la  $\beta$ -caténine au sein des cellules *Pax7*<sup>+</sup> montrent une diminution de la formation des myofibres lents au cours de la myogenèse fœtale (Hutcheson *et al.*, 2009). Les souris possédant une forme constitutivement activée de la  $\beta$ -caténine ont une réduction de la taille des fibres musculaires, une défasciculation correspondant à une sortie d'axones de l'axe nerveux, une ramification nerveuse anormale et une augmentation du nombre d'axones moteurs provoquant une létalité néonatale (Liu *et al.*, 2012). Ces différentes études indiquent que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine doit être finement régulée au cours de la myogenèse. Les ligands WNT peuvent induire l'expression de *Myf5* et *MyoD* (Münsterberg *et al.*, 1995 ; Maroto *et al.*, 1997 ; Borello *et al.*, 2006 ; Brunelli *et al.*, 2007). Ils régulent également la spécification des myoblastes dans le mésoderme paraxial et l'induction localisée de l'expression des MRFs, gouvernant ainsi la détermination et la différenciation des cellules musculaires (Cossu et Borello, 1999). La prolifération myoblastique est sous le contrôle des gènes *Ccna2* et *Cdc25*, impliqués dans le cycle cellulaire, qui sont eux-mêmes régulés par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules C2C12 ainsi que dans les myoblastes primaires isolés de la langue et des membres postérieurs de souris (Suzuki *et al.*,



2015). La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine peut induire la prolifération des cellules satellites au cours de la régénération musculaire (Otto *et al.*, 2008). Le traitement d'embryons de souris avec l'antagoniste sFRP3 des ligands WNT réduit la myogenèse squelettique de manière dose dépendante (Borello *et al.*, 1999). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine participe donc aussi bien à la phase de prolifération myogénique qu'au développement et à la régénération musculaire.

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est aussi impliquée dans la phase de fusion myoblastique. L'inhibition de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine augmente la différenciation des myoblastes et des cellules satellites (Polesskaya *et al.*, 2003 ; Rochat *et al.*, 2004 ; Brack *et al.*, 2008). L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par le ligand WNT3a ou le chlorure de lithium (LiCl, inducteur pharmacologique) augmente la fusion myoblastique des cellules C2C12 en cours de différenciation (Pansters *et al.*, 2011). Enfin, la stimulation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par l'insuline, le ligand WNT1 ou le LiCl conduit à une entrée en différenciation des cellules de réserve aboutissant à l'hypertrophie des myotubes préexistants (Rochat *et al.*, 2004). Une étude récente a montré que l'expression du gène *Fermt2* dans les cellules C2C12 est régulée par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au cours de la fusion et de la différenciation myogénique (Suzuki *et al.*, 2015). En effet, dans la région promotrice du gène *Fermt2*, se trouve un site de liaison LEF1 où peut se fixer la  $\beta$ -caténine et induire son expression nécessaire au processus myogénique. Enfin, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est nécessaire à la maturation des myofibres par l'intermédiaire du complexe formé entre la cadhérine, la  $\beta$ -caténine et l'actine au cours des contacts cellule-cellule (Kemler, 1993 ; Suzuki *et al.*, 2015). Ces études démontrent l'implication de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dès la différenciation myogénique jusqu'à l'étape de maturation.

#### **II.3.4. Autres voies de signalisation impliquées dans la différenciation myogénique**

D'autres voies de signalisation jouent un rôle dans la différenciation myogénique mettant en jeu des hormones et des facteurs de croissance. On retrouve notamment les signali-



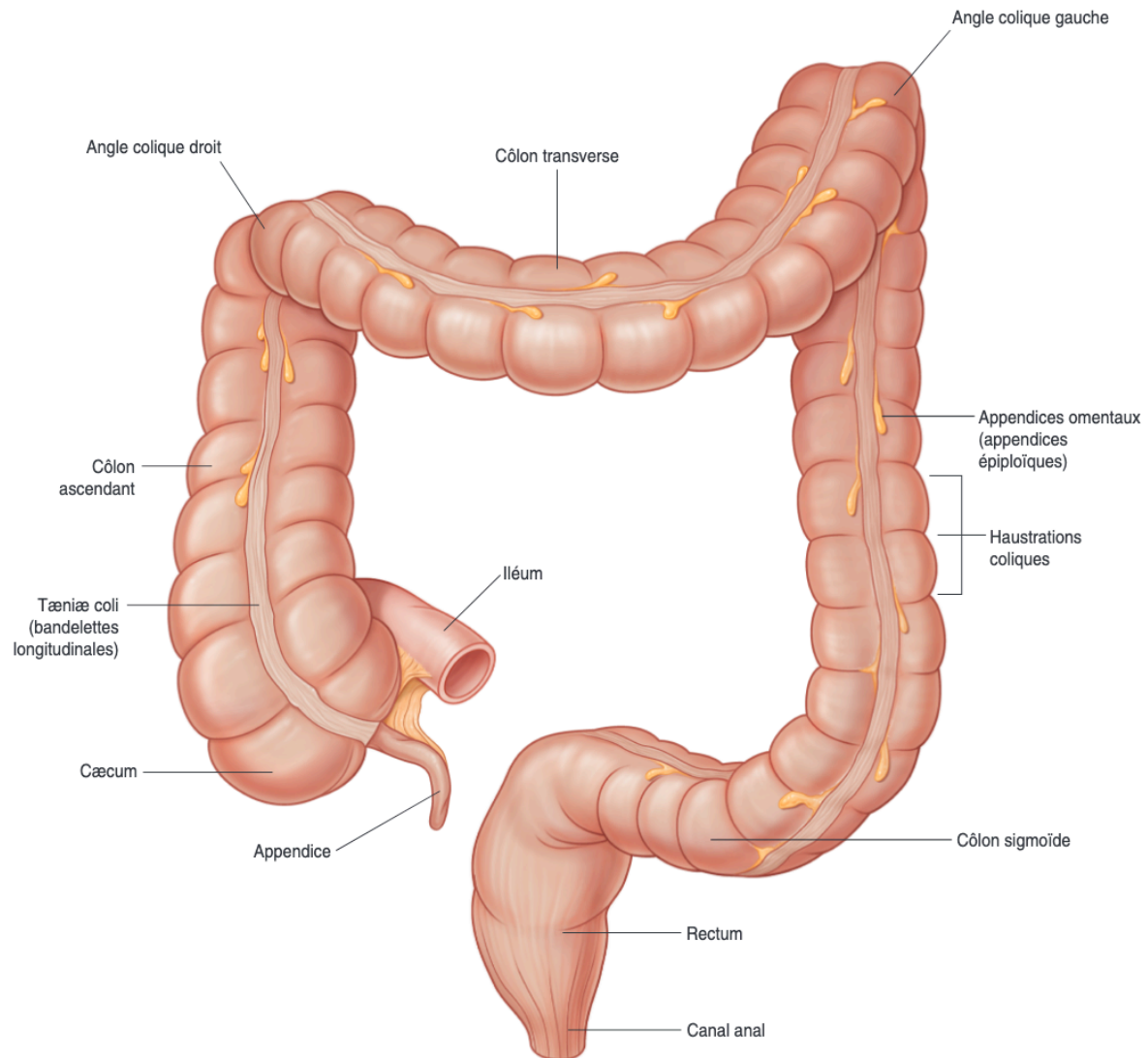
sations ERK/MAPK, p38 MAPK et PI3K/AKT. Premièrement, la voie ERK/MAPK est impliquée dans des processus favorisant la différenciation terminale myoblastique (Li et Johnson, 2006) ou l'inhibant en présence de myostatine (Yang *et al.*, 2006). La voie p38 MAPK contrôle positivement la différenciation myogénique, en partie *via* l'activation du facteur MEF2C (Zetser *et al.*, 1999). La signalisation PI3K/AKT favorise le processus myogénique suite à une stimulation du facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGF) (Coolican *et al.*, 1997 ; Tureckova *et al.*, 2001). Finalement, la kinase Janus (JAK) et l'activation de la voie STAT sont également des régulateurs du processus myogénique. En effet, la voie JAK2-STAT2-STAT3 par l'intermédiaire de MYOD et MEF2 favorise la différenciation (Wang *et al.*, 2008). Néanmoins, en réponse au facteur leucémique inhibiteur (LIF), la signalisation JAK1-STAT1-STAT3 promeut la prolifération tout en empêchant l'entrée précoce des myoblastes en différenciation (Sun *et al.*, 2007).

#### **II.4. POFUT1 et O-fucosylation dans le processus myogénique**

A ce jour peu d'études se sont intéressées à l'implication de la O-fucosylation médiée par POFUT1 au cours du processus myogénique. Néanmoins, des travaux réalisés au sein de mon laboratoire d'accueil montrent que le knockdown de *Pofut1* réduit la voie de signalisation NOTCH et affecte la différenciation des cellules myoblastiques murines C2C12. Les expressions des marqueurs myogéniques *Pax7* et *MyoD* sont altérées, si bien que la population de cellules PAX7<sup>+</sup>/MYOD<sup>-</sup> (cellules indifférenciées) diminue en faveur d'une entrée en différenciation précoce des cellules (Der Vartanian *et al.*, 2015). In vivo, le knockout de *Pofut1* est létal au stade embryonnaire E9.5 et le phénotype associé est similaire à celui présent chez les souris dont la voie NOTCH est inactive (Shi et Stanley, 2003). En 2009, une mutation spontanée au sein de gène *Pofut1* appelée *Pofut1<sup>cax</sup>* a été décrite chez des souris (Schuster-Gossler *et al.*, 2009). Les souris *Pofut1<sup>cax/cax</sup>* possèdent l'insertion d'un élément IAP (Intracisternal A particle) dans le quatrième intron du gène *Pofut1*. Cette insertion conduit à la



formation d'un allèle hypomorphe et à une diminution de l'expression du gène sans altération de la structure et de l'activité enzymatique de l'enzyme. Une autre étude effectuée dans mon laboratoire d'accueil s'est penchée sur l'étude des muscles squelettiques des souris *Pofut1<sup>cax/cax</sup>* (Al Jaam *et al.*, 2016). Chez ces mutants homozygotes, les fibres musculaires sont hypertrophiées avec une accréction nucléaire augmentée. De plus, le nombre de cellules satellites PAX7<sup>+</sup> est réduit. En effet, la mise en culture des myoblastes dérivés des cellules satellites *Pofut1<sup>cax/cax</sup>* montre une déplétion des cellules progénitrices PAX7<sup>+</sup>/MYOD<sup>-</sup> et une diminution de l'expression de *Pax7*. Il est également observé une altération du programme myogénique conduisant à une entrée précoce en différenciation des myoblastes dérivés des cellules satellites. *In vivo*, celles-ci fusionneraient avec les myofibres préexistantes ce qui pourraient être la cause de l'augmentation du poids de certains muscles squelettiques, détectée au cours des premières semaines de vie post-natale des souris *Pofut1<sup>cax/cax</sup>*. Finalement, il a été montré que l'expression de *Pofut1* diminue dans les muscles squelettiques de souris, dès les 20 premiers mois de la période post-natale (Zygmunt *et al.*, 2017). Le knockdown prématuré de *Pofut1* chez des souris jeunes, provoque un vieillissement des myofibres avec une diminution de la taille et de la force des muscles. De plus, il altère le potentiel d'auto-renouvellement et régénératif des cellules satellites, auquel s'ajoute une dégénérescence accrue des innervations neuromusculaires.



**Figure 27. Organisation anatomique du côlon et du rectum.**

Le gros intestin correspondant à la partie terminale du tube digestif peut être divisé en deux parties que sont le côlon et le rectum. Le côlon est subdivisé en trois segments : le côlon ascendant ou droit, le côlon transverse et le côlon descendant ou gauche. Schéma issu de la société Nationale Française de gastro-entérologie.



# Chapitre III. Implication de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 dans un contexte pathologique : le cancer colorectal

---

## III.1. Généralités sur le cancer colorectal

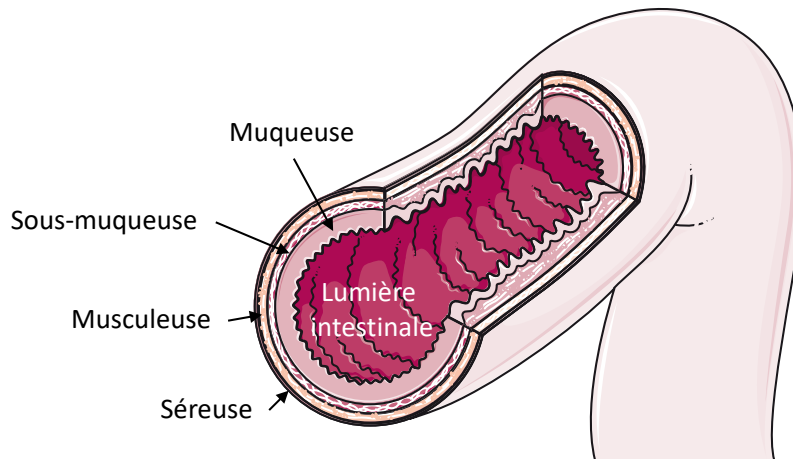
### III.1.1. Anatomie du côlon et du rectum

Le côlon fait partie de la zone terminale du canal alimentaire, et s'étend du cæcum au rectum (**Figure 27**). La fonction principale de cet organe est de finaliser l'absorption des nutriments et de l'eau, de synthétiser des vitamines grâce au microbiote, de former les selles et de les éliminer de l'organisme. Le côlon est deux fois moins long que l'intestin grêle mais son diamètre deux fois plus important. Il peut être subdivisé en quatre segments : le côlon ascendant ou droit, le transverse, le côlon descendant ou gauche et le côlon sigmoïde.

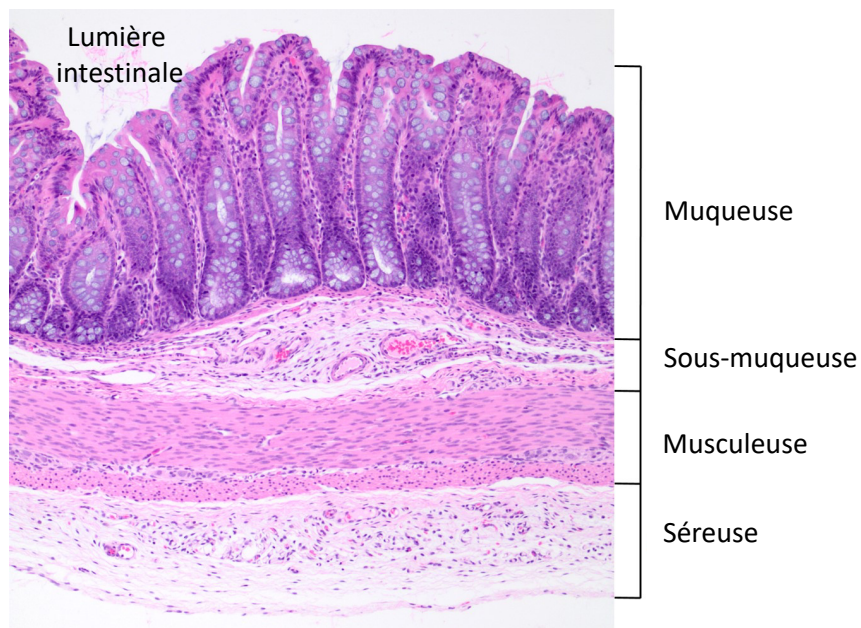
Le côlon ascendant ou droit, mesurant environ 15 centimètres, débute à partir du cæcum en face de la valve colique, et se prolonge jusqu'à la face inférieure du lobe droit du foie, à droite de la vésicule biliaire, avant de se courber vers l'avant-gauche pour former l'angle hépatique. Le côlon ascendant est recouvert par le péritoine sur ses faces antérieure et latérales. La face postérieure est reliée à un tissu aréolaire appelé fascia de Toldt. Il résulte d'un processus embryologique de fusion entre le mésentère et le péritoine pariétal postérieur.

Le côlon transverse, mesurant approximativement 45 centimètres, est le plus long segment du gros intestin. Il décrit une convexité descendante à partir de la région hypochondriaque droite à travers l'abdomen, jusqu'à la région hypochondriaque gauche où sa courbure sous la partie inférieure de la rate forme l'angle colique. Le côlon transverse est presque en totalité recouvert par le péritoine, et relié à la paroi abdominale par le mésocôlon transverse.

A.



B.



**Figure 28. Les différentes couches de la paroi intestinale.**

Les parois colique et rectale sont constituées de quatre couches tissulaires : la muqueuse (la plus interne, au contact de la lumière intestinale), la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (couche la plus externe). (A. D'après Servier medical art ; B. D'après <https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/chapter/8-general-histologic-anatomy-of-the-tubular-digestive-tract/>)

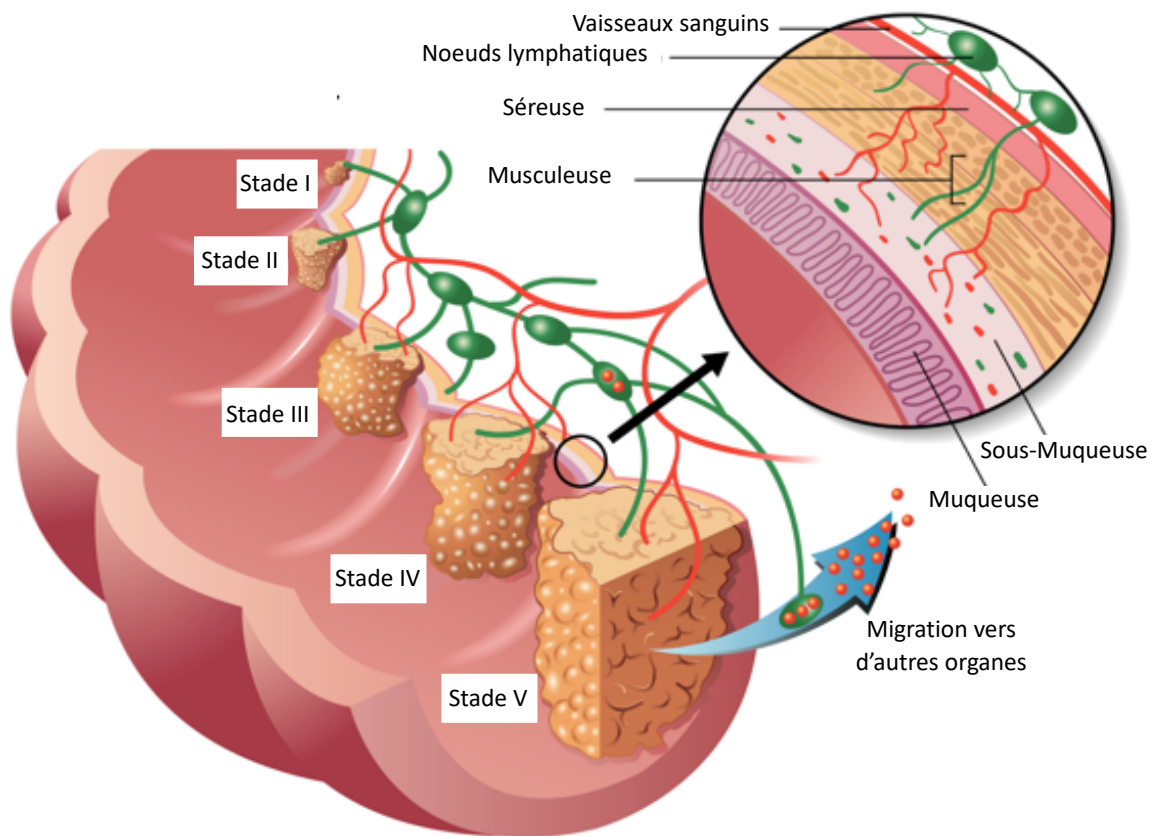
Le côlon descendant ou gauche, plus étroit que le côlon transverse, se dirige vers le bord latéral du rein gauche en passant par les régions hypocondriaques et lombaires gauches. Il décrit ensuite un virage vers l'intérieur en direction du psoas puis descend vers la crête iliaque. Le péritoine recouvre sa face antérieure et ses bords latéraux, tandis que sa face postérieure est reliée au rein gauche par du tissu aréolaire.

Le côlon sigmoïde est une partie mobile du côlon dans la cavité abdominale formant une boucle d'environ 40 centimètres. Il débute au niveau de l'ouverture du petit bassin et passe transversalement à l'avant du sacrum. Il se courbe ensuite sur lui-même et tourne vers la gauche pour atteindre la zone située au niveau de la troisième vertèbre sacrée. Il est complètement recouvert par du péritoine formant un mésentère, aussi appelé mésocôlon sigmoïde.

Le rectum commence au niveau de la 3<sup>ème</sup> vertèbre sacrée dans le prolongement du côlon sigmoïde. Il mesure entre 12 et 15 cm de longueur entre la jonction recto-sigmoïde et la ligne pectinée du canal anal. Son tracé est marqué par deux flexions antéro-postérieures ; le rectum suit d'abord la concavité du sacrum au niveau de l'angle sacré, puis une convexité antérieure à l'angle anorectal. Il y a aussi trois flexions latérales, faites par des plis sous-muqueux dans le lumen, appelées valves de Houston. La dernière partie du rectum est l'ampoule, qui est un segment élargi reposant sur le diaphragme pelvien. Le rectum est recouvert par le péritoine uniquement sur ses deux tiers supérieurs, d'abord la face avant puis les faces latérales. Enfin, le rectum est fixé postérieurement à l'aponévrose pré-sacrée au niveau de la 4<sup>ème</sup> vertèbre sacrée par le fascia de Waldeyer.

Les parois colique et rectale sont relativement identiques et constituées de quatre couches (**Figure 28**) :

- La muqueuse : elle est la couche la plus interne du tractus gastro-intestinal et elle-même constituée de trois couches :



**Figure 29. Le développement du cancer colorectal.**

La plupart des cancers colorectaux débute par le développement d'excroissances nommées polypes, sur la muqueuse intestinale. Ces excroissances peuvent devenir malignes et proliférer au sein de la paroi interne de l'intestin (Stades I-II). Les tumeurs continuent de croître dans les parois plus profondes (Stade III) jusqu'à atteindre les nœuds lymphatiques (Stade IV). A partir de ce moment, les cellules cancéreuses peuvent migrer, on parle alors de métastases, à distance vers d'autres organes comme le foie et les poumons (Stade V). (D'après <https://www.mq.edu.au/newsroom/2015/02/19/biomarker-discovery-offers-clearer-prognosis-for-bowel-and-rectal-cancer-patients/>).

- L'épithélium qui est la couche la plus interne est constituée d'entérocytes (impliqués dans l'assimilation de l'eau et des nutriments), de cellules en gobelet (produisant des mucines), des cellules de Paneth (liées à l'immunité) et de cellules endocrines (produisant des hormones intervenant dans la régulation des sécrétions digestives).
- Le chorion correspondant à du tissu conjonctif.
- La musculaire muqueuse qui est une fine couche de muscles lisses.
- La sous-muqueuse : elle est constituée d'une couche dense, irrégulière de tissu conjonctif, vascularisée et innervée.
- La musculuse : elle se compose d'une couche musculaire interne circulaire et d'une couche musculaire externe longitudinale. La première empêche les aliments de se déplacer vers l'arrière, tandis que la seconde raccourcit le tractus. Entre celles-ci, se trouve le plexus myentérique ou d'Auerbach et les cellules interstitielles de Cajal contrôlant le rythme du péristaltisme.
- La séreuse : il s'agit du feuillet viscéral conjonctif riche en adipocytes et recouvert par du péritoine uniquement au niveau de côlon.

### III.1.2. Développement de la pathologie

Généralement, le cancer colorectal s'initie au niveau de polypes précancéreux bénins (adénomes) (**Figure 29**). Ces polypes sont des excroissances ou des agrégations localisées de cellules anormales dans la muqueuse intestinale. Au fil des divisions cellulaires, l'augmentation de la taille des polypes peut se conjuguer avec des accumulations de mutations génétiques et de variations épigénétiques, se traduisant par une dysplasie cytologique et histologique (Lochhead *et al.*, 2014). Si ces polypes ne sont pas enlevés par une intervention chirurgicale, ils peuvent acquérir la capacité d'envahir les tissus adjacents et s'y développer ainsi qu'au-delà de la paroi



colorectale. Si cette croissance maligne devient vascularisée, cela va lui faciliter l'accès aux systèmes lymphatiques et circulatoires favorisant la propagation de ces cellulaires cancéreuses appelées métastases vers différents organes tels que le foie et les poumons.

### **III.1.3. Epidémiologie et étiologie**

#### **III.1.3.1. Incidence et mortalité**

En 2018 et à travers le monde, le cancer colorectal (CCR) occupe la troisième place chez les hommes et la deuxième place chez les femmes en terme d'incidence, avec respectivement 1 006 019 et 794 958 nouveaux cas. Il est la quatrième cause de décès liée au cancer chez les hommes (474 606 décès) et la troisième, chez les femmes (387 057 décès) (Bray *et al.*, 2018). En France, le CCR est la seconde cause de décès due au cancer (12%) et touche particulièrement les personnes âgées de 65 et plus (Institut national du cancer). Chez l'homme, l'incidence du CCR est en troisième position derrière les cancers de la prostate et du poumon. Chez la femme, cette incidence est en deuxième place derrière le cancer du sein. En France, en 2017, on dénombre 44 872 nouveaux cas (24 035 hommes et 20 837 femmes) et 17 684 décès (9 294 hommes et 8 390 femmes) (Jéhannin-Ligier *et al.*, 2017). Bien que le taux de survie à 5 ans soit de 63%, notamment grâce à l'accès au dépistage, à la résection des lésions précancéreuses, la prise en charge des patients et l'amélioration des thérapies, le CCR reste un enjeu de santé publique majeur.

#### **III.1.3.2. Facteurs de risque**

Les progrès de la médecine ont permis de mieux comprendre le développement multifactoriel du cancer colorectal. Il combine des éléments comme l'hérédité, le mode de vie ou encore l'exposition à des substances cancérigènes ; toutes ces situations favorisant le risque de développer un cancer sont dites facteurs de risque (Chan et Giovannucci, 2010). Ceux-ci sont classés en deux catégories : les facteurs de risque non modifiables (âge, hérédité) et modi-





fiables (mode de vie).

La probabilité de diagnostiquer un cancer colorectal augmente progressivement à partir de l'âge de 40 ans, et fortement après 50 ans (American Institute for Cancer Research, 2007, Ries *et al.*, 2008). Plus de 90% des cas de CCR surviennent chez les personnes de 50 ans ou plus (Bethesda, 2006 ; Ries *et al.*, 2008). Le taux d'incidence est plus de 50 fois supérieur chez les 60 à 79 ans que chez les moins de 40 ans (American Cancer Society, 2005 ; Ries *et al.*, 2008). C'est pourquoi, en France, un test gratuit pour les personnes de 50 à 74 ans, à renouveler tous les deux ans, est organisé dans le cadre du programme national de dépistage. Néanmoins, les cas de CCR semblent augmenter chez les personnes jeunes (O'Connell *et al.*, 2003 ; O'Connell *et al.*, 2004). Par exemple, aux États-Unis entre 1998 et 2001, le CCR faisait parti des 10 cancers les plus souvent diagnostiqués chez les personnes âgées de 20 à 49 ans (Fairley *et al.*, 2006).

Les polypes néoplasiques sont des lésions précurseurs du cancer colorectal (Janout et Kollárová, 2001). Près de 95 % des cancers colorectaux sporadiques sont dus à ces adénomes (American Cancer Society, 2005). Une personne ayant des antécédents d'adénomes présente un risque accru de CCR, comparativement aux personnes sans antécédents. Une longue période de latence, estimée entre 5 et 10 ans, est habituellement nécessaire pour le développement d'une tumeur maligne à partir d'adénome (Davies *et al.*, 2005 ; de Jong *et al.*, 2005). La détection par les techniques de dépistage et l'ablation de ces derniers avant la transformation maligne peuvent réduire le risque de CCR (Grande *et al.*, 2008).

La maladie inflammatoire de l'intestin (Inflammatory Bowel Disease, IBD) est un terme utilisé pour décrire deux maladies, la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. La colite ulcéreuse provoque une inflammation de la muqueuse du côlon et du rectum. La maladie de Crohn provoque une inflammation de toute l'épaisseur de la paroi intestinale et peut toucher n'importe quelle partie du tube digestif de la bouche à l'anus. Le risque relatif d'apparition du CCR chez



les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin a été estimé entre 4 et 20 (Janout et Kollárová, 2001). Ainsi, ces patients ont une probabilité de 4 à 20 fois plus élevée de développer un CCR que les sujets ne présentant pas d'IBD. Par conséquent, quel que soit leur âge, les personnes atteintes d'IBD sont fortement encouragées à subir un dépistage du CCR, et ceci plus fréquemment que pour le reste de la population.

La majorité des cas de cancer colorectal survient chez des personnes sans antécédents familiaux de CCR ou de maladie prédisposante. Néanmoins, jusqu'à 20% des personnes qui développent un CCR ont d'autres membres de leur famille qui ont été affectés par cette maladie (Skibber *et al.*, 2001 ; American Institute for Cancer Research, 2007). En effet, les personnes ayant des antécédents de CCR ou de polypes adénomateux chez un ou plusieurs parents au premier degré sont à risque accru (Boardman *et al.*, 2007). Les causes ne sont pas encore clairement définies, mais elles sont probablement attribuables aux gènes mutés hérités, aux facteurs environnementaux partagés ou à une combinaison des deux.

Environ 5 à 10% des cancers colorectaux sont la conséquence d'affections héréditaires reconnues (Jackson-Thompson *et al.*, 2006). Les affections héréditaires les plus courantes sont la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le cancer colorectal non polyposé héréditaire (HNPCC), également appelé syndrome de Lynch. Le HNPCC est associé à des mutations des gènes impliqués dans la voie de réparation de l'ADN, à savoir les gènes *MLH1* et *MSH2* (Papadopoulos *et al.*, 1994 ; American Institute for Cancer Research, 2007). Le risque de cancer colorectal chez les personnes présentant des mutations liées au HNPCC peut atteindre 70 à 80% (Jeter *et al.*, 2006 ; Al-Sukhni *et al.*, 2008). La PAF est causée par des mutations du gène suppresseur de tumeur *APC* (Wilmink, 1997). Elle représente moins de 1% de tous les cas de CCR (Davies *et al.*, 2005 ; Bethesda, 2006). Contrairement aux personnes atteintes du HNPCC, qui ne développent que quelques adénomes, les personnes atteintes de PAF développent des centaines de polypes, habituellement à un âge relativement jeune, et un ou plusieurs de ces adé-



nomes subissent généralement une transformation maligne dès 20 ans (Davies *et al.*, 2005).

L'alimentation influence fortement le risque de cancer colorectal, et des changements dans les habitudes alimentaires pourraient réduire jusqu'à 70% l'apparition de ce cancer (Willett, 2005). Les régimes riches en matières grasses, en particulier la graisse animale, sont un facteur de risque majeur de CCR (Boyle et Langman, 2000 ; Janout et Kollárová, 2001). La graisse favorise le développement d'une flore bactérienne capable de dégrader les sels biliaires pour donner des composés N-nitrosés potentiellement carcinogènes (Larsson et Wolk, 2006). La consommation importante de viande est également impliquée dans le développement du CCR (Santarelli *et al.*, 2008), notamment de par la présence de fer héminique dans la viande rouge (Kabat *et al.*, 2007 ; Santarelli *et al.*, 2008). De plus, certaines viandes sont cuites à haute température, entraînant la production d'amines hétérocycliques et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques connus pour leurs propriétés carcinogènes (Sinha, 2002 ; Santarelli *et al.*, 2008). Enfin, certaines études suggèrent que les personnes qui ont une alimentation pauvre en fruits et légumes peuvent avoir un risque plus élevé de développer un CCR (Bethesda, 2006).

Plusieurs facteurs liés au mode de vie ont été associés au cancer colorectal. Deux facteurs de risque modifiables et interdépendants, l'inactivité physique et l'excès de poids, seraient responsables d'environ un quart à un tiers des cancers colorectaux. Il existe de nombreuses preuves que des niveaux plus élevés d'activité physique sont associés à un risque plus faible de CCR (de Jong *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2007). De l'activité physique régulière, augmente la capacité métabolique de l'organisme et réduit la tension artérielle (Lee *et al.*, 2007). Plusieurs effets de l'obésité, notamment l'augmentation des œstrogènes circulants et la diminution de la sensibilité à l'insuline, augmente le risque de développer un CCR (de Jong *et al.*, 2005).

L'association entre le tabagisme et le cancer du poumon est bien établie, mais fumer est également extrêmement nocif pour le côlon et le rectum. On estime que 12% des décès dus au

## Tests de dépistage

---

### Techniques basées sur les selles



gFOBT



FIT



sDNA

---

### Techniques de visualisation directe



Colonographie par tomographie



Sigmoïdoscopie flexible



Coloscopie

**Figure 30. Les différents tests de dépistage du cancer colorectal.**

Il existe un large panel de tests de dépistage du cancer colorectal. Les tests gFOBT et FIT cherchent à détecter la présence de sang dans les selles. Le test sDNA, lui aussi se faisant à partir de selles, se base sur une analyse moléculaire de mutations sur des gènes cibles communément associés à la carcinogenèse colorectale. Les techniques de visualisation directe telles que la colonographie par tomographie, la sigmoïdoscopie flexible et la coloscopie, sont des techniques d'imagerie permettant de déterminer précisément l'étendue des lésions et de poser un diagnostic précis en vue d'un traitement. (D'après Polyps and prevention : the importance of screening for colorectal cancer webinar).

cancer colorectal sont attribuables au tabagisme (Zisman *et al.*, 2006). Les carcinogènes, tels que le tabagisme, la consommation régulière d'alcool peut être associée à un risque accru de développer un cancer colorectal à des âges précoces (Zisman *et al.*, 2006 ; Tsong *et al.*, 2007). Les métabolites réactifs de l'alcool comme l'acétaldéhyde peuvent être carcinogènes. De plus, les effets de l'alcool peuvent être médiés par la production de prostaglandines, la peroxydation des lipides et la production de radicaux libres associés au développement du cancer colorectal (Pöschl et Seitz, 2004).

#### **III.1.4. Dépistage et diagnostic**

Un diagnostic et une stadification appropriés sont essentiels pour assurer une stratégie de traitement correcte. Au cours des dix dernières années, le taux de mortalité dû au cancer colorectal a diminué de plus de 20% en raison de l'évolution des techniques de dépistage (**Figure 30**) et de l'optimisation des traitements chirurgicaux et thérapeutiques (Kekelidze *et al.*, 2013). Une coloscopie complète jusqu'au cæcum, couplée à une biopsie, est considérée comme l'examen majeur pour diagnostiquer les lésions colorectales en raison de sa haute précision (Kaminski *et al.*, 2010 ; Barret *et al.*, 2013). Cette technique permet à la fois la localisation de la tumeur et éventuellement l'excision endoscopique des polypes. Elle est considérée à la fois comme un atout diagnostic et thérapeutique (Zauber *et al.*, 2012). Les meilleurs résultats sont obtenus pour les lésions supérieures à 6 mm, avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 99% (Graser *et al.*, 2009). Néanmoins, une partie des patients ne pourront pas subir une coloscopie complète en raison d'une mauvaise préparation intestinale, d'une mauvaise tolérance de l'examen, d'une obstruction ou d'autres difficultés techniques. A ce moment-là, une colonographie par tomographie assistée par ordinateur (CT ou CTC) peut être envisagée en particulier chez les patients présentant une tumeur sténosante ou lorsque la coloscopie est impossible. Cette technique d'imagerie est l'une des plus utilisées avec l'IRM pour la stadification du cancer colorectal. Néanmoins, cette technique ne permet pas de réaliser des





biopsies ou des résections de polypes. L'IRM permet de définir avec précision l'expansion tumorale colorectale. Elle permet une grande précision dans la détection de la propagation extra-tissulaire et dans l'identification des tumeurs de bon (invasion inférieure à 5 mm) ou de mauvais (invasion supérieure à 5 mm) pronostic.

Une autre technique d'imagerie, la sigmoïdoscopie flexible, peut être parfois utilisée. Elle consiste en l'examen visuel des parois internes de l'intestin via un endoscope inséré à travers l'anus. Des études randomisées, où les sujets sont répartis aléatoirement entre le groupe témoin et le groupe expérimental, mettent en évidence des diminutions de l'incidence et/ou de la mortalité liée au cancer du côlon distal ou du rectosigmoïde, de 29% à 76% suite à une détection par la sigmoïdoscopie flexible (Hoff *et al.*, 2009 ; Atkin *et al.*, 2010 ; Segnan *et al.*, 2011 ; Schoen *et al.*, 2012). Cette technique est moins onéreuse et risquée que la coloscopie. De plus, elle ne nécessite pas de préparation avant l'examen, ni de sédation. Néanmoins, elle se révèle moins efficace pour la détection des atteintes présentes au niveau du côlon droit par rapport au côlon gauche (Zubarik *et al.*, 2002). Toutes ces techniques d'imagerie jouent également un rôle crucial dans le diagnostic, l'évaluation de la stadification en vue du traitement et pour le suivi des patients. Elles permettent, entre autres, de définir l'étendue des tumeurs, d'identifier les lésions et les métastases colorectales.

Il existe également des techniques non invasives basées sur l'analyse des selles. Au fur et à mesure que le cancer colorectal se développe, l'abrasion due au passage des selles contre la tumeur provoque la libération de cellules et de sang qui se mélangent aux selles. La détection du sang dans les selles a été l'un des piliers du dépistage du CCR. Le gFOBT (Guaiac-based fecal occult blood test), le FIT (Fecal immunochemical test) et le sDNA (Stool DNA test) sont des tests faisant appel à différentes techniques pour la détection du CCR (Young *et al.*, 2015, Pickhardt, 2016). Le gFOBT est l'une des nombreuses méthodes permettant de détecter la présence de sang dans les selles. Le test consiste à placer un échantillon fécal sur du papier



gaïac (contenant un composé phénolique, l'acide  $\alpha$ -guaiaconique, extrait de la résine du bois des gaïacs) et d'appliquer du peroxyde d'hydrogène qui, en présence du sang, produit une réaction bleue en quelques secondes. Ce test est à effectuer sur trois prélèvements de selles pendant trois jours consécutifs. En 2009, l'American College of Gastroenterology a recommandé l'abandon du test gFOBT comme outil de dépistage du CCR au profit du test immunochimique FIT plus précis (Rex *et al.*, 2009). Le FIT détecte la présence de quantités microscopiques de sang dans les selles. Cette méthode est réalisée par l'utilisation d'anticorps ciblant les molécules de globine. Ces anticorps détectent principalement les saignements gastro-intestinaux inférieurs, ce qui rend le FIT idéal pour la détection du CCR (Young *et al.*, 2015). Cette méthode n'est pas aussi efficace dans la détection des saignements gastro-intestinaux supérieurs parce que l'hémoglobine subit une dégradation par les enzymes digestives, ce qui diminue la fixation de l'anticorps sur l'hémoglobine (Young *et al.*, 2015). Le test sDNA, aussi appelé test d'ADN des selles multi-cibles ou FIT-DNA, permet de détecter 11 séquences différentes d'ADN communément retrouvées dans les cancers colorectaux (Pickhardt, 2016). Ce test est basé notamment sur des analyses moléculaires quantitatives pour les mutations KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), la méthylation des promoteurs des gènes *NDRG4* (N-Myc Downstream-Regulated Gene 4), de *BMP3* (Bone Morphogenetic Protein 3) et de la  $\beta$ -actine, servant de référence (Imperiale *et al.*, 2014).

Une fois la présence de tumeurs détectée et analysée, celles-ci sont classées selon plusieurs critères. Les tumeurs localisées dans les 15 premiers centimètres du bord anal sont classées comme tumeurs rectales, tandis que les tumeurs plus proximales sont classées comme tumeurs coliques. Le système de stadification le plus couramment utilisé pour le cancer colorectal est celui de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), également connu sous le nom de système TNM. Néanmoins, d'autres systèmes comme la classification de Dukes (Bomme *et al.*, 1998) et d'Astler-Coller (Bomme *et al.*, 2001) sont encore utilisés. Cependant,

**Tableau 2. Description de la classification TNM.**

(D'après AJCC 7<sup>th</sup> edition TNM staging classification of rectal cancer).

Tx	Aucune description de l'étendue de la tumeur n'est possible en raison d'informations incomplètes. Le cancer ne concerne que la muqueuse et n'a pas dépassé la muqueuse musculaire.
T1	Le cancer s'est développé à travers la muqueuse musculaire et s'étend dans la sous-muqueuse.
T2	Le cancer s'est développé à travers la sous-muqueuse et s'étend dans la musculature.
T3	Le cancer s'est développé à travers la musculature et dans les couches externes du côlon ou du rectum. Il n'a pas atteint un organe ou un tissu avoisinant.
T4a	Le cancer s'est développé à travers la séreuse, la paroi externe de l'intestin.
T4b	Le cancer s'est développé à travers la paroi du côlon ou du rectum et envahit les tissus ou organes voisins.
Nx	Aucune description de l'atteinte des ganglions lymphatiques n'est possible en raison d'informations incomplètes.
N0	Aucun cancer dans les ganglions lymphatiques voisins.
N1	Les cellules cancéreuses se trouvent dans ou près de 1 à 3 ganglions lymphatiques. N1a : Les cellules cancéreuses se trouvent dans un ganglion lymphatique voisin. N1b : Les cellules cancéreuses se trouvent dans 2 à 3 ganglions lymphatiques voisins. N1c : De petits dépôts de cellules cancéreuses se trouvent dans les zones grasses près des ganglions lymphatiques, mais pas dans les ganglions eux-mêmes.
N2	Les cellules cancéreuses se trouvent dans 4 ganglions lymphatiques ou plus voisins. N2a : Les cellules cancéreuses se trouvent dans 4 à 6 ganglions lymphatiques voisins. N2b : Les cellules cancéreuses se trouvent dans 7 ganglions lymphatiques ou plus voisins.
M0	Aucune propagation à distance n'est observée.
M1	Présence de métastases à distance. M1a : Le cancer s'est propagé à un organe éloigné ou à un ensemble de ganglions lymphatiques éloignés. M1b : Le cancer s'est propagé à plus d'un organe ou à un ensemble de ganglions lymphatiques éloignés, ou alors il s'est propagé à des zones éloignées du péritoine.

elles ne sont pas aussi précises que le système TNM (Weiser *et al.*, 2011 ; Thorsteinsson *et al.*, 2012) (**Tableau 2**). Les trois lettres TNM décrivent chacune des atteintes bien précises :

- T : décrit jusqu'à quel point la tumeur primaire s'est développée dans la paroi intestinale et si elle a envahi les régions voisines.
- N : décrit l'étendue de la propagation aux ganglions lymphatiques. Ce sont des petits organes du système immunitaire participant à la lutte contre les infections. Pour avoir une idée bien précise de l'atteinte des ganglions lymphatiques, il est recommandé d'examiner au microscope au moins 12 d'entre eux.
- M : indique si le cancer s'est propagé à d'autres organes via des métastases notamment le foie et les poumons.

Ces trois lettres sont ensuite combinées avec des chiffres pouvant aller de 0 à 4, selon le critère analysé, en relation avec la sévérité de l'atteinte. Les combinaisons TNM permettent alors de déterminer le stade du cancer (**Tableau 3**). Celui-ci est exprimé en chiffres romains du stade 0 (le moins avancé) au stade IV (le plus sévère). Ces stades peuvent être également subdivisés en sous-groupes A, B, C pour les stades II et III.

Un autre facteur est utilisé pour analyser le degré de survie, c'est le grade du cancer (Ried *et al.*, 1996). Il correspond à la description de la ressemblance du cancer avec un tissu colorectal sain lorsqu'il est observé au microscope. L'échelle utilisée pour évaluer un CCR va de G1 (où le cancer ressemble à un tissu colorectal normal) à G4 (où le tissu est très anormal). Les cancers de bas grade (G1 par exemple) ont tendance à croître et à se propager plus lentement que les cancers de haut grade (G4 par exemple).

**Tableau 3. Correspondances entre les classifications TNM, Dukes et Astler-Coller.**

« Tis » : carcinome in situ, tumeur intra-épithéliale, « Any » : n'importe quel sous-groupe de la catégorie décrite (Centelles, 2012).

	AJCC/TNM	Dukes	Astler-Coller
Stage 0	Tis, N0, M0	—	—
Stage I	T1-T2, N0, M0	A	A, B1
Stage IIA	T3, N0, M0	B	B2
Stage IIB	T4a, N0, M0	B	B2
Stage IIC	T4b, N0, M0	B	B3
Stage IIIA	T1-T2, N1, M0 T1, N2a, M0	C	C1
Stage IIIB	T3-T4a, N1, M0 T2-T3, N2a, M0 T1-T2, N2b, M0	C	C1, C2
Stage IIIC	T4a, N2a, M0 T3-T4, N2b, M0 T4b, N1-N2, M0	C	C2, C3
Stage IV	Any T, Any N, M1a Any T, Any N, M1b	—	D

## III.2. Les mécanismes moléculaires associés au processus de carcinogenèse colorectale

Les instabilités génomiques et épigénomiques distinguent l'épithélium néoplasique de l'épithélium colique normal. Elles sont caractéristiques de la carcinogenèse colorectale (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Little *et al.*, 2008). Trois types d'instabilité génomique ou épigénétique majeurs ont été décrits dans le cancer colorectal : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité microsatellitaire (MSI) et l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP).

### III.2.1. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique ou CIN (Chromosome instability) est définie comme étant la résultante d'une perte ou d'un réarrangement chromosomique au cours de la division cellulaire (McClelland, 2017). Les CIN ont été reconnues comme une marque du cancer et comme source de variations génétiques favorisant l'adaptation des tumeurs à l'environnement et aux traitements médicamenteux. Les CIN sont une caractéristique commune des tumeurs solides et peuvent être classées en deux catégories : les CIN structurales et les CIN numériques. Les premières sont caractérisées par un gain ou une perte de régions chromosomiques, tandis que les secondes sont caractérisées par un gain ou une perte d'un chromosome entier (aneuploïdie) (Tanaka et Hirota, 2016). Les mécanismes conduisant à la présence de CIN restent peu connus mais ils reflètent un dysfonctionnement de la duplication chromosomique ou de la ségrégation au cours de la mitose. En effet, ces processus défectueux sont en lien avec l'attachement des kinétochores aux microtubules, la cohésion des chromatides sœurs, une réplication anormale des centromères, le raccourcissement des télomères ou encore avec le complexe de vérification de la séparation des chromosomes dupliqués (Thompson *et al.*, 2010). L'implication des CIN dans le développement tumoral est controversée. En effet, des études suggèrent que les CIN sont un événement précoce du processus de cancérogenèse entraînant la perte ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Michor *et al.*, 2005 ; Hanahan et Weinberg, 2011). D'autres études postulent que les CIN sont un effet secondaire de la croissan-





ce tumorale au cours de laquelle les cellules néoplasiques perdent et/ou gagnent des portions chromosomiques (Kops *et al.*, 2005). Les CIN sont observées dans 65% des cas de cancers colorectaux et leur nombre augmente avec le stade (Orsetti *et al.*, 2014). Des pertes récurrentes des régions 16p13 et 19p13 sont observées dans le CCR et celles-ci sont associées à un mauvais pronostic aux stades II et III (Orsetti *et al.*, 2014). La perte de la région chromosomique 18q21 est identifiée dans 70% des tumeurs colorectales, notamment dans les stades avancés (Fearon et Vogelstein, 1990). On retrouve dans cette région des gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma) (Keino-Masu *et al.*, 1996 ; Fazeli *et al.*, 1997) ou encore des gènes régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose comme *SMAD2* et *SMAD4* (Takagi *et al.*, 1996 ; Takagi *et al.*, 1998). La perte de la portion chromosomique 17p est également fréquemment observée dans les CCR. Au sein de ce bras, plus précisément au niveau de la bande 17p13.1, se trouve le gène *TP53*. Celui-ci code pour un facteur de transcription (p53) décrit comme suppresseur de tumeur et régulant différents processus tels que le cycle cellulaire et l'apoptose (Vazquez *et al.*, 2008). Parmi les portions chromosomiques le plus souvent amplifiées dans le cadre du CRC, on retrouve notamment la région 20q (porteuse de *POFUT1*) où des gènes comme *AURKA* (Aurora kinase A, 20q13.2) et *TPX2* (Targeting protein for Xklp2, 20q11) sont associés à la progression des adénomes en carcinomes (Sillars-Hardebol *et al.*, 2012 ; Chuang *et al.*, 2016).

La détection des CIN peut se faire par plusieurs techniques dont le caryotypage pour notamment le nombre de chromosomes (Bomme *et al.*, 1996), la cytométrie en flux (Giaretti, 1994), l'hybridation *in situ*, pour le contenu en ADN (Di Vinci *et al.*, 1996 ; Herbers *et al.*, 1997 ; Bomme *et al.*, 1998 ; Bomme *et al.*, 2001) et l'hybridation génomique comparative pour ce qui concerne les gains ou pertes de fragments d'ADN (Ried *et al.*, 1996 ; Hermsen *et al.*, 2002).



### III.2.2. Instabilité microsatellitaire

Les instabilités microsatellitaires (MSI) ne sont pas aussi courantes que les CIN dans le cancer colorectal (environ 15%). Cependant, c'est un outil de dépistage très utile pour la détection des cancers colorectaux héréditaires sans polyposes (HNPCC) ou un syndrome de Lynch, en raison d'un défaut du système de réparation de l'ADN (DNA Mismatch repair ou MMR). Les MSI sont des mutations dues à des insertions ou des délétions au niveau des microsatellites, car ces séquences sont particulièrement sujettes à des défauts de réplication. Les microsatellites sont des répétitions en tandem de séquences d'ADN constituées d'un à cinq nucléotides (Ionov *et al.*, 1993). Il y a au moins 500 000 microsatellites dans le génome humain, localisés dans des régions intergéniques, des régions introniques ou des régions codantes. Les événements d'insertions ou de délétions au niveau des zones codantes entraînent la production d'une protéine tronquée généralement inactive. Parmi les gènes sujets à des MSI dans le cancer colorectal, on retrouve ceux impliqués dans les réparations de l'ADN (*RAD50*, *MSH2*, *MSH3*, *MLH1*, *BLM*, *PSM2*), l'apoptose (*APAF1*, *ACTR11*, *IGF1R*, *WISP-3*), le cycle cellulaire (*PTEN*, *RIZ*) et des facteurs de transcription (*TCF-4*) (Iacopetta *et al.*, 2010). Un test connu sous le nom de panel de Bethesda a été proposé en 1997 par le National Cancer Institute (NCI) des États-Unis pour déterminer le statut des MSI. Il s'agit d'un panel composé de deux répétitions mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et de trois répétitions dinucléotidiques (D2S123, D5S346 et D17S250) (Boland *et al.*, 1998). La classification des tumeurs se fait alors selon le nombre de microsatellites présentant une instabilité. On distingue les tumeurs MSI élevées (MSI-H) dont plus de 30% des marqueurs ont une instabilité, les tumeurs MSI faibles (MSI-L) où l'on retrouve moins de 30% d'instabilité et enfin les tumeurs sans instabilité dites microsatellites stables (MSS).

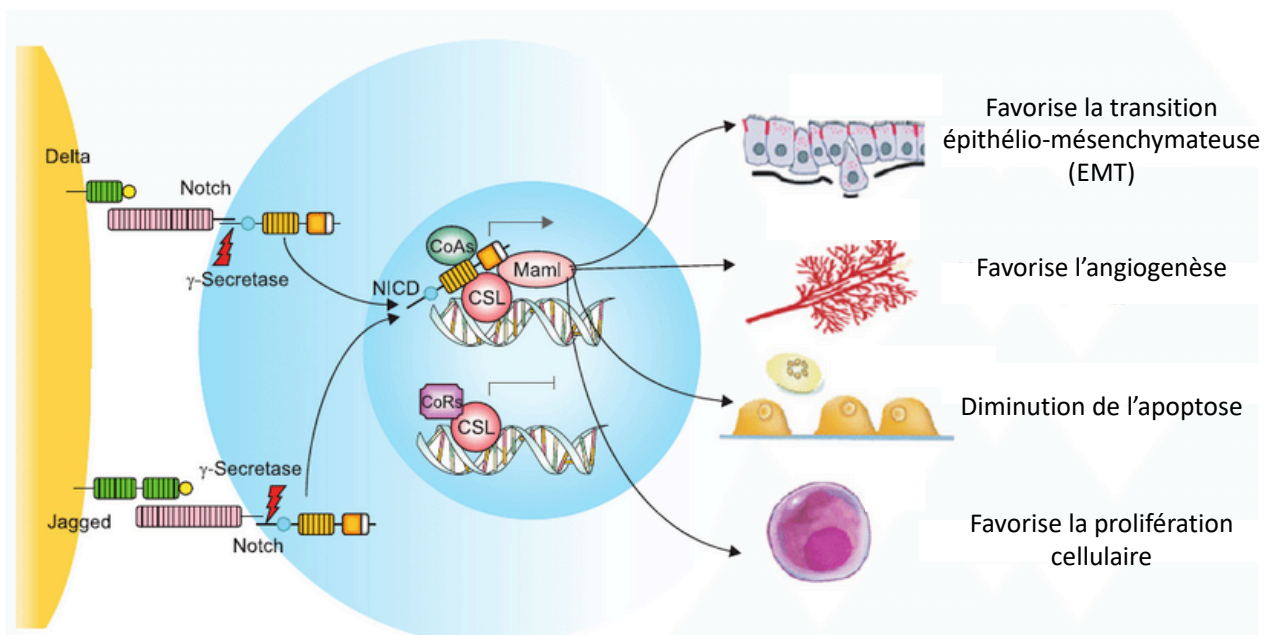


### III.2.3. Hyperméthylation des îlots CpG

Les cancers colorectaux sont souvent associés à une augmentation de la méthylation des îlots CpG, localisés dans les régions promotrices des gènes et participant à leur régulation. En effet, la méthylation de ces régions régulatrices réprime la transcription des gènes cibles. Les chercheurs utilisent souvent au moins trois loci méthylés d'un panel de cinq marqueurs (*RUNX3*, *SOCS1*, *NEUROG1*, *CACNA1G*, *IGF2*) pour déterminer le phénotype de méthylation que l'on appelle CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) (Tahara *et al.*, 2014). L'étiologie de l'élaboration de ce phénotype est compliquée à cerner. Un certain nombre de mécanismes ont été étudiés, notamment la surexpression des ADN-méthyltransférases (Grady et Carethers, 2008), les mutations dans les gènes qui remodelent la chromatine comme le *CHD8* (Bachman *et al.*, 2003 ; Hinshelwood *et al.*, 2009), les expositions environnementales comme le tabagisme (Limsui *et al.*, 2010) et les mutations dans *IDH1* et *TET*, qui causent une méthylation anormale dans les leucémies et les gliomes (Ichimura, 2012). Néanmoins, aucune de ces études n'a permis de statuer précisément sur les éléments induisant l'apparition des CIMP.

Le CIMP peut être défini comme « CIMP-High » ou « CIMP-Low », selon le nombre de marqueurs positivement méthylés (respectivement 3 marqueurs ou plus, et 2 marqueurs ou moins affectés). Les tumeurs CIMP-High sont retrouvées dans environ 20% des cancers colorectaux sporadiques. Ces tumeurs présentent la mutation *BRAF* V600E, une hyperméthylation du gène *hMLH1* et de nombreuses autres mutations (Cancer Genome Atlas Network, 2012 ; Bettington *et al.*, 2014 ; Tahara *et al.*, 2014). Les tumeurs CIMP-Low sont elles aussi observées dans environ 20% des cancers colorectaux sporadiques. La plupart de ces tumeurs est associée à des mutations du gène *KRAS* (Curtin *et al.*, 2011) mais ne présente pas d'altérations microsatellitaires, ni de nombreuses autres mutations géniques (Bettington *et al.*, 2014 ; Luo *et al.*, 2014).

En plus d'une méthylation aberrante au niveau de certains gènes, une diminution globale



**Figure 31. La voie de signalisation NOTCH contrôle différents aspects du développement tumoral colorectal.**

Une hyper-activation de la voie de signalisation NOTCH dans les cellules colorectales conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire associée à une inhibition de la mort cellulaire par apoptose. La voie NOTCH est également associée à des phases plus tardives de la tumorigenèse colorectale comme la transition épithélio-mésenchymateuse favorisant la dispersion des cellules cancéreuses à d'autres organes et l'angiogenèse assurant la vascularisation des tumeurs formées. (D'après Eskander et Tewari, 2014).

de la méthylation a également été identifiée dans de nombreux cancers colorectaux et est étroitement associée aux tumeurs présentant des instabilités chromosomiques CIN (Matsuzaki *et al.*, 2005 ; Rodriguez *et al.*, 2006). De ce fait, d'autres recherches sont nécessaires afin de déterminer si la mesure de l'hypométhylation globale d'ADN dans le cancer colorectal peut jouer un rôle dans le contexte clinique en vue d'un diagnostic.

### **III.3. Les principales voies de signalisation associées au cancer colorectal**

#### **III.3.1. La voie de signalisation NOTCH**

La signalisation NOTCH est décrite comme essentielle tout au long du processus de tumorigenèse colorectale (**Figure 31**) (Wu *et al.*, 2013). La surexpression de *NOTCH1* au sein d'adénocarcinomes corrèle avec la progression tumorale, le grade et la présence de métastases. Cela pourrait être lié à l'inhibition de l'apoptose engendrée par l'expression élevée de *NOTCH1* (Zhang *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2013). La surexpression de *HES1*, un gène cible de la voie NOTCH, supprime l'expression du facteur répresseur de la transcription *KLF4* (Kruppel-like factor 4), capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales en les bloquant en phase G1/S du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2001). Les récepteurs NOTCH1 et 2 semblent participer au processus tumoral par des mécanismes opposés. En effet, une forte expression de NOTCH1 associée à une faible expression de NOTCH2 mesurées chez des patients atteints par un cancer colorectal sont corrélées avec un faible taux de survie (Chu *et al.*, 2011). L'expression de NOTCH3 est quant à elle accentuée dans les cellules cancéreuses colorectales, favorisant le développement tumoral et la présence de métastases (Serafin *et al.*, 2011). Concernant NOTCH4, les résultats présentés par deux études au cours de la même année diffèrent. D'un côté, l'analyse de l'expression transcriptionnelle de *NOTCH4* au sein de tissus cancéreux colorectaux montre que ce récepteur est sous-exprimé (Zhang *et al.*, 2018). De plus, la surexpression de *NOTCH4* dans la lignée cancéreuse colorectale SW620 diminue la proliféra-



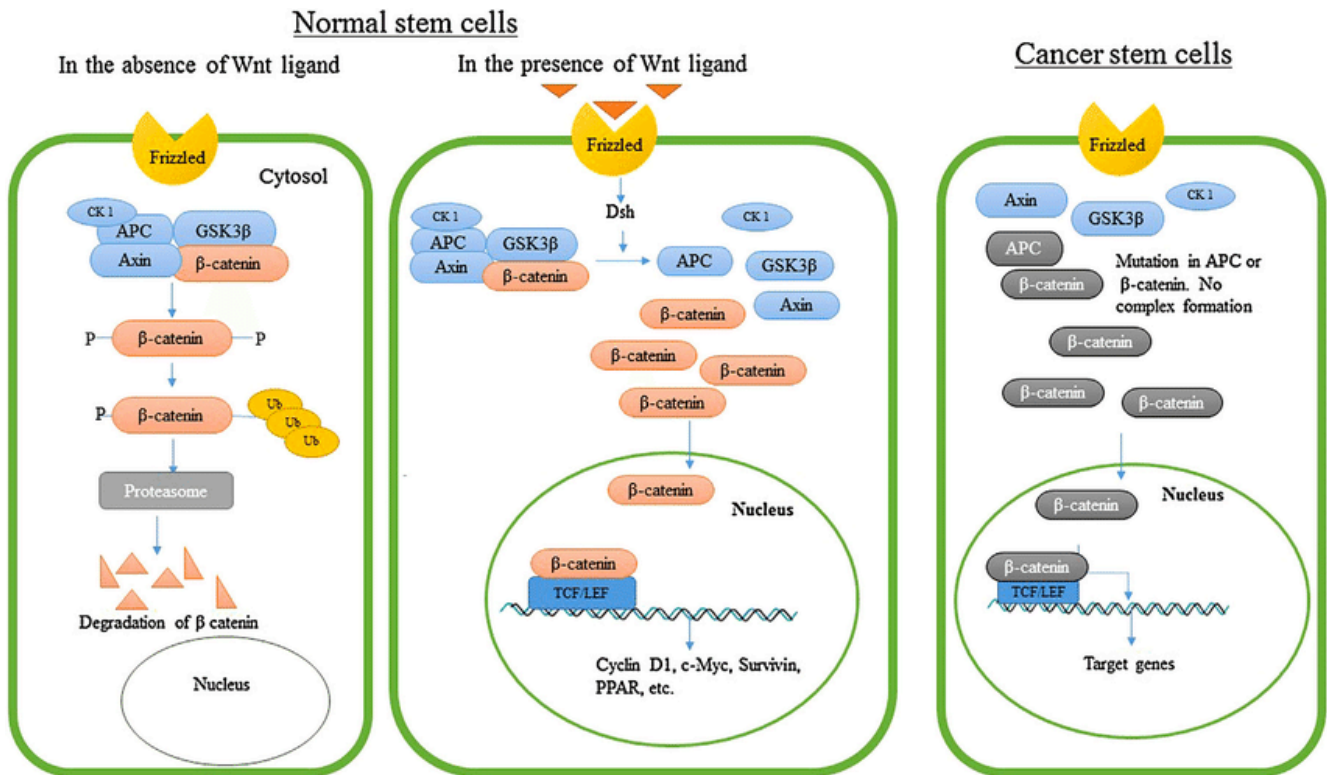


tion, la migration et l'invasion tout en favorisant l'apoptose. D'un autre côté, il a été observé une augmentation de l'expression de NOTCH4 dans des tissus cancéreux colorectaux (Wu *et al.*, 2018). Cette surexpression est également associée à un mauvais pronostic et est proposée comme potentiel nouveau biomarqueur prédictif de survie du cancer colorectal.

La voie de signalisation NOTCH a aussi été démontrée comme étant impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce mécanisme correspond au moment où une cellule épithéliale obtient un phénotype mésenchymateux aboutissant à l'activation de sa capacité migratoire. Ce processus est issu de l'interaction entre la voie NOTCH et les facteurs de transcription Snail (SNAI1), Slug (SNAI2) et la cytokine TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Dans les cellules épithéliales, la répression par le facteur Snail du gène codant la E-cadhérine qui est une glycoprotéine transmembranaire formant les jonctions serrées avec les cellules adjacentes, et la stimulation de l'expression de Slug par NOTCH1 induisent un phénomène de transition épithélio-mésenchymateux (Becker *et al.*, 2007). Également, la signalisation NOTCH, via l'expression de son gène cible *HES1*, module le niveau d'expression de *ATOH1* (ATOnal Homolog 1) impliqué dans le devenir cellulaire intestinal (Kazanjian et Shroyer, 2011).

### **III.3.2. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine**

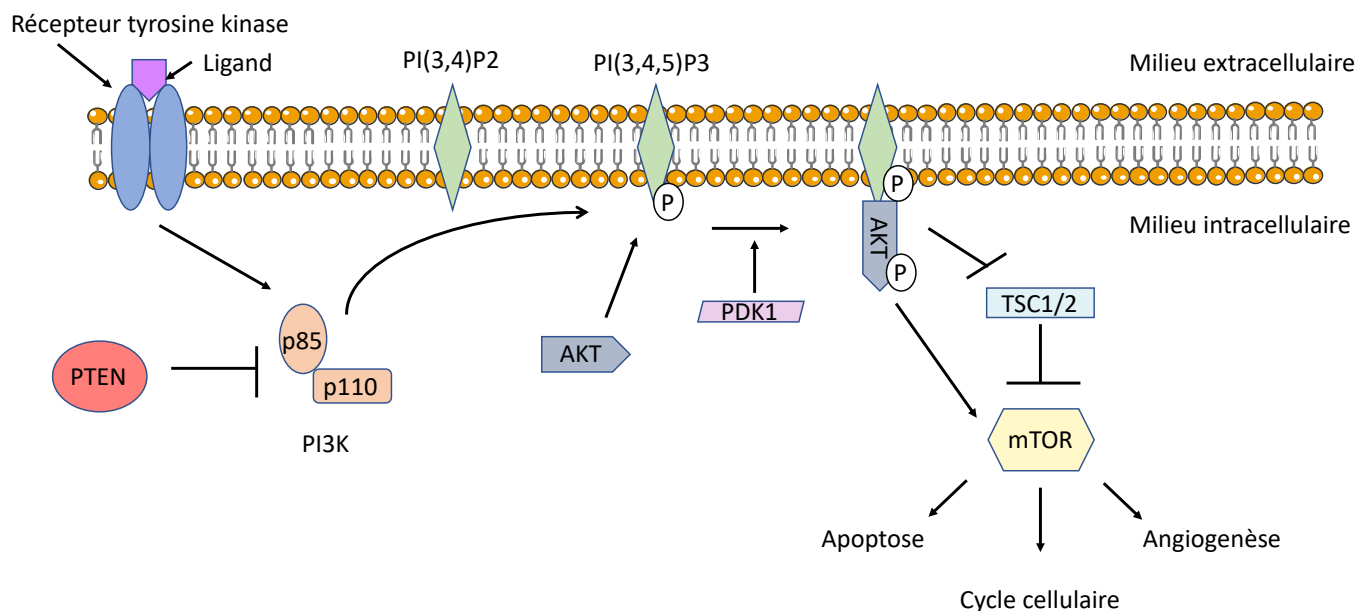
La transition de l'épithélium colique normal vers un phénotype malin s'effectue souvent sur une période de plus de 10 ans (Jass, 2007). Elle est accompagnée de nombreux changements génétiques étroitement liés à la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Celle-ci régule différents processus tels que la prolifération, l'invasion, la migration, c'est à dire l'initiation et la progression du cancer colorectal (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Parmi les acteurs de la signalisation WNT, au moins une protéine de la voie de signalisation est mutée dans plus de 94% des cas de CCR (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Dans la majorité des cas, ces mutations se produisent dans le gène *APC*, mais d'autres peuvent se produire dans des gènes



**Figure 32. La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est dérégulée au sein des cancers colorectaux.**

Dans les cellules souches normales, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine débute par la fixation d'un ligand WNT au récepteur Frizzled. Ceci induit l'activation par phosphorylation de Dishevelled (Dsh), ce qui inactive la GSK-3 $\beta$ . La quantité de  $\beta$ -caténine intracellulaire augmente, suivi de sa translocation dans le noyau. Là, elle interagit avec le facteur de liaison des lymphocytes T (TCF/LEF) et active la transcription des gènes cibles de la voie WNT qui sont associés à la prolifération et à la survie cellulaire (*cycline D1*, *cMyc*, etc.). En absence d'un ligand WNT, la GSK-3 $\beta$  forme avec l'APC et l'Axine un complexe de destruction s'associant avec la  $\beta$ -caténine. La GSK-3 $\beta$  est activée et phosphoryle la  $\beta$ -caténine, qui à son tour est ubiquitinylée avant d'être dégradée par le protéasome. Dans le cas du cancer colorectal, la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine aberrante contribue au phénotype hyperprolifératif et hypo-apoptotique, de sorte que la  $\beta$ -caténine devenue constitutive ou l'APC mutée peuvent induire une transactivation des gènes « pro-survie ». (Vadde *et al.*, 2017).

tels que ceux de la  $\beta$ -caténine ou de l'Axine (Kitaeva *et al.*, 1997 ; Suraweera *et al.*, 2006). La présence de ces mutations est considérée comme un événement précoce et la principale force motrice du CCR (**Figure 32**). Lorsque la protéine APC est absente ou mutée, la  $\beta$ -caténine s'accumule à des niveaux élevés puis elle est transloquée dans le noyau et s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF, ce qui entraîne l'augmentation de la transcription des gènes associés au développement du CCR (Markowitz et Bertagnolli, 2009). La  $\beta$ -caténine, le médiateur clé de la signalisation WNT, est présente à de multiples localisations sub-cellulaires, comme les jonctions adhérentes, le cytosol ou encore le noyau. Environ 1% des cas de CCR présentent des mutations activatrices de la protéine  $\beta$ -caténine (Polakis, 1999). Des quantités protéiques élevées de  $\beta$ -caténine au sein du noyau sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (Balduş *et al.*, 2004). Au niveau nucléaire, la  $\beta$ -caténine coopère avec les TCF/LEF pour activer l'expression de gènes cibles. Par exemple, l'oncogène *c-MYC*, identifié comme gène cible dans la voie de signalisation WNT, est surexprimé dans le CCR et joue donc un rôle potentiel dans son développement (He *et al.*, 1998). La transcription accrue de la *cycline D1* par les protéines RAS et la  $\beta$ -caténine semble aussi participer au développement du CCR (Tetsu et McCormick, 1999). La métalloprotéinase-7 matricielle (MMP-7), une autre cible de la  $\beta$ -caténine, est surexprimée dans les cas de CCR et est associée à un mauvais pronostic (Brabletz *et al.*, 1999 ; Crawford *et al.*, 1999). La signalisation WNT joue également un rôle important dans l'initiation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) en induisant l'expression des facteurs de transcription liés à ce processus tels que SOX9 (Huang *et al.*, 2019) ou Slug (Wu *et al.*, 2012). Ce mécanisme contribue à l'invasion et à la dissémination métastatique du CCR et est associé à une résistance chimiothérapeutique (Yang *et al.*, 2006). La signalisation WNT participe aussi à l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des cryptes intestinales. Les CSC ont la capacité de donner naissance à la majeure partie de la masse tumorale via leur capacité d'auto-renouvellement. Selon que le



**Figure 33. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.**

Les récepteurs à tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires qui possèdent dans leur partie extracellulaire un site de liaison pour le ligand. Ce dernier peut être un facteur de croissance tel que l'EGF ou l'IGF, ou bien des cytokines comme les interleukines. Suite à l'activation du récepteur par un ligand, celui-ci stimule la PI3K constituée de la sous-unité régulatrice p85 et de la sous-unité catalytique p110. L'activité de la PI3K peut être inhibée par la protéine PTEN. La PI3K participe à la formation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P3). Celui-ci recrute la protéine AKT, qui est phosphorylée et activée par la protéine PDK1. AKT a pour cible la protéine à activité tyrosine kinase mTOR, régulant différents processus comme l'apoptose, le cycle cellulaire et l'angiogenèse. AKT inhibe également les protéines TSC1/2 qui ne peuvent plus exercer leur rôle de régulateur négatif de la signalisation. (D'après Nakada *et al.*, 2011).

co-activateur associé à la  $\beta$ -caténine est la protéine p300 ou CREB, l'activité de la voie de signalisation favorisera la différenciation ou la prolifération des CSC. En effet, le complexe p300/ $\beta$ -caténine favorise la différenciation des CSC (Kahn, 2011), tandis que le complexe CREB/ $\beta$ -caténine favorise la croissance tumorale par l'intermédiaire des CSC (Yu *et al.*, 2017).

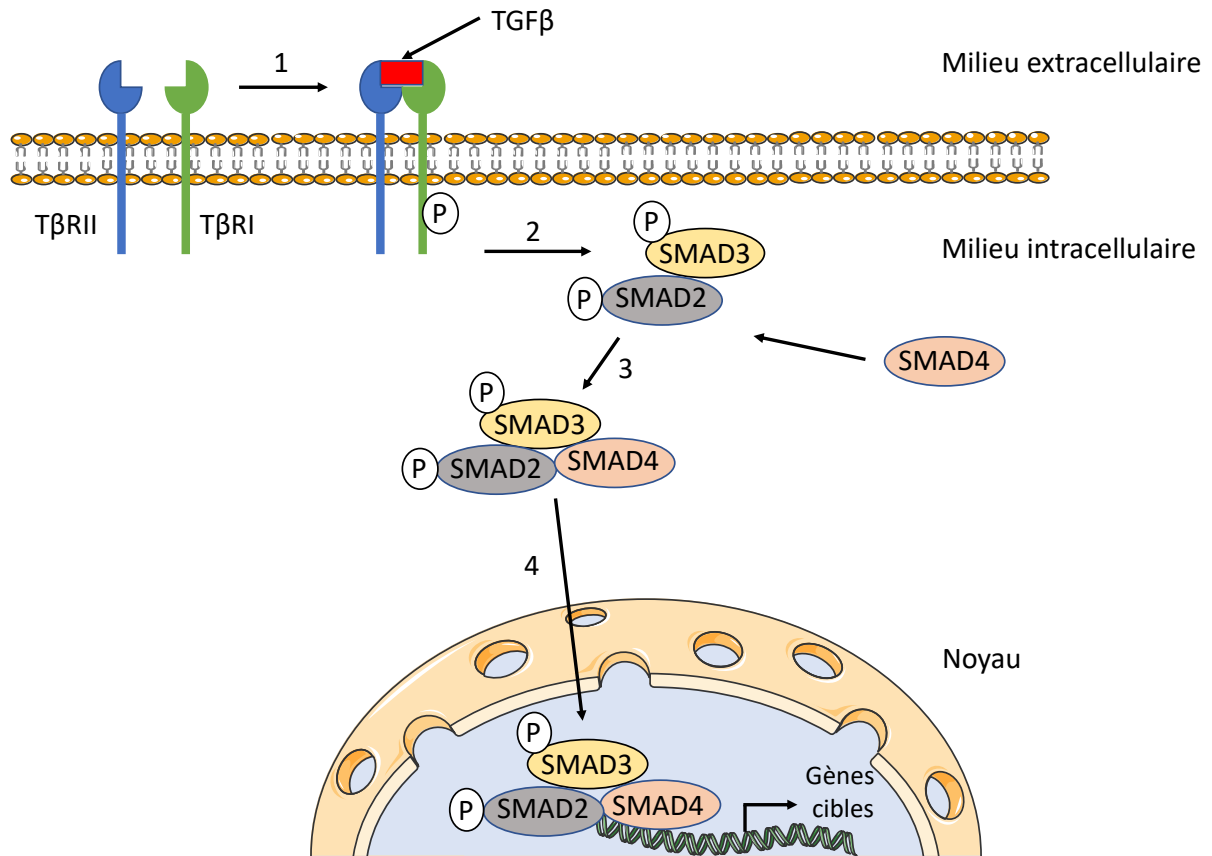
### III.3.3. Autres voies de signalisation

#### PI3K/Akt/mTOR :

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR joue un rôle prépondérant dans divers processus biologiques comme la croissance, la prolifération ou encore l'apoptose (Yu et Cui, 2016). La dérégulation de la voie PI3K/Akt/mTOR (**Figure 33**) est observée dans environ 30% des cancers humains, faisant ainsi de cette cascade de signalisation une cible thérapeutique intéressante pour contrecarrer la progression tumorale (Fortin et Mak, 2016). Dans 70% des cancers colorectaux, une augmentation de la quantité de la forme phosphorylée d'AKT (pAKT) est observée, témoin de l'activation de la voie. Cela est due à une forte diminution de l'expression de la protéine PTEN qui est décrite comme un facteur suppresseur de tumeur régulant négativement l'expression d'AKT (Colakoglu *et al.*, 2008). Il a été démontré que le caroténoïde Lycopène supprime la capacité d'invasion médiée par la leptine des cellules cancéreuses colorectales HT-29, via l'inhibition de la phosphorylation d'AKT (Lin *et al.*, 2011). Un autre groupe de recherche a rapporté que l'aspirine, inhibiteur de mTOR et activateur de la protéine kinase AMPK (AMP-activated protein Kinase) induit l'autophagie et protège contre la progression du cancer colorectal (Din *et al.*, 2012).

#### TGF $\beta$ /Smad :

Le TGF $\beta$  est impliqué dans la régulation de divers processus cellulaires, dont la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Massagué, 1998). C'est une cytokine qui déclen-



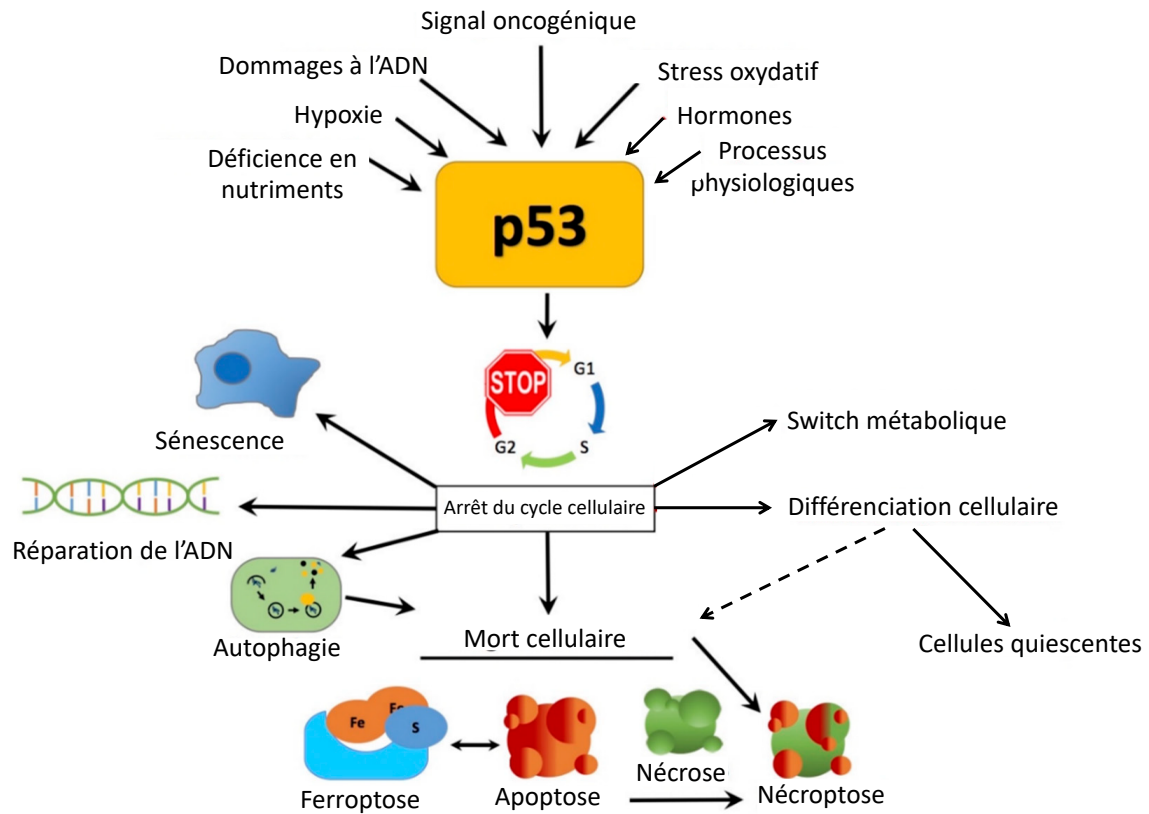
**Figure 34. La voie de signalisation canonique TGFβ.**

Le récepteur au TGFβ est un dimère constitué de la sous unité TβRII et de la sous unité TβRI possédant toutes les deux un site de liaison au TGFβ. Suite à la liaison du ligand TGFβ, le récepteur complet s'autophosphoryle (1), recrute les protéines SMAD2 et SMAD3 les phosphorylant à leur tour (2). Puis les deux protéines vont former un complexe avec SMAD4 (3), qui est transloqué dans le noyau où il se fixe sur les régions promotrices des gènes cibles (4). (D'après Neuzillet *et al.*, 2014).

che une signalisation intracellulaire impliquant notamment la famille des protéines SMAD, principalement les SMADs 2 et 3 (**Figure 34**) (Kaklamani et Pasche, 2004 ; Xu et Pasche, 2007). Il favorise l'expression de plusieurs cytokines fibrogènes et pro-inflammatoires, comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) et l'interleukine 1 $\beta$ , provoquant notamment le développement et la progression de fibroses (Leask et Abraham, 2004). Trois isoformes majeures du TGF $\beta$  ont été identifiées chez les Mammifères, à savoir TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3. En général, le TGF $\beta$  est sécrété sous forme inactivée par son attachement à une protéine latente à celui-ci (Javelaud et Mauviel, 2004). La signalisation par le TGF $\beta$  est activée lorsqu'il se lie au récepteur transmembranaire de type II, qui s'associe au récepteur de type I et en assure sa phosphorylation. Ainsi activé, il peut phosphoryler les SMADs 2 et 3. Les protéines SMADs phosphorylées s'hétérodimérisent avec SMAD4 et sont transloquées dans le noyau pour induire la transcription de gènes cibles (Clark et Coker, 1998). Le TGF $\beta$  joue un double rôle dans la progression précoce du CCR. Il peut agir comme un suppresseur de tumeur dans les cellules épithéliales normales du côlon en régulant la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans les stades ultérieurs du cancer, le TGF $\beta$  favorise la migration cellulaire en augmentant les événements de transition épithélio-mésenchymateux et en réduisant la réponse immunitaire (Lettorio et Roberts, 1998 ; Bellam et Pasche, 2010).

### TP53 :

Dans la plupart des tumeurs colorectales, les deux allèles du gène *TP53* (situé à la position chromosomique 17p13.1) sont inactivés, habituellement par l'association d'une mutation faux sens impactant la traduction de la protéine et d'une délétion chromosomique de la région 17p éliminant ainsi le second allèle (Baker *et al.*, 1989 ; Baker *et al.*, 1990 ; Grady et Markowitz, 2002 ; Kinzler et Vogelstein, 2002 ; Fearon et Bommer, 2008). La protéine p53 sauvage régule l'arrêt du cycle cellulaire et constitue un point de contrôle de la mort cellulaire



**Figure 35. Rôles canoniques et non canoniques du facteur suppresseur de tumeur de p53.**

p53 est activé par différents stress cellulaires comme le stress nutritionnel, les conditions hypoxiques, l'activation des oncogènes, les dommages à l'ADN et le stress oxydatif. Les réponses classiques ou canoniques à p53 provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages causés à l'ADN, ce qui place la cellule dans un état de sénescence ou provoque son apoptose. Les rôles non canoniques et contrôlés de la mort cellulaire programmée comprennent les voies d'autophagie, la nécrose, la nécroptose et la ferroptose. Des processus physiologiques tels que l'activation hormonale peuvent également conduire à l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine p53 induit alors un switch métabolique impliqué dans la différenciation cellulaire. (D'après Moulder *et al.*, 2018).



induite par divers stress comme l'hypoxie ou des dommages à l'ADN (**Figure 35**) (Vazquez *et al.*, 2008). L'inactivation du gène *TP53* coïncide majoritairement avec la transition des adénomes en carcinomes invasifs (Baker *et al.*, 1990).

### **III.4. Altérations de la glycosylation associées au processus de cancérogenèse**

Malgré les progrès récents dans la compréhension des mécanismes génétiques tumoraux, il y a encore un retard relatif dans l'appréhension de tous les aspects du glycome et du glycoprotéome cancéreux. Les changements dans la glycosylation cellulaire sont associés à la transformation maligne des cellules cancéreuses, à la progression de la tumeur et finalement, à la formation de métastases. Les glycanes sont ainsi les moteurs des interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral.

#### **III.4.1. Modification de la glycosylation dans le cas du cancer colorectal**

De nombreuses différences dans les profils de *N*-glycanes ont été observées dans des études comparant des tissus ou des lignées cancéreuses colorectales avec des témoins non cancéreux. Les changements détectés au niveau des *N*-glycanes correspondent à des augmentations de la présence de *N*-glycanes de type « high-mannose ». En effet ceux-ci sont retrouvés, par des techniques de chromatographies liquides associées à la spectrométrie de masse, en grand nombre dans les tissus tumoraux (Balog *et al.*, 2012) et les lignées cellulaires cancéreuses colorectales LIM1215, LIM1899 et LIM2405 (Sethi *et al.*, 2014). De plus, des analyses sur protéines totales montrent qu'ils sont particulièrement retrouvés dans les métastases, mais leur rôle dans la progression tumorale n'a pas encore été établi. Cette accumulation de *N*-glycanes hautement mannosylés serait due à une déficience dans l'étape de maturation des *N*-glycanes (Zhao *et al.*, 2008). Une augmentation de la fucosylation des *N*-glycanes complexes et hybrides est observée dans les cellules cancéreuses colorectales. Ceci est corrélé avec une augmentation de l'expression de la fucosyltransférase FUT8 qui catalyse



l'ajout d'un fucose en  $\alpha$ 1,6 sur la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) proximale du chitobiose des *N*-glycanes (Sethi *et al.*, 2014). Il a été également montré que l'augmentation de l'expression et de l'activité de FUT8 est corrélée avec l'agressivité des tumeurs colorectales (Muineloromay *et al.*, 2008).

Une autre modification de glycosylation affectant les *N*-glycanes a été rapportée. Celle-ci concerne la GlcNAc liée en position centrale à un mannose du *N*-glycane, formant ainsi une bissectrice. Cet ajout est catalysé par la *N*-acétylglucosaminyltransférase III (GnT-III) (Xu *et al.*, 2012). Dans les tissus tumoraux colorectaux, on observe une diminution des *N*-glycanes porteurs de ce motif comparativement aux tissus sains (Balog *et al.*, 2012). Enfin, la présence d'une GlcNAc liée en  $\beta$ 1,6 sur un mannose lié en  $\alpha$ 1,6 sur un *N*-glycane, est associée à l'initiation de l'invasion et à la présence de métastases (Dennis *et al.*, 1987 ; Fernandes *et al.*, 1991 ; Dennis *et al.*, 1999). L'enzyme responsable de cette addition, la *N*-acétylglucosaminyltransférase V (GnT-V), est surexprimée dans les cas de cancers colorectaux (Murata *et al.*, 2000). Cette GlcNAc liée en  $\beta$ 1,6 peut être allongée par plusieurs *N*-acétyllactosamine (LacNAc). Cette réaction est catalysée par les enzymes  $\beta$ 1,4-galactosyltransférases ( $\beta$ 4GalT) (Ujita *et al.*, 2000) et par la  $\beta$ 1,3-*N*-acétylglucosaminyltransférase 8 ( $\beta$ 3GnT8). Cette dernière est surexprimée dans les lignées cancéreuses colorectales (Ishida *et al.*, 2005). De plus dans les cancers colorectaux, la structure LacNAc est associée à la progression tumorale, aux métastases et à un faible taux de survie (Ichikawa *et al.*, 1999).

Les glycoprotéines de type mucine sont abondamment présentes au niveau du côlon, participant à la protection physique de la muqueuse colique (Itzkowitz *et al.*, 1989). Dans les mucines du côlon, les *O*-glycanes de core 1, 2, 3, et 4 retrouvés, subissent généralement des modifications comme, par exemple, leur allongement (Brockhausen, 2006). Lors de la transformation maligne, les mucines présentent des modifications spécifiques, notamment du



CCR, telles que la diminution de la présence des structures de core 3 (GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) et 4 (GlcNAc $\beta$ 1-6(GlcNAc $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) (Vavasseur *et al.*, 1994 ; Brockhausen, 2006). Les sous-expressions de la  $\beta$ 1,3-*N*-acétylglucosaminyltransférase 6 ( $\beta$ 3Gn-T6) et de la core 2  $\beta$ 1,6-*N*-acétylglucosaminyltransférase (C2GnT-I) diminuent la présence de métastases colorectales (Vavasseur *et al.*, 1994 ; Iwai *et al.*, 2005). La core 2  $\beta$ 1,6-*N*-acétylglucosaminyltransférase est aussi impliquée dans la conversion des antigènes T et Tn en structures de core 2 permettant la biosynthèse des épitopes sialyl Lewis a (sLea) et sialyl Lewis x (sLex) qui sont des marqueurs tumoraux associés à la transformation maligne du tissu colorectal (Baldus *et al.*, 2002). Leur augmentation est associée à la progression tumorale favorisant l'adhésion des cellules cancéreuses à la sélectine endothéliale (E-selectin) (Shiozaki *et al.*, 2011). La core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransférase1 (C1GALT1) est fréquemment surexprimée dans le cancer du côlon, ce qui augmente la synthèse de l'antigène T (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) associée à une progression du cancer, la présence de métastases et un faible taux de survie (Hung *et al.*, 2014).

Chez l'Homme, la forme majeure d'acides sialiques retrouvée est l'acide *N*-acétylneuraminique (NeuAc). Elle est présente sur les glycanes en position terminale et joue un rôle dans divers processus biologiques comme la croissance et la différenciation (Taylor *et al.*, 2010). L'ensemble du tractus gastro-intestinal présente une forte densité d'acides sialiques à la surface des cellules ainsi que sur les molécules sécrétées (Varki, 2008). Néanmoins, une augmentation de la sialylation des glycanes est couramment observée dans divers cancers y compris le cancer colorectal. Cela peut être dû à un dysfonctionnement de la régulation des sialyltransférases et/ou des sialidases, ou à une augmentation du nombre de sites potentiels de sialylation (Qiu *et al.*, 2008). Par exemple, la surexpression de la neuraminidase 3 (NEU3) favorise la survie des cellules cancéreuses en diminuant l'apoptose (Miyagi, 2008). L'augmentation du nombre d'acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,6 sur les *N*-glycanes est associée à la



progression tumorale, à la présence de métastases et à des résistances thérapeutiques en raison d'une diminution des interactions cellules-cellules (Seales *et al.*, 2005 ; Park et Lee, 2013 ; Sethi *et al.*, 2014). Cette augmentation d'acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,6 sur les *N*-glycanes est corrélée avec la surexpression de l' $\alpha$ 2,6-sialyltransférase (ST6Gal1) observée dans les tumeurs colorectales (Gessner *et al.*, 1993). La présence des acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,3 sur les glycanes est elle aussi augmentée dans les adénocarcinomes colorectaux (Fukasawa *et al.*, 2013). Les glycanes  $\alpha$ 2,3 sialylés sont les composants majeurs des antigènes Lewis. L'augmentation de la sialylation est une caractéristique principale de la transformation maligne, le plus souvent associée aux stades avancés du cancer colorectal.

La *O*-GlcNAcylation des protéines a également été associée au cancer colorectal. En effet, une surexpression d'OGT couplée à une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation est observée dans les tissus cancéreux colorectaux comparativement aux tissus sains (Mi *et al.*, 2011). De ce fait, différentes études se sont penchées sur l'analyse du rôle que pourrait jouer cette augmentation de *O*-GlcNAcylation dans les cas de CRC. Par exemple, il a été démontré que l'augmentation globale de la *O*-GlcNAcylation de la  $\beta$ -caténine, possédant 4 sites de *O*-GlcNAcylation, réduit la phosphorylation de la thréonine 41 portée par la  $\beta$ -caténine nécessaire à sa dégradation par le protéasome (Olivier-Van Stichelen *et al.*, 2014). Ceci favorise donc la stabilité de la  $\beta$ -caténine et l'activation de la signalisation, connue pour participer au développement tumoral. Une étude menée sur la cycline D1, une cible de la signalisation NOTCH, sur plusieurs lignées cellulaires humaines, dont les cellules cancéreuses colorectales HCT116, met en avant le fait que OGT interagit avec la cycline D1 (Masclef *et al.*, 2019). Le niveau protéique de la cycline D1, au sein des cellules en condition proliférative, est régulé par son ubiquitination. De manière intéressante, une augmentation globale de la *O*-GlcNAcylation, induite par l'inhibition d'OGA (*O*-GlcNAcase), diminue l'ubiquitination de la cycline D1 suggérant que cette modification protège la cycline D1 de la dégradation par le protéasome et





favorise le maintien des cellules en état prolifératif (Masclef *et al.*, 2019). Compte tenu de ces différents éléments, la compréhension des mécanismes liés à l'augmentation de la O-GlcNAcylation dans les cancers colorectaux s'avère primordiale.

### III.4.2. Implication de POFUT1 dans le processus tumoral

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études se sont intéressées à l'implication de POFUT1 au cours du processus tumoral. La première d'entre elles portait sur l'analyse des gènes liés à la glycosylation dans les glioblastomes (Kroes *et al.*, 2007). Les auteurs ont détecté une surexpression d'un facteur 3 de *POFUT1* dans les tissus de patients atteints, ainsi que dans les lignées cellulaires de glioblastomes (SNB19, D54MG, U87MG, U373MG, U118MG, U251 et A172). Plus récemment, POFUT1 a été proposé comme un potentiel biomarqueur et une cible thérapeutique pour les cancers oraux (Yokota *et al.*, 2013). En effet, son expression est augmentée dans les tumeurs primaires et corrélée avec la taille de ces dernières. Une expérience de knockdown de *POFUT1* dans des lignées cellulaires cancéreuses orales montre que la diminution de l'expression de *POFUT1* induit une baisse de la prolifération cellulaire. Puis d'autres études sont venues étayer cette constatation. POFUT1 est également surexprimée dans les tissus hépatiques cancéreux (Ma *et al.*, 2016). Des expériences de surexpression de *POFUT1* au sein de lignées hépatiques tumorales montrent que des niveaux élevés de l'enzyme augmentent la prolifération et la migration des cellules. De plus, une surexpression de *POFUT1* promeut la liaison de NOTCH avec le ligand DLL1 et renforce l'activation de la signalisation NOTCH dans les lignées hépatiques. L'analyse des bases de données TCGA (The Cancer Genome Atlas) met en évidence une surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs gastriques, associée à l'agressivité tumorale (Dong *et al.*, 2017). Dans le cancer du sein, la surexpression de *POFUT1* conjuguée à l'hyperactivation de la signalisation NOTCH sont associées à un mauvais pronostic (Wan *et al.*, 2017). De manière surprenante compte tenu du lieu de détection de *POFUT1*, l'analyse de son expression dans le plasma de patients atteints d'un cancer du pou-



mon met en lumière une surexpression de *POFUT1* chez ces patients par rapport à des individus sains (Leng *et al.*, 2018). Ce qui pourrait expliquer cette surexpression de *POFUT1* observée dans différents types de cancer, semble être lié à la localisation du gène. En effet, la portion chromosomique 20q11-q13 a été décrite comme amplifiée dans les cancers du sein (Kallioniemi *et al.*, 1992), de l'estomac (Kimura *et al.*, 2004), colorectaux (Postma *et al.*, 2005) et les leucémies (MacKinnon *et al.*, 2010). Toutes ces études suggèrent que la protéine *O*-fucosyltransférase 1 participe au processus tumoral et nécessite des recherches approfondies pour déterminer les mécanismes mis en jeu et évaluer son potentiel intérêt thérapeutique.



## Chapitre IV. Objectifs de thèse

---

Parmi les différents types de glycosylation des protéines, la *O*-fucosylation est une modification post-traductionnelle rare ayant lieu au sein du réticulum endoplasmique. Cette réaction catalysée par la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) correspond à l'addition d'un fucose *O*-lié sur un résidu séryl ou thréonyl contenu dans la séquence consensus C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(**S/T**)C<sup>3</sup>, localisée dans des domaines EGF-like correctement repliés. La cible de POFUT1 la plus caractérisée est le récepteur NOTCH1 dont la présence de fucoses *O*-liés et leurs éventuels allongements jusqu'en un tétrasaccharide linéaire, module son interaction avec ses ligands canoniques DSL (Delta/Serrate/Lag-2) et de ce fait la signalisation qui lui est subordonnée.

Mon projet de thèse s'est articulé autour de l'étude de la contribution de POFUT1 dans un contexte physiologique, le processus myogénique, et dans un contexte pathologique, le cancer colorectal.

Le premier versant de mon travail de thèse a été consacré à la poursuite de l'étude de l'implication de POFUT1 dans le processus myogénique. Des travaux antérieurs réalisés au sein de mon équipe d'accueil ont mis en évidence une altération du processus myogénique suite au knockdown de *Pofut1* dans la lignée cellulaire murine C2C12, la lignée Po - (Der Vartanian *et al.*, 2015). Cette altération se caractérise par une diminution de l'activation de la voie NOTCH, une entrée plus précoce en différenciation et une augmentation du nombre de myotubes avec peu de noyaux, signe d'un défaut dans la phase de fusion secondaire (thèse soutenue en 2015 par Audrey Der Vartanian). L'hypothèse a été d'examiner le statut de la voie de signalisation NFATc2/IL-4, reconnue comme associée à l'étape de fusion secondaire (Horsley *et al.*, 2003) et l'éventuelle implication de la voie NOTCH en s'appuyant sur la lignée Po -. J'ai plus particulièrement contribué aux expériences portant sur l'analyse de la signalisa-



tion NFATc2/IL-4. Ce travail a permis la publication d'un article dans la revue *International Journal of Molecular Sciences* en 2019. Parallèlement à cette étude, je me suis intéressé à l'implication de la protéine WIF1, qui est une cible potentielle de POFUT1, toujours au cours du processus myogénique. Une étude se focalisant sur l'impact des sFRPs, protéines inhibitrices de la signalisation WNT au cours du processus myogénique a inspiré ce travail (Descamps *et al.*, 2008). En effet, les auteurs ont démontré que l'incubation de la lignée C2C12 ou de cellules satellites isolées de muscles squelettiques de souris, en présence de sFRP1 ou 2, provoque une inhibition de la formation des myotubes. Les sFRPs inhibent la signalisation WNT en entrant en compétition avec le récepteur Frizzled empêchant les protéines WNT d'interagir avec leur récepteur, mais aussi *via* leur capacité d'interaction avec les protéines WNT grâce à leur domaine NTR (Bafico *et al.*, 1999). Les récepteurs à tyrosine kinase RYK (related to Receptor Tyrosine Kinase) impliqués dans la signalisation WNT possèdent un domaine WIF1 dans leur partie extracellulaire, suggérant la protéine WIF1 pourrait entrer en compétition avec ces récepteurs pour fixer les protéines WNT (Kawano et Kypa, 2003 ; Malinauskas et Jones 2014). Cette donnée nous a laissé penser que la protéine WIF1 pouvait également impacter le processus myogénique à l'instar des sFRPs. Il a donc été entrepris d'incuber les cellules myoblastiques murines C2C12 avec la protéine WIF1 recombinante produite au laboratoire, et de déterminer si cela altérerait les capacités proliférative et de différenciation myogénique des cellules musculaires. A ce jour, la rédaction d'un article est en préparation pour une soumission.

Le second versant de mon travail de thèse s'est inscrit dans une nouvelle orientation qu'a souhaité donner mon équipe d'accueil à ses travaux de recherches, à savoir l'implication de la *O*-fucosylation et de la sialylation dans le développement tumoral colorectal. Au cours de ses dernières années, des travaux ont mis en évidence l'implication de POFUT1, acteur de la *O*-fucosylation, dans différents types de cancers, mais rien n'avait été jusqu'alors entrepris pour explorer son rôle dans le cancer colorectal. J'ai ainsi pu initier les premiers travaux concernant





la mise en évidence du rôle potentiel de POFUT1 dans ce cancer. Pour ce faire, j'ai utilisé à la fois les données de la plateforme FireBrowse, des lignées colorectales saine ou cancéreuses de grades différents (CCD841CoN, HCT116, HT-29 et SW620), et des tissus colorectaux provenant du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. Ce travail s'est concrétisé par la publication d'un article dans la revue Cancers en 2018.



### V.1. Article n°1

## **Downregulation of *POFUT1* impairs secondary myogenic fusion through the NFATc2/IL-4 signaling pathway.**

**Julien Chabanais<sup>1</sup>, Audrey Der Vartanian<sup>1</sup>, Claire Carrion, Abderrahman Maftah<sup>\*</sup>,  
Agnès Germot<sup>\*</sup>**

<sup>1</sup>co-premiers auteurs, <sup>\*</sup>co-derniers auteurs

*International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 4396;  
doi:10.3390/ijms20184396

Impact factor 2019 : 4.183



Le processus myogénique et notamment la formation des myotubes multinucléés, est sous la dépendance des facteurs régulateurs myogéniques (MRF) (Bober, 1991 ; Montarras *et al.*, 1991 ; Bismuth et Relaix, 2010). Chez les Mammifères, le développement du muscle squelettique est caractérisé par l'étape de fusion myoblastique (Rochlin *et al.*, 2010 ; Abmayr et Pavlath, 2012). Les myoblastes s'alignent et fusionnent conduisant à la formation de myotubes primaires immatures. Puis, un mécanisme d'accrétion myonucléaire se met en place correspondant au recrutement de myoblastes environnants par les myotubes immatures, définissant ce que l'on nomme la fusion secondaire. Deux précédentes études réalisées au sein de mon équipe d'accueil ont mis en avant le fait que la protéine O-fucosyltransférase 1 (POFUT1), participe au processus de fusion myogénique à travers son implication dans l'activation de la voie de signalisation NOTCH (Der Vartanian *et al.*, 2015 ; Al Jaam *et al.*, 2016). En particulier la sous-expression de *Pofut1* au sein de la lignée myoblastique murine C2C12 diminue l'activation de la voie NOTCH, et favorise l'engagement précoce des myoblastes dans le processus de différenciation myogénique. De plus, des défauts dans le processus de fusion secondaire ont été observés et se traduisent par une augmentation du nombre de myotubes ayant un faible nombre de noyaux.

De ce fait, un autre versant de mon travail de thèse a été de poursuivre un travail préalablement engagé, se focalisant sur l'élucidation de ces défauts de fusion secondaire. Une des voies de signalisation associée à cette étape du processus myogénique est la voie NFATc2/IL-4. Cette dernière une fois activée, se traduit par la déphosphorylation de NFATc2 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 2) qui est alors transloqué dans le noyau induisant la production de l'interleukine 4 (IL-4) par les myotubes naissants (Horsley *et al.*, 2003). Les cellules de réserve (cellules indifférenciées ne fusionnant pas au cours de la différenciation myogénique) qui possèdent le récepteur à l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) à leur surface sont sensibles à cette augmentation d'IL-4 et vont fusionner avec les myotubes voi-



sins. Nous avons donc décidé de nous intéresser à cette signalisation dans notre lignée myoblastique murine C2C12 sous-exprimant de façon stable *Pofut1* (Po<sup>-</sup>). Nous avons observé que le knockdown de *Pofut1* diminue l'expression du facteur myogénique *Myf6* associé à la fusion secondaire et le nombre de noyaux par myotube confirmant l'altération du processus myogénique. On a pu également détecter une sous-expression de *Nfatc2* au sein des myotubes et des cellules de réserve, s'accompagnant à la fois d'une réduction de la quantité d'IL-4 sécrétée dans le milieu, et du niveau d'expression du récepteur IL-4R $\alpha$  par les cellules de réserve. Également, la neutralisation de la fixation de l'IL-4 sur son récepteur par l'intermédiaire d'un anticorps anti-IL-4R $\alpha$  provoque un défaut d'accrétion myonucléaire similaire à celui observé dans notre lignée Po<sup>-</sup>. Ceci confirme la nécessité de la liaison de l'IL-4 à son récepteur pour induire le recrutement des cellules de réserve par les myotubes.

L'ensemble des résultats mettent en avant l'implication de *Pofut1* au cours de la fusion myoblastique secondaire à travers la voie de signalisation NFATc2/IL-4. En effet, une expression non altérée de *Pofut1* participe au maintien d'un niveau de transcription de *Nfatc2* suffisant pour induire la sécrétion d'une bonne quantité d'IL-4, pouvant alors se fixer à la surface des cellules de réserve possédant le récepteur IL-4R $\alpha$  et activer la fusion secondaire. De façon plus inattendue, nous avons montré que la voie NOTCH n'était pas impliquée dans le processus d'accrétion nucléaire.










Article

# Downregulation of POFUT1 Impairs Secondary Myogenic Fusion Through a Reduced NFATc2/IL-4 Signaling Pathway

Audrey Der Vartanian <sup>1,2,†</sup>, Julien Chabanais <sup>1,†</sup> , Claire Carrion <sup>3</sup>, Abderrahman Maftah <sup>1,‡</sup>   
and Agnès Germot <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> PEIRENE, EA 7500, Glycosylation et différenciation cellulaire, Université de Limoges, F-87000 Limoges, France

<sup>2</sup> present address: INSERM, IMRB U955-E10, Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, F-94000 Créteil, France

<sup>3</sup> UMR CNRS 7276, Contrôle de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations, Université de Limoges, F-87000 Limoges, France

\* Correspondence: agnes.germot@unilim.fr; Tel.: +33-(0)5-55-45-76-57

† A. Der Vartanian and J. Chabanais contributed equally to this work and are considered co-first authors.

‡ A. Maftah and A. Germot contributed equally to this work and are considered co-last authors.

Received: 4 August 2019; Accepted: 5 September 2019; Published: 6 September 2019



**Abstract:** Past work has shown that the protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1) is involved in mammal myogenic differentiation program. *Pofut1* knockdown (Po<sup>-</sup>) in murine C2C12 cells leads to numerous elongated and thin myotubes, suggesting significant defects in secondary fusion. Among the few pathways involved in this process, NFATc2/IL-4 is described as the major one. To unravel the impact of POFUT1 on secondary fusion, we used wild-type (WT) C2C12 and Po<sup>-</sup> cell lines to follow *Myf6*, *Nfatc2*, *Il-4* and *Il-4ra* expressions during a 120 h myogenic differentiation time course. Secreted IL-4 was quantified by ELISA. IL-4R $\alpha$  expression and its labeling on myogenic cell types were investigated by Western blot and immunofluorescence, respectively. Phenotypic observations of cells treated with IL-4R $\alpha$  blocking antibody were performed. In Po<sup>-</sup>, we found a decrease in nuclei number per myotube and a downexpression of *Myf6*. The observed downregulation of *Nfatc2* is correlated to a diminution of secreted IL-4 and to the low level of IL-4R $\alpha$  for reserve cells. Neutralization of IL-4R $\alpha$  on WT C2C12 promotes myonuclear accretion defects, similarly to those identified in Po<sup>-</sup>. Thus, POFUT1 could be a new controller of myotube growth during myogenesis, especially through NFATc2/IL-4 signaling pathway.

**Keywords:** IL-4; myogenic differentiation; NFATc2; NOTCH pathway; POFUT1; secondary fusion

## 1. Introduction

During postnatal skeletal myogenesis, the muscle stem cells called satellite cells play a crucial role in muscle growth, homeostasis and regeneration. Under activation, these cells commit to a myoblast cell fate and allow cell fusion and fiber formation. Initiation of the myogenic program is defined by expression of *Pax3/7* followed by the hierarchized expression of the myogenic regulatory factors (MRFs), *Myf5*, *MyoD*, *MyoG* [1,2] and *Myf6* [3,4], which are necessary for the formation of multinucleated myotubes (MT). For mammals, myoblast (MB) fusion is a critical mechanism in muscle development and regeneration of mature myofibers upon muscle injury in adults [5]. Skeletal muscle fibers arise from two complementary fusion processes of MB [6,7]. Initially, the primary fusion is defined by the alignment of MB, which fuse together leading to the formation of nascent MT. Then, the myonuclear accretion, corresponding to the secondary fusion, results from the recruitment of surrounding MB by



the immature MT. Distinct signaling pathways are involved in the myogenic differentiation [8]. Among them, the activation of the NOTCH pathway maintains satellite cells in a quiescent state and contributes to proliferation of MB [9]. The NFATc2/IL-4 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 2/Interleukin-4) pathway is specifically involved in the secondary fusion process [10,11]. It acts on myoblast fusion after the initial formation of MT and is necessary for their growth. Regulated by calcium-dependent signaling, NFATc2 is dephosphorylated and translocates to the nucleus to induce the production of the cytokine IL-4 by nascent MT. The IL-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) expressed at the cell surface of MB allows their recruitment by nascent MT [12]. Furthermore, it is known that *Il-4ra* expression is induced and stabilized in the presence of IL-4 itself [13,14]. *Il-4ra* is overexpressed in severe human diseases such as embryonic and alveolar subtypes of rhabdomyosarcoma (ERMS, ARMS, respectively). In humans, and mouse model, it is involved in tumor metastatic properties [15]. RMSs are common pediatric cancers of soft tissue with a poor prognosis [16]. An aberrant upregulation of NOTCH signaling pathway [17] and Pax3/7 expression [18] are also found in the rhabdomyosarcoma cells to be responsible for the tumor growth. Even if tumors are mostly positive for MYOD and MYOG [19–21], which act as skeletal muscle lineage and differentiation markers, RMS cells fail to fuse into mature myofibers [20,21]. As myogenic differentiation and fusion capacities are distinctively, but both impaired, one potential therapeutic strategy could be to combine the IL-4R $\alpha$  blockade with an inhibition of NOTCH signaling to target the tumorigenesis of RMS. Recently, we proposed that protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1) acts through the NOTCH signaling pathway as a myogenic modulator, which controls the commitment of MB into the myogenic program [22,23]. POFUT1 is an endoplasmic reticulum (ER)-resident enzyme [24] responsible for the O-fucosylation of S or T included in EGF-like domains of around eighty secreted or membrane glycoproteins in human or mouse, especially NOTCH receptors and ligands, that contain the consensus sequence C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(S/T)C<sup>3</sup> (where C<sup>2</sup> and C<sup>3</sup> are the second and third cysteines of EGF-like domain, respectively) [25]. *Pofut1*<sup>-/-</sup> mice die at mid-gestation with severe alterations particularly in somitogenesis, similar to those observed for embryos lacking downstream effectors of the NOTCH signaling pathway [26]. In *Pofut1*<sup>cax/cax</sup> mice presenting the *cax* (compact axial skeleton) hypomorphic allele of *Pofut1*, skeletal muscles show a postnatal hypertrophy associated with a decrease in PAX7+ satellite cells [23]. The O-fucosylation of NOTCH receptors mediated by POFUT1 is essential for the canonical NOTCH signaling pathway [27]. Abnormal NOTCH signaling has been associated with human POFUT1 dysfunction in various cancers such as breast [28], hepatocellular [29] or colorectal [30] ones where POFUT1 overexpression is correlated with tumor development. Several studies demonstrated in osteoblasts [31] and keratinocytes [32] the interdependence of NOTCH and NFATc2 signaling pathways. The cleavage of NOTCH intracellular domain (NICD) is involved in the stabilization of *NFATc2* transcript via a post-transcriptional mechanism [31]. Moreover, *NFATc2* overexpression suppress canonical NOTCH transactivation and expression of *HEY* (Hairy/Enhancer of Split-related with YRPW motif) genes.

Our study identifies a new critical role of POFUT1 in the secondary fusion process. Downregulation of *Pofut1* in differentiating C2C12 cells induces a myonuclear accretion defect in MT. It results from a decrease of *Nfatc2* mRNA expression, which is associated with a diminution of secreted IL-4 in the culture medium and a reduction of IL-4R $\alpha$  quantity for cells normally contributing to MT growth.

## 2. Results

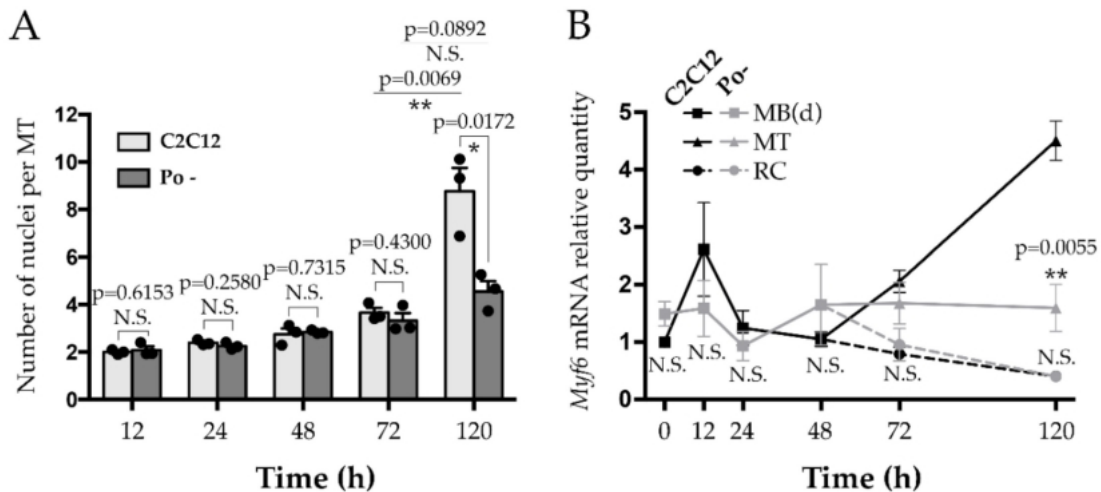
### 2.1. Secondary Fusion Defect Occurs between 72 h and 120 h of Differentiation in *Pofut1* Knockdown C2C12 Cells

To evaluate myonuclear accretion process in C2C12 cells, nuclei number was determined during 120 h of differentiation time course in wild-type (WT) and *Pofut1* knockdown (Po-) cell lines; the latter having been created for a previous study [22]. Although no significant difference was observed in the first 72 h of myogenic differentiation between the cell lines, Po-MT had a significant lower number of nuclei at 120 h. They contained around four nuclei per MT, whereas WT MT contained around nine





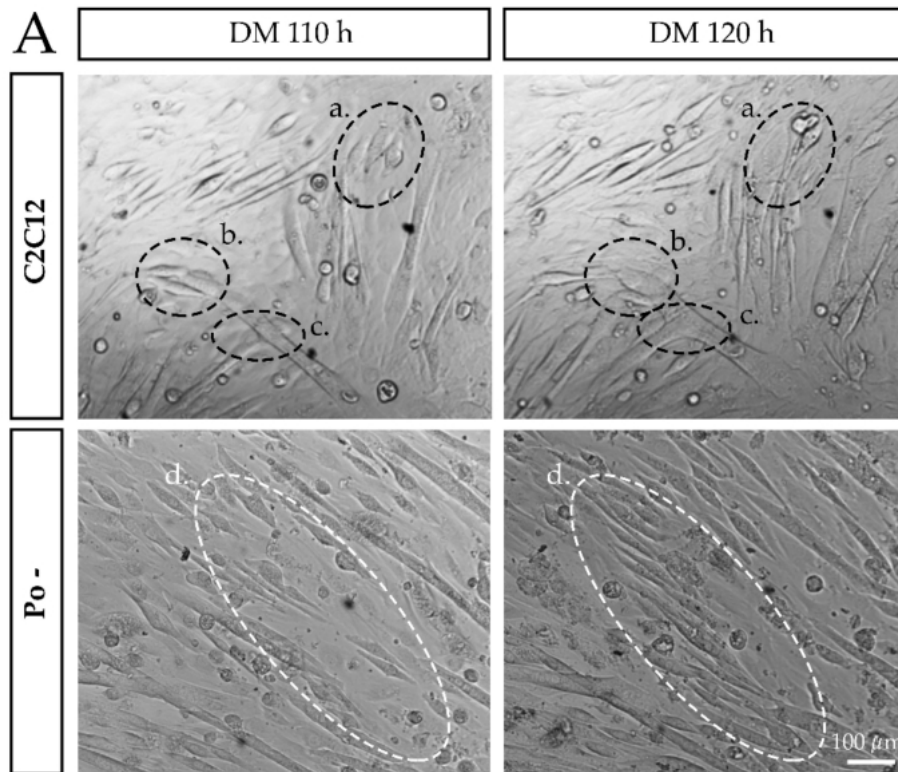
nuclei ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). In the normal differentiation process of C2C12, the number of nuclei in MT was at least multiplied by two between 72 h and 120 h ( $p < 0.01$ ), whereas in Po<sup>-</sup>, no significant difference was noticed. We already observed [22] that the knockdown of *Pofut1* in C2C12 cell line induced thinner and longer MT than WT ones and a significant increase of MT population containing fewer nuclei compared to WT.



**Figure 1.** Timing of secondary fusion in C2C12 cell lines. (A) Mean number of nuclei in myotubes from wild-type (WT) C2C12 and *Pofut1* knockdown (Po<sup>-</sup>) cells during myogenic differentiation time course. (B) Relative quantities of *Myf6* expression in WT C2C12 (black) and Po<sup>-</sup> cells (grey). During myogenic fusion, some of the differentiating myoblasts (MB(d)) will fuse together leading to the formation of myotubes (MT), while others will generate mononucleated reserve cells (RC) that will participate in MT growth during secondary fusion. All experiments were performed in biological triplicates. In both cell lines, fold changes were relative to time 0 h of WT C2C12. Bar graphs and plots represented means  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean). In (A), each mean of replicates was symbolized by a dark dot. Statistical analyses were done using a two-tailed Student test, which compared within and between differentiation times, and according to both cell types, MT and RC. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . N.S., not significant.

The maturation of MT was evaluated by *Myf6* gene expression measurement during the differentiation time course of WT C2C12 and Po<sup>-</sup> (Figure 1B). During the first 48 h, expression level of *Myf6* was not significantly different in Po<sup>-</sup> compared to WT cells. At 72 h, when cell types are distinguishable, no significant difference was observed between cell lines regardless the MT and RC considered. At 120 h, WT MT, but not Po<sup>-</sup> MT, showed a remarkable increase of *Myf6* expression, around 4.5 times more than in the differentiating myoblasts, MB(d), at 0 h ( $p < 0.01$ ). From 96 h of differentiation, the cell fusion was periodically followed every 15 min until 120 h using a time-lapse microscope, in both WT and Po<sup>-</sup> cell cultures (Figure 2; Supplementary Video S1a,b). Both WT and Po<sup>-</sup> cell lines presented capacities for the primary fusion step since their respective myoblasts were able to fuse together as shown in Figure 2a,d. However, only WT RC were observed to fuse with nascent WT MT (Figure 2b), which is characteristic of the secondary fusion step. Moreover, the fusion of the primary MT, observed in WT (Figure 2c), also promoted the growth of mature MT, which constitutes properties of the secondary fusion step. In *Pofut1* knockdown context, after cell alignment, only an end to end multifusion of MB(d) was observed (Figure 2d) whereas Po<sup>-</sup> nascent MT were never shown to fuse together. These results suggest that knockdown of *Pofut1* induces secondary fusion and maturation defects.





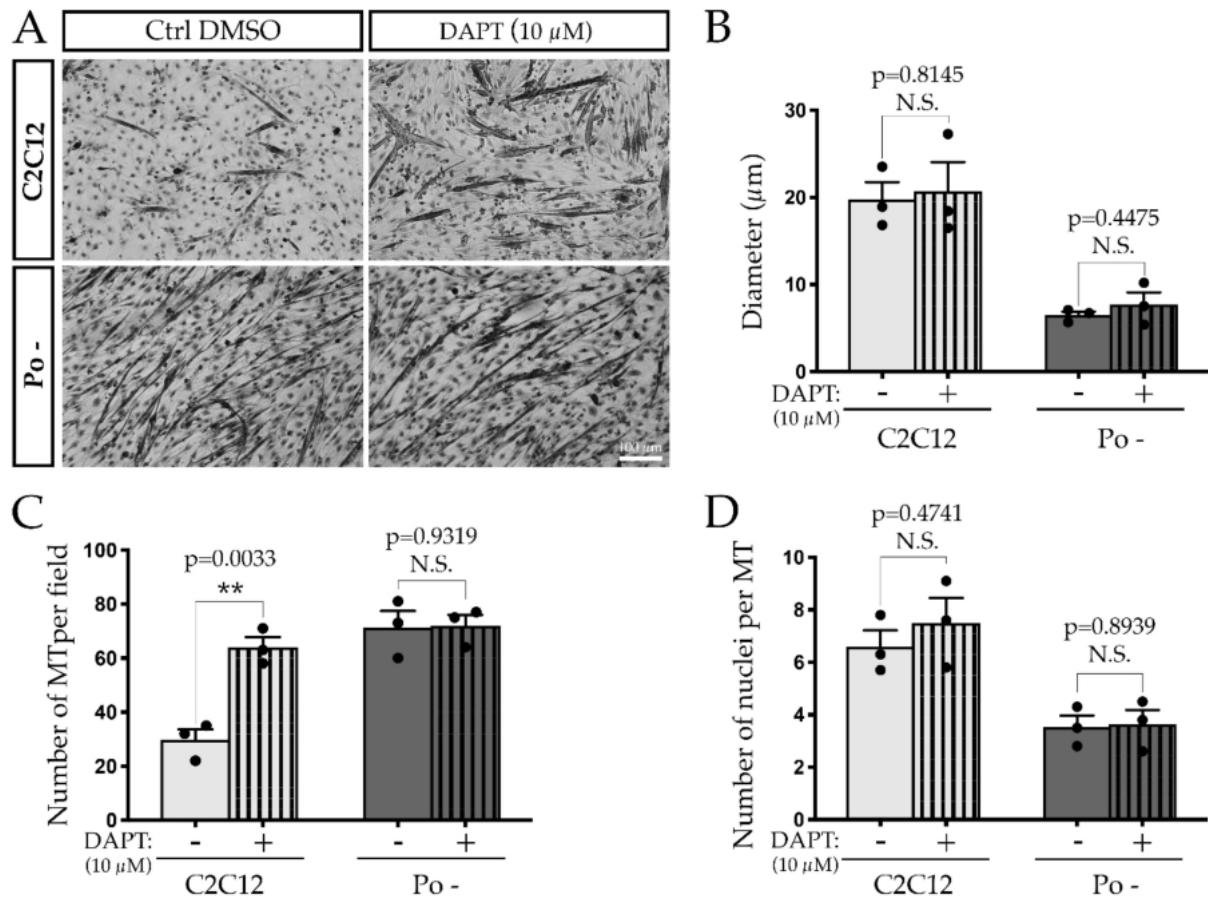
**Figure 2.** Live-cell monitoring of fusion dynamics in WT C2C12 and Po – cells at 110 h and 120 h of myogenic differentiation. The C2C12 myoblasts, in the process of differentiation, align and fuse together to form nascent myotubes, in the primary fusion step (a). Then, some of the surrounding reserve cells fuse with the nascent myotubes participating in their elongation, in the secondary fusion step (b). Primary myotubes also fuse together in the secondary fusion process (c). In the case of Po – myoblasts, they align and rapidly fuse into elongated myotubes, but only include a small number of nuclei (d). Thus, the surrounding reserve cells will not fuse with these atypical myotubes and lengthen them.

## 2.2. Myonuclear Accretion Defect in Po – Cells is Independent of NOTCH Pathway Activation

As POFUT1 impacts myogenic cell commitment through NOTCH signaling [22], alteration of this pathway could also be responsible of the secondary fusion defect observed in Po – cells. To challenge this hypothesis, the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-l-(S)-phenylglycine t-butyl ester), which prevents proteolytic cleavage of NICD, was used at 10  $\mu$ M during the first 120 h of WT C2C12 and Po – cell differentiation. This concentration was previously demonstrated to inhibit NOTCH signaling in WT C2C12 cells [22]. Phenotypic analyses (Figure 3A) revealed that at 120 h, WT C2C12 treated with DAPT present significantly more MT per field ( $64.0 \pm 3.79$ ) compared to C2C12 cells treated with an equivalent volume of DMSO (dimethyl sulfoxide),  $29.7 \pm 3.93$  (Ctrl DMSO, Figure 3C). This increased number of MT in WT C2C12 following DAPT exposure is comparable to the number of Po – MT, which is unchanged by the treatment (Po –/DAPT:  $72.0 \pm 4.04$ ; Po –/DMSO:  $71.3 \pm 6.12$ ). However, neither the diameter (WT C2C12/DMSO:  $19.78 \pm 1.98$  and WT C2C12/DAPT:  $20.74 \pm 3.32$ ; Po –/DMSO:  $6.50 \pm 0.41$  and Po –/DAPT:  $7.72 \pm 1.39$ , Figure 3B) nor the number of nuclei per MT (WT C2C12/DMSO:  $6.6 \pm 0.62$  and WT C2C12/DAPT:  $7.5 \pm 0.95$ ; Po –/DMSO:  $3.5 \pm 0.43$  and Po –/DAPT:  $3.6 \pm 0.55$ , Figure 3D) were impacted following DAPT treatment on both C2C12 cell lines. Taken together, these results demonstrate that NOTCH is crucial for cell fate decision and determination of myoblasts primed for fusion, but not responsible for myonuclear accretion.





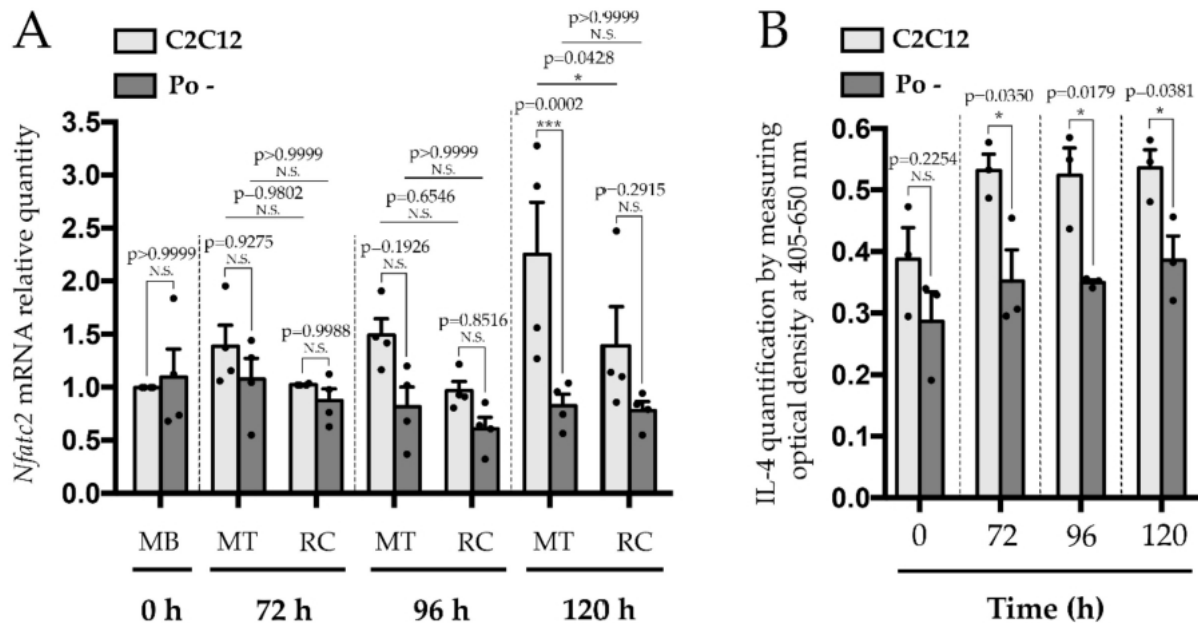


**Figure 3.** Secondary fusion does not rely on the NOTCH signaling pathway. Photographs show WT C2C12 and Po – cells at 120 h of differentiation treated with DMSO (the control – Ctrl) or DAPT at 10 μM (A). Although the inhibition of NOTCH signaling did not impact the diameter of the MT in any conditions (B) the number of MT per field increased in treated WT C2C12 cells and became similar to Po – ones (C). The number of nuclei per MT, reflecting the myonuclear accretion, was not modulated following the blockade of NOTCH intracellular domain (NICD) cleavage in both cell lines (D). Experiments were conducted in biological triplicates. Bar graphs represented means ± SEM. In B, C and D, each mean of replicates was symbolized by a dark dot. Statistical analyses were performed using a two-tailed Student test, which compared cell lines treated or not with DAPT. \*\*,  $p < 0.01$ . N.S., not significant.

### 2.3. NFATc2/IL-4 Pathway Is Deregulated in Po—Cells

Numerous signaling molecules and pathways are involved in myogenic fusion processes, especially for the primary step [33]. However, those specifically involved in the secondary step of the fusion are not so abundant, with the exception of the NFATc2/IL-4 pathway. NFATc2 translocation into the nucleus directly controls IL-4 production. The presence of IL-4 in the myotubes' secretome ensures the recruitment of RC during the secondary fusion process [10,12]. Lack of IL-4 or the IL-4R $\alpha$  induces a peculiar MT phenotype close to the Po – one, with a reduced size and a lowest myonuclear number compared to WT [12]. We first determined the relative quantity of *Nfatc2* mRNA in WT C2C12 and Po – cells during the myoblast differentiation process. From 96 h, i.e., at the time of which the secondary fusion takes place, a decrease of *Nfatc2* mRNA quantity was observed in Po – compared to WT C2C12, especially in MT at 96 h (by 45%) and at 120 h (by 65%) ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A). Interestingly, at 120 h, a significant difference ( $p < 0.001$ ) in *Nfatc2* expression is detected between MT and RC in WT C2C12, unlike Po –.



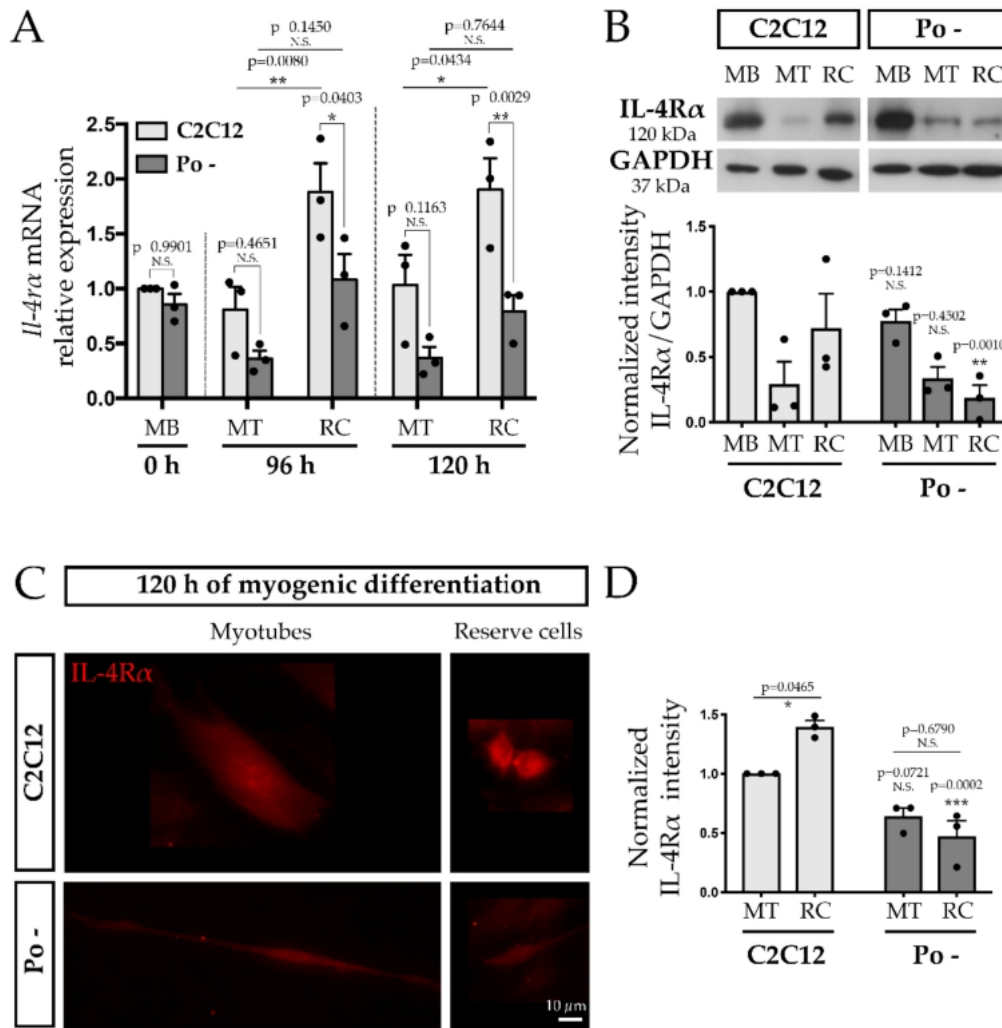


**Figure 4.** *Nfatc2* mRNA and IL-4 quantities are downregulated in Po – cells during secondary fusion process. qPCR analysis (A) indicates that *Nfatc2* was significantly decreased at 96 h and 120 h in Po – compared to WT C2C12 cells. Mouse IL-4 ELISA (B) performed on WT C2C12 and Po – cells during differentiation process shows that its presence in the culture medium was impaired in Po – cells. All experiments were carried out at least in biological triplicates and each mean of replicates was symbolized by a dark dot. Bar graphs represented means  $\pm$  SEM. For both cell lines, fold changes were relative to time 0 h of WT C2C12. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with p-value calculated by Sidak’s post-test (A) and a two-tailed Student test (B), which compared within differentiation times and according to both cell types, MT and RC. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . N.S., not significant.

We also quantified the presence of IL-4 in the culture medium of WT C2C12 and Po – cells. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) in Po – compared to WT C2C12 was detected, especially from 72 h (around 30%) (Figure 4B), that corresponds to the notable apparition of MT in WT C2C12, up to 120 h, where the secondary fusion is still in progress (Figure 2b,c). In parallel to the altered *Nfatc2* profile of expression, Po – cells present an impaired IL-4 profile of expression, which could modify the expression of the IL-4 receptor.

Thus, we followed the *Il-4ra* expression in WT C2C12 and Po – cells by qPCR during differentiation. We showed significant decreases by 42.4% at 96 h ( $p < 0.05$ ) and 58.3% at 120 h ( $p < 0.01$ ) in Po – RC compared to WT ones, while no significant difference was observed in MT (Figure 5A). For both cell lines, *Il-4ra* expression was higher in RC relative to MT, especially at 96 h where significant differences were observed ( $p < 0.01$ ).





**Figure 5.** IL-4Rα expression for reserve cells decreases in Po – cells during differentiation time course compared to WT C2C12. qPCR analysis (A) performed on both cell lines highlighted that *Il-4ra* mRNA quantity is significantly decreased in Po – RC at 120 h, which is confirmed in terms of proteins by Western blot (WB) (B), immunofluorescence labelling (C) and its quantification (D). qPCR, WB and immunofluorescence experiments were done in biological triplicates and fold changes calculated relative to WT C2C12 cells, MB for qPCR and WB, and MT at 120 h for immunofluorescence quantification. Bar graphs represented means ± SEM. In (A), each mean of replicates was symbolized by a dark dot. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA with p-value calculated by Sidak’s post-, which compared within differentiation times and according to both cell types, MT and RC. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . N.S., not significant.

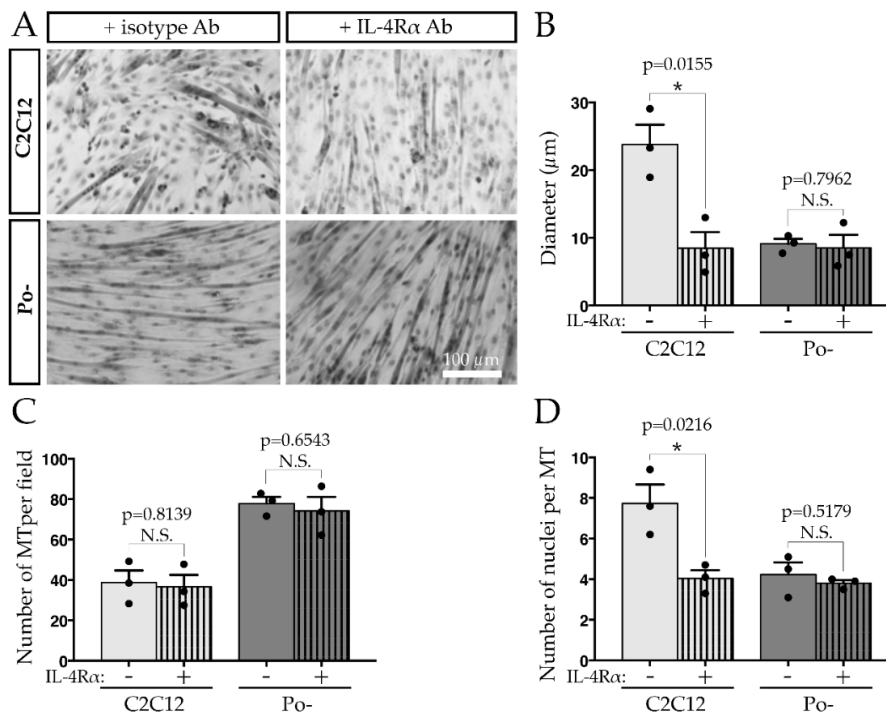
Western blot analysis performed on MB at 0 h, MT and RC at 120 h of differentiation only showed a significant drastic decrease (by 66.5%) of IL-4Rα in Po – RC compared to WT ones (Figure 5B). Furthermore, IL-4Rα immunofluorescence labeling confirmed its downexpression in Po – RC and a similar expression level in MT between WT C2C12 and Po – (Figure 5C,D). Taken together, these results establish that *Pofut1* knockdown cells present an impaired profile of *Nfatc2* expression profile and secrete a lesser amount of IL-4 than WT C2C12 during differentiation. It is correlated with a decrease of IL-4Rα expression in Po – RC, which would be unable to perform a correct secondary fusion with nascent myotubes.





#### 2.4. Presence of IL-4 Receptor $\alpha$ at the Cell Membrane Is Necessary for the Recruitment and Fusion of Reserve Cells with Nascent Myotubes

To determine if the defect of NFATc2/IL-4 pathway could be responsible of the Po – cell phenotype, neutralizing experiments were performed using anti-IL-4R $\alpha$  antibodies or a rabbit IgG isotype control on WT C2C12 cells to block the recruitment of RC. Morphometric analysis and MT counting per field showed that at 120 h, WT C2C12 MT treated with anti-IL-4R $\alpha$  antibody displayed a slender and elongated phenotype, closely resembling that of *Pofut1* knockdown MT (Figure 6A). Their diameter significantly decreased from 23.5 to 8.8  $\mu$ m (Figure 6B). Conversely, the anti-IL-4R $\alpha$  treatment of Po – cells did not affect the already elongated and slender phenotype of Po – MT nor their diameter (Figure 6A,B). The anti-IL-4R $\alpha$  treatment did not impact the total number of MT counted per field in WT C2C12 (around 40) and Po – cells (around 80) (Figure 6C), but the number of nuclei per myotube was significantly lowered in treated WT C2C12, being comparable to the Po – one (around four, Figure 6D). It indicates that after the primary fusion process, the recruitment of RC involved at least the IL-4 secretion and its interaction with IL-4R $\alpha$  to allow the growth of MT in WT C2C12.



**Figure 6.** IL-4R $\alpha$  is involved in the MT growth. Neutralizing assay with anti-IL-4R $\alpha$  antibody on WT C2C12 cells generated thin and elongated MT like in Po –, observable at 120 h (A). WT C2C12 MT incubated with anti-IL-4R $\alpha$  antibody during differentiation time course presented a lesser diameter than C2C12 untreated cells, similar to the diameter of Po – MT (B). Anti-IL-4R $\alpha$  antibody treatment did not impact the number of MT per field in any cases (C) but in C2C12 treated cells, the number of nuclei per MT decreased and became similar to Po – one (D). Experiments were conducted in biological triplicates. Bar graphs represented means  $\pm$  SEM. In B, C and D, each mean of replicates was symbolized by a dark dot. Statistical analyses were performed using a two-tailed Student test, which compared cell lines treated or not with anti-IL-4R $\alpha$  antibody. \*  $p < 0.05$ . N.S., not significant.

### 3. Discussion

In this study, we revealed that the impaired expression of *Pofut1* gene encoding enzyme responsible for O-fucosylation of proteins, leads to defects of the secondary fusion process during myogenesis, in particular through NFATc2/IL-4 signaling pathway. Myogenic differentiation process is under the complex dependence of the transcriptional factors, MRFs (Myf5, MyoD, Myogenin and Myf6), whose expression is coordinated and highly specific for the skeletal muscle lineage. Myf6 is the





later expressed MRFs, which makes it essential for organizing and maintaining myotubes triggering the expression of myotube-specific genes [34] and fundamental for the final phase of myogenic differentiation in postnatal myogenesis [1,35]. The significant difference in *Myf6* expression observed between WT C2C12 and the *Pofut1* knockdown cell line (Po<sup>-</sup>) at 120 h of the differentiation time course attests to a disturbed myotube maturation characteristic of an impaired secondary fusion in Po<sup>-</sup>. This result is confirmed by a reduced number of nuclei per myotube. Both WT C2C12 and Po<sup>-</sup> myoblasts are able to fuse together whereas peculiar nascent Po<sup>-</sup> MT were not able to fuse with surrounding Po<sup>-</sup> RC to form mature MT. So, POFUT1 is essential to the correct myoblast-myotube and myotube-myotube fusions. Myonuclear accretion is normally facilitated in the secondary fusion process by the recruitment of neighboring myoblasts, which express IL-4R $\alpha$  at their cell surface. This recruitment is induced by nascent MT secreting interleukin 4 (IL-4) under the control of NFATc2 pathway [12]. *Pofut1* knockdown in C2C12 prevents the normal *Nfatc2* expression in MT and RC at the myogenic fusion time. It also impairs *Nfatc2* differential expression between the two cell types, necessary to the recruitment of RC by nascent MT. The secreted IL-4 is also decreased, which would notably affect the myonuclear accretion by Po<sup>-</sup> nascent MT. Conservation of an optimum IL-4 centripetal concentration gradient produced by nascent MT could be a key part to attract the surrounding RC. Moreover, IL-4 itself was involved in the expression of IL-4R $\alpha$  receptor [14]. Its increased presence at the cell surface of WT RC could possibly involve STAT6, which can bind on the *Il-4ra* gene promoter and induce its expression [36]. IL-4 diminution in Po<sup>-</sup> would then explain the reduction of IL-4R $\alpha$  for Po<sup>-</sup> RC. An interconnection was reported between NOTCH1 activation and calcineurin-NFAT pathways in keratinocyte differentiation control [32] and in T-cell acute leukemia malignancy and recidivism [37]. Furthermore, an exposure of osteoblasts to the NOTCH ligand DLL1 induces *Nfatc2* expression and this effect could be due to a post-transcriptional mechanism where NICD stabilized *Nfatc2* mRNA [31]. Although the secondary myogenic fusion is independent of NOTCH pathway activation, a link between *Nfatc2* expression and NOTCH signaling exist during proliferation (data not shown). Possibly, as in the osteoblasts, NICD, through the regulation of some miRNA expression, could contribute to stabilization of the *Nfatc2* mRNA, improving its half-life time [31]. The miRNA expression profile of mouse satellite cells was recently unraveled and highlighted several miRNA clusters, whose modulation of expression depends on lineage progression from quiescent to activated and differentiated satellite cells [38]. Among them, mmu-miR-329-3p and mmu-miR-190a-3p are highly expressed in quiescent satellite cells, presenting similarity with RC, but drastically downregulated in differentiated cells, such as MT. These miRNAs present strong evidence to target *Nfatc2* in 3'UTR region of murine embryonic stem cells [39] and hepatocytes [40], using a high-throughput sequencing of RNAs, isolated by cross-linking immunoprecipitation approach. To date, most studies have shown that miRNAs bind to a specific sequence at the 3' UTR of their target mRNAs to induce translational repression and mRNA deadenylation and decapping. Indeed, the decrease of mmu-miR-329-3p and mmu-miR-190a-3p expression in differentiated muscle cells could explain the increase of *Nfatc2* expression in MT of WT C2C12 model. The protein O-fucosyltransferase 1, POFUT1, a soluble protein located in ER lumen [24,41], is responsible of O-fucose addition on S or T residue within the consensus sequence C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(S/T) C<sup>3</sup> of EGF-like domain [25] of cell surface and secreted proteins [42]. A correct O-fucosylation of NOTCH receptors, which can include 17 O-linked fucoses on the 36 EGF-like of mouse NOTCH1 [43], is essential to their cleavage, i.e., NICD production. Otherwise, it is known that elevation in the intracellular calcium activates the phosphatase calcineurin, which in turn dephosphorylates NFATc2, allowing its nuclear translocation [44]. The intracytoplasmic calcium homeostasis is possibly impacted in Po<sup>-</sup> cell line because the POFUT1 overexpression was shown to disrupt the ER structure [22] and could result in modifying the intracellular calcium regulation. Moreover, many of the NOTCH EGF-like repeats bind calcium that imparts rigidity necessary to ligand interaction and successful receptor cleavage [45].

Among all proteins linked to myogenesis [46], several are implicated in myoblast polarization, like cadherins [47]. Among the few eighties POFUT1 predicted target proteins, CELSR1 to three



(Cadherin EGF LAG seven pass G type receptors) proteins present up to eight EGF-like domains and two *O*-fucosylation potential sites per isoform, in human and mouse [48]. They belong to an atypical cadherin subfamily and play critical roles in neuronal cell differentiation, axon guidance, neuronal migration and cilium polarity [49]. Although CELSR are expressed in human skeletal muscle, they were poorly studied in the myogenesis context [50]. STAB2, another putative POFUT1 target containing in mouse 17 EGF-like domains with six potentially *O*-fucosylation sites, which contributes to cell-cell interactions [51,52], is implicated in myogenic fusion process. During myogenic differentiation, *Stab2*<sup>-/-</sup> mouse myoblasts produce small and thin MT with a reduced number of nuclei per MT, highlighting the participation of STAB2 in myonuclear accretion [53]. This phenotype similar to that of Po – MT suggests that *Pofut1* knockdown could also impair STAB2 function in myogenic fusion. Thus, POFUT1 expression and *O*-fucosylation of its targets might be new controllers of the myogenic fusion process and should, as such, deserve more attention in research on skeletal muscular diseases.

Finally, the results exposed in this work were obtained from an *in vitro* model, the mouse myoblast C2C12 cell line. The next step would be to test if the NFATc2/Il-4 pathway is also affected in *in vivo* models. The knockout of *Pofut1* in mouse is lethal at midgestation with severe defects similar to those of mice in which canonical NOTCH signaling pathway is inactivated [26]. In 2009, a spontaneous mutation in *Pofut1* gene called *Pofut1*<sup>cax</sup> was described in a mouse strain [54]. It corresponds to insertion of an intracisternal A particle (IAP) in the fourth intron of the *Pofut1* gene, leading to a hypomorphic allele and a decrease in gene expression without affecting protein structure and activity. Homozygous *Pofut1*<sup>cax/cax</sup> mice are viable and display compact axial skeleton [54] consistent with a defect in Notch patterning during somitogenesis. Analysis performed on a culture of *Pofut1*<sup>cax/cax</sup> myoblasts derived from satellite cells revealed a decrease in *Pax7* expression, a depletion of PAX7<sup>+</sup>/MYOD<sup>-</sup> cells and a disruption of the myogenic process, leading to an earlier differentiation [23]. These observations were clearly similar to those of Po – cell line. However, a moderate hypertrophy was observed for skeletal muscles in *Pofut1*<sup>cax/cax</sup> mice [23]. The fate of satellite cells was not analyzed following regeneration time course to evaluate the capacity of the oncoming migrating progenitors to fuse together or with nascent myotubes. As pre- and post- natal myogenesis involved distinct mechanisms, the *Pofut1*<sup>cax/cax</sup> muscle hypertrophy could reveal the involvement of IGF/Akt/mTOR pathway [55] rather than NFATc2/IL-4 one. Thus, secondary fusion in myogenesis would be as the primary fusion a complex physiological process involving several key proteins as POFUT1 and dependent of various signaling pathways.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. C2C12 Cell Lines and Culture

The murine myoblast C2C12 cell line was purchased from ATCC® (American Type Culture Collection). *Pofut1* knockdown C2C12 cell line (Po –) was obtained as previously described [22]. Cells were cultured in a growth medium (GM) with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco®Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 50 units/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. To induce differentiation of confluent cells, GM was removed and replaced by a differentiation medium (DM), which comprises DMEM supplemented with 2% horse serum, 50 units/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin (Gibco®Life Technologies™). Samples named myoblasts (MB) correspond to cells at time 0 h, defined by replacement of GM with DM. Two cell types were collected from 72 h after DM addition. Indeed, a short trypsinization of 30 s in 0.1% trypsin, 0.1 mM EDTA allowed to remove myotubes (MT), the reserve cells (RC) being adherent to the flask. Then, a second trypsinization (0.1% trypsin, 0.1 mM EDTA; 2 min) allowed collecting them in turn, as previously reported [22].

### 4.2. Semi-Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and the reverse transcription was performed using high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem™,





Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression was determined by semi-quantitative real-time RT-PCR on QuantStudio 3 real-time PCR system (Applied Biosystem™) with Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem™) using the following TaqMan™ probes: *Gapdh* Mm99999915\_g1, *Il-4rα* Mm01275139\_m1, *Myf6* Mm00435126\_m1, *Nfatc2* Mm00477776\_m1. The comparative threshold cycle ( $C_T$ ) method ( $\Delta\Delta C_T$ ) was used to quantify mRNA [56] and the relative quantity was normalized with *Gapdh* reference gene. Statistical analyses were performed by comparison of each differentiation time relative to 0 h of WT C2C12 cells, which was set as 1.

#### 4.3. Phenotypic Studies

Cells were fixed in Phosphate Buffer Saline (PBS) containing paraformaldehyde 4% (PFA) for 20 min and dried overnight in 70% ethanol. The number of MT, their diameter and the number of nuclei per MT were counted after hematoxylin/eosin staining in three independent experiments during a 120 h differentiation time course. For each morphometric study, six randomized visual fields at 100 X magnification were studied using ImageJ 1.45s software (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA) [57].

#### 4.4. IL-4 Medium Concentration Measured by ELISA Test

Cells were seeded at 5000 cells/cm<sup>2</sup> in six well plates in GM. After two days of proliferation, they were induced in differentiation with the DM. Then, the culture medium was collected and replaced every 24 h. After 120 h, IL-4 concentration in each collected medium was measured using the Murine IL-4 Mini ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and following the manufacturer's recommendations. Optical density measurement at 405 nm, corrected by a measure at 650 nm, that is directly related to the amount of IL-4 present in the sample was quantified via the FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France).

#### 4.5. Neutralizing Antibody Assay

C2C12 cells were treated with 10 µg/mL of isotype control antibody (rabbit IgG, sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or rabbit anti-IL-4Rα antibody (S-20, sc-686, Santa Cruz Biotechnology) from 72 h to 120 h of myogenic differentiation. Then, the number of MT, their diameter and the number of nuclei per MT were determined at 120 h.

#### 4.6. Western Blot

Proteins were extracted from MB at 0 h, MT and RC populations at 120 h, of myogenic differentiation, in WT C2C12 and Po – cell lines using RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecylsulfate (v/v), pH 8) and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Protein lysates were centrifuged at 12,000× g for 20 minutes at 4 °C and protein supernatant concentrations were determined using Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific™, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked with TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) supplemented with 0.1% Tween-20 (v/v) (TBST) and 5% (w/v) non-fat dry milk for 1 h at room temperature. They were probed with rabbit anti-IL-4Rα antibody (S-20) or with goat anti-GAPDH antibody (AF5718, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluted at 1:500 in TBST, 2.5% (w/v) non-fat dry milk overnight at 4 °C. After three washes with TBST, membranes were incubated with secondary antibodies (anti-rabbit or anti-goat HRP-conjugated IgG, Dako, Glostrup, Denmark) diluted at 1: 1000 in TBST, 2.5% (w/v) non-fat dry milk, for 1 h at room temperature. After three washes in TBST, reactive proteins were revealed by enhanced chemiluminescence using BM Chemiluminescence Western blotting substrate (peroxidase [POD]) (Roche Applied Science) and exposed to a film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).



#### 4.7. Immunofluorescence Studies

At 120 h of differentiation, WT C2C12 and Po – cells were fixed with 4% PFA-PBS for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100–PBS for 30 min at 4 °C. To minimize nonspecific reactions, cells were saturated for 1 h at room temperature using PBS with 20% goat serum and washed three times with PBS. Immunolabeling was performed with the rabbit anti-IL-4R $\alpha$  (S-20) or isotype (sc-2027) antibodies. Cells were rinsed and incubated 1 h at room temperature with Alexa Fluor®594 conjugate polyclonal goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) before mounting on slides. Photographs were taken using an epifluorescence microscope (Leica DMI4000B MM AF Imaging System) powered by MetaMorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA). The mean intensity of IL-4R $\alpha$  staining for MT and RC were quantified using ImageJ [57].

#### 4.8. Live Cell Imaging

Living cells were followed from 96 h to 120 h of myogenic differentiation by microscopy (Leica DMI4000B) powered by MetaMorph (Universal Imaging Corp.). WT C2C12 or Po – cells were photographed every 15 min by the Leica microscope using bright field mode to build the time-lapse.

#### 4.9. Statistical Analysis

All the experiments were performed at least three times and the results were reported as the means  $\pm$  standard error of the means (SEMs). Statistical comparisons were performed using two-tailed t tests or ANOVAs two-way with Sidak's post-test (Figures 4A and 5) implemented in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *p* value of 0.05 or less was statistically significant.

#### 4.10. DAPT Cell Treatment

Wild-type C2C12 and Po – cells were induced to differentiate for 120 h in DM in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) or 10  $\mu$ M N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-l-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Afterwards, phenotypic studies were performed as previously explained in Section 4.3.

**Supplementary Materials:** Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4396/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.D.V., J.C., A.M. and A.G.; Methodology, A.D.V., J.C. and C.C.; Supervision, A.M. and A.G.; Validation, A.D.V., J.C., C.C., A.M. and A.G.; Writing – original draft, A.D.V. and J.C.; Writing – review & editing, A.M. and A.G.

**Funding:** This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowships to A.D.V. and J.C.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Montarras, D.; Chelly, J.; Bober, E.; Arnold, H.; Ott, M.O.; Gros, F.; Pinset, C. Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 during myogenesis. *The New Biol.* **1991**, *3*, 592–600.
2. Bismuth, K.; Relaix, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 3081–3086. [[CrossRef](#)]
3. Bober, E.; Lyons, G.E.; Braun, T.; Cossu, G.; Buckingham, M.; Arnold, H.H. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1255–1265. [[CrossRef](#)]
4. Hinterberger, T.J.; Sassoon, D.A.; Rhodes, S.J.; Konieczny, S.F. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev. Biol.* **1991**, *147*, 144–156. [[CrossRef](#)]
5. Mitchell, P.O.; Pavlath, G.K. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, C1706–C1715. [[CrossRef](#)]





6. Rochlin, K.; Yu, S.; Roy, S.; Baylies, M.K. Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev. Biol.* **2010**, *341*, 66–83. [[CrossRef](#)]
7. Abmayr, S.M.; Pavlath, G.K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **2012**, *139*, 641–656. [[CrossRef](#)]
8. Olguín, H.C.; Pisconti, A. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 1013–1025. [[CrossRef](#)]
9. Mourikis, P.; Tajbakhsh, S. Distinct contextual roles for Notch signalling in skeletal muscle stem cells. *BMC Dev. Biol.* **2014**, *14*, 2. [[CrossRef](#)]
10. Horsley, V.; Friday, B.B.; Matteson, S.; Kegley, K.M.; Gephart, J.; Pavlath, G.K. Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 329–338. [[CrossRef](#)]
11. Horsley, V.; Pavlath, G.K. Nfat: Ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 771–774. [[CrossRef](#)]
12. Horsley, V.; Jansen, K.M.; Mills, S.T.; Pavlath, G.K. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **2003**, *113*, 483–494. [[CrossRef](#)]
13. Ohara, J.; Paul, W.E. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8221–8225. [[CrossRef](#)]
14. Dokter, W.H.; Borger, P.; Hendriks, D.; Van der Horst, I.; Halie, M.R.; Vellenga, E. Interleukin-4 (IL-4) receptor expression on Human T Cells is affected by different intracellular signaling pathways and by IL-4 at transcriptional and posttranscriptional level. *Blood* **1992**, *80*, 2721–2728.
15. Hosoyama, T.; Aslam, M.I.; Abraham, J.; Prajapati, S.I.; Nishijo, K.; Michalek, J.E.; Zarzabal, L.A.; Nelson, L.D.; Guttridge, D.C.; Rubin, B.P.; et al. IL-4R drives dedifferentiation, mitogenesis, and metastasis in rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2757–2766. [[CrossRef](#)]
16. Newton Jr, W.A.; Gehan, E.A.; Webber, B.L.; Marsden, H.B.; Van Unnik, A.J.M.; Hamoudi, A.B.; Tsokos, M.G.; Shimada, H.; Harms, D.; Schmidt, D.; et al. Classification of Rhabdomyosarcomas and Related Sarcomas. *Cancer* **1995**, *76*, 1073–1085.
17. Rota, R.; Ciarapica, R.; Miele, L.; Locatelli, F. Notch signaling in pediatric soft tissue sarcomas. *BMC Med.* **2012**, *10*, 141. [[CrossRef](#)]
18. Marshall, A.D.; Grosveld, G.C. Alveolar rhabdomyosarcoma – The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skelet. Muscle* **2012**, *2*, 25. [[CrossRef](#)]
19. Clark, J.; Rocques, P.J.; Braun, T.; Bober, E.; Arnold, H.H.; Fischer, C.; Fletcher, C.; Brown, K.; Gusterson, B.A.; Carter, R.L.; et al. Expression of members of the myf gene family in human rhabdomyosarcomas. *Br. J. Cancer* **1991**, *64*, 1039–1042. [[CrossRef](#)]
20. Tapscott, S.J.; Thayer, M.J.; Weintraub, H. Deficiency in rhabdomyosarcomas of a factor required for MyoD activity and myogenesis. *Science* **1993**, *259*, 1450–1453. [[CrossRef](#)]
21. Sirri, V.; Leibovitch, M.P.; Leibovitch, S.A. Muscle regulatory factor MRF4 activates differentiation in rhabdomyosarcoma RD cells through a positive-acting C-terminal protein domain. *Oncogene* **2003**, *22*, 5658–5666. [[CrossRef](#)]
22. Der Vartanian, A.; Audfray, A.; Al Jaam, B.; Janot, M.; Legardinier, S.; Maftah, A.; Germot, A. Protein O-Fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol. Cellular Biol.* **2015**, *35*, 391–405. [[CrossRef](#)]
23. Al Jaam, B.; Heu, K.; Pennarubia, F.; Segelle, A.; Magnol, L.; Germot, A.; Legardinier, S.; Blanquet, V.; Maftah, A. Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in Pofut1<sup>cax/cax</sup> mice. *Open Biol.* **2016**, *6*, 160211. [[CrossRef](#)]
24. Luo, Y.; Haltiwanger, R.S. O-Fucosylation of Notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11289–11294. [[CrossRef](#)]
25. Takeuchi, H.; Haltiwanger, R.S. Role of glycosylation of Notch in development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 638–645. [[CrossRef](#)]
26. Shi, S.; Stanley, P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5234–5239. [[CrossRef](#)]
27. Stahl, M.; Uemura, K.; Ge, C.; Shi, S.; Tashima, Y.; Stanley, P. Roles of Pofut1 and O-Fucose in mammalian Notch signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 13638–13651. [[CrossRef](#)]



28. Wan, G.; Tian, L.; Yu, Y.; Li, F.; Wang, X.; Li, C.; Deng, S.; Yu, X.; Cai, X.; Zuo, Z.; et al. Overexpression of Pofut1 and activated Notch1 may be associated with poor prognosis in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 104–111. [[CrossRef](#)]
29. Ma, L.; Dong, P.; Liu, L.; Gao, Q.; Duan, M.; Zhang, S.; Chen, S.; Xue, R.; Wang, X. Overexpression of protein O-fucosyltransferase 1 accelerates hepatocellular carcinoma progression via the Notch signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 503–510. [[CrossRef](#)]
30. Chabanais, J.; Labrousse, F.; Chaunavel, A.; Germot, A.; Maftah, A. POFUT1 as a promising novel biomarker of colorectal cancer. *Cancers* **2018**, *10*, 411. [[CrossRef](#)]
31. Zanotti, S.; Smerdel-Ramoya, A.; Canalis, E. Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)c2 inhibits Notch receptor signaling in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 624–632. [[CrossRef](#)]
32. Mammucari, C.; Tommasi di Vignano, A.; Sharov, A.A.; Neilson, J.; Havrda, M.C.; Roop, D.R.; Botchkarev, V.A.; Crabtree, G.R.; Dotto, G.P. Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev. Cell* **2005**, *8*, 665–676. [[CrossRef](#)]
33. Hindi, S.M.; Tajrishi, M.M.; Kumar, A. Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Science Signal.* **2013**, *6*, re2. [[CrossRef](#)]
34. Kassar-Duchossoy, L.; Gayraud-Morel, B.; Gomès, D.; Rocancourt, D.; Buckingham, M.; Shinin, V.; Tajbakhsh, S. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5: Myod double-mutant mice. *Nature* **2004**, *431*, 466–471. [[CrossRef](#)]
35. Braun, T.; Bober, E.; Winter, B.; Rosenthal, N.; Arnold, H.H. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* **1990**, *9*, 821–831. [[CrossRef](#)]
36. Kotanides, H.; Reich, N.C. Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor Gene. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25555–25561. [[CrossRef](#)]
37. Gachet, S.; Genescà, E.; Passaro, D.; Irigoyen, M.; Alcalde, H.; Clémenson, C.; Poglio, S.; Pflumio, F.; Janin, A.; Lasgi, C.; et al. Leukemia-initiating cell activity requires calcineurin in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2013**, *27*, 2289–2300. [[CrossRef](#)]
38. Castel, D.; Baghdadi, M.B.; Mella, S.; Gayraud-Morel, B.; Marty, V.; Cavallé, J.; Antoniewski, C.; Tajbakhsh, S. Small-RNA sequencing identifies dynamic microRNA deregulation during skeletal muscle lineage progression. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4208. [[CrossRef](#)]
39. Leung, A.K.L.; Young, A.G.; Bhutkar, A.; Zheng, G.X.; Bosson, A.D.; Nielsen, C.B. and Sharp, P.A. Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 237–244. [[CrossRef](#)]
40. Schug, J.; McKenna, L.B.; Walton, G.; Hand, N.; Mukherjee, S.; Essuman, K.; Shi, Z.; Gao, Y.; Markley, K.; Nakagawa, M.; et al. Dynamic recruitment of microRNAs to their mRNA targets in the regenerating liver. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 264. [[CrossRef](#)]
41. Okajima, T.; Aiguo, X.; Liang, L.; Kenneth D., I. Chaperone activity of Protein O-Fucosyltransferase 1 promotes Notch receptor folding. *Science* **2005**, *307*, 1599–1603. [[CrossRef](#)]
42. Wang, Y.; Lee, G.F.; Kelley, R.F.; Spellman, M.W. Identification of a GDP-L-fucose: polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* **1996**, *6*, 837–842. [[CrossRef](#)]
43. Kakuda, S.; Haltiwanger, R.S. Deciphering the Fringe-mediated Notch code: identification of activating and inhibiting sites allowing discrimination between ligands. *Dev. Cell* **2017**, *40*, 193–201. [[CrossRef](#)]
44. Pavlath, G.K.; Horsley, V. Cell fusion in skeletal muscle. Central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle* **2003**, *2*, 420–423. [[CrossRef](#)]
45. Cordle, J.; Redfieldz, C.; Stacey, M.; Van der Merwe, P.A.; Willis, A.C.; Champion, B.R.; Hambleton, S.; Handford, P.A. Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11785–11793. [[CrossRef](#)]
46. Krauss, R.S.; Joseph, G.A.; Goel, A.J. Keep your friends close: cell–cell contact and skeletal myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a029298. [[CrossRef](#)]
47. Redfield, A.; Nieman, M.T.; Knudsen, K.A. Cadherins promote skeletal muscle differentiation in three-dimensional cultures. *J. Cell Biol.* **1997**, *138*, 1323–1331. [[CrossRef](#)]
48. Schneider, M.; Al-Shareffi, E.; Haltiwanger, R.S. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology* **2017**, *27*, 601–618. [[CrossRef](#)]



49. Feng, J.; Han, Q.; Zhou, L. Planar cell polarity genes, Celsr1-3, in neural development. *Neurosci. Bull.* **2012**, *28*, 309–315. [[CrossRef](#)]
50. Uhlen, M.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Lundberg, E.; Jonasson, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Kampf, C.; Wester, K.; Hober, S.; et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *12*, 1248–1250. [[CrossRef](#)]
51. Jung, M.Y.; Park, S.Y.; Kim, I.S. Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to the hepatic sinusoidal endothelium via the interaction with  $\alpha M\beta 2$  integrin. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *82*, 1156–1165. [[CrossRef](#)]
52. Park, S.Y.; Jung, M.Y.; Kim, I.S. Stabilin-2 mediates homophilic cell-cell interactions via its FAS1 domains. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1375–1380. [[CrossRef](#)]
53. Park, S.Y.; Yun, Y.; Lim, J.S.; Kim, M.J.; Kim, S.Y.; Kim, J.E.; Kim, I.S. Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
54. Schuster-Gossler, K.; Harris, B.; Johnson, K.R.; Serth, J.; Gossler, A. Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 6. [[CrossRef](#)]
55. Bodine, S.C.; Stitt, T.N.; Gonzalez, M.; Kline, W.O.; Stover, G.L.; Bauerlein, R.; Zlotchenko, E.; Scrimgeour, A.; Lawrence, J.C.; Glass, D.J.; et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 1014–1019. [[CrossRef](#)]
56. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
57. Abramoff, M.D.; Magalhães, P.J.; Ram, S.J. Image Processing with ImageJ. *J. Biophotonics* **2004**, *11*, 36–42.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Impact of WIF1 on proliferation and differentiation of  
C2C12 murine myogenic cells.**

**Julien Chabanais<sup>1</sup>**, Florian Pennarubia<sup>1</sup>, Abderrahman Maftah, Agnès Germot\*,  
Sébastien Legardinier\*

<sup>1</sup>co-premiers auteurs, \*co-derniers auteurs

En préparation





Le processus de différenciation myogénique est contrôlé par différentes voies de signalisations dont la voie WNT/ $\beta$ -caténine. En effet, dès le stade embryonnaire, cette dernière est indispensable à la formation du dermomyotome et du myotome (Ikeya et Takada, 1998 ; Linker *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2004 ; Hutcheson *et al.*, 2009). Les ligands WNT sont capables d'induire l'expression des facteurs régulateurs myogéniques *Myf5* et *MyoD*. Ceux-ci sont indispensables au bon déroulement du processus myogénique (Münsterberg *et al.*, 1995 ; Maroto *et al.*, 1997 ; Borello *et al.*, 2006 ; Brunelli *et al.*, 2007), et régulent la détermination ainsi que la différenciation terminale des cellules musculaires (Cossu et Borello, 1999). Une régulation fine de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine est donc nécessaire au développement musculaire correct. Différents facteurs sont connus comme étant des inhibiteurs de cette voie. Parmi eux, mon laboratoire d'accueil s'intéresse à la protéine WIF1 (Wnt inhibitory factor 1), car celle-ci est notamment décrite comme étant une protéine cible de POFUT1 possédant deux sites potentiels de *O*-fucosylation. WIF1 comprend deux domaines distincts capables d'interagir avec les protéines WNT et ainsi inhiber la signalisation WNT (Malinauskas, 2008 ; Kerekes *et al.*, 2015). Les protéines sFRPs, autres inhibiteurs de la voie WNT, peuvent en se fixant sur les protéines WNT ou en rentrant en compétition avec le récepteur Frizzled inactiver la cascade de signalisation (Bafico *et al.*, 1999). Elles ont été démontrées comme impliquées dans le processus myogénique (Descamps *et al.*, 2008). L'incubation des cellules myoblastiques avec les protéines sFRP1 et 2 altèrent ce dernier en provoquant une diminution de la différenciation myoblastique associée à une baisse de l'expression des MRFs tardifs *MyoG* et *Myf6*. Compte tenu du fait que la protéine WIF1 pourrait utiliser un mécanisme similaire à celui des sFRPs pour inhiber la voie WNT, nous avons voulu déterminer si le traitement des cellules myoblastiques murines C2C12 avec du WIF1 exogène perturbait également le processus myogénique. Pour ce faire, la protéine recombinante WIF1 murine a été produite au laboratoire par l'intermédiaire de cellules CHO et les cellules C2C12,



incubées avec une quantité de 5 µg/mL de WIF1. Cette concentration est identique à celle retenue par Descamps et collaborateurs (2008), lors de leur étude des sFRPs, comme montrant le plus d'impact sur le processus myogénique. Nous avons pu observer dès 48 h d'incubation avec la protéine WIF1, une augmentation de la prolifération des cellules C2C12. Le processus myogénique est également altéré. En effet, nous observons des défauts de la fusion myoblastique se caractérisant par la formation de myotubes plus petits, accompagnée d'une baisse du nombre de noyaux présents au sein des myotubes. Parallèlement à cela, nous avons détecté une augmentation de l'expression du facteur myogénique précoce *Myf5* et une diminution de l'expression du facteur myogénique tardif *MyoG* concordant avec le phénotype des cellules C2C12 traitées avec de la protéine WIF1 recombinante.

L'ensemble de ces résultats mettent en avant l'implication de la protéine WIF1 au cours du processus myogénique. En effet, la mise en contact de cette dernière avec les cellules myoblastiques C2C12 favorise leur maintien dans un état prolifératif au détriment du processus de différenciation aboutissant à des défauts de formation des myotubes multinucléés. De plus, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par Descamps et collaborateurs (2008), suggèrent que les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu selon les inhibiteurs de la signalisation WNT, WIF1 et sFRPs, diffèrent.



# **Impact of WIF1 on proliferation and differentiation of C2C12 murine myogenic cells**

**Florian Pennarubia<sup>1,S</sup>, Julien Chabanais<sup>1,S</sup>, Abderrahman Maftah<sup>1</sup>, Agnès Germot<sup>1,#</sup> and Sébastien Legardinier<sup>1,#</sup>**

<sup>1</sup> Limoges University, PEIRENE, EA 7500, Glycosylation and cell differentiation, F-87060 Limoges cedex, France.

<sup>S</sup> are considered co-first authors and contributed equally to this work

<sup>#</sup> are considered co-last authors and contributed equally to this work

\*corresponding author: [agnes.germot@unilim.fr](mailto:agnes.germot@unilim.fr)

## **ABSTRACT**

**The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is an antagonist of the Wnt signaling pathway, which is involved in myoblast proliferation and differentiation. Such as sFRP (secreted Frizzled-related protein), WIF1 prevents Wnt proteins from binding to their specific receptors, resulting in inactivation of both canonical and non-canonical Wnt pathways. In this study, recombinant secreted WIF1 was purified from stable CHO cells and used to investigate its roles in proliferation and myogenic differentiation of murine myoblast C2C12 cell line. We demonstrated that exogenous treatment with recombinant WIF1 led to increased C2C12 cell proliferation. In addition, the phenotypic analysis of WIF1-treated cells revealed impairment of myoblast differentiation, as shown by reduced fusion index and myotube size. After categorization of multinucleate cell populations, we showed that exogenous WIF1 treatment resulted in myotubes with 1 to 3 nuclei in higher amount than myotubes with 6 nuclei, in agreement with an altered cell fusion. These results were further associated with impaired expression of myogenic regulatory factors (MRF). To conclude, we demonstrated for the first time an involvement of WIF1 in both proliferation and differentiation of myogenic cell lines.**

**Keywords:** C2C12; differentiation; proliferation; WIF1; WNT



## INTRODUCTION

Wnt signaling pathway is important for stem cell renewal, cell proliferation and cell differentiation during embryogenesis and adult tissue homeostasis (1,2). Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway is induced by Wnt proteins binding to their co-receptors Frizzled and LRP5/6, leading to the recruitment of cytoplasmic proteins such as disheveled and the axin-GSK3 (Glycogen synthase kinase) complex. In this protein complex, GSK3 kinase becomes unable to phosphorylate the cytoplasmic  $\beta$ -catenin, which is no longer polyubiquitinated and degraded by the proteasome. Increased levels of  $\beta$ -catenin result in its translocation to the nucleus and its interaction with LEF/TCF transcription factors, thus leading to modulate expression of Wnt target genes (3). However, in the absence of Wnt proteins binding to Frizzled/LRP5/6 co-receptors, the cytosolic  $\beta$ -catenin is constitutively degraded by proteasome after a kinase-dependent phosphorylation. Interestingly, a non-canonical Wnt signaling pathway requiring Frizzled receptor and other co-receptors like Knypek can occur independently of  $\beta$ -catenin (4).

Among protein inhibitors regulating Wnt signaling, a first class is composed of four members of the Dickkopf family (DKK1–4) which can specifically inhibit Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway by interaction with LRP5/6. A second class is composed of Cerberus, sFRPs (secreted Frizzled-related proteins) and WIF1 (Wnt inhibitory factor 1), which are able to act on both canonical and non-canonical Wnt pathways by preventing Wnt proteins from binding to their receptors (5). These different Wnt protein inhibitors modulate the Wnt signaling pathway in many developmental and physiological processes. Consequently, their dysregulation can lead to developmental defects or diseases such as cancers (6-8).

Wnt signaling is involved in myogenesis: it activates myogenesis in newly formed somites and expression of early myogenic regulating factors (MRFs), namely *Myf5* and *MyoD* (9). Wnt proteins play also an important role during muscle growth and in muscle regeneration (10), where canonical Wnt signaling promotes muscle satellite-cell proliferation and differentiation (11,12). In myogenic C2C12 cells, known to express different Wnt proteins (4, 5b, 9a, 10b and 11) (13), Wnt/ $\beta$ -catenin canonical signaling induced a switch from cell proliferation to myoblast differentiation through involvement of various Wnt ligands (14). Moreover, the amplification of Wnt/ $\beta$ -catenin canonical signaling leads to an increase in myogenic differentiation of C2C12 cells, either by overexpression of R-spondins (15) or following GSK-3 $\beta$  inhibition (16). These different studies clearly show the importance of Wnt signaling in the myogenic process, which is regulated by some of the 19 Wnt proteins known in mammals (17,18) and by two types of protein inhibitors affecting canonical and / or non-canonical Wnt pathways.

Among the inhibitors that directly interact with Wnt proteins, only members of sFRPs family have been shown to be implicated in the myogenic process. Indeed, Sfrp 1 or 2 exogenous addition to C2C12 cells or satellite cells cultures prevented myoblasts from entering the terminal differentiation but did not affect cell cycle (19). This differentiation delay was attributed to a decrease in the expression of late





MRFs *MyoG* and *Myf6* (also known as *Mrf4*). To date, no data are available concerning WIF1 roles in the myogenic process.

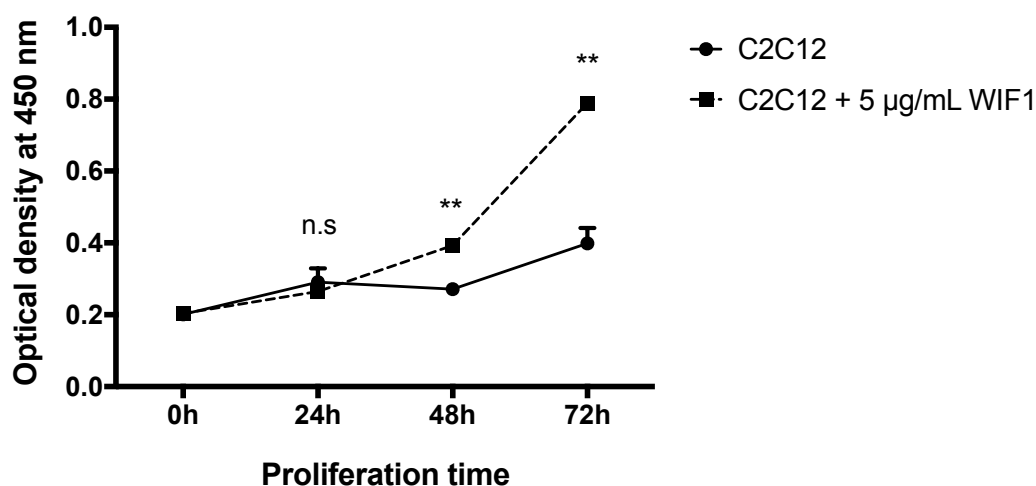
WIF1 has been first identified in the human retina and conserved orthologues were found in different species (20). WIF1 is a secreted glycoprotein, known to interact with different Wnt proteins (3a, 4, 5a, 7a, 9a and 11) (21), able to inhibit both canonical and non-canonical Wnt signaling pathways (5). Mature WIF1 is mainly composed of an N-terminal  $\beta$ -sandwich WIF domain (WD)(22) and five EGF-like domains (ELD). Even though WD was mainly incriminated in Wnt proteins binding (23), ELDs were shown to strengthen WIF1/Wnt interaction (24). Moreover, ELDs were also shown to be involved in the interaction with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) through electrostatic interaction. Consequently, WIF1 is able to sequester Wnt proteins close to surface membrane and control the Wnt proteins morphogenic gradient (24).

To better understand WIF1 roles in myogenic process, exogenous treatments of murine myoblast C2C12 cell line were performed in this study with recombinant mouse WIF1 during cell differentiation, as well as proliferation. Contrary to previous results using sFRPs (19), we showed for the first time that addition of exogenous WIF1 did not only result in a differentiation retardation of C2C12 cell line but also induced an increase in their proliferation. This differentiation alteration consisted in a decrease of myotube number and myotube size, as well as a switch in amount of the different multinucleated cell populations. We finally determined the effects of WIF1 exogenous addition on MRFs expression in C2C12 cell lines. WIF1 treatment on C2C12 cells during proliferation stage induced an increase of *Myf5* expression and a lesser amount of *MyoG*, which supported myotubes formation delay.

## RESULTS

**WIF1 treatment increased myoblasts proliferation.** To determine the effect of WIF1 treatment on myoblasts proliferation, recombinant WIF1 protein was first produced in stably transfected Flp-In™ CHO cells and purified from cell culture supernatants. Exogenous treatment of C2C12 cells was then performed with 5  $\mu$ g/mL of recombinant WIF1, as it was previously done with recombinant sFRPs (19). Following incubation, myoblasts proliferation was determined by formazan method using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) at four times (0, 24, 48 and 72 hours). A significant increase ( $p < 0.01$ ) of C2C12 proliferation was observed at 48 and 72 hours of proliferation after WIF1 treatment compared to untreated C2C12 cells (Fig.1).

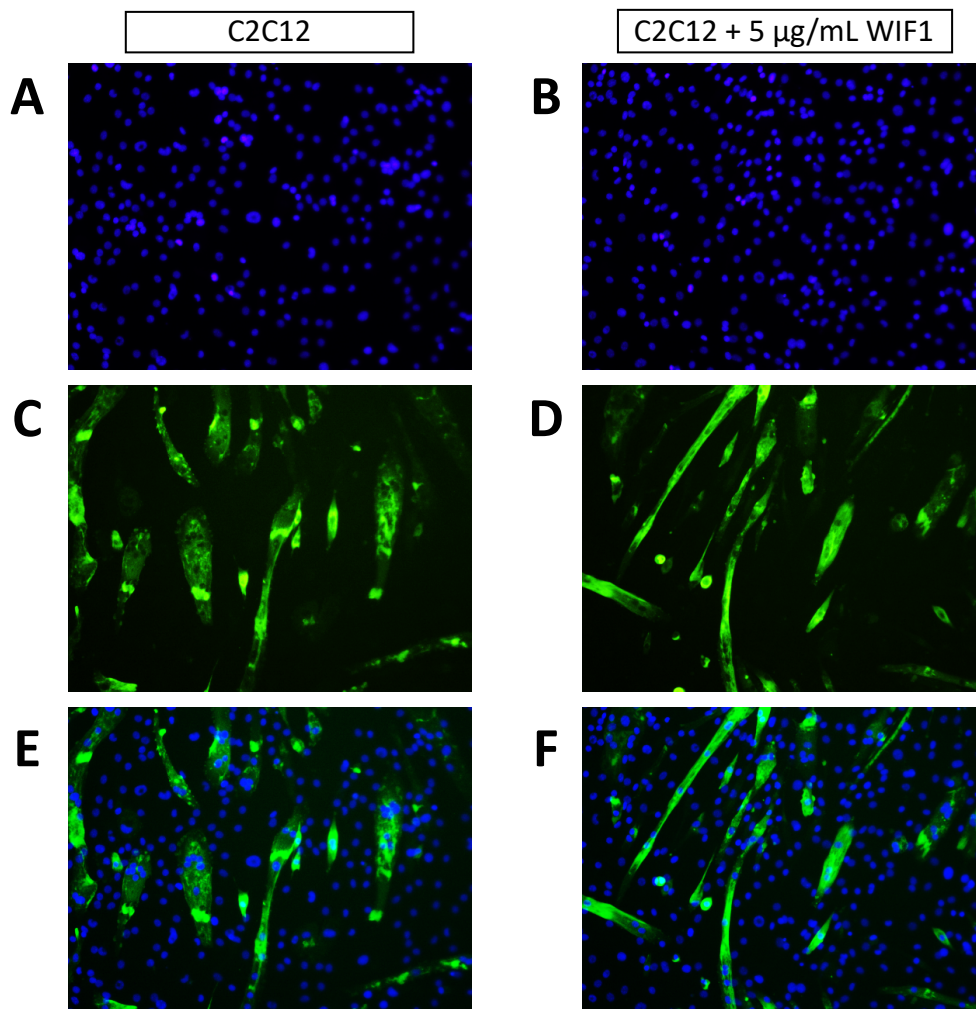




**Figure 1. WIF1 treatment induced a proliferation increase of C2C12 cells.** Proliferation assay was performed for 72 hours on C2C12 cells, treated or not with 5µg/mL of WIF1. Optical density was measured at 450 nm each 24 hours. Plots represented mean of optical density ± SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student test; n.s, non-significant; \*\*  $p < 0.01$

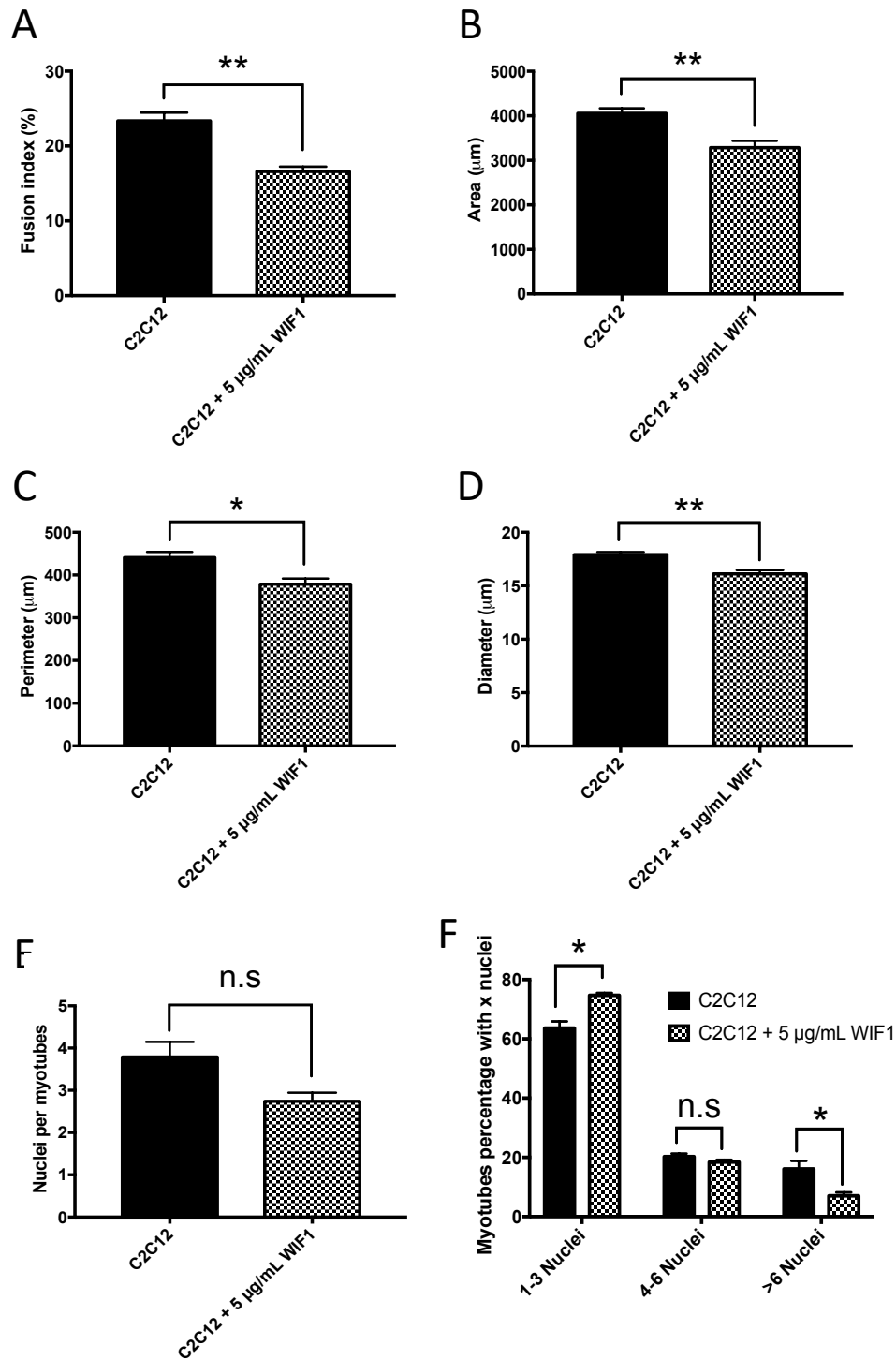
**WIF1 treatment impaired myoblasts differentiation process.** Exogenous treatment was performed with 5µg/mL of recombinant WIF1 at the beginning of C2C12 differentiation and renewed every two days. The effect of WIF1 treatment on C2C12 differentiation was analyzed using cell immunofluorescence staining (Fig.2A-2F) 7 days after onset of differentiation, when fusion index of C2C12 cells was often considered as maximal. An impairment of myotubes formation was observed in WIF1-treated C2C12 cells compared to C2C12 control cells (Fig.2). This observation was supported by a significant decrease of fusion index ( $p < 0.01$ ; Fig.3A) associated with a significant decrease of area ( $p < 0.01$ ; Fig.3B), perimeter ( $p < 0.05$ ; Fig.3C) and diameter ( $p < 0.01$ ; Fig.3D) of myotubes. Despite myotube size decrease, WIF1 treatment did not significantly alter the nuclei number per myotube. However, a downward trend was observed in WIF1-treated differentiated cells (Fig.3E). To further investigate the effects of WIF1 treatment on myotube phenotype, nuclei number per multinucleated cells was counted to categorize myotube populations in three groups, namely myotubes with 1-3, 4-6 and higher than 6 nuclei. Exogenous treatment of C2C12 with recombinant WIF1 during myogenic differentiation led to an increased number of myotubes comprising 1-3 nuclei ( $p < 0.05$ ; Fig.3F) associated with a lower percentage of myotubes with more than 6 nuclei ( $p < 0.05$ ; Fig.3F). Interestingly, the myotube population with 4-6 nuclei was unchanged.





**Figure 2. WIF1 treatment impaired C2C12 cell differentiation.** Immunofluorescence labeling with anti-myosin (green) and DAPI (blue), performed on untreated cells (A, C, E) or treated with 5μg/mL of WIF1 (B, D, F), highlighted an alteration in myogenic process after 7 days of treatment.



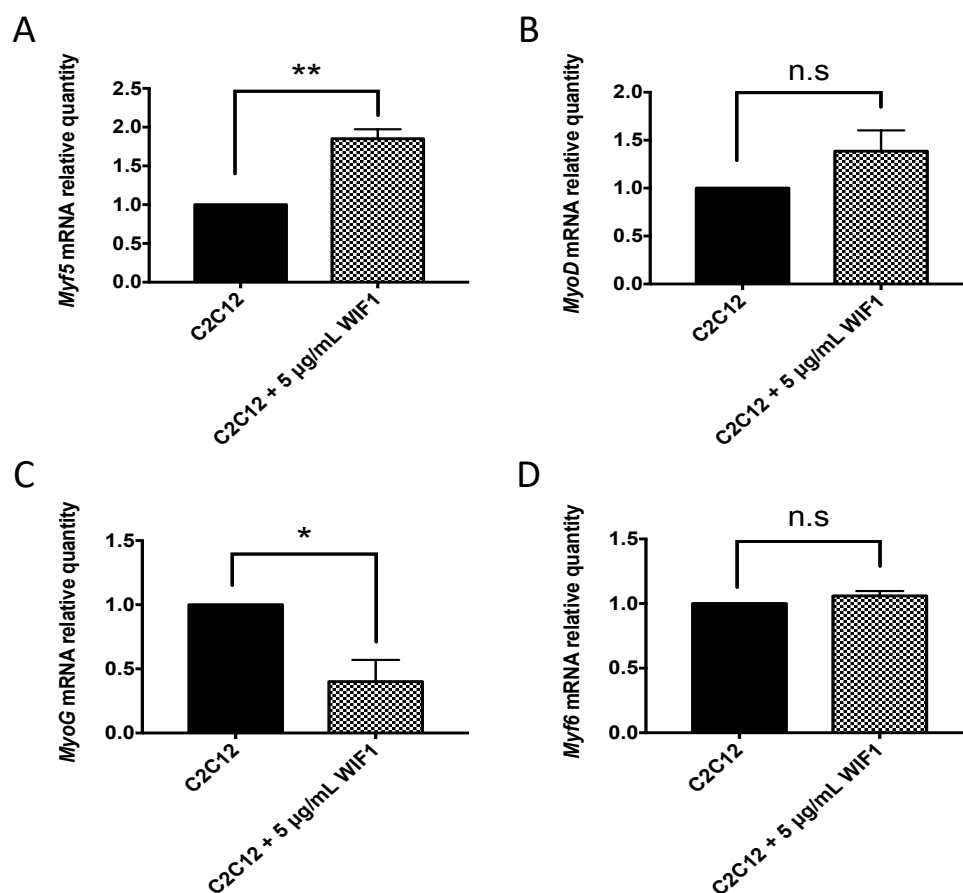


**Figure 3. WIF1 treatment impaired myogenic differentiation and altered myotube phenotype.** After C2C12 cells treatment with 5µg/mL of recombinant WIF1 for 7 days, myotubes and nuclei were immunolabelled to analyze impact of WIF1 on C2C12 myogenic differentiation. Fusion index (A) was calculated by dividing nuclei number in myotubes by total nuclei number. Myotube size was determined by measuring area (B), perimeter (C) and diameter (D) using ImageJ software 10.2v. Number of nuclei per myotubes (E) was counted in different fields. Myotubes were categorized into three groups according to the nuclei number per myotube (F) (1- 3, 4- 6 and >6 nuclei). Bar graphs represented mean of values  $\pm$  SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student test; n.s not significance; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .





**WIF1 treatment affected *Myf5* and *MyoG* expressions.** Since proliferation and myogenic differentiation of C2C12 cells were altered by exogenous addition of 5µg/mL recombinant WIF1, we chose to measure the expression of early (*Myf5*, *MyoD*) and late (*MyoG* and *Myf6*) myogenic regulatory factors (MRFs) in C2C12 cells. This was done 48 hours after WIF1 treatment in proliferation condition before onset of myogenic differentiation, similarly to previous study using sFRP (19). A significant increase of *Myf5* expression ( $p<0.01$ ; Fig.4A) was detected after WIF1 treatment, whereas the expression of the other early MRF, *MyoD*, did not significantly vary despite an upward trend (Fig.4B). Concerning late MRFs, the exogenous treatment with recombinant WIF1 led to a significant decrease of *MyoG* expression ( $p<0.05$ ; Fig.3C), while *Myf6* expression was not affected.



**Figure 4. WIF1 treatment affected expression of myogenic regulatory factors in C2C12 cell line.** After incubation of proliferating C2C12 cells treated or not with 5µg/mL of WIF1 during 48 hours, *Myf5* (A), *MyoD* (B), *MyoG* (C) and *Myf6* (D) expressions were quantified by qPCR using GAPDH as intern reference. For each MRF gene, relative quantity (RQ) fold changes were determined in WIF1-treated cells compared to untreated ones. Bar graphs represented mean of RQ ± SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student test; n.s not significance; \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ .



## Discussion

Wnt signaling pathway is essential for myogenesis, muscle growth and regeneration (10). The C2C12 cells used in this study and derived from murine skeletal muscle cells, in which Wnt signaling pathways occur (13), represent a relevant model to study muscle differentiation and also regeneration. Therefore, C2C12 cells are useful to investigate the role of Wnt inhibitors such as sFRP (19) and WIF1 in both proliferation and differentiation of these immortalized mouse myoblast cell lines. Similarly to recombinant sFRP1 and sFRP2 (19) used at a dose of 5µg/ml, we showed for the first time that a same dose of mouse recombinant WIF1 was able to inhibit myoblast differentiation of C2C12 cells by reducing fusion index and myotube size (area, diameter and perimeter). In addition, we observed an increased amount of myotubes with 1-3 nuclei at the expense of that for myotubes with more than 6 nuclei after 7 days of WIF1 treatment. These results could reflect a negative impact of WIF1 in secondary fusion. Interestingly, WIF1 treatment significantly increased C2C12 cells proliferation.

The differences between this previous study using exogenous treatment of C2C12 cells with sFRP (19) and our work using recombinant mouse WIF1 could be explained by involvement of distinct Wnt proteins acting on canonical and/or non-canonical Wnt signaling pathways. To date, 19 Wnt proteins are known in Mammals (18). Previous studies based on coimmunoprecipitation and pull-down assays show that WIF1 is able to bind to cartilage-related murine recombinant Wnt ligands (3a, 4, 5a, 7a, 9a, 11) (21). Others also reported an interaction of Human WIF1 with *Drosophila* ortholog of mouse Wnt1 (Wingless) and to *Xenopus* Wnt8 (20). Among Wnt proteins expressed in proliferating C2C12 myoblasts (Wnts 4, 5b, 9a, 10, 11) (13) at the transcript level, only three Wnts (4, 9a, 11) could be therefore targeted by WIF1 in treated C2C12 cell lines. Moreover, for these three Wnts expressed at the proliferation stage, the expression was shown to be gradually increased during the first 96h of C2C12 differentiation (13). Wnt4, which promotes C2C12 differentiation as well as Wnt9a, was the most strongly induced Wnt protein during differentiation of C2C12 cells (13,14). Less is known about Wnt11 but it was involved in cardiomyogenic differentiation (25), which can be enhanced from skeletal muscle-derived stem cells (26).

To further appreciate how WIF1 treatment deregulated the proliferation and the myogenic process, the expression of all MRFs was measured in WIF1-treated C2C12 cells versus untreated controls during the proliferative phase. Using qPCR analysis, we showed that WIF1 treatment led to a significant increase of the early MRF *Myf5* while *MyoD* was unaffected, related to the pro-proliferative effect of recombinant WIF1 reported here. Using recombinant sFRP2 (19), the expression of *MyoD* was similarly unchanged but a non-significant upward trend was observed for *Myf5* expression. So, the addition of sFRP2 did not significantly alter the C2C12 proliferation unlike to WIF1 treatment. While expression was significantly reduced for both late MRFs (*MyoG* and *MRF4*) in sFRP2-treated C2C12 cells, WIF1 treatment only diminished the expression of *MyoG*. In both cases, the expression of one or both late MRFs was reduced as soon as the proliferation stage. This difference could be explained by



the ability of these two inhibitors to bind different Wnt proteins endogenously produced by C2C12 cells. Further work needs to be realized in order to determine the way that WIF1 modulates the Wnt pathway in C2C12 cells.

In summary, our results demonstrate the effects of an exogenous addition of recombinant mouse WIF1 on proliferation and myogenic differentiation of C2C12 cells. WIF1-treatment leads to a pro-proliferative effect associated with increased *Myf5* expression while it resulted in an altered myogenic process, related to decreased fusion index, smaller myotubes and lower expression of *MyoG* as soon as the proliferation stage. WIF1 exogenous addition also induced impairment of myonuclear accretion, leading to more myotubes with 1-3 nuclei than myotubes with 6 nuclei or more. Taken together, our results suggest that WIF1 treatment might affect secondary fusion since it leads to inhibition the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, which is necessary for myotube maturation through the complex cadherin/ $\beta$ -catenin/actin during cell-cell contacts (27).

## **Materials and methods**

### Expression and purification of recombinant mouse WIF1 protein

The coding sequence of mouse WIF1 without endogenous signal peptide (NP\_036045.1, residues 29-379) was TA cloned into the pSecTag/FRT/V5-His TOPO<sup>R</sup> (pSec vector)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in frame with sequences encoding the N-terminal Ig k-chain secretion signal and a C-terminal peptide bearing the V5 epitope and the polyhistidine tag (V5 His6). After sequencing of cloned WIF1 cDNA, Flp-In<sup>TM</sup> CHO cells (Thermo Fisher Scientific).were co-transfected with pSec-[WIF1] plasmid construct and the recombinase pOG44 expression plasmid as recommended by manufacturer (Thermo Fisher Scientific) to get a targeted expression and secreted expression of the WIF1 cDNA. Selection and amplification of hygromycin-resistant cells were performed, then secreted WIF1 was produced in serum-free Opti-MEM I medium (Thermo Fisher Scientific) containing 50 units/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin and recovered by centrifugation after 96 h from cell culture supernatants. After concentration by ultrafiltration in binding buffer (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM imidazole, pH 7.5), recombinant WIF1 was purified on Ni-NTA column by imidazole gradient using AKTA prime system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Elution fractions containing purified WIF1 were pooled, concentrated by ultrafiltration and quantified using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Sigma-Aldrich Corp.) with bovine serum albumin as a standard. Using densitometry measurements performed on Coomassie-blue stained polyacrylamide gels, we estimated that recombinant WIF1 protein, which was also recognized by Western blot using anti-V5-peroxidase antibody (Sigma-Aldrich Corp.), was more than 90% pure.



### Cell culture and cell differentiation

The murine C2C12 cell line (ATCC<sup>R</sup>CRL-1772<sup>TM</sup>) was chosen as a model to study myogenic differentiation. C2C12 cells were cultured in growth medium (GM) corresponding to Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life technologies) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Eurobio), 50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Cells were seeded at 5 000 viable cells/cm<sup>2</sup> and cultured in humidified environment at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in air without reaching confluence to preserve the myoblastic population in the culture during maintenance. Myogenic differentiation was induced at about 80% of cell confluence using myogenic differentiation medium (DM) composed of DMEM supplemented with 2% (v/v) horse serum (HS, Gibco), 50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. The change of serum added in lower amount was usually used to induce myogenic differentiation of C2C12 cells [33]. At the induction of cell differentiation (time 0h), cells were treated or not with 5µg/ml of recombinant WIF1. During differentiation, culture media were changed every two days to renew the supply of recombinant WIF1 during 7 days of treatment, at the end of which the fusion index of C2C12 cells is generally considered as maximal.

### Proliferation assay:

Proliferation rate of C2C12 cells treated or not with 5µg/mL of recombinant purified WIF1 was analyzed by Cell Counting Kit-8 test (Sigma-Aldrich) according to supplier's recommendations. Cells were seeded in 96 well plate in 100 µL GM containing or not 5µg/mL WIF1 at the cell density of 2 000 cells/well in duplicate. Two hours after cell seeding (time 0h) and every 24 hours for 72 hours, 10 µL of commercial reagent were added to plating cells in wells. After one hour incubation in humidified environment at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, absorbance measurement was performed at 450nm (FLUOstar Omega, BMG Labtech)

### Myotubes labeling by immunofluorescence:

C2C12 cells treated or not with 5µg/mL of recombinant WIF1 for 7 days were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature and permeabilized with HEPES Triton buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, pH 7.4) for 30 min at 4°C. After three washes with PBS, non-specific binding sites were saturated for 1h at room temperature with a blocking solution containing 10% goat serum, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS. After one wash with PBS/0.2% BSA, immunolabeling was performed with monoclonal mouse anti-Myosin (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) antibody diluted at 1:100 in PBS/1% BSA overnight at 4°C. After washes with PBS and PBS/0.2% BSA/0.1% Tween-20, cells were incubated with the Alexa Fluor® goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) secondary antibody used at 1:1,000 in PBS/1% BSA for 15 min in dark at room temperature. After three washes, nuclei were stained with DAPI (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) at 1 µg/mL in PBS, 5 min





in dark at room temperature. Finally, after three PBS washes, we used the MetaMorph® software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) to acquire images with a LEICA microsystem DMI6000B inverted epifluorescence microscope.

#### RNA extraction, reverse transcription and gene expression analysis:

Total RNA was extracted from proliferating C2C12 cells 48h after addition or not of 5µg/mL recombinant WIF1 with RNeasy MiniKit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) using the protocol described by the manufacturer. RNA was quantified with NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). RNA was retrotranscribed with High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystem, United States). Samples were then placed in thermocycler (Applied Biosystem Gene Amp PCR system 9700) and following program was applied: 25°C 10 minutes, 37°C 2 hours and 85°C 5 minutes. Then single-stranded cDNA were used for quantitative PCR.

Relative quantification of expression target genes was performed from 20 ng of cDNA, 10µL of Taqman gene expression Master Mix (Applied Biosystem) and 1µL of specific Taqman probes (*Myf5* Mm00435125\_m1; *MyoD* Mm00440387\_m1; *MyoG* Mm00446194\_m1; *Myf6* Mm00435126\_m1; *GAPDH* Mm9999915\_g1) in final volume of 20 µL. Experimental method is described as follow: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Fluorescence due to Taqman probe degradation was recorded by detection system QuantStudio 3 real-time PCR systems (Applied Biosystem) and quantified by QuantStudio Design and Analysis Software v1.3 (Applied Biosystem) according the  $\Delta\Delta C_t$  method.

#### Statistical analysis:

All of the experiments were performed at least three times and results are reported as the means  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were realized using two-tailed Student test implemented in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Results were considered statistically significant if the p-value was less than 0.05.

#### **Author contributions**

#### **Competing interests**

The authors declare no competing interests.

#### **Acknowledgements**



## REFERENCES

1. Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810
2. Steinhart, Z., and Angers, S. (2018) Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* **145**
3. Clevers, H., and Nusse, R. (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-1205
4. Veeman, M. T., Axelrod, J. D., and Moon, R. T. (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**, 367-377
5. Kawano, Y., and Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-2634
6. Surana, R., Sikka, S., Cai, W., Shin, E. M., Warriar, S. R., Tan, H. J., Arfuso, F., Fox, S. A., Dharmarajan, A. M., and Kumar, A. P. (2014) Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochim Biophys Acta* **1845**, 53-65
7. Shao, Y. C., Wei, Y., Liu, J. F., and Xu, X. Y. (2017) The role of Dickkopf family in cancers: from Bench to Bedside. *Am J Cancer Res* **7**, 1754-1768
8. Poggi, L., Casarosa, S., and Carl, M. (2018) An Eye on the Wnt Inhibitory Factor Wif1. *Front Cell Dev Biol* **6**, 167
9. Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., and Cossu, G. (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**, 4155-4162
10. Rudnicki, M. A., and Williams, B. O. (2015) Wnt signaling in bone and muscle. *Bone* **80**, 60-66
11. Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F., Lawrence-Watt, D., and Patel, K. (2008) Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci* **121**, 2939-2950
12. Takata, H., Terada, K., Oka, H., Sunada, Y., Moriguchi, T., and Nohno, T. (2007) Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Dev Dyn* **236**, 2800-2807
13. Bernardi, H., Gay, S., Fedon, Y., Vernus, B., Bonnieu, A., and Bacou, F. (2011) Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C1122-1138
14. Tanaka, S., Terada, K., and Nohno, T. (2011) Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. *J Mol Signal* **6**, 12
15. Han, X. H., Jin, Y. R., Seto, M., and Yoon, J. K. (2011) A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* **286**, 10649-10659
16. Rochat, A., Fernandez, A., Vandromme, M., Moles, J. P., Bouschet, T., Carnac, G., and Lamb, N. J. (2004) Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Biol Cell* **15**, 4544-4555
17. Nusse, R. (2001) An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet* **17**, 443
18. Mikels, A. J., and Nusse, R. (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* **25**, 7461-7468
19. Descamps, S., Arzouk, H., Bacou, F., Bernardi, H., Fedon, Y., Gay, S., Reyne, Y., Rossano, B., and Levin, J. (2008) Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2. *Cell Tissue Res* **332**, 299-306
20. Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B., and Nathans, J. (1999) A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-436



21. Surmann-Schmitt, C., Widmann, N., Dietz, U., Saeger, B., Eitzinger, N., Nakamura, Y., Rattel, M., Latham, R., Hartmann, C., von der Mark, H., Schett, G., von der Mark, K., and Stock, M. (2009) Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J Cell Sci* **122**, 3627-3637
22. Liepinsh, E., Banyai, L., Patthy, L., and Otting, G. (2006) NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J Mol Biol* **357**, 942-950
23. Malinauskas, T. (2008) Docking of fatty acids into the WIF domain of the human Wnt inhibitory factor-1. *Lipids* **43**, 227-230
24. Malinauskas, T., Aricescu, A. R., Lu, W., Siebold, C., and Jones, E. Y. (2011) Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 886-893
25. Flaherty, M. P., Kamerzell, T. J., and Dawn, B. (2012) Wnt signaling and cardiac differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci* **111**, 153-174
26. Xiang, G., Yang, Q., Wang, B., Sekiya, N., Mu, X., Tang, Y., Chen, C. W., Okada, M., Cummins, J., Gharaibeh, B., and Huard, J. (2011) Lentivirus-mediated Wnt11 gene transfer enhances Cardiomyogenic differentiation of skeletal muscle-derived stem cells. *Mol Ther* **19**, 790-796
27. Suzuki, A., Scruggs, A., and Iwata, J. (2015) The temporal specific role of WNT/beta-catenin signaling during myogenesis. *J Nat Sci* **1**, e143



**V.3. Article n°3**

***POFUT1* as a promising novel biomarker of colorectal cancer.**

**Julien Chabanais**, François Labrousse, Alain Chaunavel, Agnès Germot\*, Abderrahman Maftah\*  
\*co-derniers auteurs

*Cancers* 2018, 10, 411; doi:10.3390/cancers10110411

Impact factor 2018 : 5.326





Compte tenu des changements de glycosylation observés dès le début du développement tumoral, de plus en plus d'études concernent ce type de modifications post-traductionnelles. Ces dernières années, des travaux ont mis en évidence la participation de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1), liée à la *O*-fucosylation de protéines, dans le processus de tumorigenèse. Une partie de mon travail de thèse s'inscrit dans l'exploration du rôle potentiel de POFUT1 dans le cancer colorectal.

L'étude s'est construite dans un premier temps autour d'une approche *in silico* qui a consisté en l'utilisation de données bioinformatiques disponibles sur le site firebrowse.org. Cette plateforme met à disposition des données TCGA (The Cancer Genome Atlas) associées à 37 cancers différents. Pour répondre à ma problématique, nous avons extrait et analysé les données cliniques de 51 patients sains et 626 patients malades, le niveau d'expression des 18 068 gènes référencés, l'état de la région chromosomique 20q11.21 (amplifiée ou non) et en cas d'amplification, le nombre de copies de *POFUT1*. L'analyse de ces éléments a permis d'observer que *POFUT1* est surexprimé dans 22 cancers dont le cancer colorectal et sous-exprimé dans 6 autres. Dans les 9 derniers cancers, l'absence de données sur le niveau d'expression de *POFUT1* dans les tissus sains ne nous a pas permis de statuer sur une éventuelle altération de son expression. Dans le cas du cancer colorectal, la surexpression de *POFUT1* est observée dès le stade I (le cancer s'étend de la muqueuse à la musculuse) et se maintient tout au long du développement tumoral. De plus, elle est majoritairement observée dans les tumeurs rectales, les stades avancés et les tumeurs métastatiques. Afin de déterminer le mécanisme conduisant à cette surexpression, nous nous sommes intéressés à l'état de la portion chromosomique 20q11.21 où se situe *POFUT1* et qui est fréquemment amplifiée dans des cas de cancers. On retrouve chez 76,02% des patients atteints de CRC, une amplification de cette région, corrélée dans 90,13% des cas à une augmentation de l'expression de *POFUT1* dans les tissus atteints par rapport aux tissus sains. Une forte corrélation positive entre le niveau d'ex-



pression de *POFUT1* et le nombre de copies de ce gène est observée. L'analyse du nombre de copies de *POFUT1* révèle que 49% des patients possèdent entre 2 et 3 copies du gène, suggérant que la surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs colorectales est majoritairement due à l'amplification chromosomique. Comme l'association entre les expressions de *POFUT1* et des récepteurs NOTCH a été démontrée dans les carcinomes hépatiques et le cancer de l'estomac (Ma *et al.*, 2016 ; Dong *et al.*, 2017), des tests de corrélation d'expression ont été réalisés. Ils montrent une corrélation positive entre l'expression de *POFUT1* et celles des récepteurs *NOTCH1*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, mais également une corrélation négative entre *POFUT1* et *NOTCH2*. Néanmoins, il faut noter que *POFUT1* est le plus fortement corrélé avec *NOTCH1*. L'association entre l'expression de *POFUT1* et les paramètres cliniques, met en lumière une plus forte expression du gène dans les adénocarcinomes rectaux de stade avancé et métastatiques. De façon identique, l'étude de l'association entre l'expression de *NOTCH1* et les paramètres cliniques, souligne une plus forte expression du gène dans les adénocarcinomes rectaux. La constitution de groupes de patients selon les niveaux d'expression combinés de *POFUT1* et *NOTCH1*, montre que la surexpression des deux gènes est majoritairement observée dans les stades avancés ainsi que dans les adénocarcinomes rectaux. L'expression de différents gènes cibles de la voie NOTCH, en particulier celles de la *cycline D1* (*CCND1*) et de *c-Myc* (*MYC*) favorisant la prolifération, de *Snail1* qui active la transition épithélio-mésenchymateuse et de la *survivine* (*BIRC5*) qui inhibe l'apoptose, sont augmentées. Parallèlement, celles de *p21* (*CDKN1A*) régulant négativement le cycle cellulaire et de *HEY1* qui est un facteur de transcription dont le promoteur est activé par le NICD, sont diminuées. Conjointement ces résultats montrent que la voie de signalisation NOTCH est altérée dans le cancer colorectal favorisant le développement tumoral.

Parallèlement à ce travail bioinformatique, nous avons pu utiliser des échantillons tumoraux colorectaux issus du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges et des



lignées cellulaires humaines colorectales. Ces éléments m'ont permis à la fois de confirmer l'augmentation du nombre de copies de *POFUT1* dans les tumeurs et sa surexpression protéique détectée dès les stades précoces du cancer colorectal.

En conclusion, ce travail indique que *POFUT1* est surexprimé chez les patients atteints de cancer colorectal, dans la majorité des cas par une amplification chromosomique 20q11.21. Sa dérégulation impacte significativement la voie de signalisation NOTCH associée à différents processus biologiques tels que le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse. Du fait de sa surexpression dès le stade I, *POFUT1* semble être un nouveau marqueur d'intérêt pour le diagnostic précoce du cancer colorectal.





Article

# POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer

Julien Chabanais <sup>1</sup>, François Labrousse <sup>2</sup>, Alain Chaunavel <sup>2</sup>, Agnès Germot <sup>1,†</sup> and Abderrahman Maftah <sup>1,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Glycosylation and Cell Differentiation, Limoges University, PEIRENE, EA 7500, F-87060 Limoges cedex, France; julien.chabanais@unilim.fr (J.C.); agnes.germot@unilim.fr (A.G.)

<sup>2</sup> Department of Pathology, Limoges University Hospital, 87042 Limoges cedex, France; francois.labrousse@unilim.fr (F.L.); alain.chaunavel@chu-limoges.fr (A.C.)

\* Correspondence: abderrahman.maftah@unilim.fr

† Abderrahman Maftah and Agnès Germot are considered co-last authors and contributed equally to this work.

Received: 19 September 2018; Accepted: 27 October 2018; Published: 30 October 2018



**Abstract:** Background: While protein *O*-fucosyltransferase 1 (*POFUT1*) overexpression has been recently proposed as a potential biomarker for different cancer types, no study was carried out on *POFUT1* implication in colorectal cancer (CRC). Methods: Data from 626 tumors and 51 non-tumor adjacent tissues available in FireBrowse had been used in this study. Statistical analyses on *POFUT1* expression and gene copy number, *NOTCH* receptors (main targets of *POFUT1* enzymatic activity) expression and association of *POFUT1* and *NOTCH1* expressions with clinical parameters were investigated. Data were completed by *POFUT1* histological labeling on six tumor tissues from patients with CRC. Results: We found that *POFUT1* is overexpressed from the stage I ( $p < 0.001$ ) and 76.02% of tumors have a 20q11.21 amplification, associated in 90.13% of cases with a *POFUT1* overexpression, compared to non-tumor adjacent tissues. The *POFUT1* copy number in tumors is mainly between 2 and 3. *POFUT1* is positively correlated with *NOTCH1* ( $r_s = 0.34$ ,  $p < 0.001$ ), *NOTCH3* ( $r_s = 0.087$ ,  $p = 0.0297$ ), and *NOTCH4* ( $r_s = 0.097$ ,  $p = 0.0148$ ) expressions, while negatively correlated with *NOTCH2* expression ( $r_s = -0.098$ ,  $p = 0.0142$ ). *POFUT1* overexpression is markedly associated with rectal location, non-mucinous adenocarcinoma and cancer stages IV and M1. *NOTCH1* overexpression is only associated with rectal location and non-mucinous adenocarcinoma. Conclusion: We conclude that *POFUT1* is overexpressed in CRC from stage I, and its high expression is associated with metastatic process, probably through NOTCH pathway activation. Then, *POFUT1* could represent a potential novel biomarker for CRC diagnosis.

**Keywords:** *POFUT1*; colorectal cancer; early detection; biomarker; NOTCH

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females with 1.65 million new cases and almost 835,000 deaths in 2015 [1]. The majority of CRC (75%) has a sporadic origin but in some cases the origin is related to familial heredity or due to inflammatory bowel diseases [2]. Although the mortality associated with CRC declined over the past decades, identification of new biomarkers for an early diagnosis and the improved treatment of CRC are crucial. Previous studies have demonstrated the association between glycosylation changes and tumorigenesis [3,4]. Glycosylation is the main post-translational modification of proteins. *N*- and/or *O*-glycans play major roles as in protein conformation then modulating their functional activity [5], in ligand-receptor complex formation for cell–cell interactions [6], and in cellular metabolism [7]. Fucose





is frequently found as a carbohydrate constituent of *N*-glycans at peripheral positions but also, linked to core *N*-acetylglucosamine. It is involved in selectin-dependent leukocyte adhesion, maternal-fetal interface stability, and formation of Lewis blood group antigen [8–10]. In malignant transformation, fucosyltransferases are altered in their expressions and activities. For example, in CRC the  $\alpha$ 1,6 core-fucosyltransferase encoded by *FUT8* is increased in both enzyme activity and protein expression during malignant transformation [11]. The  $\alpha$ 1,3/4-fucosyltransferase gene *FUT6* is overexpressed in colorectal tissues where the enzyme functions as a tumor regulator by promoting cell growth, migration, invasion and angiogenesis [12]. *O*-fucosylation is an atypical post-translational modification of proteins catalyzed by two glycosyltransferases, Protein *O*-fucosyltransferase 1 (Pofut1) and Protein *O*-fucosyltransferase 2 (Pofut2). Pofut1 modifies epidermal growth factor-like (EGF-like) domains and Pofut2 modifies thrombospondin repeats (TSR) [13]. Increasing evidences demonstrate the role of Pofut1 in controlling the balance between non-differentiated and differentiated normal cells [14,15]. The human glycoprotein POFUT1 consists of 393 amino acids encoded by a gene located between *PLAGL2* and *KIF3B* on the long arm of chromosome 20, near the centromere [16]. Pofut1 is an ER-resident enzyme [17], which allows fucose addition [18] on S or T included in the C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>(S/T)C<sup>3</sup> consensus motif, where C<sup>2</sup> and C<sup>3</sup> are the second and third cysteines of the 6 conserved ones in EGF-like domains. The major known target of Pofut1 is Notch receptor, with four paralogs in human, NOTCH1 to NOTCH4, which contain between 29 and 36 EGF-like domains with 14 to 20 *O*-fucosylation consensus sites [19]. Correct glycosylation of Notch receptors especially their *O*-fucosylation [20] is necessary for subsequent optimal cleavages releasing the NICD (Notch intracellular domain), which translocates into the nucleus to control transcription of target genes [21]. In mice, *Pofut1* knockout is lethal; embryos die at midgestation with severe defects in somitogenesis, cardiogenesis, and neurogenesis, and their phenotype is similar to that of embryos lacking downstream effectors of NOTCH signaling pathway [22]. *POFUT1* knockdown in HEK293T cells induces a 2-fold reduction of the amount of NOTCH1 on the cell surface [23]. Indeed, *O*-fucose addition contributes to EGF-like stabilization, which participates to a novel ER quality control pathway, essential to correct targeting of Notch to the cell membrane and its interaction with ligands [24]. Recent evidences demonstrated NOTCH implication in tumoral pathologies. In T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), *NOTCH1* gene is mutated in at least 65% of the cases [25] and an aberrant NOTCH signaling is implicated in this pathologic development process [26]. An ectopic *NOTCH1* expression triggers epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer inducing tumor growth and metastasis [27]. In gastric cancer cells, NOTCH pathway activation also induces cell proliferation and metastasis, here through phosphorylated STAT3 and TWIST [28]. In CRC, NOTCH pathway participates to the tumor growth by promoting cell proliferation and inhibiting cell apoptosis [29]. As *O*-fucosylation of NOTCH receptor is necessary for its activation, several cancer studies focused on *POFUT1* expression. A decade ago, the first finding showed a higher expression of *POFUT1* in gliomas compared to normal cells [30]. More recently, *POFUT1* overexpression was also detected in oral squamous cell carcinoma and correlated with an increase of tumor size [31]. In hepatocellular carcinomas, it was associated with a poor prognosis, as it induces an aberrant activation of NOTCH pathway, which promotes cell proliferation, migration and invasion [32]. In gastric cancer, increased *POFUT1* expression is associated with some clinical features such as higher TNM staging and tumoral differentiation states [33]. *POFUT1* gene is localized in the 20q11.21 region, which is frequently amplified in tumor cells as for breast [34] and gastric cancers [35], acute myeloid leukemia [36] and colorectal cancer with poor prognosis [37]. In this last case, a positive correlation is reported between *POFUT1* expression and the copy number of the 20q11-13 amplicon [38]. All these data suggest that POFUT1 could play a significant role in cancer development.

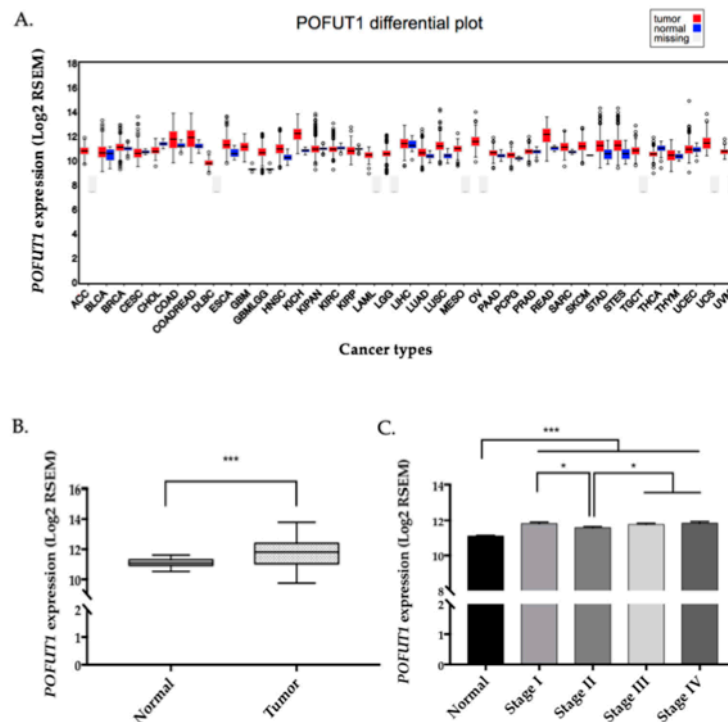
Therefore, we started this study to evaluate *POFUT1* expression in CRC and determine its potential value as a novel diagnostic biomarker for this cancer. Using Firebrowse database, we collected expression data from RNAseq, copy number variation (CNV) of *POFUT1* gene and diverse clinical information. In parallel, based on six different colorectal tumors, we detected POFUT1 and estimated the number of *POFUT1* copies.



## 2. Results

### 2.1. POFUT1 is Overexpressed in Human Colorectal Cancer Tissues

On a panel of 28 cancer types available in FireBrowse database, *POFUT1* expression is predominantly higher in 22 tumors compared to normal tissues (Figure 1A). COAD (colon adenocarcinoma) and READ (rectum adenocarcinoma) presented the greatest means of log<sub>2</sub> RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) 11.633 and 11.962, respectively for *POFUT1*, only being exceeded in chromophobe kidney carcinoma KICH (12.086). As expected, the COADREAD data, which are a compilation of COAD and READ, showed an increased *POFUT1* expression in tumor compared to healthy tissues.



**Figure 1.** *POFUT1* is overexpressed in most of cancer types especially in colorectal cancer from the first stage. RNAseq data from FireBrowse database show that in 22 cancer types (including COAD and READ), *POFUT1* expression is higher than in the corresponding normal tissues and for 6 cancer types it is the reverse (A). Data are missing for nine cancer types. ACC: adrenocortical carcinoma, BLCA: bladder urothelial Carcinoma, BRCA: breast invasive carcinoma, CESC: cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CHOL: cholangiocarcinoma, COAD: colon adenocarcinoma, COADREAD: colorectal adenocarcinoma, DLBC: lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma, ESCA: esophageal carcinoma, GBM: glioblastoma multiforme, GBMLGG: glioma, HNSC: head and neck squamous cell carcinoma, KICH: kidney chromophobe, KIPAN: pan-kidney cohort, KIRC: kidney renal clear cell carcinoma, KIRP: kidney renal papillary cell carcinoma, LAML: acute myeloid leukemia, LGG: brain lower grade glioma, LIHC: liver hepatocellular carcinoma, LUAD: lung adenocarcinoma, LUSC: lung squamous cell carcinoma, MESO: mesothelioma, OV: ovarian serous cystadenocarcinoma, PAAD: pancreatic adenocarcinoma, PCPG: pheochromocytoma and paraganglioma, PRAD: prostate adenocarcinoma, READ: rectum adenocarcinoma, SARC: sarcoma, SKCM: skin Cutaneous Melanoma, STAD: stomach adenocarcinoma, STES: stomach and esophageal carcinoma, TGCT: testicular germ cell tumors, THCA: thyroid carcinoma, THYM: Thymoma, UCEC: uterine corpus endometrial carcinoma, UCS: uterine carcinosarcoma, UVM: uveal melanoma. COADREAD RNAseq data extracted from FireBrowse database containing 626 CRC and 51 normal adjacent tissues show that *POFUT1* is significantly overexpressed in tumor tissues (B) and from the first stage of tumor classification (C). For B. and C., bar graph represented mean of log<sub>2</sub> RSEM ± SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student test; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



To investigate in detail *POFUT1* expression in colorectal cancer (CRC), an in silico analysis using the RNAseq data of COADREAD samples extracted from FireBrowse was performed using 626 tumor and 51 adjacent non tumor tissues. *POFUT1* expression is significantly higher in 459 (72.8%) tumor compared to normal tissues ( $p < 0.001$ ) (Figure 1B). The distinction between cancer stages showed a significant ( $p < 0.001$ ) increase in *POFUT1* expression whatever the stage is, therefore at the first signs of the tumor growth (Figure 1C). Stage II presented a lesser amount of *POFUT1* transcripts compared to other stages. *POFUT1* immunolabeling performed on tumors representing each CRC pathological stage confirms that *POFUT1* is overexpressed in tumor (Figure 2A). To demonstrate anti-*POFUT1* antibody (ab74302) specificity, we performed an immunofluorescence detection on two human colorectal cancer cell lines (HCT 116 and SW620) stably transfected or not, with shRNAs targeting *POFUT1*. As shown in Figure 2B, HCT 116 sh*POFUT1* cell line, whose *POFUT1* expression is 30% lesser (quantification by Taqman probe qRT-PCR method), has a lower staining compared to HCT 116. This result is more accentuated with SW620 sh*POFUT1* cell line, which has 60% *POFUT1* expression decrease compared to SW620. As the *POFUT1* antibody (ab74302) was ineffective in immunoblotting, we used another antibody raised against Pofut1 and produced in our laboratory [39]. This antibody has been proven in different studies especially in mice [24,40]. Despite a low quality of protein migration due to the Optimal Cutting Temperature (OCT) embedded colorectal tissues, we observed an increase (1.134 and 1.565 fold) of *POFUT1* labeling in tumor samples compared to normal tissues (Figure 2C). Such a result was confirmed on human colorectal cancer cell lines HCT 116, HT-29 and SW620 where the expression levels were respectively 2.680, 2.418 and 2.608 fold higher compared to the human embryonic colon cell line CCD841CoN (Figure 2D).

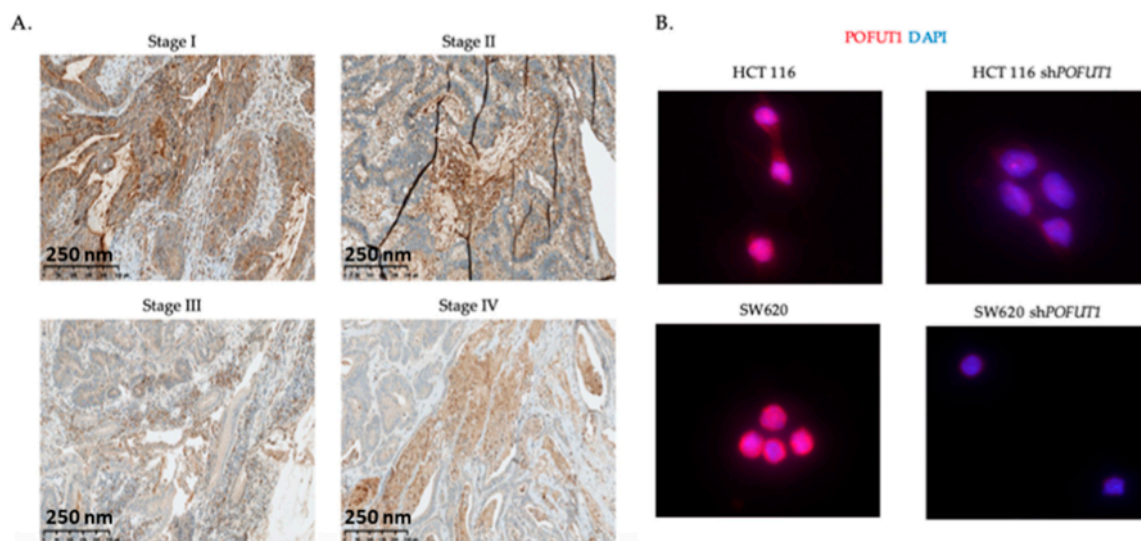
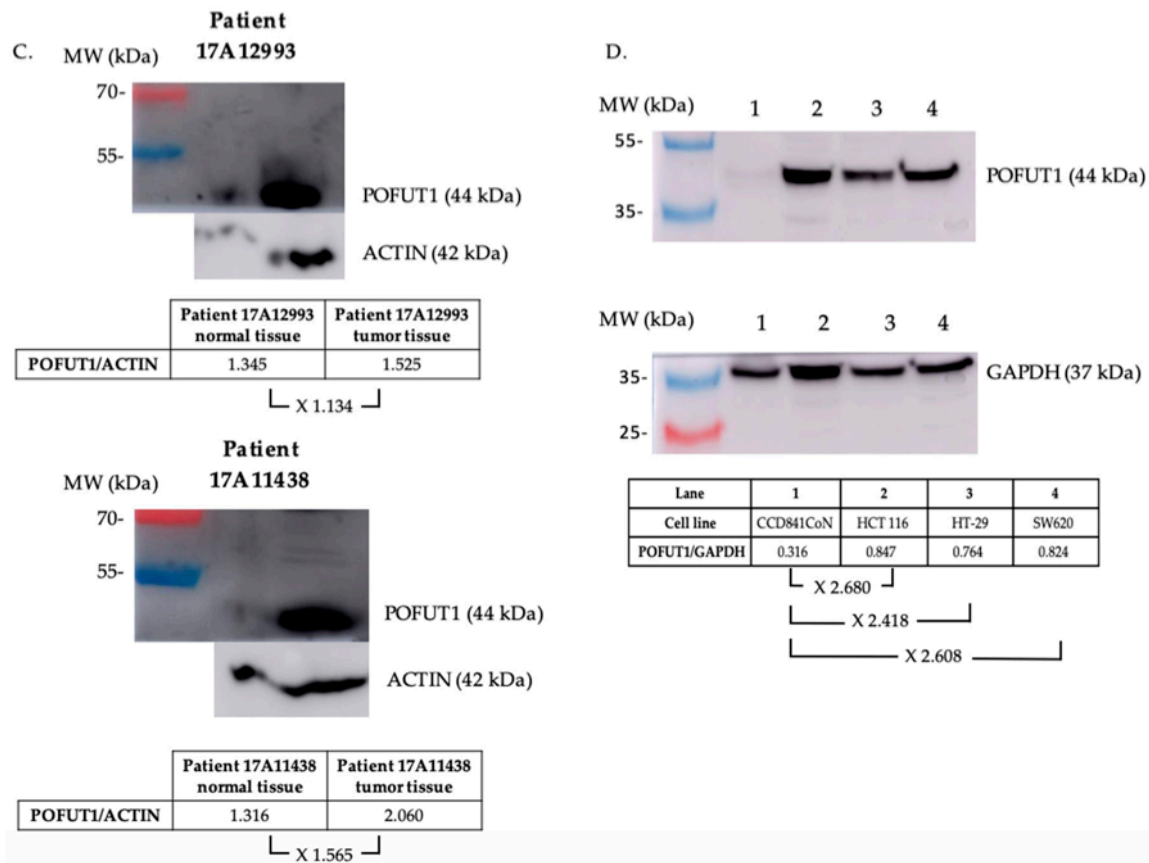


Figure 2. Cont.







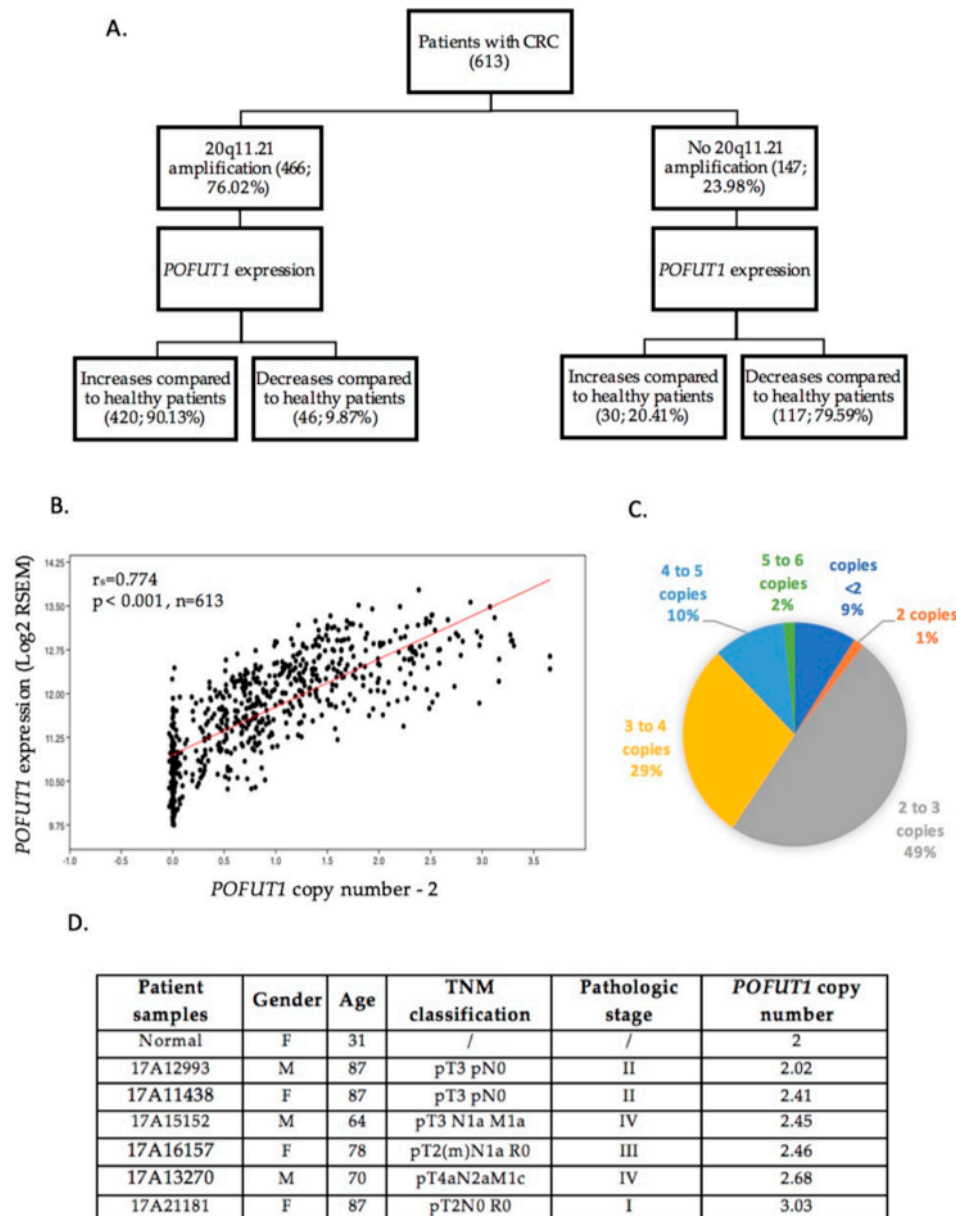
**Figure 2.** POFUT1 expression in colorectal tissues and cell lines. Immunohistochemistry analysis (A) shows that POFUT1 is overexpressed in tumor tissues from first colorectal cancer (CRC) stage. Immunofluorescence labeling of POFUT1 (red), performed on wild-type and *POFUT1* knockdown HCT 116 and SW620 human colorectal cancer cell lines, confirmed the antibody specificity (B). Western blot realized on colorectal tissues (C) and colorectal CCD841CoN, HCT 116, HT-29 and SW620 cell lines (D) validate the POFUT1 overexpression in cancer samples compared to healthy samples.

## 2.2. In CRC, 20q11.21 Chromosomal Region is Often Amplified, Which Induced POFUT1 Copy Number Alteration

To determine if a link exists between *POFUT1* chromosomal region state (20q11.21) and its overexpression, an in silico analysis was performed. The study showed that among 613 patients with CRC, 76.02% had an amplification of the 20q11.21 region, which correlated, in 90.13% of cases, with the increase in *POFUT1* expression compared to healthy patients (Figure 3A). Interestingly, around 80% of CRC patients who had no 20q11.21 amplification presented a lower *POFUT1* expression compared to healthy patients. A significant positive correlation exists between copy number and *POFUT1* expression ( $r_s = 0.774$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 3B), suggesting that *POFUT1* transcript quantity is predominantly due to the gene copy number. Furthermore, copy number analysis of *POFUT1* gene showed that 20q11.21 chromosomal region amplification mostly generates between two and three *POFUT1* copies per genome (49%) and no more than six copies (Figure 3C). Copy number analysis performed on six selected CRC tumors including those immunolabeled by anti-*POFUT1* revealed an increase of *POFUT1* copy number in five patients with in majority of cases between 2 and 3 copies, like in bioinformatics analysis (Figure 3D).







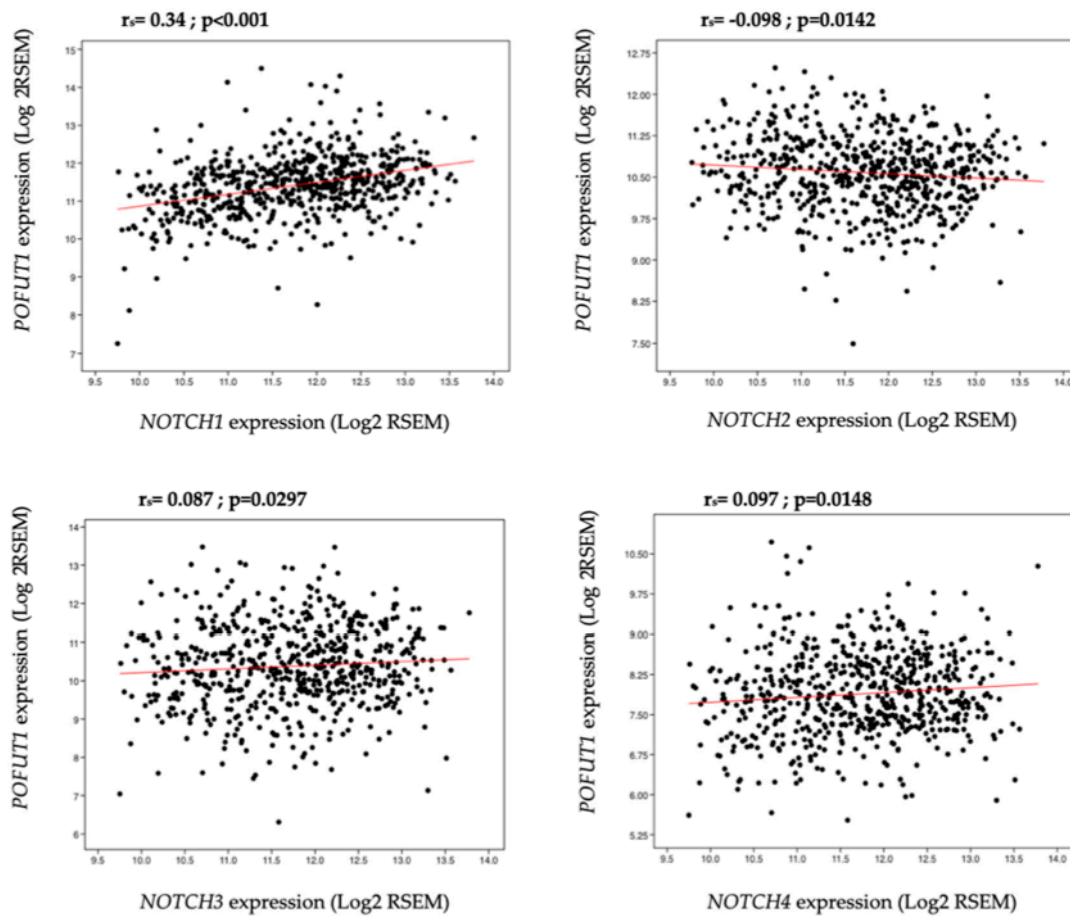
**Figure 3.** *POFUT1* overexpression is strongly correlated with gene copy number variation. (A) Hierarchical analysis of 613 RNAseq data concerning *POFUT1* shows that 76.02% of CRC patients have an amplification of 20q11.21 chromosomal region where *POFUT1* is located. Among them 90.13% have a *POFUT1* overexpression compared to the *POFUT1* mean expression in non-tumor adjacent tissues. (B) Spearman Rho correlation analysis in 613 CRC patients shows that *POFUT1* expression is significantly correlated with its copy number. To only view additional copies of *POFUT1* gene, a subtraction of two copies corresponding to a physiological state is applied for each sample. (C) CRC patients have in the majority of cases between two and three *POFUT1* gene copies. (D) *POFUT1* copy number analysis performed on gDNA extracted from six CRC and one normal tissues shows an increase of *POFUT1* copy number in five CRC cases compared to the normal sample.

### 2.3. Correlation between *POFUT1* and NOTCH Receptor Expressions

Since the cross talk between *POFUT1* and NOTCH receptors has been demonstrated in hepatocellular carcinoma and gastric cancer [32,33], a Spearman’s correlation coefficient was used to determine their relationships in CRC. A significant positive correlation was observed between *POFUT1* and *NOTCH1* ( $r_s = 0.34, p < 0.001$ ), *NOTCH3* ( $r_s = 0.087, p = 0.0297$ ) and *NOTCH4* ( $r_s = 0.097,$



$p = 0.0148$ ) receptors (Figure 4). Furthermore, a significant negative correlation was detected between *POFUT1* and *NOTCH2* ( $r_s = -0.098$ ,  $p = 0.0142$ ). Among all correlations, *POFUT1/NOTCH1* one was the strongest.

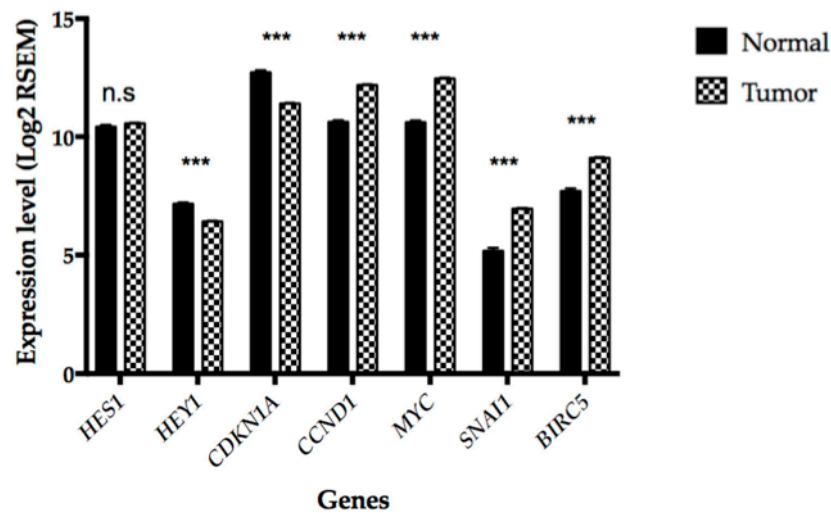


**Figure 4.** Correlation analysis between *POFUT1* and all *NOTCH* receptor expressions. A total of 626 CRC data for each gene is used for a Spearman Rho correlation. In all of cases, *POFUT1* expression is significantly correlated with *NOTCH* receptor expressions.

#### 2.4. NOTCH Signaling Pathway is Deregulated in CRC

Although the expressions of *POFUT1* and *NOTCH1* receptor are significantly and positively correlated, it is necessary to characterize the expression of the NOTCH target genes in order to highlight a potential deregulation of the signaling pathway. We were interested in *HES/HEY* transcription factor gene family especially *HES1* and *HEY1* widely studied in NOTCH pathway analysis, *p21* (*CDKN1A*) and *Cyclin D1* (*CCND1*) that encode cell cycle regulators, *c-Myc* (*MYC*) which is an oncogene, *Snail 1* (*SNAI1*) implicated in EMT and *Survivin* (*BIRC5*) related to apoptosis regulation (Figure 5). All genes, except *HES1*, are significantly modified in their expression levels in tumor compared to normal tissues ( $p < 0.001$ ). *Cyclin D1* and *c-Myc* that induce proliferation, *Snail 1* that promotes EMT and *Survivin* that inhibits apoptosis are overexpressed. *p21*, a negative regulator of cell cycle, and *HEY1* transcription factor mediator of Notch signaling, are downregulated. Taken together these results demonstrate that NOTCH signaling is altered in CRC.





**Figure 5.** Expression of a set of NOTCH target genes. Data extracted from FireBrowse were obtained from 626 CRC and 51 normal adjacent tissues. The genes related to proliferation (*p21*, *c-Myc* and *Cyclin D1*), EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) process (*Snail 1*) and apoptosis (*Survivin*) are altered in their expressions in the sense of promoting tumor development. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 2.5. Relationship between *POFUT1*, *NOTCH1* Expressions, and Clinical Features

To further explore the association between *POFUT1* and *NOTCH1* in CRC progression, analysis of their expressions compared to the mean value of healthy patients was studied in the light of various clinical parameters in CRC patients (Tables 1 and 2). *POFUT1* expression is significantly associated with tumor issue site ( $p = 0.0001$ ), overexpressed in 68.9% of colon and 84.6% of rectum tissues (Table 1). It is linked to pathologic stage ( $p = 0.00019$ ) and markedly overexpressed in 79% of stage I, 63.3% of stage II, 74.9% of stage III and 85.2% of stage IV. *POFUT1* expression is associated with M classification ( $p = 0.01087$ ) and overexpressed in 70.7% of M0 stage and 83.9% of M1 stage. In addition, *POFUT1* is differently expressed according to histological type ( $p = 0.00001$ ) with an overexpression in 75% of colon adenocarcinoma, 30.6% of colon mucinous adenocarcinoma, 88.4% of rectal adenocarcinoma and 46.2% of rectal mucinous adenocarcinoma. However, no correlation was observed between *POFUT1* expression and gender, age, T and N classifications.

**Table 1.** Correlation between *POFUT1* expression and clinical parameters in patients with CRC.

Clinical Parameters	N	<i>POFUT1</i>		<i>p</i> Value
		High (%)	Low (%)	
<b>Gender</b>				
Female	290	203 (70.0)	87 (30.0)	0.10206
Male	331	251 (75.8)	80 (24.2)	
<b>Age (years)</b>				
≤60	193	146 (75.6)	47 (24.4)	0.38296
>60	426	308 (72.3)	118 (27.7)	
<b>Tumor Issue Site</b>				
Colon	454	313 (68.9)	141 (31.1)	0.00010
Rectum	163	138 (84.6)	25 (15.4)	
<b>Pathologic Stage</b>				
Stage I	105	83 (79.0)	22 (21.0)	0.00019
Stage II	229	145 (63.3)	84 (36.7)	
Stage III	179	134 (74.9)	45 (25.1)	
Stage IV	88	75 (85.2)	13 (14.8)	



Table 1. Cont.

Clinical Parameters	N	POFUT1		p Value
		High (%)	Low (%)	
<b>Pathology T Stage</b>				
T1	20	17 (85.0)	3 (15.0)	0.16581
T2	105	84 (80.0)	21 (20.0)	
T3	423	300 (70.9)	123 (29.1)	
T4	70	50 (71.4)	20 (28.6)	
<b>Pathology N Stage</b>				
N0	352	245 (69.6)	107 (30.4)	0.05423
N1	150	120 (80.0)	30 (20.0)	
N2	115	85 (73.9)	30 (26.1)	
<b>Pathology M Stage</b>				
M0	460	325 (70.7)	135 (29.3)	<b>0.01087</b>
M1	87	73 (83.9)	14 (16.1)	
<b>Histological Type</b>				
Colon adenocarcinoma	388	291 (75.0)	97 (25.0)	<b>0.00001</b>
Colon mucinous adenocarcinoma	62	19 (30.6)	43 (69.4)	
Rectal adenocarcinoma	147	130 (88.4)	17 (11.6)	
Rectal mucinous adenocarcinoma	13	6 (46.2)	7 (53.8)	

Bold values indicate statistical significance.

*NOTCH1* expression was significantly associated with tumor issue site ( $p = 0.00099$ ) and overexpressed in 70.9% of colon and 84% of rectum tissues (Table 2). It is associated to histological type ( $p = 0.00173$ ) and *NOTCH1* is overexpressed in 73.2% of colon adenocarcinoma, 59.7% of colon mucinous adenocarcinoma, 84.4% of rectal adenocarcinoma and 76.9% of rectal mucinous adenocarcinoma. No correlation was observed between *NOTCH1* expression and gender, age, pathological stage, T, N and M classifications.

Table 2. Correlation between *NOTCH1* expression and clinical parameters in patients with CRC.

Clinical Parameters	N	NOTCH1		p Value
		High (%)	Low (%)	
<b>Gender</b>				
Female	290	214 (73.8)	76 (26.2)	0.74724
Male	331	248 (74.9)	83 (25.1)	
<b>Age (years)</b>				
≤60	193	141 (73.1)	52 (26.9)	0.58601
>60	426	320 (75.1)	106 (24.9)	
<b>Tumor Issue Site</b>				
Colon	454	322 (70.9)	132 (29.1)	<b>0.00099</b>
Rectum	163	137 (84.0)	26 (16.0)	
<b>Pathologic Stage</b>				
Stage I	105	80 (76.2)	25 (23.8)	0.59717
Stage II	229	163 (71.2)	66 (28.8)	
Stage III	179	135 (75.4)	44 (24.6)	
Stage IV	88	68 (77.3)	20 (22.7)	





Table 2. Cont.

Clinical Parameters	N	NOTCH1		p Value
		High (%)	Low (%)	
<b>Pathology T Stage</b>				
T1	20	11 (55.0)	9 (45.0)	0.16062
T2	105	79 (75.2)	26 (24.8)	
T3	423	313 (74.0)	110 (26.0)	
T4	70	56 (80.0)	14 (20.0)	
<b>Pathology N Stage</b>				
N0	352	257 (73.0)	95 (27.0)	0.66047
N1	150	114 (76.0)	36 (24.0)	
N2	115	88 (76.5)	27 (23.5)	
<b>Pathology M Stage</b>				
M0	460	335 (72.8)	125 (27.2)	0.41731
M1	87	67 (77.0)	20 (23.0)	
<b>Histological Type</b>				
Colon adenocarcinoma	388	284 (73.2)	104 (26.8)	<b>0.00173</b>
Colon mucinous adenocarcinoma	62	37 (59.7)	25 (40.3)	
Rectal adenocarcinoma	147	124 (84.4)	23 (15.6)	
Rectal mucinous adenocarcinoma	13	10 (76.9)	3 (23.1)	

Bold values indicate statistical significance.

In addition, we classified CRC patients into four groups according to their combined expression status of *POFUT1* and *NOTCH1* as follow: high *POFUT1*/high *NOTCH1*, low *POFUT1*/low *NOTCH1*, high *POFUT1*/low *NOTCH1* and low *POFUT1*/high *NOTCH1*. The threshold value which allows to classify individuals in the high and low groups is the mean expression value of *POFUT1* and *NOTCH1* in healthy patients. The associations between these groups and clinical features were analyzed in Table 3. Combined *POFUT1*/*NOTCH1* expressions were significantly associated with tumor issue site ( $p = 0.00004$ ), pathologic stage ( $p = 0.00498$ ) and histological type ( $p < 0.001$ ). It should be noted that in all cases, the majority of CRC are located in high/high group.

**Table 3.** Correlation between *POFUT1*/*NOTCH1* expressions and clinical parameters in patients with CRC.

Clinical Parameters	N	<i>POFUT1</i> / <i>NOTCH1</i>				p Value
		High/High (%)	Low/Low (%)	High/Low (%)	Low/High (%)	
<b>Gender</b>						
Female	290	169 (58.3)	42 (14.5)	34 (11.7)	45 (15.5)	0.4020
Male	331	205 (61.9)	37 (11.2)	46 (13.9)	43 (13.0)	
<b>Age (years)</b>						
≤60	193	116 (60.1)	22 (11.4)	30 (15.5)	25 (13.0)	0.56050
>60	426	258 (60.6)	56 (13.1)	50 (11.7)	62 (14.6)	
<b>Tumor Issue Site</b>						
Colon	454	248 (54.6)	67 (14.8)	65 (14.3)	74 (16.3)	<b>0.00004</b>
Rectum	163	124 (76.1)	12 (7.4)	14 (8.6)	13 (8.0)	
<b>Pathologic Stage</b>						
Stage I	105	68 (64.8)	10 (9.5)	15 (14.3)	12 (11.4)	<b>0.00498</b>
Stage II	229	123 (53.7)	44 (19.2)	22 (9.6)	40 (17.5)	
Stage III	179	107 (59.8)	17 (9.5)	27 (15.1)	28 (15.6)	
Stage IV	88	62 (70.5)	7 (8)	13 (14.8)	6 (6.8)	



Table 3. Cont.

Clinical Parameters	N	POFUT1/NOTCH1				p Value
		High/High (%)	Low/Low (%)	High/Low (%)	Low/High (%)	
<b>Pathology T Stage</b>						
T1	20	10 (50.0)	2 (10.0)	7 (35.0)	1 (5.0)	0.09107
T2	105	68 (64.8)	10 (9.5)	16 (15.2)	11 (10.5)	
T3	423	250 (59.1)	60 (14.2)	50 (11.8)	63 (14.9)	
T4	70	43 (61.4)	7 (10.0)	7 (10.0)	13 (18.6)	
<b>Pathology N Stage</b>						
N0	352	204 (58.0)	54 (15.3)	41 (11.6)	53 (15.1)	0.42789
N1	150	97 (64.7)	13 (8.7)	23 (15.3)	17 (11.3)	
N2	115	70 (60.9)	12 (10.4)	15 (13.0)	18 (15.7)	
<b>Pathology M Stage</b>						
M0	460	266 (57.8)	66 (14.3)	59 (12.8)	69 (15.0)	0.07716
M1	87	61 (70.1)	8 (9.2)	12 (13.8)	6 (6.9)	
<b>Histological Type</b>						
Colon adenocarcinoma	388	235 (60.6)	48 (12.4)	56 (14.4)	49 (12.6)	$1.5335 \times 10^{-15}$
Colon mucinous adenocarcinoma	62	12 (19.4)	18 (29.0)	7 (11.3)	25 (40.3)	
Rectal adenocarcinoma	147	116 (78.9)	9 (6.1)	14 (9.5)	8 (5.4)	
Rectal mucinous adenocarcinoma	13	6 (46.2)	3 (23.1)	0 (0)	4 (30.8)	

Bold values indicate statistical significance.

### 3. Discussion

Comprehension of mechanisms which initiate tumor development is crucial since an early diagnosis of cancer can trigger treatment and increase the patient chances of recovery. Therefore, research of new potential diagnostic markers of cancer occupies a substantial part in the scientific field. Recently, many studies focused on glycosylation, especially in malignant tumor development [41]. In that context, *O*-fucosylation, linked to expression of Protein *O*-fucosyltransferase 1 (*POFUT1*) and its activity on EGF-like domains, appears promising. *POFUT1* adds *O*-fucose on S or T residues within the consensus sequence  $C^2X_4(S/T)C^3$  of EGF-like domains [42] present in some cell surface and secreted proteins [43]. In humans, 87 putative *POFUT1* targets had been referenced [44]. Among those, *NOTCH* receptors are the most described in literature and their *O*-fucosylation was shown to be essential for their interaction with ligands and therefore for *NOTCH* signaling [24]. *POFUT1* and *NOTCH* cross talk had been described in two cancer types. In breast cancer, an overexpression of *POFUT1* and *NOTCH1* was associated with lymph node metastasis and advanced tumor stage [45]. In hepatocellular carcinoma, *POFUT1* overexpression induced an aberrant activation of *NOTCH* pathway switching on *HES1*, which in turn promoted migration and cell proliferation [32]. Currently, no study focused on the implication of *POFUT1* in colorectal cancer, although it is a major public health issue. Colorectal cancer is one of the cancers where *POFUT1* is the most overexpressed. Here, bioinformatics combined with immunohistochemistry, western blot and gene copy number analysis had been used as an approach to determine if *POFUT1* could be a potential novel CRC biomarker. Among the data of 626 CRC patients available in FireBrowse database, 459 (72.8%) had a *POFUT1* overexpression compared to healthy patients. The overexpression was detected from the first stage of CRC. *POFUT1* labeling on CRC biopsies confirmed the overexpression in tumor compared to the adjacent non-tumor tissues. The chromosomal region 20q11.21, where *POFUT1* gene is located, appears to be unstable leading to gene copy number variation, which could explain the expression increase [46]. In the CRC panel, we observed a 20q11.21 amplification in 466 cases over 613 (76.02%), which induces an increase of *POFUT1* gene copy number to 5.7 copies. Our *POFUT1* copy number analysis performed on six CRC tissues follows the same trend as the bioinformatics analysis. As expected, the small sample size does not allow observing the whole range of copy number alterations. A strong positive correlation ( $r_s = 0.774$ ) between *POFUT1* copy number and its expression argues for a direct link as already noticed [38]. It should be noted that the significant decrease of *POFUT1* expression in stage II (Figure 2B) is mainly due to a greater proportion of cases without 20q11.21 chromosomal region amplification (33.9%) compared to other



stages (Stage I, 23.1%; Stage III, 18.0%; Stage IV, 13.8%). Significant correlations between *POFUT1* and *NOTCH* receptor expressions were measured with the strongest for *POFUT1/NOTCH1* association ( $r_s = 0.34$ ). *POFUT1*, *NOTCH1* and *POFUT1/NOTCH1* high expressions are significantly associated with the tumor tissue site, preferentially overexpressed in rectum tissue (84.6%, 84%, 76.1%, respectively). Several other studies highlighted different gene expressions and genetic features associated with carcinogenesis between colon and rectum [47,48]. Interestingly, *POFUT1*, and not *NOTCH1*, expression appears to be significantly associated with M classification. *POFUT1* is predominantly overexpressed in colorectal metastasis (83.9%) and could *O*-fucosylate other protein targets than *NOTCH* receptors, such as *AGRIN* which was shown to enhance tumor progression by activating cell migration and invasion in oral cancer [49]. Overexpression of *POFUT1* and *NOTCH1* is preferentially observed in non-mucinous adenocarcinoma histological type. This observation can be explained by the fact that mucinous adenocarcinoma are characterized by a markedly reduced rate of copy-number aberrations compared to adenocarcinoma [50]. Indeed, in mucinous adenocarcinoma, only 42.6% of cases had an amplified 20q11.21 region. Regarding *NOTCH* signaling activation, it is known that in tumor tissues a greater activation of *NOTCH* pathway is involved in cell proliferation and metastasis process [51,52]. In this study on CRC, an increase of *NOTCH* activation is supported by the higher expression levels of its target genes such as *p21*, *Cyclin D1*, *c-Myc*, *Survivin* and *Snail 1*. However, the expression of *HES1*, a proved *Notch* signaling downstream target, is not modified in tumor compared to healthy tissues (Figure 5). Nevertheless, studies in relation with *HES1* expression in CRC are controversial [53–55] suggesting that it is not a good marker of *NOTCH* signaling activation in colorectal cancer. We also showed that *HEY1* expression is downregulated although this gene is also known to be activated by *Notch* signaling [56,57]. As well, conflicting studies showed that this *NOTCH* target transcriptional factor was overexpressed [58] or non-expressed [59] in colorectal cancer. Surprisingly, significant positive correlations between the expressions of *POFUT1* and *HES1* or *HEY1* are found for healthy tissues and not for tumor ones (Figure S1). It could be explained by the cell heterogeneity of tumors. Therefore, the consequences of *POFUT1* overexpression on *NOTCH* signaling activation could be opposite depending on the *NOTCH* target genes. The effect of *POFUT1* overexpression on *O*-fucosylation levels and *NOTCH* signaling would be cell-type dependent. Overexpression of *POFUT1* most likely does not result in increased *O*-fucosylation of *NOTCH* receptors. Indeed, in HEK293T cells, most EGF-like repeats containing *O*-fucose consensus sequences are *O*-fucosylated at high stoichiometry degree [60]. If it is the case in colorectal cancer, the overexpression of *POFUT1* may affect the *O*-fucosylation state of other proteins. Nevertheless, it is important to note that in the majority of CRC cases analyzed in the present study, both *POFUT1* and *NOTCH1* are overexpressed (60.5%), suggesting that overexpression of *POFUT1* is necessary to ensure *O*-fucosylation of additional *NOTCH* receptors in the tumor. Finally, in addition to its *O*-fucosyltransferase activity, it had been demonstrated an independent chaperone function for the *POFUT1* orthologue in *Drosophila melanogaster* [61]. However, this additional function is still controversial in mammals [24]. Ajima et al. (2017) [62] showed that in mouse it is not possible to dissociate the possible chaperone contribution from its *O*-fucosyltransferase activity, which could also be the case for human *POFUT1*. Our study focuses on *POFUT1* expression level related to its copy number determined by 20q11.21 chromosomal region state. Nevertheless we cannot exclude that gene expression level can also be modified by other mechanisms such as mutations within promoter or by miR-34 family regulation [63]. The lack of these informations in the database did not allow us to explore these expression regulatory mechanisms.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. The Cancer Genome Atlas Data Analysis

Data for colorectal carcinoma were extracted from FireBrowse database (<http://www.firebrowse.org>). A total of 626 tumor samples and 51 normal samples were studied. Gene expression levels were merged from COADREAD.uncv2.mRNAseq\_RSEM\_normalized\_log2.txt





found in COADREAD.mRNAseq\_Preprocess.Level file. Clinical features for each patient were determined from “CLI\_years\_to\_birth”, “CLI\_tumor\_tissue\_site”, “CLI\_pathologic\_stage”, “CLI\_pathology\_T\_stage”, “CLI\_pathology\_N\_stage”, “CLI\_pathology\_M\_stage”, “CLI\_gender” and “CLI\_histological\_type” extracted from COADREAD-TP.samplefeatures.txt available in COADREAD-TP.Aggregate\_AnalysisFeatures.Level metadata. *POFUT1* gene copy number was retrieved from all\_data\_by\_genes.txt provided in COADREAD-TP.CopyNumber\_GISTIC2.Level metadata. The presence or absence of 20q11.21 chromosomal region amplification was found in transformed.cor.cli from COADREAD-TP.Correlate\_Clinical\_vs\_CopyNumber-Focal.Level metadata.

#### 4.2. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Past3 3.20 version [64] and GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). mRNA expression data were referenced as mean  $\pm$  SEM and a t-Student test was applied to compare values between normal and tumor tissues. Bivariate correlation analysis between *POFUT1* and *NOTCH* receptor mRNA expressions was performed using Spearman’s Rho. Associations between *POFUT1*, *NOTCH1* expressions and clinicopathological parameters were estimated by a Chi-square test. Results were considered statistically significant if the p-value was less than 0.05.

#### 4.3. Genomic DNA Extraction and *POFUT1* Copy Number Analysis

Genomic DNA was extracted from normal and tumor tissues with Maxwell<sup>®</sup> 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit and Maxwell<sup>®</sup> 16 IVD device (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer’s protocol. Genomic DNA concentration was determined using Quantifluor<sup>®</sup> ONE dsDNA system (Promega) and measured with Quantus<sup>™</sup> Fluorometer (Promega) following manufacturer’s recommendations. Taqman<sup>™</sup> copy number assay for *POFUT1* (Hs02487189\_cn) and RNase P reference assays (4403326) were used with Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to product literature. Twenty nanograms of gDNA were run in triplicate on QuantStudio 3 real-time PCR system (Applied Biosystem<sup>™</sup>). *POFUT1* copy number was estimated using  $\Delta\Delta C_t$  method [65].

#### 4.4. *POFUT1* Labelling by Immunohistochemistry

Paraffin-embedded blocks of six colorectal adenocarcinomas corresponding to each CRC pathological stage were obtained from the Tumor Bank (CRBiolim) of Limoges University Hospital. Immunohistochemical analysis was performed on five- $\mu$ m-thick paraffin sections with anti-*POFUT1* antibody (1/25, ab74302, Abcam, Cambridge, UK). Slides were automatically processed (Ventana Benchmark ULTRA, Roche, Meylan, France) according to the protocol supplied by the manufacturer. Images were acquired with NanoZoomer RS 2.0 Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Massy, France). All samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent. Ethics approval (CRB-CESSION-2018-016) was obtained from the “Comité médico-scientifique de la tumorothèque de l’Hôpital Dupuytren”, the bioethics committee of our hospital.

#### 4.5. *POFUT1* Labeling by Immunofluorescence

Colorectal cancer cell lines, HCT 116 and SW620 obtained from ATCC and the stably transfected cell lines, HCT 116 sh*POFUT1* and SW620 sh*POFUT1*, created by our team were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature and permeabilized with HEPES Triton buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, pH 7.4) for 30 min at 4 °C. After three washes with PBS, non-specific binding sites were saturated for 1 h at room temperature with a blocking solution containing 10% goat serum, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS. After one wash with PBS/0.2% BSA, immunolabeling was performed with anti-*POFUT1* (ab74302) antibody diluted at 1:100 in PBS/1% BSA overnight at 4 °C. After washes with PBS and PBS/0.2% BSA/0.1% Tween-20, cells were incubated with the F(ab’)<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H + L)





secondary antibody Alexa fluo<sup>®</sup> 546 conjugated (Molecular Probes, Life Technology, Eugene, OR, USA) used at 1:1000 in PBS/1% BSA for 15 min in dark at room temperature. After new washes, nuclei were stained with DAPI (Thermo Fisher Scientific) at 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in PBS, 5 min in dark at room temperature. Finally, after three PBS washes, cells were mounted on slides with Fluoromount-G<sup>®</sup> (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) and sealed with glass coverslips. We used the MetaMorph<sup>®</sup> software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) to acquire images with a LEICA microsystem DMI6000B inverted epifluorescence microscope.

#### 4.6. Protein Extraction and Western Blot

Total cell protein extracts were prepared by solubilizing tissue or cell pellets (from CCD841CoN, HCT 116, HT-29 and SW620 cell lines obtained from ATCC) in a RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (*v/v*), 0.5% sodium deoxycholate (*w/v*), 0.1% sodium dodecylsulfate (*v/v*), pH 8) and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 1 h 30 min at 4 °C. Protein lysates were centrifuged at 12,000 $\times$  *g* for 20 min at 4 °C, and protein supernatant concentrations were determined using Pierce<sup>™</sup> BCA protein assay kit (Thermo Scientific<sup>™</sup>, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal amounts of proteins (25 or 50  $\mu\text{g}$ ) were resolved by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels for 1 h at 20 mA. Proteins were transferred onto Amersham<sup>™</sup> Protra<sup>®</sup> premium 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 1 h 30 min at 0.8 mA/cm<sup>2</sup>. Membranes were blocked with TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) supplemented with 0.1% Tween-20 (*v/v*) (TBST) and 5% (*w/v*) non-fat dry milk during 1 h at room temperature. They were incubated with anti-POFUT1 [39], anti-GAPDH (AF5718, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or anti-Actin (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies, diluted at 1:1000 in TBST, 2.5% (*w/v*) non-fat dry milk overnight at 4 °C. After three washes with TBST, membranes were incubated with secondary antibodies (anti-goat or anti-rabbit HRP-conjugated IgG, Dako, Glostrup, Denmark) diluted at 1:1000 in TBST, 2.5% (*w/v*) non-fat dry milk for 1 h at room temperature. After three washes in TBST, reactive proteins were visualized with ECL<sup>™</sup> Prime Western blotting system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). For detection and relative quantification of band intensities, we used Amersham Imager 600 device (GE Healthcare).

## 5. Conclusions

In conclusion, our findings indicated that *POFUT1* is overexpressed in colorectal cancer driven in majority of cases by a 20q11.21 chromosomal region amplification. This aberrant expression may promote carcinogenesis by *NOTCH* pathway activation. Finally, targeting *POFUT1* seems to be a promising strategy for CRC diagnosis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/11/411/s1>, Figure S1: Correlation analysis between *POFUT1* and *HES1*, *HEY1* transcription factor expressions.

**Author Contributions:** A.G. and A.M. contributed to the study concept. J.C. collected and analyzed data and wrote the initial draft of the manuscript. A.G., F.L. and A.M. assisted in the preparation of the manuscript. A.C. choose analyzed tumors in Tumor Bank and F.L. validated them. A.C. supervised tumors immunolabeling. All authors reviewed and approved the manuscript.

**Funding:** This work was supported by a French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowship to J.C. The work was funded by the GlyCanColor project within the CORC program.

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge Karine Durand for image acquisitions and Daniel Petit for his help in statistics. We are grateful to Pr. Bertrand Liagre and his team for providing us with the wild-type HCT 116, HT-29 and SW620; and to Dr. Anne Harduin-Lepers for providing us with CC841CoN.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R.M.; Barregard, L.; Bhutta, Z.A.; Brenner, H.; Dicker, D.J.; Chimed-Orchir, O.; Dandona, R.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hisamuddin, I.M.; Yang, V.W. Genetics of Colorectal Cancer. *Med. Gen. Med.* **2004**, *6*, 13.
3. Dennis, J.W.; Granovsky, M.; Warren, C.E. Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays* **1999**, *21*, 412–421. [[CrossRef](#)]
4. Dube, D.H.; Bertozzi, C.R. Glycans in cancer and inflammation—Potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Shental-Bechor, D.; Levy, Y. Folding of glycoproteins: Toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 524–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E. *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Chapter 6; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2009; ISBN 978-0-87969-770-9.
7. Dennis, J.W.; Nabi, I.R.; Demetriou, M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 1229–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Natsuka, S.; Lowe, J.B. Enzymes involved in mammalian oligosaccharide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 683–691. [[CrossRef](#)]
9. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* **1996**, *88*, 3259–3287. [[PubMed](#)]
10. Aplin, J.D.; Jones, C.J. Fucose, placental evolution and the glycode. *Glycobiology* **2012**, *22*, 470–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Muinelo-Romay, L.; Vázquez-Martín, C.; Villar-Portela, S.; Cuevas, E.; Gil-Martín, E.; Fernández-Briera, A. Expression and enzyme activity of  $\alpha(1,6)$ fucosyltransferase in human colorectal cancer:  $\alpha(1,6)$ FT in Human CRC. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 641–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liang, L.; Gao, C.; Li, Y.; Sun, M.; Xu, J.; Li, H.; Jia, L.; Zhao, Y. miR-125a-3p/FUT5-FUT6 axis mediates colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and pathological angiogenesis via PI3K-Akt pathway. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Luo, Y.; Nita-Lazar, A.; Haltiwanger, R.S. Two Distinct Pathways for O-fucosylation of Epidermal Growth Factor-like or Thrombospondin Type 1 Repeats. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9385–9392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yao, D.; Huang, Y.; Huang, X.; Wang, W.; Yan, Q.; Wei, L.; Xin, W.; Gerson, S.; Stanley, P.; Lowe, J.B.; et al. Protein O-fucosyltransferase 1 (Pofut1) regulates lymphoid and myeloid homeostasis through modulation of Notch receptor ligand interactions. *Blood* **2011**, *117*, 5652–5662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Der Vartanian, A.; Audfray, A.; Al Jaam, B.; Janot, M.; Legardinier, S.; Maftah, A.; Germot, A. Protein O-fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 391–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wang, Y.; Shao, L.; Shi, S.; Harris, R.J.; Spellman, M.W.; Stanley, P.; Haltiwanger, R.S. Modification of Epidermal Growth Factor-like Repeats with O-fucose: Molecular and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40338–40345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Luo, Y.; Haltiwanger, R.S. O-fucosylation of Notch Occurs in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11289–11294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wang, Y.; Spellman, M.W. Purification and characterization of a GDP-fucose: Polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8112–8118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rampal, R.; Luther, K.; Haltiwanger, R. Notch Signaling in Normal and Disease States: Possible Therapies Related to Glycosylation. *Curr. Mol. Med.* **2007**, *7*, 427–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Jafar-Nejad, H.; Leonardi, J.; Fernandez-Valdivia, R. Role of glycans and glycosyltransferases in the regulation of Notch signaling. *Glycobiology* **2010**, *20*, 931–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Artavanis-Tsakonas, S.; Muskavitch, M.A.T. Notch: The Past, the Present, and the Future. In *Current Topics in Developmental Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010; Volume 92, pp. 1–29. ISBN 978-0-12-380914-8.



22. Shi, S.; Stanley, P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5234–5239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Takeuchi, H.; Yu, H.; Hao, H.; Takeuchi, M.; Ito, A.; Li, H.; Haltiwanger, R.S. O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 15964–15973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Stahl, M.; Uemura, K.; Ge, C.; Shi, S.; Tashima, Y.; Stanley, P. Roles of Pofut1 and Fucose in Mammalian Notch Signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 13638–13651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Weng, A.P. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* **2004**, *306*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Göthert, J.R.; Brake, R.L.; Smeets, M.; Dührsen, U.; Begley, C.G.; Izon, D.J. NOTCH1 pathway activation is an early hallmark of SCL T leukemogenesis. *Blood* **2007**, *110*, 3753–3762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bolós, V.; Mira, E.; Martínez-Poveda, B.; Luxán, G.; Cañamero, M.; Martínez-A, C.; Mañes, S.; de la Pompa, J.L. Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hsu, K.-W.; Hsieh, R.-H.; Huang, K.-H.; Fen-Yau Li, A.; Chi, C.-W.; Wang, T.-Y.; Tseng, M.-J.; Wu, K.-J.; Yeh, T.-S. Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1459–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Zhang, Y.; Li, B.; Ji, Z.-Z.; Zheng, P.-S. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer* **2010**, *116*, 5207–5218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kroes, R.A.; Dawson, G.; Moskal, J.R. Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 14–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yokota, S.; Ogawara, K.; Kimura, R.; Shimizu, F.; Baba, T.; Minakawa, Y.; Higo, M.; Kasamatsu, A.; Endo-Sakamoto, Y.; Shiiba, M.; et al. Protein O-fucosyltransferase 1: A potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1864–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ma, L.; Dong, P.; Liu, L.; Gao, Q.; Duan, M.; Zhang, S.; Chen, S.; Xue, R.; Wang, X. Overexpression of protein O-fucosyltransferase 1 accelerates hepatocellular carcinoma progression via the Notch signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dong, S.; Wang, Z.; Huang, B.; Zhang, J.; Ge, Y.; Fan, Q.; Wang, Z. Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 171–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J.; Waldman, F.; Pinkel, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **1992**, *258*, 818–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kimura, Y.; Noguchi, T.; Kawahara, K.; Kashima, K.; Daa, T.; Yokoyama, S. Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: Gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod. Pathol.* **2004**, *17*, 1328–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. MacKinnon, R.N.; Selan, C.; Wall, M.; Baker, E.; Nandurkar, H.; Campbell, L.J. The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosom. Cancer* **2010**, *49*, 998–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Postma, C.; Hermsen, M.; Coffa, J.; Baak, J.; Mueller, J.; Mueller, E.; Bethke, B.; Schouten, J.; Stolte, M.; Meijer, G. Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon. *J. Pathol.* **2005**, *205*, 514–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Loo, L.W.M.; Tiirikainen, M.; Cheng, I.; Lum-Jones, A.; Seifried, A.; Church, J.M.; Gryfe, R.; Weisenberger, D.J.; Lindor, N.M.; Gallinger, S.; et al. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **2013**, *52*, 450–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Loriol, C.; Audfray, A.; Dupuy, F.; Germot, A.; Maftah, A. The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1202–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Schuster-Gossler, K.; Harris, B.; Johnson, K.R.; Serth, J.; Gossler, A. Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced Pofut1 levels during early mouse development. *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Munkley, J.; Elliott, D.J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 35478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





42. Takeuchi, H.; Haltiwanger, R.S. Role of glycosylation of Notch in development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 638–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, Y.; Lee, G.F.; Kelley, R.F.; Spellman, M.W. Identification of a GDP-L-fucose: Polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* **1996**, *6*, 837–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Schneider, M.; Al-Shareffi, E.; Haltiwanger, R.S. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology* **2017**, *27*, 601–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wan, G.; Tian, L.; Yu, Y.; Li, F.; Wang, X.; Li, C.; Deng, S.; Yu, X.; Cai, X.; Zuo, Z.; et al. Overexpression of Pofut1 and activated Notch1 may be associated with poor prognosis in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 104–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lefort, N.; Feyeux, M.; Bas, C.; Féraud, O.; Bennaceur-Griscelli, A.; Tachdjian, G.; Peschanski, M.; Perrier, A.L. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1364–1366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Birkenkamp-Demtroder, K. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* **2005**, *54*, 374–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Frattini, M. Different Genetic Features Associated with Colon and Rectal Carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4015–4021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kawahara, R.; Granato, D.C.; Carnielli, C.M.; Cervigne, N.K.; Oliveria, C.E.; Martinez, C.A.R.; Yokoo, S.; Fonseca, F.P.; Lopes, M.; Santos-Silva, A.R.; et al. Agrin and Perlecan Mediate Tumorigenic Processes in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hugen, N.; Brown, G.; Glynne-Jones, R.; de Wilt, J.H.W.; Nagtegaal, I.D. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 361–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Zou, J.; Li, P.; Lu, F.; Liu, N.; Dai, J.; Ye, J.; Qu, X.; Sun, X.; Ma, D.; Park, J.; et al. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Hematol. Oncol.* **2013**, *6*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. De Craene, B.; Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 97–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gao, F.; Zhang, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Zheng, L.; Yang, J.; Huang, W.; Ye, Y.; Luo, W.; Xiao, D. Hes1 is involved in the self-renewal and tumourigenicity of stem-like cancer cells in colon cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 3963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ahadi, M.; Andrici, J.; Sioson, L.; Sheen, A.; Clarkson, A.; Gill, A.J. Loss of Hes1 expression is associated with poor prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **2016**, *57*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Reedjik, M.; Odorcic, S.; Zhang, H.; Chetty, R.; Tennert, C.; Dickson, B.C.; Lockwood, G.; Gallinger, S.; Egan, S.E. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **1992**. [[CrossRef](#)]
56. Maier, M.M.; Gessler, M. Comparative Analysis of the Human and Mouse Hey1 Promoter: Hey Genes Are New Notch Target Genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 652–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jarriault, S.; Brou, C.; Logeat, F.; Schroeter, E.H.; Kopan, R.; Israel, A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **1995**, *377*, 355–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Candy, P.A.; Phillips, M.R.; Redfern, A.D.; Colley, S.M.; Davidson, J.A.; Stuart, L.M.; Wood, B.A.; Zeps, N.; Leedman, P.J. Notch-induced transcription factors are predictive of survival and 5-fluorouracil response in colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* **2013**, *109*, 1023–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hulleman, E.; Quarto, M.; Vernell, R.; Masserdotti, G.; Colli, E.; Kros, J.M.; Levi, D.; Gaetani, P.; Tunici, P.; Finocchiaro, G.; et al. A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *13*, 136–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kakuda, S.; Haltiwanger, R.S. Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev. Cell* **2017**, *40*, 193–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Okajima, T.; Xu, A.; Lei, L.; Irvine, K.D. Chaperone Activity of Protein O-fucosyltransferase 1 Promotes Notch Receptor Folding. *Science* **2005**, *307*, 1599–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ajima, R.; Suzuki, E.; Saga, Y. Pofut1 point-mutations that disrupt O-fucosyltransferase activity destabilize the protein and abolish Notch1 signaling during mouse somitogenesis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



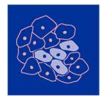


63. Bernardo, B.C.; Gao, X.-M.; Winbanks, C.E.; Boey, E.J.H.; Tham, Y.K.; Kiriazis, H.; Gregorevic, P.; Obad, S.; Kauppinen, S.; Du, X.-J.; et al. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17615–17620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 9.
65. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



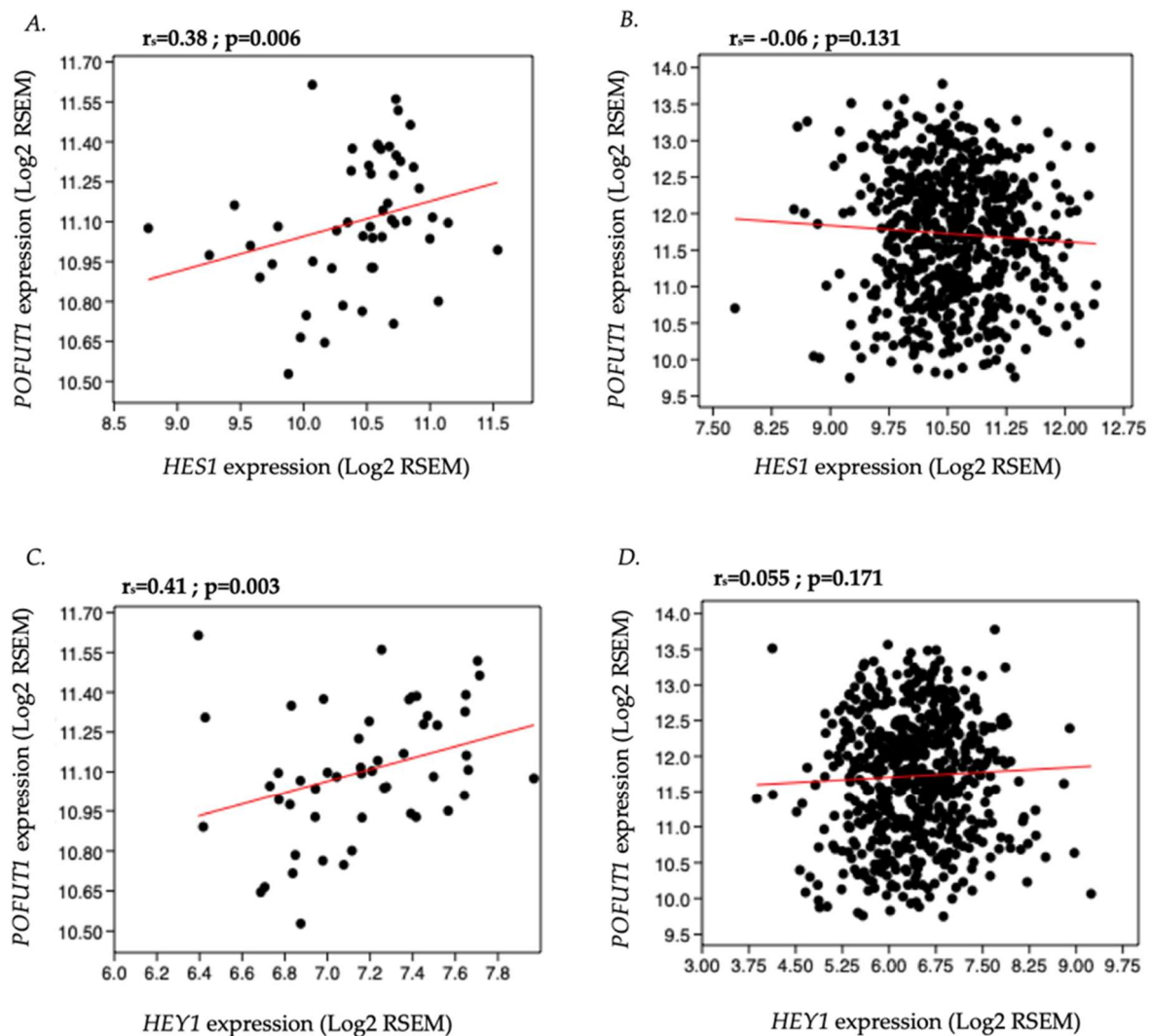
© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





## Supplementary Materials: *POFUT1* as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer

Julien Chabanais, François Labrousse, Alain Chaunavel, Agnès Germot, Abderrahman Maftah



**Figure S1.** Correlation analysis between *POFUT1* and *HES1*, *HEY1* transcription factor expressions. A total of 626 CRC data for each gene is used for a Spearman Rho correlation. *POFUT1* expression is significantly correlated with *HES1* and *HEY1* expressions only in healthy tissues, (A) and (C). In tumor tissues no correlation is detected, (B) and (D).



## Chapitre VI. Discussion générale et perspectives

---

### **POFUT1 et le processus myogénique :**

Une précédente étude réalisée au sein de mon laboratoire d'accueil (Der Vartanian *et al.*, 2015) a démontré que la sous-expression de façon stable de *Pofut1* dans les cellules myoblastiques murines C2C12 (lignées Po -) altérait le processus myogénique. Une diminution de l'activation de la voie de signalisation NOTCH, caractérisée par une baisse de la quantité de NICD, provoquait une entrée précoce des cellules en différenciation. Phénotypiquement, cela se caractérise par une augmentation du nombre de myotubes ayant chacun peu de noyaux, suggérant des défauts dans le processus de fusion secondaire. C'est la raison pour laquelle des travaux ont été entrepris lors d'une précédente thèse (Audrey Der Vartanian, 2015) pour comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ce dysfonctionnement. Ils s'appuyaient sur la démonstration du lien existant entre la fusion myoblastique secondaire et la voie de signalisation NFATc2/IL-4 (Horsley *et al.*, 2003). Il était donc évident d'étudier cette voie dans le contexte de la lignée Po -. Tout d'abord, nous avons repéré au cours d'une cinétique de différenciation de cette lignée, le moment à partir duquel les défauts d'expressions affectant le processus myogénique apparaissaient. Ceux-ci font leur apparition entre 72 h 120 h de différenciation, laissant penser que le knockdown de *Pofut1* altère plutôt les phases tardives du processus myogénique. Afin de confirmer cette observation, nous avons porté notre attention sur l'expression de *Myf6*, qui est un MRF exprimé seulement dans les myotubes matures au cours de la phase terminale de la différenciation myogénique (Braun *et al.*, 1989 ; Montarras *et al.*, 1991). Une diminution de son expression est observée à 120 h de différenciation dans les myotubes Po -, ce qui concorde avec leur phénotype particulier (myotubes longs, fins, avec peu de noyaux). Il serait intéressant de mesurer l'expression d'autres protéines impliquées dans le processus myogénique afin de déterminer si ces acteurs sont également impactés par la sous-



expression de *Pofut1*. Par exemple, la protéine Myomixer également appelée Minion ou Myomerger, localisée dans la membrane plasmique, est fortement exprimée durant les 6 premiers jours après l'induction de la différenciation des C2C12 et participe à la fusion myoblastique (Bi *et al.*, 2017). Son knockout dans les cellules C2C12 réduit considérablement le nombre de noyaux par myotube (Quinn *et al.*, 2017). De plus, l'expression de Myomixer est requise pour la fusion des cellules satellites et la régénération du tissu musculaire adulte (Bi *et al.*, 2018). Également, nous avons fait quelques tentatives avec la protéine Myomaker dont l'expression favorise la fusion membranaire au cours du processus myogénique *in vitro et in vivo* (Millay *et al.*, 2013). Malheureusement, les résultats de PCRq obtenus n'étaient pas exploitables ; ces expériences mériteraient d'être renouvelées.

Des analyses de live-monitoring du processus myogénique réalisées sur les cellules C2C12 sauvages et sous-exprimant *Pofut1* confirment que le processus myogénique est altéré au moment de la fusion secondaire, dès lors que celui-ci se déroule dans des conditions où *Pofut1* est significativement moins exprimé. Cette étape correspond à la fusion des cellules de certaines cellules de réserve avec les myotubes pré-existants. Nous pouvons remarquer que dans le cas des cellules de réserve Po<sup>-</sup>, celles-ci ne fusionnent pas et ne participent donc pas à l'accrétion myonucléaire de la fusion secondaire. D'après le modèle proposé par Horsley et collaborateurs (2003), la voie de signalisation NFATc2/IL-4 joue un rôle majeur. En effet, le facteur de transcription NFATc2 permet la production de l'IL-4, qui est sécrétée par les myotubes naissants, attirant les cellules de réserve périphériques. Dans notre lignée Po<sup>-</sup>, nous remarquons une diminution de l'expression de *Nfatc2* dans les myotubes, corrélée avec une baisse de la quantité d'IL-4 dans le milieu de culture. Ces premiers résultats sont en accord avec le modèle proposé par Horsley et collaborateurs (2003). Toutefois, l'expression de *Nfatc2* et la sécrétion de l'IL-4 bien que diminuées dans les cellules Po<sup>-</sup>, restent présentes à un niveau significatif, suggérant que *Pofut1* n'est pas le seul facteur régulateur de ces deux acteurs. La





poursuite de l'étude s'est focalisée sur le récepteur à l'IL-4 et plus précisément la sous-unité alpha (IL-4R $\alpha$ ). En effet, puisque l'IL-4 peut se fixer sur deux types de récepteurs, le récepteur de type I (composé des sous-unités  $\gamma$  -60 kDa- et IL-4R $\alpha$  -140 kDa-) et le récepteur de type II (composé des sous-unités IL-4R $\alpha$  et IL-13R $\alpha$ 1 -65/70 kDa-) (Ul-Haq *et al.*, 2016), notre choix s'est porté sur la sous-unité IL-4R $\alpha$  afin de couvrir tous les récepteurs. De plus, l'expression du récepteur à la surface des cellules est stimulée par l'IL-4 elle-même (Dokter *et al.*, 1992). En effet, nous avons constaté que la baisse de la sécrétion de l'IL-4 dans le milieu de culture des cellules Po - en différenciation est associée à une diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-4, durant la phase de fusion secondaire. Pour confirmer la nécessité de l'interaction IL-4/IL-4R $\alpha$  pour accomplir ce processus myogénique, nous avons utilisé un anticorps anti-IL-4R $\alpha$  pour bloquer le site de liaison de l'IL-4. Il en résulte que le phénotype des C2C12 sauvages en différenciation est équivalent à celui des Po - avec notamment une baisse similaire du nombre moyen de noyaux par myotubes passant de 8 à 4. Nos résultats montrent donc que les défauts de fusion secondaire observés dans les cellules knockdown pour *Pofut1* sont la conséquence d'une dérégulation de la voie de signalisation NFATc2/IL-4. Néanmoins, plusieurs éléments restent à explorer et tout d'abord le lien entre le *O*-fucosylation par POFUT1 et la signalisation NFATc2/IL-4. Compte tenu du fait que le récepteur NOTCH est une cible bien caractérisée de POFUT1, nos premières investigations se sont portées sur cette voie. Au sein d'ostéoblastes, le NICD, résultant du clivage de la partie intracellulaire de NOTCH, augmente l'expression de *Nfatc2* par un mécanisme post-transcriptionnel. Il est mis en avant que la présence du NICD stabilise l'ARNm de *Nfatc2* en favorisant sa durée de vie (Zanotti *et al.*, 2013). Afin d'étudier ce cas dans nos cellules C2C12, nous avons commencé une étude préliminaire consistant à inactiver le clivage du récepteur NOTCH (via le DAPT qui est un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase) et à en mesurer l'impact sur l'expression de *Nfact2*. Sur des cellules C2C12 en prolifération, nous observons une diminution significative de la quantité de



transcrits de *Nfatc2* en présence de DAPT. Ceci nous laisse penser que le mécanisme de stabilisation de l'ARNm *Nfatc2* par la présence du NICD dans les ostéoblastes peut se transposer à notre modèle. Néanmoins cette observation n'est pour le moment faite qu'en phase de prolifération. Il semble que cela ne soit pas le cas lors de la phase de différenciation. En effet, au sein du laboratoire il a été démontré que dans les cellules C2C12, la quantité de NICD décline dans les myotubes et se maintient dans les cellules de réserve (Der Vartanian *et al.*, 2015). Or dans notre étude nous avons vu que le *Nfatc2*, dans la lignée C2C12, est plus exprimé dans les myotubes que dans les cellules de réserve. Des études supplémentaires sont à réaliser afin de déterminer si un lien persiste entre *Nfatc2* et NICD au cours de la différenciation.

Parmi la liste des cibles potentielles de POFUT1, nous pouvons remarquer la présence d'une famille de cadhérines particulières appelée CELSR1 à 3 (Cadherin EGF LAG seven pass G type receptors) et d'un récepteur transmembranaire nommé STAB2. Les protéines CELSR jouent un rôle dans différents mécanismes associés aux cellules neuronales, comme la migration et la différenciation, également observés au cours du processus myogénique (Feng *et al.*, 2012). Le récepteur STAB2, impliqué dans les interactions cellule-cellule (Jung *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2009), participe à la différenciation myogénique et à la régénération musculaire (Park *et al.*, 2016). Ces différentes données font de ces protéines potentiellement *O*-fucosylées (2 sites potentiels pour les CELSR et 6, pour STAB2) de bons candidats à étudier dans notre modèle cellulaire sous exprimant *Pofut1*. Néanmoins, les domaines EGF-like de ces protéines possédant la séquence consensus de *O*-fucosylation n'ont pas été démontrés comme étant porteurs de *O*-fucose voire de *O*-fucosylglycane. De ce fait, le rôle de ces modifications sur la fonction de ces protéines est pour l'heure inconnu. Des travaux menés au sein de mon équipe d'accueil se sont focalisés sur la mise en évidence de la présence de *O*-fucose sur la protéine WIF1 (Pennarubia *et al.*, 2019, en révision). Les techniques utilisées combinant la production de domaines EGF-like isolés, la chimie click et la spectrométrie de masse pourraient être trans-



posées à nos protéines candidates afin de déterminer si oui ou non des *O*-fucoses sont liés à leurs domaines EGF-like (Pennarubia *et al.*, 2018). Si cela est le cas, nous pourrions ensuite créer des mutants sur les sites *O*-fucosylés afin de déterminer si l'absence de *O*-fucoses affecte la fonction de la protéine d'intérêt et potentiellement son rôle dans le processus myogénique.

### **WIF1 et le processus myogénique :**

Les ligands WNT constituent une famille conservée de glycoprotéines riches en cystéines impliquées dans un grande variété de processus biologiques. Chez l'Homme, 19 gènes codant pour des protéines WNT sont décrits et possèdent différents patterns d'expression et fonctions (Gordon et Nusse, 2006 ; Clevers et Nusse, 2012 ; Nusse et Varmus, 2012). La signalisation WNT peut être divisée en deux voies : la voie dite canonique ou  $\beta$ -caténine dépendante et la voie non canonique ou  $\beta$ -caténine indépendante (Clevers et Nusse, 2012). Il existe différents inhibiteurs capables d'inactiver ces deux voies, il s'agit de Cerberus (Piccolo *et al.*, 1999), des protéines sFRP (Rattner *et al.*, 1997) et de la protéine WIF1 (Hsieh *et al.*, 1999). Ces inhibiteurs se fixent aux protéines WNT les empêchant ainsi de se lier à leur récepteur Frizzled et co-récepteur LRP5/6 (Malinauskas et Jones, 2014). Mon équipe d'accueil s'intéresse à la protéine WIF1 et de ce fait une partie de mon travail de thèse s'est porté sur l'implication de cette protéine au cours du processus myogénique. WIF1 possède dans sa partie C-terminale cinq domaines EGF-like dont deux contiennent la séquence consensus de *O*-fucosylation par POFUT1. La protéine porte également un domaine d'interaction protéique nommé WIF (Liepinsh *et al.*, 2006) constitué de deux sites distincts permettant son interaction avec les protéines WNT (Malinauskas, 2008 ; Kerekes *et al.*, 2015). Cela laisse penser que la protéine WIF1 inhibe la signalisation WNT par un mécanisme de compétition notamment utilisé par les protéines sFRPs avec le récepteur Frizzled. Dans le contexte myogénique, il a été démontré que les protéines SFRP1 et 2 altèrent le processus de différenciation myoblastique (Descamps *et al.*, 2008). Cela se traduit par une diminution de la surface des myotubes, une



baisse du nombre de noyaux présents à l'intérieur des myotubes et une dérégulation de l'expression des facteurs myogénique tardifs *MyoG* et *Myf6*. Compte tenu de ces différents éléments, nous avons décidé d'étudier le rôle potentiel de la protéine WIF1 au cours du processus myogénique de façon similaire à l'équipe de Descamps et collaborateurs. Nous avons décidé d'utiliser une concentration de 5 µg/mL de WIF1, produite au laboratoire, car cette concentration a été de façon probante utilisée pour les sFRPs sur les cellules C2C2 (Descamps *et al.*, 2008). De plus, nous avons été confrontés à des difficultés techniques de production des protéines recombinantes en cellules CHO adhérentes, ce qui nous a empêché de réaliser des traitements à des concentrations variées de WIF1. Pour donner une suite à ce travail, il faudrait arriver à produire davantage de WIF1, potentiellement en changeant notre méthode de production et utiliser des cultures cellulaires en suspension. Cela nous permettrait de déterminer si l'impact de WIF1 observé dans notre étude est dose-dépendant. Dans un premier, nous avons voulu observer si l'incubation des cellules C2C12 avec WIF1 modifiait leur capacité proliférative. Dès 48 heures de traitement, la vitesse de prolifération ces cellules est augmentée de façon significative. Ceci diffère du traitement des cellules C2C12 avec les protéines sFRP1 et 2 où aucune variation de la vitesse de prolifération n'a été détectée (Descamps *et al.*, 2008). Cela pourrait s'expliquer par des affinités différentes pour les ligands WNT. Par exemple WNT4, exprimé dans les cellules C2C12, induit la différenciation myogénique (Tanaka *et al.*, 2018). Ce dernier est fortement reconnu par WIF1, ce qui pourrait expliquer le maintien des cellules dans un état prolifératif aux dépens de la différenciation. Une des étapes clés du processus myogénique est la diminution de l'expression des activateurs du cycle cellulaire comme les cyclines et les CDKs (cyclin dependent kinases) au profit des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 ou p27 (Kitzmann et Fernandez, 2001). Ceci induit l'arrêt de la prolifération et l'activation de la différenciation. Le gène de la cycline D1 possède dans sa région promotrice un site de fixation LEF-1, sur lequel le complexe β-caténine/LEF-1 se fixe





pour induire sa transcription et la progression dans les phases du cycle cellulaire (Shtutman *et al.*, 1999). Dans notre étude, l'état prolifératif pourrait être dû au maintien de l'expression de la cycline D1 suggérant que la protéine WIF1 n'inhibe pas la voie WNT canonique dont la  $\beta$ -caténine est l'effecteur. Compte tenu de cette hypothèse, il serait alors intéressant de quantifier l'expression de la  $\beta$ -caténine afin de déterminer si elle est affectée ou non par le traitement WIF1. Si son expression n'est pas diminuée, cela confirmerait que la protéine WIF1 cible la voie WNT non canonique dans notre modèle cellulaire. Pour aller plus loin, il serait également envisageable de mesurer l'expression de la cycline D1, celle-ci devrait être supérieure dans les cellules C2C12 traitées avec la protéine WIF1 par rapport aux cellules Mock. Une analyse par cytométrie en flux des cellules C2C12 traitées ou non par la protéine exogène WIF1 recombinant, permettrait de déterminer si la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est modifiée par le traitement. Une activation constitutive de la voie WNT canonique engendre une surexpression de *Myf5* (Gros *et al.*, 2009). Cette surexpression est aussi observée dans notre étude, nous faisant alors penser une fois de plus que la voie WNT canonique ne semble pas être la cible prioritaire de la protéine WIF1 dans notre modèle C2C12. La signalisation WNT non canonique contrôle également la voie dénommée planar cell polarity (PCP) qui régule l'orientation des myocytes au cours du développement du myotome (Gros *et al.*, 2009). Or il est connu que la fusion myoblastique se fait suite à l'alignement des myocytes les uns avec les autres. Si la présence de la protéine WIF1 diminue l'activation non canonique de la voie WNT, cela perturberait la voie PCP altérant ainsi le processus myogénique. Il apparaît que cela est le cas dans notre étude où l'on observe une diminution de l'indice de fusion et du nombre de myotubes ayant plus de 6 noyaux. Une fois activée, la voie PCP conduit également à l'activation des Janus kinases (JNK) qui peuvent ensuite phosphoryler les protéines NFAT provoquant leur translocation dans le noyau où elles exercent leur rôle de facteur de transcription (Simons et Mlodzik, 2008). La voie NFAT est associée à la fusion myoblastique



secondaire. Or nous observons justement un phénotype nous laissant penser que cette étape est altérée. C'est pourquoi il serait intéressant de porter notre attention sur l'état de la signalisation NFAT dans les cellules C2C12 traitées avec du WIF1 exogène.

### **POFUT1 et le cancer colorectal :**

Afin d'explorer l'implication potentielle de POFUT1 dans le cancer colorectal, notre étude s'est d'abord tournée vers une analyse bioinformatique. De nombreuses données pertinentes sont disponibles sur différentes plateformes, mais celles-ci sont malheureusement peu exploitées. Nous avons décidé d'utiliser la base de données TCGA de la plateforme FireBrowse dont des informations ont permis de mettre en évidence un lien entre le cancer de l'estomac et l'expression de *POFUT1* (Dong *et al.*, 2017). L'analyse du niveau d'expression de *POFUT1* dans les 37 types de cancers référencés actuellement dans la base de données montre que ce gène est surexprimé dans 22 d'entre-eux dont le cancer colorectal, *POFUT1* est sous-exprimé dans 6 autres cancers. Dans les 9 derniers cancers aucunes données n'étant disponibles concernant les tissus sains, nous n'avons pas pu déterminer si l'expression de *POFUT1* dans ces cancers était altérée. De façon générale, nous pouvons donc remarquer que l'expression de *POFUT1* est dérégulée lors du développement tumoral au sein de nombreux organes comme le colon, le rectum, les reins ou encore les poumons. Cette généralité lui confère un intérêt particulier, car il semble être un bon marqueur cancéreux quasiment universel.

Dans le cas du cancer colorectal, où *POFUT1* est le plus exprimé au sein de tumeurs après celles des reins, nous avons pu mettre en évidence une surexpression de *POFUT1* dès le stade I du processus tumoral et qui reste restante constante au fil des différentes stades de la progression tumorale. Parallèlement, le marquage de la protéine POFUT1 sur des tissus issus du CRB du CHU de Limoges et au sein de lignées cellulaires colorectales ont permis de consolider cette constatation. L'expression de *POFUT1* ne peut donc pas être utilisée pour la classification des tumeurs colorectales du fait que son expression ne permet pas de discriminer



les stades tumoraux entre eux. Néanmoins, le fait qu'elle soit précoce pourrait en faire un marqueur de diagnostic complémentaire des techniques conventionnelles, recherchant des mutations au sein de marqueurs moléculaires tels que KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) et BRAF (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B), lorsque des biopsies sont réalisées.

De l'étude de l'association entre l'expression de *POFUT1* et différents paramètres cliniques ressort notamment que la surexpression de *POFUT1* est plus prononcée au niveau du rectum, en particulier dans les adénocarcinomes rectaux par rapport à ceux qui sont mucineux. Les adénocarcinomes mucineux forment un sous-groupe d'adénocarcinomes caractérisés par une abondante quantité de constituants mucineux pouvant représenter jusqu'à 50 % du volume de la tumeur (Bosman *et al.*, 2010). La surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs rectales pourrait s'expliquer par le fait que les cellules du rectum sont plus sujettes aux instabilités chromosomiques que celle du côlon (Aaltonen *et al.*, 1998 ; Fernebro *et al.*, 2002 ; Frattini *et al.*, 2004). Il est connu que la région chromosomique 20q11.21 est très instable (Lefort *et al.*, 2008) et que des amplifications de cette portion sont détectées dans plus de 76% des cas de cancer colorectaux. Cela conduit à l'augmentation du nombre de copies du gène *POFUT1*. Il serait intéressant d'exploiter les données sur les amplifications chromosomiques de façon distincte, avec d'un côté les données pour le cancer du côlon et de l'autre, celles pour le cancer du rectum. Cette analyse nous permettrait de savoir s'il y a effectivement plus d'amplification de la région 20q11.21 porteuse de *POFUT1* dans les cancers du rectum par rapport à ceux du côlon.

Concernant le nombre de copies de *POFUT1*, nous pouvons observer que les valeurs obtenues sur la base de données et sur les échantillons testés ne sont pas des nombres entiers. Cela vient du fait qu'au sein d'une tumeur chaque cellule se trouve dans un état différent et possède son propre nombre de copies de *POFUT1*. La valeur finale que nous exploitons corres-



pond donc à une moyenne de nombre de copies du gène retrouvé dans l'ensemble de la population cellulaire tumorale. Nos analyses nous montrent que 49% des tumeurs colorectales possèdent entre 2 et 3 copies du gène. Tous nos échantillons provenant du CHU de Limoges rentrent également dans cette catégorie. Il est intéressant de noter que 90% des patients référencés dans la base de données TCGA pour un CCR possèdent plus de deux copies du gène *POFUT1*, tandis que seulement 76.02% présentent une amplification de la région chromosomique 20q11.21. Cette observation suggère que le phénomène d'amplification chromosomique n'est pas la seule raison provoquant l'augmentation du nombre de copies de *POFUT1*. Celle-ci pourrait être également le résultat d'une duplication génique de *POFUT1*. En effet, dans ce cas-là, la région chromosomique 20q11.21 n'est pas altérée mais on détecte une augmentation du nombre de copies de *POFUT1*. Nous constatons également des cas où la région chromosomique 20q11.21 n'est pas amplifiée mais l'expression de *POFUT1* se retrouve quand même augmentée. Ceci pourrait s'expliquer par différents processus. Par exemple, la portion chromosomique comprenant le gène *POFUT1* pourrait être transloquée sur un autre chromosome, dans une région en aval d'un promoteur fort conduisant ainsi à sa surexpression. Ce phénomène est par exemple observé pour le gène *c-Myc*, celui-ci étant fréquemment associé au processus tumoral. En effet, dans les lymphomes de Burkitt, une portion du chromosome 8 incluant le gène *c-Myc* est transloquée sur le chromosome 14 au locus des chaînes lourdes des immunoglobulines conduisant à une activation constitutive de sa transcription (Dalla-Favera *et al.*, 1982 ; Taub *et al.*, 1982). Il serait intéressant de réaliser chez les patients surexprimant *POFUT1* sans amplification de la région chromosomique 20q11.21, des expériences d'hybridation *in situ* afin de localiser *POFUT1* et détecter d'éventuelles translocations. Autre hypothèse, il se pourrait que l'expression d'éléments régulateurs de la transcription des gènes comme les miRNA soient altérés. La quantité de miRNA ciblant *POFUT1* varie de 85 à 133 selon la base de données utilisées (miRNET, miRDB et miRTarBase). Parmi eux, il a été dé-





montré que la famille des miR-34 régule négativement l'expression de *POFUT1* (Bernardo *et al.*, 2012). La mesure de l'expression par PCRq des membres de cette famille nous permettrait d'observer si oui ou non l'expression de ces miRNA est altérée dans les tumeurs avec une surexpression de *POFUT1* sans amplification 20q11.21. De plus, certains miRNA pourraient également être surexprimés, et ceci peut être une hypothèse expliquant pourquoi dans certaines tumeurs avec amplification 20q11.21, l'expression de *POFUT1* est de manière surprenante diminuée. Une autre hypothèse pouvant expliquer les variations d'expression de *POFUT1* en absence d'altération de la région chromosomique est la présence de polymorphismes dans la région promotrice du gène. En effet, cela pourrait impacter la fixation des facteurs de transcriptions sur les régions promotrices et ainsi diminuer l'expression de *POFUT1* comme cela est le cas pour le gène *CDHI* codant pour la cadhérine E (Li *et al.*, 2000 ; Shin *et al.*, 2004). Également, la présence de polymorphismes dans les régions promotrices de *POFUT1* pourrait dans le cas contraire, induire l'apparition d'un nouveau site de fixation pour un facteur de transcription augmentant ainsi l'expression du gène *POFUT1*. Ce type de mécanisme est notamment observé dans le promoteur du gène *COX-2* où un polymorphisme génère un nouveau site de liaison pour le facteur de transcription c-MYB conduisant à la surexpression du gène *COX-2* associée au risque de développer un cancer de l'œsophage (Zhang *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant de séquencer la région promotrice de *POFUT1* au sein d'individus ne présentant pas d'altération de la région chromosomique 20q11.21 pour statuer sur la présence ou non de polymorphisme et par la suite s'intéresser à leur potentiel impact sur l'expression du gène. La méthylation du promoteur de *POFUT1* serait également une piste à exploiter dans l'étude de la variation de l'expression du gène toujours sans altération de la région chromosomique. En effet, dans les cellules cancéreuses colorectales HCT-116 une hyperméthylation des promoteurs des SFRP diminue leur expression et renforce les capacités tumorales des cellules du fait de l'absence d'inhibition de la voie de signalisation WNT (Suzuki



*et al.*, 2004). De plus, on observe dans les cas de lymphomes une délétion du gène *DNMT3b* (DNA méthyltransférase 3b) codant pour une méthyltransférase qui ne peut donc plus exercer sa fonction répressive de la transcription génique favorisant ainsi le développement tumoral (Zheng *et al.*, 2016). C'est pourquoi, il serait intéressant de déterminer le niveau de méthylation du promoteur de *POFUT1*, notamment par pyroséquençage, mais également le niveau d'expression des gènes codant les méthyltransférases, par PCRq, dans les cas de tumeurs sans altérations chromosomiques 20q11.21.

Compte tenu de l'implication de la *O*-fucosylation médiée par *POFUT1* dans l'activation de la voie NOTCH, nous nous sommes intéressés à l'expression des quatre récepteurs dans les tumeurs colorectales. Il en ressort qu'à l'exception de *NOTCH2*, il s'agit dans tous les cas de corrélations positives dont la plus forte se faisant entre *POFUT1* et *NOTCH1*. Parmi les 20 sites potentiels de *O*-fucosylation présents sur *NOTCH1*, 17 d'entre eux sont démontrés comme étant *O*-fucosylés dans la lignée HEK293T et par la suite certains sont rallongés par les enzymes de la famille Fringe (Lunatic, Manic, Radical) (Kakuda et Haltiwanger, 2017). Néanmoins, il est possible que les sites de *O*-fucosylation ne soient pas occupés de la même manière selon le type cellulaire. Il se pourrait que certains sites non occupés dans les cellules saines le deviennent suite à leur transformation cancéreuse liée à la surexpression de *POFUT1*. De plus, cette surexpression dans le cancer colorectal pourrait favoriser un allongement supplémentaire de *O*-fucoses. Celui-ci permet l'interaction entre NOTCH et DELTA aux dépens de JAGGED (Kakuda et Haltiwanger, 2017). En modifiant l'interaction avec le ligand partenaire privilégié, l'activation de la voie de signalisation NOTCH en serait perturbée. Nous avons donc suivi l'expression de gènes cibles de la voie NOTCH contrôlant des processus cellulaires souvent altérés au cours du développement tumoral. On observe à partir de la base de données TCGA, une surexpression de la *cycline D1* et de *c-Myc* (associés à la prolifération), de *Snail* (promouvant la transition épithélio-mésenchymateuse) et



de la *Survivine* (inhibiteur de l'apoptose) dans les tumeurs colorectales. Les expressions de *p21* (régulateur négatif du cycle cellulaire) et de *HEY1* (facteur de transcription de la voie NOTCH) sont significativement diminuées. Concernant *HEY1*, on pourrait imaginer que son expression est induite suite à l'interaction NOTCH/JAGGED, si bien que l'allongement potentiel des *O*-fucoses favorisant l'interaction NOTCH/DELTA conduirait à la baisse de l'expression de *HEY1*. Dans tous les cas, nous remarquons que la dérégulation significative des gènes associés à la voie de signalisation NOTCH se fait au profit du développement tumoral. Désormais, il serait pertinent de regarder la corrélation de l'expression de *POFUT1* et des enzymes de la famille Fringe. Dans le cas où une forte corrélation est retrouvée, on pourrait réaliser des knockdown des gènes codant les enzymes Fringe dans des lignées colorectales, afin d'inhiber l'allongement des *O*-fucose, et regarder si cela diminue l'expression des gènes cibles de NOTCH mentionnés ci-dessus. Cela nous confirmerait alors que l'élongation des *O*-fucose due à la surexpression de *POFUT1* et favorisant l'interaction NOTCH/DELTA, participe au développement tumoral en modifiant l'expression de gènes associés à la tumorigenèse.

Enfin, nous avons analysé les expressions de *POFUT1* et de *NOTCH1* dans les tumeurs colorectales en les catégorisant en fonction de la moyenne d'expression des gènes observée chez les individus sains. Globalement, nous avons pu constater une surexpression de *POFUT1* et de *NOTCH1* dans les tumeurs colorectales, plus prononcée dans le grade IV, et dans les adénocarcinomes notamment rectaux. Dans les adénocarcinomes mucineux, nous détectons majoritairement une sous-expression de *POFUT1* et une surexpression de *NOTCH1*. Cela peut paraître surprenant compte tenu de l'implication de la *O*-fucosylation, contrôlée par *POFUT1*, des récepteurs NOTCH dans l'activation de la voie de signalisation. Cependant, ces résultats ne reflètent pas l'activation de la voie elle-même, mais l'expression des gènes. Il serait nécessaire d'évaluer l'expression des gènes cibles de NOTCH dans ce type de tumeurs ou bien de réaliser des immunomarquages de la partie clivée de NOTCH (NICD) témoignant de l'acti-



tivité de la voie de signalisation. Ces données nous donneraient une vision plus précise de l'activité de la voie NOTCH dans ces adénocarcinomes mucineux. Néanmoins, ce type de tumeur présente des mécanismes moléculaires différents des adénocarcinomes classiques comme le révèle des analyses moléculaires, focalisées sur l'étude de la présence d'instabilités microsatellitaires (Hugen *et al.*, 2014) et de mutations dans la signalisation RAS/MAPK (Hugen *et al.*, 2015), suggérant ainsi un processus de tumorigenèse qui lui est propre (Luo *et al.*, 2019). C'est pourquoi les conclusions concernant les adénocarcinomes non mucineux peuvent diverger de celles obtenues pour les tumeurs mucineuses. Une étude parue en même temps que notre article dans *Cancers*, s'est intéressée au rôle de *POFUT1* dans le CCR (Du *et al.*, 2018). Ils ont réalisé une étude bioinformatique sur des données TGCA différentes des nôtres aboutissant à la même conclusion concernant la surexpression de *POFUT1* dans le CCR. Ils ont également effectué des expériences *in vitro* (de prolifération, de migration et d'invasion) et *in vivo* (xénogreffes) utilisant des lignées cancéreuses colorectales (HCT-116 et SW620) knockdown pour *POFUT1*. Ils en ont conclu que le KD de *POFUT1* diminué d'une part l'activation de la signalisation NOTCH et d'autre part, la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses en promouvant l'apoptose. En outre, ces éléments renforcent l'intérêt de l'étude de *POFUT1* dans le cancer colorectal mais également nos conclusions. Récemment, *POFUT1* a été mis en relation avec la protéine *PLAGL2* (pleomorphic adenoma gene-like 2) dans le cadre du cancer colorectal (Li *et al.*, 2019). *PLAGL2* est un facteur de transcription surexprimé dans le CCR induisant la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (Li *et al.*, 2019). Les gènes codant les protéines *POFUT1* et *PLAGL2* sont contigus et partagent un promoteur commun bidirectionnel, dans la région 20q11.21, conservé chez les Mammifères (Li *et al.*, 2019). Ces deux gènes partagent également le fait que leur surexpression dans le CCR est due à un phénomène d'amplification chromosomique. Il est intéressant de noter qu'ils sont associés à deux signalisations différentes,





la voie NOTCH et la voie WNT, démontrées comme impliquées dans le processus de cancérisation colorectale. Des études bioinformatiques et fonctionnelles sont à réaliser afin de déterminer comment ces deux protéines possédant des fonctions biologiques différentes, induisent le développement tumoral colorectal, et si cela peut s'étendre à d'autres cancers (Germot et Maftah, 2019).



## Références bibliographiques

---

- Aaltonen, L.A., Salovaara, R., Kristo, P., Canzian, F., Hemminki, A., Peltomäki, P., Chadwick, R.B., Kääriäinen, H., Eskelinen, M., Järvinen, H., et al. (1998). Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N. Engl. J. Med.* *338*, 1481–1487.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* *16*, 3797–3804.
- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* *139*, 641–656.
- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N.A., Pan, H., Haltiwanger, R.S., and Bellen, H.J. (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* *132*, 247–258.
- Ahluwalia, N., Bergeron, J.J., Wada, I., Degen, E., and Williams, D.B. (1992). The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein, calnexin. *J. Biol. Chem.* *267*, 10914–10918.
- Ajima, R., Suzuki, E., and Saga, Y. (2017). Pofut1 point-mutations that disrupt O-fucosyltransferase activity destabilize the protein and abolish Notch1 signaling during mouse somitogenesis. *PLoS ONE* *12*, e0187248.
- Albig, A.R., Becenti, D.J., Roy, T.G., and Schiemann, W.P. (2008). Microfibril-Associate Glycoprotein-2 (MAGP-2) Promotes Angiogenic cell sprouting by Blocking Notch Signaling in Endothelial Cells. *Microvasc Res* *76*, 7–14.
- Al Jaam, B., Heu, K., Pennarubia, F., Segelle, A., Magnol, L., Germot, A., Legardinier, S., Blanquet, V., and Maftah, A. (2016). Reduced Notch signalling leads to postnatal skeletal muscle hypertrophy in Pofut1<sup>cax/cax</sup> mice. *Open Biol* *6*.
- Allen, R.E., Merkel, R.A., and Young, R.B. (1979). Cellular aspect of muscle growth: myogenic cell proliferation. *Journal of Animal Science* *49*, 115–127.
- Al-Sukhni, W., Aronson, M., and Gallinger, S. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg. Clin. North Am.* *88*, 819–844, vii.
- American Cancer Society Colorectal Cancer Facts & Figures Special Edition 2005. Oklahoma City, OK: American Cancer Society; 2005; Accessed May 26, 2009. Available from: [http://www.cancer.org/docroot/STT/stt\\_0.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp)
- Amthor, H., Christ, B., and Patel, K. (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* *126*, 1041–1053.



Anelli, T., and Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 27, 315–327.

Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 4–8.

Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.-P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., et al. (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441, 595–600.

Arruga, F., Vaisitti, T., and Deaglio, S. (2018). The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies. *Front. Oncol.* 8.

Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M.A., and Yedvobnick, B. (1983). Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1977–1981.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

Ashikov, A., Routier, F., Fuhlrott, J., Helmus, Y., Wild, M., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2005). The human solute carrier gene SLC35B4 encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 280, 27230–27235.

Atkin, W.S., Edwards, R., Kralj-Hans, I., Wooldrage, K., Hart, A.R., Northover, J.M.A., Parkin, D.M., Wardle, J., Duffy, S.W., Cuzick, J., et al. (2010). Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 375, 1624–1633.

Avanesov, A., Honeyager, S.M., Malicki, J., and Blair, S.S. (2012). The role of glypicans in Wnt inhibitory factor-1 activity and the structural basis of Wif1's effects on Wnt and Hedgehog signaling. *PLoS Genet.* 8, e1002503.

Bachman, K.E., Park, B.H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J.G., Baylin, S.B., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 3, 89–95.

Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P.W., Yaniv, A., and Aaronson, S.A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16180–16187.

Bailey, P., Holowacz, T., and Lassar, A.B. (2001). The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 679–689.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217–221.



Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S., and Vogelstein, B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* *50*, 7717–7722.

Baldus, S.E., Mönig, S.P., Hanisch, F.-G., Zirbes, T.K., Flucke, U., Oelert, S., Zilkens, G., Madejczik, B., Thiele, J., Schneider, P.M., et al. (2002). Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis<sup>a</sup> and sialyl-Lewis<sup>x</sup> antigens in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology* *40*, 440–449.

Baldus, S.E., Mönig, S.P., Huxel, S., Landsberg, S., Hanisch, F.-G., Engelmann, K., Schneider, P.M., Thiele, J., Hölscher, A.H., and Dienes, H.P. (2004). MUC1 and Nuclear  $\beta$ -Catenin Are Coexpressed at the Invasion Front of Colorectal Carcinomas and Are Both Correlated with Tumor Prognosis. *Clin Cancer Res* *10*, 2790–2796.

Balog, C.I.A., Stavenhagen, K., Fung, W.L.J., Koeleman, C.A., McDonnell, L.A., Verhoeven, A., Mesker, W.E., Tollenaar, R.A.E.M., Deelder, A.M., and Wuhrer, M. (2012). N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Mol. Cell Proteomics* *11*, 571–585.

Barlowe, C. (2002). COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 417–422.

Barolo, S., Stone, T., Bang, A.G., and Posakony, J.W. (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* *16*, 1964–1976.

Barresi, R., and Campbell, K.P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science* *119*, 199–207.

Barret, M., Boustiere, C., Canard, J.-M., Arpurt, J.-P., Bernardini, D., Bulois, P., Chaussade, S., Heresbach, D., Joly, I., Lapuelle, J., et al. (2013). Factors Associated with Adenoma Detection Rate and Diagnosis of Polyps and Colorectal Cancer during Colonoscopy in France: Results of a Prospective, Nationwide Survey. *PLOS ONE* *8*, e68947.

Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* *275*, 1930–1934.

Becker, D.J., and Lowe, J.B. (2003). Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* *13*, 41R – 53R.

Becker, K.-F., Rosivatz, E., Blechschmidt, K., Kremmer, E., Sarbia, M., and Höfler, H. (2007). Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells Tissues Organs (Print)* *185*, 204–212.

de Beer, T., Vliegenthart, J.F.G., Loeffler, A., and Hofsteenge, J. (1995). The Hexopyranosyl Residue That Is C-Glycosidically Linked to the Side Chain of Tryptophan-7 in Human RNase U<sub>s</sub> Is  $\alpha$ -Mannopyranose. *Biochemistry* *34*, 11785–11789.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638–642.





- Bellam, N., and Pasche, B. (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat. Res.* 155, 85–103.
- Bello, L., Morgenroth, L.P., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E.P., McDonald, C.M., Cirak, S., and CINRG investigators (2016). DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 87, 401–409.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008342.
- Berardo, A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2010). A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10, 118–126.
- Bernardo, B.C., Gao, X.-M., Winbanks, C.E., Boey, E.J.H., Tham, Y.K., Kiriazis, H., Gregorevic, P., Obad, S., Kauppinen, S., Du, X.-J., et al. (2012). Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17615–17620.
- Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services & National Institutes of Health; National Institutes of Health What You Need To Know About Cancer of the Colon and Rectum. 2006.
- Bettington, M., Walker, N., Rosty, C., Brown, I., Clouston, A., Wockner, L., Whitehall, V., and Leggett, B. (2014). Critical appraisal of the diagnosis of the sessile serrated adenoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 38, 158–166.
- Bi, P., Ramirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2017). Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* 356, 323–327.
- Bi, P., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2018). Fusogenic micropeptide Myomixer is essential for satellite cell fusion and muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 3864–3869.
- Binari, R.C., Staveley, B.E., Johnson, W.A., Godavarti, R., Sasisekharan, R., and Manoukian, A.S. (1997). Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development* 124, 2623–2632.
- Bismuth, K., and Relaix, F. (2010). Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp. Cell Res.* 316, 3081–3086.
- Bjornson, C.R.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., and Rando, T.A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* 30, 232–242.
- Blonden, L.A., den Dunnen, J.T., van Paassen, H.M., Wapenaar, M.C., Grootsholten, P.M., Ginjaar, H.B., Bakker, E., Pearson, P.L., and van Ommen, G.J. (1989). High resolution deletion breakpoint mapping in the DMD gene by whole cosmid hybridization. *Nucleic Acids Res* 17, 5611–5621.



Boardman, L.A., Morlan, B.W., Rabe, K.G., Petersen, G.M., Lindor, N.M., Nigon, S.K., Goldberg, J., and Gallinger, S. (2007). Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 1195–1198.

Bober, E., Lyons, G.E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M., and Arnold, H.H. (1991). The muscle regulatory gene, *Myf-6*, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* 113, 1255–1265.

Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5248–5257.

Bomme, L., Bardi, G., Pandis, N., Fenger, C., Kronborg, O., and Heim, S. (1996). Chromosome abnormalities in colorectal adenomas: Two cytogenetic subgroups characterized by deletion of 1 p and numerical aberrations. *Human Pathology* 27, 1192–1197.

Bomme, L., Heim, S., Bardi, G., Fenger, C., Kronborg, O., Brøgger, A., and Lothe, R.A. (1998). Allelic imbalance and cytogenetic deletion of 1p in colorectal adenomas: A target region identified between DIS199 and DIS234. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21, 185–194.

Bomme, L., Lothe, R.A., Bardi, G., Fenger, C., Kronborg, O., and Heim, S. (2001). Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosomes 1, 7, 13 and 20. *International Journal of Cancer* 92, 816–823.

Borello, U., Coletta, M., Tajbakhsh, S., Leyns, L., Robertis, E.M.D., Buckingham, M., and Cossu, G. (1999). Transplacental delivery of the Wnt antagonist *Frzb1* inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. *Development* 126, 4247–4255.

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

Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., and Theise, N.D. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*.

Bouisset, S., and Maton, B. (1995). *Muscles, posture et mouvement*.

Boyle, P., and Langman, J.S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 321, 805–808.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999).  $\beta$ -Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer. *The American Journal of Pathology* 155, 1033–1038.

Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., and Rando, T.A. (2008). A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50–59.



- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701–709.
- Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369–382.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.
- Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 7, 599–604.
- Brockhausen, I., and Stanley, P. (2015). O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207–216.
- Brunelli, S., Relaix, F., Baesso, S., Buckingham, M., and Cossu, G. (2007). Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev. Biol.* 304, 604–614.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., and Basler, K. (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 385, 829–833.
- Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T.M., and Ellenrieder, V. (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.* 25, 3714–3724.
- Buckingham, M. (1992). Making muscle in mammals. *Trends Genet.* 8, 144–148.
- Buettner, F.F.R., Ashikov, A., Tiemann, B., Lehle, L., and Bakker, H. (2013). *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell* 50, 295–302.
- Burda, P., and Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 239–257.
- Campbell, I.D., and Bork, P. (1993). Epidermal growth factor-like modules. *Current Opinion in Structural Biology* 3, 385–392.
- Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337.



- Caramelo, J.J., Castro, O.A., de Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J. Biol. Chem.* 279, 46280–46285.
- de Celis, J.F., and Bray, S.J. (2000). The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* 127, 1291–1302.
- Centelles, J.J. (2012). General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncology* 2012, 1–19.
- Chabanais, J., Labrousse, F., Chaunavel, A., Germot, A., and Maftah, A. (2018). POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer. *Cancers* 10, 411.
- Chai, W., Hounsell, E.F., Cashmore, G.C., Rosankiewicz, J.R., Bauer, C.J., Feeney, J., Feizi, T., and Lawson, A.M. (1992). Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. *European Journal of Biochemistry* 203, 257–268.
- Chan, A.T., and Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029–2043.e10.
- Chang, L.-Y., Teppa, E., Noel, M., Gilormini, P.-A., Decloquement, M., Lion, C., Biot, C., Mir, A.-M., Cogez, V., Delannoy, P., et al. (2019). Novel Zebrafish Mono- $\alpha$ 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VIII): An Evolutionary Perspective of  $\alpha$ 2,8-Sialylation. *Int J Mol Sci* 20.
- Chen, L., Glover, J.N., Hogan, P.G., Rao, A., and Harrison, S.C. (1998). Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392, 42–48.
- Chen, X., Johns, D.C., Geiman, D.E., Marban, E., Dang, D.T., Hamlin, G., Sun, R., and Yang, V.W. (2001). Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 276, 30423–30428.
- Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S.T., Scarlato, G., and Attardi, G. (1991). In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2236–2244.
- Chomyn, A., Enriquez, J.A., Micol, V., Fernandez-Silva, P., and Attardi, G. (2000). The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J. Biol. Chem.* 275, 19198–19209.
- Chow, C.-W., Rincón, M., Cavanagh, J., Dickens, M., and Davis, R.J. (1997). Nuclear Accumulation of NFAT4 Opposed by the JNK Signal Transduction Pathway. *Science* 278, 1638–1641.
- Chu, D., Zhang, Z., Zhou, Y., Wang, W., Li, Y., Zhang, H., Dong, G., Zhao, Q., and Ji, G. (2011). Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 22, 2440–2447.





Chuang, T.-P., Wang, J.-Y., Jao, S.-W., Wu, C.-C., Chen, J.-H., Hsiao, K.-H., Lin, C.-Y., Chen, S.-H., Su, S.-Y., Chen, Y.-J., et al. (2016). Over-expression of AURKA, SKA3 and DSN1 contributes to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Oncotarget* 7, 45803–45818.

Clark, D.A., and Coker, R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 293–298.

Clement, E.M., Feng, L., Mein, R., Sewry, C.A., Robb, S.A., Manzur, A.Y., Mercuri, E., Godfrey, C., Cullup, T., Abbs, S., et al. (2012). Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: Analysis of the UK diagnostic service 2001–2008. *Neuromuscular Disorders* 22, 522–527.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.

Colakoglu, T., Yildirim, S., Kayaselcuk, F., Nursal, T.Z., Ezer, A., Noyan, T., Karakayali, H., and Haberal, M. (2008). Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am. J. Surg.* 195, 719–725.

Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J., and Florini, J.R. (1997). The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 6653–6662.

Cordle, J., Redfieldz, C., Stacey, M., van der Merwe, P.A., Willis, A.C., Champion, B.R., Hambleton, S., and Handford, P.A. (2008). Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J. Biol. Chem.* 283, 11785–11793.

Cossu, G., and Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18, 6867–6872.

Craig, R., and Padrón, R. (2004). Chapter 7 Molecular Structure of the Sarcomere. In *Myology*, pp. 129–166.

Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J.H., Rubinfeld, B., Polakis, P., and Matrisian, L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of  $\beta$ -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18, 2883–2891.

Cui, X.-Y., Hu, Q.-D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B.-T., Nie, D.-Y., Sun, L., Hu, W.-P., Karsak, M., Duka, T., et al. (2004). NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 25858–25865.

Curtin, K., Slattery, M.L., and Samowitz, W.S. (2011). CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathology Research International* 2011, 1–8.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824–7827.

Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–371.



- Dauncey, M.J., and Gilmour, R.S. (1996). Regulatory factors in the control of muscle development. *Proceedings of the Nutrition Society* 55, 543–559.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- Davies, R.J., Miller, R., and Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 199–209.
- Delfini, M.C., Hirsinger, E., Pourquié, O., and Duprez, D. (2000). Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* 127, 5213–5224.
- Dennis, J.W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M.L., and Kerbel, R.S. (1987). Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236, 582–585.
- Dennis, J.W., Granovsky, M., and Warren, C.E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* 21, 412–421.
- Der Vartanian, A. (2015). Rôle(s) de la protéine *O*-fucosyltransférase 1 au cours de la différenciation myogénique. Thèse. Limoges.
- Der Vartanian, A., Audfray, A., Al Jaam, B., Janot, M., Legardinier, S., Maftah, A., and Germot, A. (2015). Protein *O*-fucosyltransférase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 35, 391–405.
- Der Vartanian, A., Quétin, M., Michineau, S., Auradé, F., Hayashi, S., Dubois, C., Rocancourt, D., Drayton-Libotte, B., Szegedi, A., Buckingham, M., et al. (2019). PAX3 Confers Functional Heterogeneity in Skeletal Muscle Stem Cell Responses to Environmental Stress. *Cell Stem Cell* 24, 958–973.e9.
- Der Vartanian, A., Chabanais, J., Carrion, C., Maftah, A., and Germot, A. (2019). Downregulation of POFUT1 Impairs Secondary Myogenic Fusion Through a Reduced NFATc2/IL-4 Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4396.
- Descamps, S., Arzouk, H., Bacou, F., Bernardi, H., Fedon, Y., Gay, S., Reyne, Y., Rossano, B., and Levin, J. (2008). Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2. *Cell and Tissue Research* 332, 299–306.
- DiMauro, S., and Hirano, M. (2015). MERRF. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle).
- Din, F.V.N., Valanciute, A., Houde, V.P., Zibrova, D., Green, K.A., Sakamoto, K., Alessi, D.R., and Dunlop, M.G. (2012). Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142, 1504–1515.e3.



Di Vinci, A., Infusini, E., Peveri, C., Risio, M., Rossini, F.P., and Giaretti, W. (1996). Deletions at chromosome 1p by fluorescence in situ hybridization are an early event in human colorectal tumorigenesis. *Gastroenterology* *111*, 102–107.

Dokter, W.H., Borger, P., Hendriks, D., van der Horst, I., Halie, M.R., and Vellenga, E. (1992). Interleukin-4 (IL-4) receptor expression on human T cells is affected by different intracellular signaling pathways and by IL-4 at transcriptional and posttranscriptional level. *Blood* *80*, 2721–2728.

Dong, S., Wang, Z., Huang, B., Zhang, J., Ge, Y., Fan, Q., and Wang, Z. (2017). Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *483*, 171–177.

Doucey, M.A., Hess, D., Cacan, R., and Hofsteenge, J. (1998). Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol. Biol. Cell* *9*, 291–300.

D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2010). Chapter Three - Canonical and Non-Canonical Notch Ligands. In *Current Topics in Developmental Biology*, R. Kopan, ed. (Academic Press), pp. 73–129.

Du, J., Takeuchi, H., Leonhard-Melief, C., Shroyer, K.R., Dlugosz, M., Haltiwanger, R.S., and Holdener, B.C. (2010a). O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats restricts epithelial to mesenchymal transition (EMT) and maintains epiblast pluripotency during mouse gastrulation. *Dev Biol* *346*, 25–38.

Du, M., Tong, J., Zhao, J., Underwood, K.R., Zhu, M., Ford, S.P., and Nathanielsz, P.W. (2010). Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* *88*, E51–E60.

Du, M., Yan, X., Tong, J.F., Zhao, J., and Zhu, M.J. (2010b). Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol. Reprod.* *82*, 4–12.

Du, Y., Li, D., Li, N., Su, C., Yang, C., Lin, C., Chen, M., Wu, R., Li, X., and Hu, G. (2018). POFUT1 promotes colorectal cancer development through the activation of Notch1 signaling. *Cell Death Dis* *9*.

Dumont, N.A., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* *142*, 1572–1581.

Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2002). Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J. Biol. Chem.* *277*, 25400–25407.

Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T., and Kengaku, M. (2005). DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat. Neurosci.* *8*, 873–880.



El-Hattab, A.W., Almannai, M., and Scaglia, F. (2001). MELAS. In GeneReviews®, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle).

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 431–437.

Eskander, R.N., and Tewari, K.S. (2014). Beyond angiogenesis blockade: targeted therapy for advanced cervical cancer. *Journal of Gynecologic Oncology* 25, 249.

Fairley, T.L., Cardinez, C.J., Martin, J., Alley, L., Friedman, C., Edwards, B., and Jamison, P. (2006). Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 107, 1153–1161.

Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796–804.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Fearon ER, Bommer GT. Molecular biology of colorectal cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. De-Vita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: 2008. pp. 1218–31.

Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523–534.

Feng, J., Han, Q., and Zhou, L. (2012). Planar cell polarity genes, *Celsr1-3*, in neural development. *Neurosci Bull* 28, 309–315.

Fernandes, B., Sagman, U., Auger, M., Demetrio, M., and Dennis, J.W. (1991).  $\beta$ 1–6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia. *Cancer Res* 51, 718–723.

Fernebro, E., Halvarsson, B., Baldetorp, B., and Nilbert, M. (2002). Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2, 25.

Finsterer, J., and Stöllberger, C. (2008). Cardiac involvement in Becker muscular dystrophy. *Can J Cardiol* 24, 786–792.

Flanigan, K.M., Dunn, D.M., von Niederhausern, A., Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M.T., Sampson, J.B., Mendell, J.R., Wall, C., King, W.M., et al. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum. Mutat.* 30, 1657–1666.

Flanigan, K.M. (2014). Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin* 32, 671–688, viii.





- Fleming, R.J., Scottgale, T.N., Diederich, R.J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* *4*, 2188–2201.
- Fortin, J., and Mak, T.W. (2016). Targeting PI3K Signaling in Cancer: A Cautionary Tale of Two AKTs. *Cancer Cell* *29*, 429–431.
- Fortini, M.E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 673–684.
- Frattini, M., Balestra, D., Suardi, S., Oggionni, M., Alberici, P., Radice, P., Costa, A., Daidone, M.G., Leo, E., Pilotti, S., et al. (2004). Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4015–4021.
- Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K.A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev.* *16*, 1397–1411.
- Fukasawa, T., Asao, T., Yamauchi, H., Ide, M., Tabe, Y., Fujii, T., Yamaguchi, S., Tsutsumi, S., Yazawa, S., and Kuwano, H. (2013). Associated expression of  $\alpha$ 2,3sialylated type 2 chain structures with lymph node metastasis in distal colorectal cancer. *Surg Today* *43*, 155–162.
- Furmanek, A., and Hofsteenge, J. (2000). Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim. Pol.* *47*, 781–789.
- Galli, L.M., Willert, K., Nusse, R., Yablonka-Reuveni, Z., Nohno, T., Denetclaw, W., and Burrus, L.W. (2004). A proliferative role for Wnt-3a in chick somites. *Developmental Biology* *269*, 489–504.
- Ge, C., and Stanley, P. (2008). The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development. *PNAS* *105*, 1539–1544.
- Gensch, N., Borchardt, T., Schneider, A., Riethmacher, D., and Braun, T. (2008). Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis. *Development* *135*, 1597–1604.
- Germot, A., and Maftah, A. (2019). POFUT1 and PLAGL2 gene pair linked by a bidirectional promoter: the two in one of tumour progression in colorectal cancer? *EBioMedicine* *46*, 25–26.
- Gessner, P., Riedl, S., Quentmaier, A., and Kemmner, W. (1993). Enhanced activity of CMP-neuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett.* *75*, 143–149.
- Giaretti, W. (1994). A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. *Lab. Invest.* *71*, 904–910.
- Girardi, F., and Le Grand, F. (2018). Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci* *153*, 157–179.



Goettig, P. (2016). Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int J Mol Sci* 17.

Gomez del Arco, P., Martínez-Martínez, S., Maldonado, J.L., Ortega-Pérez, I., and Redondo, J.M. (2000). A Role for the p38 MAP Kinase Pathway in the Nuclear Shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* 275, 13872–13878.

Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., and Faye, L. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol. J.* 8, 564–587.

Gonzalez de Peredo, A., Klein, D., Macek, B., Hess, D., Peter-Katalinic, J., and Hofsteenge, J. (2002). C-Mannosylation and O-Fucosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 11–18.

Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 295–300.

Goto, Y., Nonaka, I., and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348, 651–653.

Grady WM, Markowitz S. Colorectal cancer: genetic alterations. In: Kelsen D, Daly J, Kern S, Levin B, Tepper J, editors. *Gastrointestinal oncology: principles and practice*. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: (2002). pp. 685–702

Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.

Graef, I.A., Gastier, J.M., Francke, U., and Crabtree, G.R. (2001). Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *PNAS* 98, 5740–5745.

Grande, M., Milito, G., Attinà, G.M., Cadeddu, F., Muzi, M.G., Nigro, C., Rulli, F., and Farinon, A.M. (2008). Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World J Surg Oncol* 6, 98.

Graser, A., Stieber, P., Nagel, D., Schäfer, C., Horst, D., Becker, C.R., Nikolaou, K., Lottes, A., Geisbüsch, S., Kramer, H., et al. (2009). Comparison of CT colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population. *Gut* 58, 241–248.

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

Guiraud, S., Aartsma-Rus, A., Vieira, N.M., Davies, K.E., van Ommen, G.-J.B., and Kunkel, L.M. (2015). The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 16, 281–308.

Gupta, R., Hong, D., Iborra, F., Sarno, S., and Enver, T. (2007). NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science* 316, 590–593.



Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P.G., et al. (2006). A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* *441*, 646–650.

Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell* *107*, 843–854.

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* *121*, 3529–3537.

van Halbeek, H., Strang, A.M., Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G., and Roussel, P. (1994). Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Lea+b-) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure. *Glycobiology* *4*, 203–219.

Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P., and Capecchi, M.R. (2008). Two Cell Lineages, myf5 and myf5-Independent, Participate in Mouse Skeletal Myogenesis. *Dev Cell* *14*, 437–445.

Hallgren, P., Lundblad, A., and Svensson, S. (1975). A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine. *J. Biol. Chem.* *250*, 5312–5314.

Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *267*, 9005–9013.

Haltom, A.R., and Jafar-Nejad, H. (2015). The multiple roles of epidermal growth factor repeat O-glycans in animal development. *Glycobiology* *25*, 1027–1042.

Hamel, S., Fantini, J., and Schweisguth, F. (2010). Notch ligand activity is modulated by glycosphingolipid membrane composition in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* *188*, 581–594.

Hammans, S.R., Sweeney, M.G., Brockington, M., Lennox, G.G., Lawton, N.F., Kennedy, C.R., Morgan-Hughes, J.A., and Harding, A.E. (1993). The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* *116* (Pt 3), 617–632.

Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 913–917.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hang, H.C., and Bertozzi, C.R. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 5021–5034.



Harris, B.Z., and Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell. Sci.* *114*, 3219–3231.

Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2615–2624.

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

He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Costa, L.T. da, Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* *281*, 1509–1512.

Helenius, J., and Aebi, M. (2002). Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 171–178.

Henderson, S.T., Gao, D., Lambie, E.J., and Kimble, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* *120*, 2913–2924.

Henderson, C.A., Gomez, C.G., Novak, S.M., Mi-Mi, L., and Gregorio, C.C. (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton.

Herbers, J., Schullerus, D., Müller, H., Kenck, C., Chudek, J., Weimer, J., Bugert, P., and Kovacs, G. (1997). Significance of chromosome arm 14q loss in nonpapillary renal cell carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* *19*, 29–35.

Hermesen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciutto, A., Roemen, G., Arends, J.-W., Williams, R., Giaretti, W., et al. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* *123*, 1109–1119.

Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., and Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm Biopharm* *100*, 94–100.

Hinshelwood, R.A., Melki, J.R., Huschtscha, L.I., Paul, C., Song, J.Z., Stirzaker, C., Reddel, R.R., and Clark, S.J. (2009). Aberrant de novo methylation of the p16INK4A CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3098–3109.

Hirano, M., Ricci, E., Koenigsberger, M.R., Defendini, R., Pavlakis, S.G., DeVivo, D.C., DiMauro, S., and Rowland, L.P. (1992). Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul. Disord.* *2*, 125–135.

Hirschberg, C.B., Robbins, P.W., and Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA).





- Ho, I.-C., Kim, J.H.-J., Rooney, J.W., Spiegelman, B.M., and Glimcher, L.H. (1998). A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15537–15541.
- Hoff, G., Grotmol, T., Skovlund, E., Bretthauer, M., and Norwegian Colorectal Cancer Prevention Study Group (2009). Risk of colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy screening: randomised controlled trial. *BMJ* 338, b1846.
- Hofsteenge, J., Müller, D.R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W.J., and Vliegthart, J.F. (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* 33, 13524–13530.
- Hofsteenge, J., Blommers, M., Hess, D., Furmanek, A., and Miroshnichenko, O. (1999). The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. *J. Biol. Chem.* 274, 32786–32794.
- Hofsteenge, J., Huwiler, K.G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D.F., and Peter-Katalinic, J. (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J. Biol. Chem.* 276, 6485–6498.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232.
- Horsley, V., Friday, B.B., Matteson, S., Kegley, K.M., Gephart, J., and Pavlath, G.K. (2001). Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.* 153, 329–338.
- Horsley, V., and Pavlath, G.K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* 156, 771–774.
- Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483–494.
- Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436.
- Hsieh, J.C., Rattner, A., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (1999). Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3546–3551.
- Hu, Q.-D., Ang, B.-T., Karsak, M., Hu, W.-P., Cui, X.-Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y.-K., et al. (2003). F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115, 163–175.
- Huang, J.-Q., Wei, F.-K., Xu, X.-L., Ye, S.-X., Song, J.-W., Ding, P.-K., Zhu, J., Li, H.-F., Luo, X.-P., Gong, H., et al. (2019). SOX9 drives the epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *J Transl Med* 17.



- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* *59*, 3–10.
- Hugen, N., van Beek, J.J.P., de Wilt, J.H.W., and Nagtegaal, I.D. (2014). Insight into Mucinous Colorectal Carcinoma: Clues from Etiology. *Ann Surg Oncol* *21*, 2963–2970.
- Hugen, N., Simons, M., Halilović, A., Post, R.S. van der, Bogers, A.J., Zanten, M.A.M., Wilt, J.H. de, and Nagtegaal, I.D. (2015). The molecular background of mucinous carcinoma beyond MUC2. *The Journal of Pathology: Clinical Research* *1*, 3–17.
- Hung, J.-S., Huang, J., Lin, Y.-C., Huang, M.-J., Lee, P.-H., Lai, H.-S., Liang, J.-T., and Huang, M.-C. (2014). C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying O-glycosylation of FGFR2. *Oncotarget* *5*, 2096–2106.
- Huppert, S.S., Le, A., Schroeter, E.H., Mumm, J.S., Saxena, M.T., Milner, L.A., and Kopan, R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* *405*, 966–970.
- Hutcheson, D.A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M., and Kardon, G. (2009). Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev.* *23*, 997–1013.
- Hüttner, S., and Strasser, R. (2012). Endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins in plants. *Front Plant Sci* *3*, 67.
- Hyatt, J.-P.K., McCall, G.E., Kander, E.M., Zhong, H., Roy, R.R., and Huey, K.A. (2008). PAX3/7 EXPRESSION COINCIDES WITH MYOD DURING CHRONIC SKELETAL MUSCLE OVERLOAD. *Muscle Nerve* *38*, 861–866.
- Iacopetta, B., Grieu, F., and Amanuel, B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* *6*, 260–269.
- Ichikawa, T., Nakayama, J., Sakura, N., Hashimoto, T., Fukuda, M., Fukuda, M.N., and Taki, T. (1999). Expression of N-acetyllactosamine and beta1,4-galactosyltransferase (beta4GalT-I) during adenoma-carcinoma sequence in the human colorectum. *J. Histochem. Cytochem.* *47*, 1593–1602.
- Ichimura, K. (2012). Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* *29*, 131–139.
- Ikeya, M., and Takada, S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* *125*, 4969–4976.
- Imperiale, T.F., Ransohoff, D.F., Itzkowitz, S.H., Levin, T.R., Lavin, P., Lidgard, G.P., Ahlquist, D.A., and Berger, B.M. (2014). Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1287–1297.



- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558–561.
- Ishida, H., Togayachi, A., Sakai, T., Iwai, T., Hiruma, T., Sato, T., Okubo, R., Inaba, N., Kudo, T., Gotoh, M., et al. (2005). A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS Lett.* 579, 71–78.
- Ishikawa, H.O., Ayukawa, T., Nakayama, M., Higashi, S., Kamiyama, S., Nishihara, S., Aoki, K., Ishida, N., Sanai, Y., and Matsuno, K. (2010). Two Pathways for Importing GDP-fucose into the Endoplasmic Reticulum Lumen Function Redundantly in the O-Fucosylation of Notch in *Drosophila*. *J Biol Chem* 285, 4122–4129.
- Itoh, K., Brott, B.K., Bae, G.-U., Ratcliffe, M.J., and Sokol, S.Y. (2005). Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol.* 4, 3.
- Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L., and Kim, Y.S. (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* 49, 197–204.
- Iwai, T., Kudo, T., Kawamoto, R., Kubota, T., Togayachi, A., Hiruma, T., Okada, T., Kawamoto, T., Morozumi, K., and Narimatsu, H. (2005). Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4572–4577.
- Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R.R., Lai, S.-M., and Friedman, C. (2006). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer* 107, 1103–1111.
- Jae, L.T., Raaben, M., Riemersma, M., van Beusekom, E., Blomen, V.A., Velds, A., Kerkhoven, R.M., Carette, J.E., Topaloglu, H., Meinecke, P., et al. (2013). Deciphering the glycosylome of dystroglycanopathies using haploid screens for lassa virus entry. *Science* 340, 479–483.
- Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.
- Janda, C.Y., and Garcia, K.C. (2015). Wnt acylation and its functional implication in Wnt signalling regulation. *Biochemical Society Transactions* 43, 211–216.
- Janout, V., and Kollárová, H. (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145, 5–10.
- Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1161–1165.



- Jéhannin-Ligier, K., Dantony, E., Bossard, N., Molinié, F., Defosse, G., Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Remontet, L., and Uhry, Z. (2017). Rapport technique. Saint-Maurice: Santé Publique France 1–80.
- Jeong, W.-J., Ro, E.J., and Choi, K.-Y. (2018). Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of  $\beta$ -catenin and RAS by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Npj Precision Onc* 2, 1–10.
- Jeter, J.M., Kohlmann, W., and Gruber, S.B. (2006). Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 20, 269–276; discussion 285–286, 288–289.
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* 5, 226.
- de Jong, A.E., Morreau, H., Nagengast, F.M., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kleibeuker, J.H., Griffioen, G., Cats, A., and Vasen, H.F.A. (2005). Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 139–143.
- Jung, M.-Y., Park, S.-Y., and Kim, I.-S. (2007). Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to the hepatic sinusoidal endothelium via the interaction with  $\alpha$ 5 $\beta$ 2 integrin. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1156–1165.
- Kabat, G.C., Miller, A.B., Jain, M., and Rohan, T.E. (2007). A cohort study of dietary iron and heme iron intake and risk of colorectal cancer in women. *Br. J. Cancer* 97, 118–122.
- Kahn, M. (2011). Symmetric division versus asymmetric division: a tale of two coactivators.
- Kaklamani, V.G., and Pasche, B. (2004). Role of TGF- $\beta$  in cancer and the potential for therapy and prevention. *Expert Rev Anticancer Ther* 4, 649–661.
- Kakuda, S., and Haltiwanger, R.S. (2017). Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev. Cell* 40, 193–201.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818–821.
- Kamdar, F., and Garry, D.J. (2016). Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67, 2533–2546.
- Kaminski, M.F., Regula, J., Kraszewska, E., Polkowski, M., Wojciechowska, U., Didkowska, J., Zwierko, M., Rupinski, M., Nowacki, M.P., and Butruk, E. (2010). Quality Indicators for Colonoscopy and the Risk of Interval Cancer. *New England Journal of Medicine* 362, 1795–1803.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* 12, 2269–2277.





- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466–471.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell. Sci.* 116, 2627–2634.
- Kazanjan, A., and Shroyer, N.F. (2011). NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Curr Colorectal Cancer Rep* 7, 121–127.
- Kearns, T.P., and Sayre, G.P. (1958). Retinitis Pigmentosa, External Ophthalmoplegia, and Complete Heart Block: Unusual Syndrome with Histologic Study in One of Two Cases. *AMA Arch Ophthalmol* 60, 280–289.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175–185.
- Kekelidze, M., D’Errico, L., Pansini, M., Tyndall, A., and Hohmann, J. (2013). Colorectal cancer: Current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol* 19, 8502–8514.
- Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317–321.
- Kerekes, K., Bányai, L., and Patthy, L. (2015). Wnts grasp the WIF domain of Wnt Inhibitory Factor 1 at two distinct binding sites. *FEBS Lett.* 589, 3044–3051.
- Kim, M.-L., Chandrasekharan, K., Glass, M., Shi, S., Stahl, M.C., Kaspar, B., Stanley, P., and Martin, P.T. (2008). O-fucosylation of muscle agrin determines its ability to cluster acetylcholine receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 452–464.
- Kimura, Y., Noguchi, T., Kawahara, K., Kashima, K., Daa, T., and Yokoyama, S. (2004). Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod. Pathol.* 17, 1328–1337.
- King, M.P., Koga, Y., Davidson, M., and Schon, E.A. (1992). Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Mol Cell Biol* 12, 480–490.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed McGraw-Hill; New York: 2002. pp. 583–612.
- Kitaeva, M.N., Grogan, L., Williams, J.P., Dimond, E., Nakahara, K., Hausner, P., DeNobile, J.W., Soballe, P.W., and Kirsch, I.R. (1997). Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res.* 57, 4478–4481.



- Kitazawa, S., Ross, F.P., McHugh, K., and Teitelbaum, S.L. (1995). Interleukin-4 Induces Expression of the Integrin  $\alpha v\beta 3$  via Transactivation of the  $\beta 3$  Gene. *J. Biol. Chem.* 270, 4115–4120.
- Kitzmann, M., and Fernandez, A. (2001). Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 571–579.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C.R., Lindlöf, M., Kaariainen, H., et al. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 498–506.
- Komatsu, H., Chao, M.Y., Larkins-Ford, J., Corkins, M.E., Somers, G.A., Tucey, T., Dionne, H.M., White, J.Q., Wani, K., Boxem, M., et al. (2008). OSM-11 Facilitates LIN-12 Notch Signaling during *Caenorhabditis elegans* Vulval Development. *PLoS Biol* 6.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5, 773–785.
- Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., and Hofsteenge, J. (1998). Recognition Signal for C-Mannosylation of Trp-7 in RNase 2 Consists of Sequence Trp-x-x-Trp. *Mol Biol Cell* 9, 301–309.
- Kroes, R.A., Dawson, G., and Moskal, J.R. (2007). Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *Journal of Neurochemistry* 103, 14–24.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 275, 12701–12711.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 7238–7244.
- Kurosaka, A., Nakajima, H., Funakoshi, I., Matsuyama, M., Nagayo, T., and Yamashina, I. (1983). Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 258, 11594–11598.
- Kurosawa, S., Stearns, D.J., Jackson, K.W., and Esmon, C.T. (1988). A 10-kDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site. *J. Biol. Chem.* 263, 5993–5996.



- Laborda, J., Sausville, E.A., Hoffman, T., and Notario, V. (1993). *dlk*, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J. Biol. Chem.* *268*, 3817–3820.
- Lagow, E., DeSouza, M.M., and Carson, D.D. (1999). Mammalian reproductive tract mucins. *Hum. Reprod. Update* *5*, 280–292.
- Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.* *94*, 1023–1031.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer* *119*, 2657–2664.
- Leach, M.R., Cohen-Doyle, M.F., Thomas, D.Y., and Williams, D.B. (2002). Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J. Biol. Chem.* *277*, 29686–29697.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* *18*, 816–827.
- Lee, K.-J., Inoue, M., Otani, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Tsugane, S., and JPHC Study Group (2007). Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Causes Control* *18*, 199–209.
- Lee, N., Kim, D., and Kim, W.-U. (2019). Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* *10*.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* *26*, 1364–1366.
- Leng, Q., Tsou, J.-H., Zhan, M., and Jiang, F. (2018). Fucosylation genes as circulating biomarkers for lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *144*, 2109–2115.
- Leonhard-Melief, C., and Haltiwanger, R.S. (2010). O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Meth. Enzymol.* *480*, 401–416.
- Leslie, N.D., Valencia, C.A., Strauss, A.W., and Zhang, K. (2009). Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle).
- Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 137–161.
- Li, L.C., Chui, R.M., Sasaki, M., Nakajima, K., Perinchery, G., Au, H.C., Nojima, D., Carroll, P., and Dahiya, R. (2000). A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res.* *60*, 873–876.



- Li, J., and Johnson, S.E. (2006). ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1425–1433.
- Li, Z., Han, K., Pak, J.E., Satkunarajah, M., Zhou, D., and Rini, J.M. (2017). Recognition of EGF-like domains by the Notch-modifying O-fucosyltransferase POFUT1. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 757–763.
- Li, D., Lin, C., Li, N., Du, Y., Yang, C., Bai, Y., Feng, Z., Su, C., Wu, R., Song, S., et al. (2019). PLAGL2 and POFUT1 are regulated by an evolutionarily conserved bidirectional promoter and are collaboratively involved in colorectal cancer by maintaining stemness. *EBioMedicine* *45*, 124–138.
- Li, N., Li, D., Du, Y., Su, C., Yang, C., Lin, C., Li, X., and Hu, G. (2019). Overexpressed PLAGL2 transcriptionally activates Wnt6 and promotes cancer development in colorectal cancer. *Oncology Reports* *41*, 875.
- Liepinsh, E., Bányai, L., Patthy, L., and Otting, G. (2006). NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J. Mol. Biol.* *357*, 942–950.
- Limsui, D., Vierkant, R.A., Tillmans, L.S., Wang, A.H., Weisenberger, D.J., Laird, P.W., Lynch, C.F., Anderson, K.E., French, A.J., Haile, R.W., et al. (2010). Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Risk by Molecularly Defined Subtypes. *J Natl Cancer Inst* *102*, 1012–1022.
- Lin, M.-C., Wang, F.-Y., Kuo, Y.-H., and Tang, F.-Y. (2011). Cancer Chemopreventive Effects of Lycopene: Suppression of MMP-7 Expression and Cell Invasion in Human Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 11304–11318.
- Lind, M., Deleuran, B., Yssel, H., Fink-Eriksen, E., and Thestrup-Pedersen, K. (1995). IL-4 and IL-13, but not IL-10, are Chemotactic Factors for Human Osteoblasts. *Cytokine* *7*, 78–82.
- Linker, C., Lesbros, C., Stark, M.R., and Marcelle, C. (2003). Intrinsic signals regulate the initial steps of myogenesis in vertebrates. *Development* *130*, 4797–4807.
- Lira-Navarrete, E., and Hurtado-Guerrero, R. (2018). A perspective on structural and mechanistic aspects of protein O-fucosylation. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* *74*, 443–450.
- Little, M.P., Vineis, P., and Li, G. (2008). A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. *Journal of Theoretical Biology* *254*, 229–238.
- Liu, Y., Sugiura, Y., Wu, F., Mi, W., Taketo, M.M., Cannon, S., Carroll, T., and Lin, W. (2012).  $\beta$ -Catenin stabilization in skeletal muscles, but not in motor neurons, leads to aberrant motor innervation of the muscle during neuromuscular development in mice. *Dev. Biol.* *366*, 255–267.
- Lochhead, P., Chan, A.T., Giovannucci, E., Fuchs, C.S., Wu, K., Nishihara, R., O'Brien, M., and Ogino, S. (2014). Progress and Opportunities in Molecular Pathological Epidemiology of Colorectal Premalignant Lesions. *Am J Gastroenterol* *109*, 1205–1214.





Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israël, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 8108–8112.

Loo, L.W.M., Tiirikainen, M., Cheng, I., Lum-Jones, A., Seifried, A., Church, J.M., Gryfe, R., Weisenberger, D.J., Lindor, N.M., Gallinger, S., et al. (2013). Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *52*, 450–466.

Lopez-Rodríguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., and Rao, A. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 7214–7219.

Loriol, C., Dupuy, F., Rampal, R., Dlugosz, M.A., Haltiwanger, R.S., Maftah, A., and Germot, A. (2006). Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology* *16*, 736–747.

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

Lote, C.J., and Weiss, J.B. (1971). Identification of digalactosylcysteine in a glycopeptide isolated from urine by a new preparative technique. *FEBS Lett.* *16*, 81–85.

Lowe, J.B., and Marth, J.D. (2003). A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 643–691.

Lubman, O.Y., Korolev, S.V., and Kopan, R. (2004). Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol. Cell* *13*, 619–626.

Lubman, O.Y., Ilagan, M.X.G., Kopan, R., and Barrick, D. (2007). Quantitative Dissection of the Notch:CSL Interaction: Insights into the Notch Transcriptional Switch. *J Mol Biol* *365*, 577–589.

Luca, V.C., Jude, K.M., Pierce, N.W., Nachury, M.V., Fischer, S., and Garcia, K.C. (2015). Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* *347*, 847–853.

Luca, V.C., Kim, B.C., Ge, C., Kakuda, S., Wu, D., Roein-Peikar, M., Haltiwanger, R.S., Zhu, C., Ha, T., and Garcia, K.C. (2017). Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligand sensitivity. *Science* *355*, 1320–1324.

Luo, C., Shaw, K.T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B.A., Hogan, P.G., and Rao, A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8907–8912.

Luo, C., Cen, S., Ding, G., and Wu, W. (2019). Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. *Cancer Commun (Lond)* *39*.



- Luo, Y., and Haltiwanger, R.S. (2005). O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *280*, 11289–11294.
- Luo, Y., Nita-Lazar, A., and Haltiwanger, R.S. (2006). Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. *J. Biol. Chem.* *281*, 9385–9392.
- Luo, Y., Wong, C.-J., Kaz, A.M., Dzieciatkowski, S., Carter, K.T., Morris, S.M., Wang, J., Willis, J.E., Makar, K.W., Ulrich, C.M., et al. (2014). Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. *Gastroenterology* *147*, 418–429.e8.
- Ma, L., Dong, P., Liu, L., Gao, Q., Duan, M., Zhang, S., Chen, S., Xue, R., and Wang, X. (2016). Overexpression of protein O-fucosyltransferase 1 accelerates hepatocellular carcinoma progression via the Notch signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *473*, 503–510.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 472–484.
- Mackinnon, R.N., Selan, C., Wall, M., Baker, E., Nandurkar, H., and Campbell, L.J. (2010). The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosomes Cancer* *49*, 998–1013.
- Malinauskas, T. (2008). Docking of fatty acids into the WIF domain of the human Wnt inhibitory factor-1. *Lipids* *43*, 227–230.
- Malinauskas, T., Aricescu, A.R., Lu, W., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2011). Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 886–893.
- Malinauskas, T., and Jones, E.Y. (2014). Extracellular modulators of Wnt signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *29*, 77–84.
- Marino, M., Scuderi, F., Mazzarelli, P., Mannella, F., Provenzano, C., and Bartoccioni, E. (2001). Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *Journal of Neuroimmunology* *116*, 94–101.
- Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2449–2460.
- Maroto, M., Reshef, R., Münsterberg, A.E., Koester, S., Goulding, M., and Lassar, A.B. (1997). Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* *89*, 139–148.
- Masclef, L., Dehennaut, V., Mortuaire, M., Schulz, C., Leturcq, M., Lefebvre, T., and Vercoutter-Edouart, A.-S. (2019). Cyclin D1 Stability Is Partly Controlled by O-GlcNAcylation. *Front Endocrinol (Lausanne)* *10*.



- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 753–791.
- Massari, M.E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 429–440.
- Matsumoto, H., Hayashi, Y.K., Kim, D.-S., Ogawa, M., Murakami, T., Noguchi, S., Nonaka, I., Nakazawa, T., Matsuo, T., Futagami, S., et al. (2005). Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of  $\alpha$ -dystroglycan in Japan. *Neuromuscular Disorders* *15*, 342–348.
- Matsuzaki, K., Deng, G., Tanaka, H., Kakar, S., Miura, S., and Kim, Y.S. (2005). The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 8564–8569.
- McArdle, B. (1951). Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* *10*, 13–35.
- McClelland, S.E. (2017). Role of chromosomal instability in cancer progression. *Endocrine-Related Cancer* *24*, T23–T31.
- Mehndiratta, M.M., Agarwal, P., Tatke, M., and Krishnamurthy, M. (2002). Neurological mitochondrial cytopathies. *Neurol India* *50*, 162–167.
- Mendell, J.R., Shilling, C., Leslie, N.D., Flanigan, K.M., al-Dahhak, R., Gastier-Foster, J., Kneile, K., Dunn, D.M., Duval, B., Aoyagi, A., et al. (2012). Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* *71*, 304–313.
- Mendell, J.R., and Lloyd-Puryear, M. (2013). Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* *48*, 21–26.
- Meng, H., Zhang, X., Hankenson, K.D., and Wang, M.M. (2009). Thrombospondin 2 Potentiates Notch3/Jagged1 Signaling. *J Biol Chem* *284*, 7866–7874.
- Messina, G., and Cossu, G. (2009). The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes Dev.* *23*, 902–905.
- Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X., Cong, Q., and Yu, W. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 514–519.
- Michor, F., Iwasa, Y., Lengauer, C., and Nowak, M.A. (2005). Dynamics of colorectal cancer. *Semin. Cancer Biol.* *15*, 484–493.
- Miele, L., and Osborne, B. (1999). Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J. Cell. Physiol.* *181*, 393–409.
- Milland, J., Taylor, S.G., Dodson, H.C., McKenzie, I.F.C., and Sandrin, M.S. (2001). The Cytoplasmic Tail of  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase Contains a Sequence for Golgi Localization. *J. Biol. Chem.* *276*, 12012–12018.



Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301–305.

Miller, J.R., and Moon, R.T. (1996). Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev.* 10, 2527–2539.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3001.

Minamizato, T., Sakamoto, K., Liu, T., Kokubo, H., Katsube, K., Perbal, B., Nakamura, S., and Yamaguchi, A. (2007). CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 567–573.

Miyagi, T. (2008). Aberrant expression of sialidase and cancer progression. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84, 407–418.

Miyamoto, A., Lau, R., Hein, P.W., Shipley, J.M., and Weinmaster, G. (2006). Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10089–10097.

Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A., and Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne Muscular Dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur J Hum Genet* 21, 1049–1053.

Mohr, O.L. (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4, 275–282.

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391–399.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

Montarras, D., Chelly, J., Bober, E., Arnold, H., Ott, M.O., Gros, F., and Pinset, C. (1991). Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 during myogenesis. *The New Biologist*.

Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002). The Promise and Perils of Wnt Signaling Through  $\beta$ -Catenin. *Science* 296, 1644–1646.

Moore, C.J., and Winder, S.J. (2012). The inside and out of dystroglycan post-translational modification. *Neuromuscul. Disord.* 22, 959–965.

Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., and Servidei, S. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320, 1293–1299.





Moremen, K.W., and Molinari, M. (2006). N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr Opin Struct Biol* 16, 592–599.

Moulder, D.E., Hatoum, D., Tay, E., Lin, Y., and McGowan, E.M. (2018). The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer? *Cancers (Basel)* 10.

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

Muñelo-Romay, L., Vázquez-Martín, C., Villar-Portela, S., Cuevas, E., Gil-Martín, E., and Fernández-Briera, A. (2008). Expression and enzyme activity of  $\alpha(1,6)$ fucosyltransferase in human colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 123, 641–646.

Müller, J., Rana, N.A., Serth, K., Kakuda, S., Haltiwanger, R.S., and Gossler, A. (2014). O-fucosylation of the Notch Ligand mDLL1 by POFUT1 Is Dispensable for Ligand Function. *PLOS ONE* 9, e88571.

Münsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., and Lassar, A.B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9, 2911–2922.

Muntoni, F., and Voit, T. (2004). The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscular Disorders* 14, 635–649.

Murata, K., Miyoshi, E., Kameyama, M., Ishikawa, O., Kabuto, T., Sasaki, Y., Hiratsuka, M., Ohigashi, H., Ishiguro, S., Ito, S., et al. (2000). Expression of N-Acetylglucosaminyltransferase V in Colorectal Cancer Correlates with Metastasis and Poor Prognosis. *Clin Cancer Res* 6, 1772–1777.

Murshid, A., and Presley, J.F. (2004). ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 133–145.

Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I.V., and Hamada, J.-I. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers* 3, 3242–3278.

Ndong Ntoutoume, G.M.A., Grassot, V., Brégier, F., Chabanais, J., Petit, J.-M., Granet, R., and Sol, V. (2017). PEI-cellulose nanocrystal hybrids as efficient siRNA delivery agents—Synthesis, physicochemical characterization and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers* 164, 258–267.

Neumann, S., Coudreuse, D.Y.M., van der Westhuyzen, D.R., Eckhardt, E.R.M., Korswagen, H.C., Schmitz, G., and Sprong, H. (2009). Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* 10, 334–343.

Neuzillet, C., de Gramont, A., Tijeras-Raballand, A., de Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., and Raymond, E. (2014). Perspectives of TGF- $\beta$  inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 5.



- Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K.M., and Weinmaster, G. (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* *126*, 1689–1702.
- Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* *31*, 99–109.
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A., Liu, J.H., Etzioni, D.A., Livingston, E.H., and Ko, C.Y. (2003). Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg* *69*, 866–872.
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A., Livingston, E.H., and Yo, C.K. (2004). Colorectal cancer in the young. *Am. J. Surg.* *187*, 343–348.
- Okajima, T., and Irvine, K.D. (2002). Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* *111*, 893–904.
- Okajima, T., Xu, A., Lei, L., and Irvine, K.D. (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* *307*, 1599–1603.
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J.P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G., and Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* *6*, 539–550.
- Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M., and Rao, A. (2004). A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 4184–4195.
- Oldfors, A., Larsson, N.G., Holme, E., Tulinius, M., Kadenbach, B., and Droste, M. (1992). Mitochondrial DNA deletions and cytochrome c oxidase deficiency in muscle fibres. *J. Neurol. Sci.* *110*, 169–177.
- Olivier-Van Stichelen, S., Dehennaut, V., Buzy, A., Zacharyus, J.-L., Guinez, C., Mir, A.-M., El Yazidi-Belkoura, I., Copin, M.-C., Boureme, D., Loyaux, D., et al. (2014). O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* *28*, 3325–3338.
- Oman, T.J., Boettcher, J.M., Wang, H., Okalibe, X.N., and van der Donk, W.A. (2011). Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 78–80.
- Orsetti, B., Selves, J., Bascoul-Molleivi, C., Lasorsa, L., Gordien, K., Bibeau, F., Massemin, B., Paraf, F., Soubeyran, I., and Hostein, I. (2014). Impact of chromosomal instability on colorectal cancer progression and outcome. *BMC Cancer* *14*, 121.
- Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U., Ludwig, L., Wilda, M., Hameister, H., Knöchel, W., et al. (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J.* *21*, 5417–5426.



- Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knöchel, W., and Borggreffe, T. (2005). RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10379–10390.
- Ott, M.O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., and Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* *111*, 1097–1107.
- Otto, A., Schmidt, C., and Patel, K. (2006). Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo. *Anat. Embryol.* *211*, 293–310.
- Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F., Lawrence-Watt, D., and Patel, K. (2008). Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Sci.* *121*, 2939–2950.
- Otvos, L., Krivulka, G.R., Urge, L., Szendrei, G.I., Nagy, L., Xiang, Z.Q., and Ertl, H.C. (1995). Comparison of the effects of amino acid substitutions and beta-N- vs. alpha-O-glycosylation on the T-cell stimulatory activity and conformation of an epitope on the rabies virus glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* *1267*, 55–64.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* *8*, 1711–1717.
- Ozerniuk, I.D., and Miuge, N.S. (2012). [Evolutional principles of homology in regulatory genes of myogenesis]. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 383–390.
- Pan, Y.T., and Elbein, A.D. (1990). Control of N-linked oligosaccharide synthesis: cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor. *Biochemistry* *29*, 8077–8084.
- Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* *435*, 58–65.
- Pansters, N.A.M., van der Velden, J.L.J., Kelders, M.C.J.M., Laeremans, H., Schols, A.M.W.J., and Langen, R.C.J. (2011). Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3 $\beta$ . *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 523–535.
- Papadopoulos, N., Nicolaidis, N.C., Wei, Y.F., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., and Adams, M.D. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* *263*, 1625–1629.
- Park, J.-J., and Lee, M. (2013). Increasing the  $\alpha$  2, 6 Sialylation of Glycoproteins May Contribute to Metastatic Spread and Therapeutic Resistance in Colorectal Cancer. *Gut Liver* *7*, 629–641.
- Park, S.-Y., Jung, M.-Y., and Kim, I.-S. (2009). Stabilin-2 mediates homophilic cell–cell interactions via its FAS1 domains. *FEBS Letters* *583*, 1375–1380.



- Park, S.-Y., Yun, Y., Lim, J.-S., Kim, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, J.-E., and Kim, I.-S. (2016). Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. *Nature Communications* 7, 10871.
- Parks, A.L., Stout, J.R., Shepard, S.B., Klueg, K.M., Dos Santos, A.A., Parody, T.R., Vaskova, M., and Muskavitch, M.A.T. (2006). Structure–Function Analysis of Delta Trafficking, Receptor Binding and Signaling in *Drosophila*. *Genetics* 174, 1947–1961.
- Parodi, A.J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69–93.
- Pavlakakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C., and Rowland, L.P. (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* 16, 481–488.
- Pennarubia, F., Pinault, E., Maftah, A., and Legardinier, S. (2018). In vitro acellular method to reveal O-fucosylation on EGF-like domains. *Glycobiology*.
- Pennarubia, F., Al Jaam, B., Pinault, E., Brun, C., Maftah, A., Germot, A., and Legardinier, S. (2019). Mouse WIF1 is only O-fucosylated on EGF-III despite two evolutionary conserved consensus sites.
- Perez-Vilar, J., Randell, S.H., and Boucher, R.C. (2004). C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* 14, 325–337.
- Petit, D., Maftah, A., Julien, R., and Petit, J.-M. (2006). En bloc duplications, mutation rates, and densities of amino acid changes clarify the evolution of vertebrate  $\alpha$ -1,3/4-fucosyltransferases. *J. Mol. Evol.* 63, 353–364.
- Pickhardt, P.J. (2016). Emerging stool-based and blood-based non-invasive DNA tests for colorectal cancer screening: the importance of cancer prevention in addition to cancer detection. *Abdom Radiol (NY)* 41, 1441–1444.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707–710.
- Pinho, S.S., and Reis, C.A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer* 15, 540–555.
- Pintar, A., De Biasio, A., Popovic, M., Ivanova, N., and Pongor, S. (2007). The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? *Biol Direct* 2, 19.
- Polakis, P. (1999). The oncogenic activation of  $\beta$ -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 15–21.
- Polesskaya, A., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45<sup>+</sup> adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113, 841–852.





- Pöschl, G., and Seitz, H.K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 39, 155–165.
- Postma, C., Hermsen, M. a. J.A., Coffa, J., Baak, J.P.A., Mueller, J.D., Mueller, E., Bethke, B., Schouten, J.P., Stolte, M., and Meijer, G.A. (2005). Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon. *J. Pathol.* 205, 514–521.
- Qiu, Y., Patwa, T.H., Xu, L., Shedden, K., Misek, D.E., Tuck, M., Jin, G., Ruffin, M.T., Turgeon, D.K., Synal, S., et al. (2008). Plasma Glycoprotein Profiling for Colorectal Cancer Biomarker Identification by Lectin Glycoarray and Lectin Blot. *J Proteome Res* 7, 1693–1703.
- Quinn, M.E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D.G., Petrany, M.J., Prasad, V., and Millay, D.P. (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature Communications* 8, 15665.
- Rampal, R., Luther, K.B., and Haltiwanger, R.S. (2007). Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. *Curr. Mol. Med.* 7, 427–445.
- Ranger, A.M., Gerstenfeld, L.C., Wang, J., Kon, T., Bae, H., Gravallesse, E.M., Glimcher, M.J., and Glimcher, L.H. (2000). The Nuclear Factor of Activated T Cells (Nfat) Transcription Factor Nfatp (Nfatc2) Is a Repressor of Chondrogenesis. *J Exp Med* 191, 9–22.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707–747.
- Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2859–2863.
- Rauen, T., Raffetseder, U., Frye, B.C., Djudjaj, S., Mühlenberg, P.J.T., Eitner, F., Lendahl, U., Bernhagen, J., Dooley, S., and Mertens, P.R. (2009). YB-1 Acts as a Ligand for Notch-3 Receptors and Modulates Receptor Activation. *J Biol Chem* 284, 26928–26940.
- Raya, A., Kawakami, Y., Rodríguez-Esteban, C., Ibañes, M., Rasskin-Gutman, D., Rodríguez-León, J., Büscher, D., Feijó, J.A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2004). Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* 427, 121–128.
- Reichsman, F., Smith, L., and Cumberledge, S. (1996). Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J. Cell Biol.* 135, 819–827.
- Rex, D.K., Johnson, D.A., Anderson, J.C., Schoenfeld, P.S., Burke, C.A., Inadomi, J.M., and American College of Gastroenterology (2009). American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 739–750.
- Rhodes, S.J., and Konieczny, S.F. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3, 2050–2061.
- Ricketts, L.M., Dlugosz, M., Luther, K.B., Haltiwanger, R.S., and Majerus, E.M. (2007). O-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 17014–17023.



- Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schröck, E., Heselmeyer, K., Manoir, S. du, and Auer, G. (1996). Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 15, 234–245.
- Ries L AG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2005. Bethesda, MD: 2008
- Riggleman, B., Schedl, P., and Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell* 63, 549–560.
- Robinson-Hamm, J.N., and Gersbach, C.A. (2016). Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 135, 1029–1040.
- Rochat, A., Fernandez, A., Vandromme, M., Molès, J.-P., Bouschet, T., Carnac, G., and Lamb, N.J.C. (2004). Insulin and *wnt1* pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol. Biol. Cell* 15, 4544–4555.
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., and Baylies, M.K. (2010). Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev. Biol.* 341, 66–83.
- Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.-A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capellà, G., Ribas, M., et al. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* 66, 8462–9468.
- Ross, D.A., Rao, P.K., and Kadesch, T. (2004). Dual Roles for the Notch Target Gene *Hes-1* in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Mol Cell Biol* 24, 3505–3513.
- Roth, J.-F., Shikama, N., Henzen, C., Desbaillets, I., Lutz, W., Marino, S., Wittwer, J., Schorle, H., Gassmann, M., and Eckner, R. (2003). Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of *MyoD* and *Myf5*. *EMBO J* 22, 5186–5196.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023–1026.
- Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. (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.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). *MyoD* or *Myf-5* is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351–1359.
- Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., and Okajima, T. (2011). O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun* 2, 583.



- Sakamoto, K., Yamaguchi, S., Ando, R., Miyawaki, A., Kabasawa, Y., Takagi, M., Li, C.L., Perbal, B., and Katsube, K. (2002). The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 29399–29405.
- Sambasivan, R., Comai, G., Le Roux, I., Gomès, D., Konge, J., Dumas, G., Cimper, C., and Tajbakhsh, S. (2013). Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene *Mrf4*. *Dev. Biol.* *381*, 241–255.
- Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A.C., Weng, A.P., Pear, W.S., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2004). Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9265–9273.
- Santarelli, R.L., Pierre, F., and Corpet, D.E. (2008b). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* *60*, 131–144.
- Schedin-Weiss, S., Winblad, B., and Tjernberg, L.O. (2014). The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *The FEBS Journal* *281*, 46–62.
- Schmidt, M., Patterson, M., Farrell, E., and Münsterberg, A. (2004). Dynamic expression of *Lef/Tcf* family members and beta-catenin during chick gastrulation, neurulation, and early limb development. *Dev. Dyn.* *229*, 703–707.
- Schmidt, M.H.H., Bicker, F., Nikolic, I., Meister, J., Babuke, T., Picuric, S., Müller-Esterl, W., Plate, K.H., and Dikic, I. (2009). Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nat. Cell Biol.* *11*, 873–880.
- Schmidt, M., Schüler, S.C., Hüttner, S.S., von Eyss, B., and von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* *76*, 2559–2570.
- Schneider, M., Al-Shareffi, E., and Haltiwanger, R.S. (2017). Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology* *27*, 601–618.
- Schoen, R.E., Pinsky, P.F., Weissfeld, J.L., Yokochi, L.A., Church, T., Laiyemo, A.O., Bresalier, R., Andriole, G.L., Buys, S.S., Crawford, E.D., et al. (2012). Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2345–2357.
- Schuster-Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. (2007). Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in *Delta1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 537–542.
- Schuster-Gossler, K., Harris, B., Johnson, K.R., Serth, J., and Gossler, A. (2009). Notch signalling in the paraxial mesoderm is most sensitive to reduced *Pofut1* levels during early mouse development. *BMC Dev. Biol.* *9*, 6.
- Schwarz, F., and Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 576–582.



Sciote, J.J., and Morris, T.J. (2000). Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *J Orthod* 27, 15–30.

Seales, E.C., Jurado, G.A., Brunson, B.A., Wakefield, J.K., Frost, A.R., and Bellis, S.L. (2005). Hypersialylation of  $\beta$ 1 Integrins, Observed in Colon Adenocarcinoma, May Contribute to Cancer Progression by Up-regulating Cell Motility. *Cancer Res* 65, 4645–4652.

Segnan, N., Armaroli, P., Bonelli, L., Risio, M., Sciallero, S., Zappa, M., Andreoni, B., Arrighi, A., Bisanti, L., Casella, C., et al. (2011). Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial--SCORE. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1310–1322.

Serafin, V., Persano, L., Moserle, L., Esposito, G., Ghisi, M., Curtarello, M., Bonanno, L., Masiero, M., Ribatti, D., Stürzl, M., et al. (2011). Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J. Pathol.* 224, 448–460.

Sethi, M.K., Buettner, F.F.R., Krylov, V.B., Takeuchi, H., Nifantiev, N.E., Haltiwanger, R.S., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2010). Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glycosylated notch epidermal growth factor repeats. *J. Biol. Chem.* 285, 1582–1586.

Sethi, M.K., Buettner, F.F.R., Ashikov, A., Krylov, V.B., Takeuchi, H., Nifantiev, N.E., Haltiwanger, R.S., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2012). Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to O-glycosylated epidermal growth factor repeats of notch. *J. Biol. Chem.* 287, 2739–2748.

Sethi, M.K., Thaysen-Andersen, M., Smith, J.T., Baker, M.S., Packer, N.H., Hancock, W.S., and Fanayan, S. (2014). Comparative N-Glycan Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Unique Bisecting GlcNAc and  $\alpha$ -2,3-Linked Sialic Acid Determinants Are Associated with Membrane Proteins of the More Metastatic/Aggressive Cell Lines. *J. Proteome Res.* 13, 277–288.

Shao, L., Moloney, D.J., and Haltiwanger, R. (2003). Fringe modifies O-fucose on mouse Notch1 at epidermal growth factor-like repeats within the ligand-binding site and the Abruption region. *J. Biol. Chem.* 278, 7775–7782.

Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., and Crabtree, G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202–205.

Shcherbakova, A., Tiemann, B., Buettner, F.F.R., and Bakker, H. (2017). Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 2574–2579.

Shefer, G., Van de Mark, D.P., Richardson, J.B., and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). Satellite-cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Developmental Biology* 294, 50–66.

Shi, S., and Stanley, P. (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5234–5239.





Shin, Y., Kim, I.-J., Kang, H.C., Park, J.-H., Park, H.-R., Park, H.-W., Park, M.A., Lee, J.S., Yoon, K.-A., Ku, J.-L., et al. (2004). The E-cadherin -347G->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. *Carcinogenesis* 25, 895–899.

Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M., and Kitajewski, J. (1997). Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth & Differentiation* 8, 1349.

Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J. Biol. Chem.* 274, 32961–32969.

Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2011). Regulation of sialyl Lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *J. Biol. Chem.* 286, 21052–21061.

Shou, J., Jing, J., Xie, J., You, L., Jing, Z., Yao, J., Han, W., and Pan, H. (2015). Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer Letters* 361, 174–184.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522–5527.

Siegfried, E., Wilder, E.L., and Perrimon, N. (1994). Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 367, 76–80.

Sigauke, E., Rakheja, D., Kitson, K., and Bennett, M.J. (2003). Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review. *Lab. Invest.* 83, 1543–1554.

Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 10, 849–858.

Sillars-Hardebol, A.H., Carvalho, B., Tijssen, M., Beliën, J.A.M., de Wit, M., Delis-van Diemen, P.M., Pontén, F., van de Wiel, M.A., Fijneman, R.J.A., and Meijer, G.A. (2012). TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* 61, 1568–1575.

Simons, M., and Mlodzik, M. (2008). Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu. Rev. Genet.* 42, 517–540.

Sinha, R. (2002). An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 506-507, 197–204.

Skibber, J., Minsky, B., Hoff, P., In: DeVita, V.T., Jr, Hellmann, S., Rosenberg, S.A., editor. *Cancer: principles & practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; (2001). *Cancer of the colon and rectum*. pp. 1216–1271.

Smas, C.M., and Sul, H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725–734.



- Spiro, R.G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R – 56R.
- Sproule, D.M., and Kaufmann, P. (2008). Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1142, 133–158.
- Song, X., Hu, J., Jin, P., Chen, L., and Ma, F. (2013). Identification and evolution of an NFAT gene involving *Branchiostoma belcheri* innate immunity. *Genomics* 102, 355–362.
- Sriuranpong, V., Borges, M.W., Strock, C.L., Nakakura, E.K., Watkins, D.N., Blaumueller, C.M., Nelkin, B.D., and Ball, D.W. (2002). Notch Signaling Induces Rapid Degradation of Achaete-Scute Homolog 1. *Mol Cell Biol* 22, 3129–3139.
- Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y., and Stanley, P. (2008). Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 13638–13651.
- Stanley, P. (2007). Regulation of Notch Signaling by Glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 17, 530–535.
- Stepper, J., Shastri, S., Loo, T.S., Preston, J.C., Novak, P., Man, P., Moore, C.H., Havlíček, V., Patchett, M.L., and Norris, G.E. (2011). Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* 585, 645–650.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522–525.
- Sun, L., Ma, K., Wang, H., Xiao, F., Gao, Y., Zhang, W., Wang, K., Gao, X., Ip, N., and Wu, Z. (2007). JAK1-STAT1-STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts. *J. Cell Biol.* 179, 129–138.
- Suraweera, N., Robinson, J., Volikos, E., Guenther, T., Talbot, I., Tomlinson, I., and Silver, A. (2006). Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *International Journal of Cancer* 119, 1837–1842.
- Suzuki, K., Hayashi, T., Nishioka, J., Kosaka, Y., Zushi, M., Honda, G., and Yamamoto, S. (1989). A domain composed of epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin is essential for thrombin binding and for protein C activation. *J. Biol. Chem.* 264, 4872–4876.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.-W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Engeland, M. van, et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36, 417–422.
- Suzuki, A., Pelikan, R.C., and Iwata, J. (2015). WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Multiple Steps of Myogenesis by Regulating Step-Specific Targets. *Molecular and Cellular Biology* 35, 1763–1776.



- Tahara, T., Yamamoto, E., Madireddi, P., Suzuki, H., Maruyama, R., Chung, W., Garriga, J., Jelinek, J., Yamano, H., Sugai, T., et al. (2014). Colorectal Carcinomas With CpG Island Methylator Phenotype 1 Frequently Contain Mutations in Chromatin Regulators. *Gastroenterology* *146*, 530–538.e5.
- Takagi, Y., Kohmura, H., Futamura, M., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K., and Saji, S. (1996). Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* *111*, 1369–1372.
- Takagi, Y., Koumura, H., Futamura, M., Aoki, S., Ymaguchi, K., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K., and Saji, S. (1998). Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *British Journal of Cancer* *78*, 1152.
- Takeuchi, H., Fernández-Valdivia, R.C., Caswell, D.S., Nita-Lazar, A., Rana, N.A., Garner, T.P., Weldeghiorghis, T.K., Macnaughtan, M.A., Jafar-Nejad, H., and Haltiwanger, R.S. (2011). Rumi functions as both a protein O-glycosyltransferase and a protein O-xylosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 16600–16605.
- Takeuchi, H., Yu, H., Hao, H., Takeuchi, M., Ito, A., Li, H., and Haltiwanger, R.S. (2017). O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. *J. Biol. Chem.* jbc.M117.800102.
- Takeuchi, H., Schneider, M., Williamson, D.B., Ito, A., Takeuchi, M., Handford, P.A., and Haltiwanger, R.S. (2018). Two novel protein O-glycosyltransferases that modify sites distinct from POGUT1 and affect Notch trafficking and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E8395–E8402.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J $\kappa$ /Su(H). *Current Biology* *5*, 1416–1423.
- Tanaka, K., and Hirota, T. (2016). Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1866*, 64–75.
- Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., and Wong, C.-H. (2015). *Glycoscience: Biology and Medicine* (Tokyo: Springer Japan).
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 7837–7841.
- Tax, F.E., Yeagers, J.J., and Thomas, J.H. (1994). Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* *368*, 150–154.
- Taylor, P., Takeuchi, H., Sheppard, D., Chillakuri, C., Lea, S.M., Haltiwanger, R.S., and Handford, P.A. (2014). Fringe-mediated extension of O-linked fucose in the ligand-binding region of Notch1 increases binding to mammalian Notch ligands. *PNAS* *111*, 7290–7295.



- Taylor, R.E., Gregg, C.J., Padler-Karavani, V., Ghaderi, D., Yu, H., Huang, S., Sorensen, R.U., Chen, X., Inostroza, J., Nizet, V., et al. (2010). Novel mechanism for the generation of human xeno-autoantibodies against the nonhuman sialic acid N-glycolylneuraminic acid. *J Exp Med* 207, 1637–1646.
- Teppa, R.E., Petit, D., Plechakova, O., Cogez, V., and Harduin-Lepers, A. (2016). Phylogenetic-Derived Insights into the Evolution of Sialylation in Eukaryotes: Comprehensive Analysis of Vertebrate  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$ 2,3/6-Sialyltransferases (ST3Gal and ST6Gal). *Int J Mol Sci* 17.
- Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem.* 279, 28257–28265.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999).  $\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.
- Thompson, S.L., Bakhroum, S.F., and Compton, D.A. (2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. *Curr Biol* 20, R285–R295.
- Thorsteinsson, M., Kirkeby, L.T., Hansen, R., Lund, L.R., Sørensen, L.T., Gerds, T.A., Jess, P., and Olsen, J. (2012). Gene expression profiles in stages II and III colon cancers: application of a 128-gene signature. *Int J Colorectal Dis* 27, 1579–1586.
- Tong, J., Zhu, M.J., Underwood, K.R., Hess, B.W., Ford, S.P., and Du, M. (2008). AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *Journal of Animal Science* 86, 1296–1305.
- Trensz, F., Haroun, S., Cloutier, A., Richter, M.V., and Grenier, G. (2010). A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 299, C939–C947.
- Trinick, J. (1996). Cytoskeleton: Titin as a scaffold and spring. *Current Biology* 6, 258–260.
- Tsong, W.H., Koh, W.-P., Yuan, J.-M., Wang, R., Sun, C.-L., and Yu, M.C. (2007). Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Br. J. Cancer* 96, 821–827.
- Tsuiji, H., Takasaki, S., Sakamoto, M., Irimura, T., and Hirohashi, S. (2003). Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion. *Glycobiology* 13, 521–527.
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.-P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., et al. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945.
- Tureckova, J., Wilson, E.M., Cappalunga, J.L., and Rotwein, P. (2001). Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin. *J. Biol. Chem.* 276, 39264–39270.





Ujita, M., Misra, A.K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2000). Poly-N-acetyllactosamine extension in N-glycans and core 2- and core 4-branched O-glycans is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the beta 1,4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 275, 15868–15875.

Ul-Haq, Z., Naz, S., and Mesaik, M.A. (2016). Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor Rev.* 32, 3–15.

Vadde, R., Vemula, S., Jinka, R., Merchant, N., Bramhachari, P.V., and Nagaraju, G.P. (2017). Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 113, 22–27.

Valero-González, J., Leonhard-Melief, C., Lira-Navarrete, E., Jiménez-Osés, G., Hernández-Ruiz, C., Pallarés, M.C., Yruela, I., Vasudevan, D., Lostao, A., Corzana, F., et al. (2016). A proactive role of water molecules in acceptor recognition by protein O-fucosyltransferase 2. *Nat. Chem. Biol.* 12, 240–246.

Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 14, 351–360.

Varki, A., and Sharon, N. (2009). Historical Background and Overview. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology* 27, 3–49.

Vässin, H., Bremer, K.A., Knust, E., and Campos-Ortega, J.A. (1987). The neurogenic gene Delta of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF-like repeats. *EMBO J* 6, 3431–3440.

Vasudevan, D., and Haltiwanger, R.S. (2014). Novel roles for O-linked glycans in protein folding. *Glycoconj. J.* 31, 417–426.

Vasyutina, E., Lenhard, D.C., Wende, H., Erdmann, B., Epstein, J.A., and Birchmeier, C. (2007). RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4443–4448.

Vavasseur, F., Dole, K., Yang, J., Matta, K.L., Myerscough, N., Corfield, A., Paraskeva, C., and Brockhausen, I. (1994). O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer. *Eur. J. Biochem.* 222, 415–424.

Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., and Bond, G.L. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7, 979–987.

Vestweber, D., and Kemler, R. (1984). Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differ.* 15, 269–273.



- Viollet, L., Thrush, P.T., Flanigan, K.M., Mendell, J.R., and Allen, H.D. (2012). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and/or beta blockers on the cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Cardiol.* *110*, 98–102.
- Vishwakarma, R.A., and Menon, A.K. (2005). Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER. *Chem. Commun. (Camb.)* 453–455.
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2001). Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol.* *15*, 681–694.
- Waisman, D.M., Salimath, B.P., and Anderson, M.J. (1985). Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* *260*, 1652–1660.
- Wan, G., Tian, L., Yu, Y., Li, F., Wang, X., Li, C., Deng, S., Yu, X., Cai, X., Zuo, Z., et al. (2017). Overexpression of Pofut1 and activated Notch1 may be associated with poor prognosis in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *491*, 104–111.
- Wang, Y., Lee, G.F., Kelley, R.F., and Spellman, M.W. (1996a). Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* *6*, 837–842.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P., and Haltiwanger, R.S. (2001a). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* *276*, 40338–40345.
- Wang, Y., and Sul, H.S. (2006). Ectodomain Shedding of Preadipocyte Factor 1 (Pref-1) by Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme (TACE) and Inhibition of Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol* *26*, 5421–5435.
- Wang, L.W., Dlugosz, M., Somerville, R.P.T., Raed, M., Haltiwanger, R.S., and Apte, S.S. (2007). O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats in ADAMTS-like-1/punctin-1 regulates secretion: implications for the ADAMTS superfamily. *J. Biol. Chem.* *282*, 17024–17031.
- Wang, K., Wang, C., Xiao, F., Wang, H., and Wu, Z. (2008). JAK2/STAT2/STAT3 Are Required for Myogenic Differentiation. *J. Biol. Chem.* *283*, 34029–34036.
- Wang, L.W., Leonhard-Melief, C., Haltiwanger, R.S., and Apte, S.S. (2009). Post-translational Modification of Thrombospondin Type-1 Repeats in ADAMTS-like 1/Punctin-1 by C-Mannosylation of Tryptophan. *J Biol Chem* *284*, 30004–30015.
- Weiser, M.R., Gönen, M., Chou, J.F., Kattan, M.W., and Schrag, D. (2011). Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J. Clin. Oncol.* *29*, 4796–4802.



Weiss, J.B., Lote, C.J., and Bobinski, H. (1971). New Low Molecular Weight Glycopeptide containing Triglycosylcysteine in Human Erythrocyte Membrane. *Nature New Biology* 234, 25–26.

Weiss, J.B., Lote, C.J., and Bobinski, H. (1971). New Low Molecular Weight Glycopeptide containing Triglycosylcysteine in Human Erythrocyte Membrane. *Nature New Biology* 234, 25–26.

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789–799.

Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567–581.

Wharton, K.A. (2003). Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev. Biol.* 253, 1–17.

Wicklund, M.P. (2013). The muscular dystrophies. *Continuum (Minneapolis)* 19, 1535–1570.

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 193, 296–307.

Wieschaus, E., and Riggleman, R. (1987). Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 49, 177–184.

Willert, K., and Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95–102.

Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007864.

Willett, W.C. (2005). Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA* 293, 233–234.

Wilmink, A.B. (1997). Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 40, 483–493.

Wilson-Rawls, J., Molkenin, J.D., Black, B.L., and Olson, E.N. (1999). Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2853–2862.

Wong, G.T., Gavin, B.J., and McMahon, A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Molecular and Cellular Biology* 14, 6278–6286.

World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007.



- Wright, W.E., Sassoon, D.A., and Lin, V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* *56*, 607–617.
- Wu, G., Chen, Z., Li, J., Ye, F., Chen, G., Fan, Q., Dong, H., Yuan, S., and Zhu, X. (2018). NOTCH4 Is a Novel Prognostic Marker that Correlates with Colorectal Cancer Progression and Prognosis. *J Cancer* *9*, 2374–2379.
- Wu, H.Y., Peisley, A., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2007). NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends in Cell Biology* *17*, 251–260.
- Wu, W.K.K., Wang, X.J., Cheng, A.S.L., Luo, M.X.M., Ng, S.S.M., To, K.F., Chan, F.K.L., Cho, C.H., Sung, J.J.Y., and Yu, J. (2013). Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* *86*, 251–277.
- Wu, Z.-Q., Li, X.-Y., Hu, C.Y., Ford, M., Kleer, C.G., and Weiss, S.J. (2012). Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial–mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *PNAS* *109*, 16654–16659.
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* *16*, 478–487.
- Xu, W., and Kimelman, D. (2007). Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J. Cell. Sci.* *120*, 3337–3344.
- Xu, Y., and Pasche, B. (2007). TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* *16 Spec No 1*, R14–R20.
- Xu, Q., Isaji, T., Lu, Y., Gu, W., Kondo, M., Fukuda, T., Du, Y., and Gu, J. (2012). Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in epithelial cell lines. *J. Biol. Chem.* *287*, 16563–16574.
- Yamashita, K., Hara-Kuge, S., and Ohkura, T. (1999). Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1473*, 147–160.
- Yan, X., Zhu, M.-J., Dodson, M.V., and Du, M. (2013). Developmental Programming of Fetal Skeletal Muscle and Adipose Tissue Development. *J Genomics* *1*, 29–38.
- Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., Gray, M.J., Cheng, H., Hoff, P.M., and Ellis, L.M. (2006a). Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* *12*, 4147–4153.
- Yang, W., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, N., and Zhu, D. (2006b). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res.* *66*, 1320–1326.
- Yavropoulou, M.P., and Yovos, J.G. (2014). The role of notch signaling in bone development and disease. *Hormones* *13*, 24–37.





- Yazawa, S., Abbas, S.A., Madiyalakan, R., Barlow, J.J., and Matta, K.L. (1986). N-acetyl-beta-D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarian tissue. *Carbohydr. Res.* *149*, 241–252.
- Yokota, S., Yokota, S., Ogawara, K., Ogawara, K., Kimura, R., Kimura, R., Shimizu, F., Shimizu, F., Baba, T., Baba, T., et al. (2013). Protein O-fucosyltransferase 1: A potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *International Journal of Oncology* *43*, 1864–1870.
- Young, G.P., Symonds, E.L., Allison, J.E., Cole, S.R., Fraser, C.G., Halloran, S.P., Kuipers, E.J., and Seaman, H.E. (2015). Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution. *Dig. Dis. Sci.* *60*, 609–622.
- Yu, J.S.L., and Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* *143*, 3050–3060.
- Yu, W., Li, L., Zheng, F., Yang, W., Zhao, S., Tian, C., Yin, W., Chen, Y., Guo, W., Zou, L., et al. (2017).  $\beta$ -Catenin Cooperates with CREB Binding Protein to Promote the Growth of Tumor Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *44*, 467–478.
- Zanotti, S., Smerdel-Ramoya, A., and Canalis, E. (2013). Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)c2 Inhibits Notch Receptor Signaling in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* *288*, 624–632.
- Zauber, A.G., Winawer, S.J., O'Brien, M.J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B.F., Shi, W., Bond, J.H., Schapiro, M., Panish, J.F., et al. (2012). Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *New England Journal of Medicine* *366*, 687–696.
- Zetser, A., Gredinger, E., and Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J. Biol. Chem.* *274*, 5193–5200.
- Zhang, X., Miao, X., Tan, W., Ning, B., Liu, Z., Hong, Y., Song, W., Guo, Y., Zhang, X., Shen, Y., et al. (2005). Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* *129*, 565–576.
- Zhang, D.-W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* *282*, 18602–18612.
- Zhang, Y., Li, B., Ji, Z.-Z., and Zheng, P.-S. (2010). Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer* *116*, 5207–5218.
- Zhang, Z., Bu, X., Yang, J., Zhu, S., He, S., Zheng, J., Wang, W., and Chu, D. (2018). NOTCH4 regulates colorectal cancer proliferation, invasiveness, and determines clinical outcome of patients. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6975–6985.



- Zhao, Y.-Y., Takahashi, M., Gu, J.-G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S., and Taniguchi, N. (2008). Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci.* *99*, 1304–1310.
- Zheng, Y., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Lu, P., Dong, F., Pang, Y., Ma, S., Cheng, H., Hao, S., et al. (2016). Loss of Dnmt3b accelerates MLL-AF9 leukemia progression. *Leukemia* *30*, 2373–2384.
- Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dötsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., and McKeon, F. (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NFAT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* *93*, 851–861.
- Zhu, W., Leber, B., and Andrews, D.W. (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* *20*, 5999–6007.
- Zisman, A.L., Nickolov, A., Brand, R.E., Gorchow, A., and Roy, H.K. (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch. Intern. Med.* *166*, 629–634.
- Zot, A.S., and Potter, J.D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* *16*, 535–559.
- Zubarik, R., Ganguly, E., Benway, D., Ferrentino, N., Moses, P., and Vecchio, J. (2002). Procedure-related abdominal discomfort in patients undergoing colorectal cancer screening: a comparison of colonoscopy and flexible sigmoidoscopy. *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 3056–3061.
- Zygmunt, D.A., Singhal, N., Kim, M.-L., Cramer, M.L., Crowe, K.E., Xu, R., Jia, Y., Adair, J., Martinez-Pena y Valenzuela, I., Akaaboune, M., et al. (2017). Deletion of Pofut1 in Mouse Skeletal Myofibers Induces Muscle Aging-Related Phenotypes in cis and in trans. *Mol Cell Biol* *37*.









## **Résumé**

La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) réticulaire, dont le gène est localisé dans la région chromosomique 20q11.21 chez l'Homme, catalyse le transfert d'un fucose qui sera *O*-lié sur la sérine ou la thréonine présente dans la séquence consensus (C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>S/T<sup>3</sup>), portée par un domaine EGF-like d'une glycoprotéine membranaire ou sécrétée. Le knockdown de *Pofut1* (Po<sup>-</sup>) dans la lignée myoblastique murines C2C12 conduit à la formation de myotubes allongés et minces, à faible nombre de noyaux ainsi qu'à une sous-expression du marqueur myogénique tardif *Myf6*, suggérant des défauts significatifs dans la fusion secondaire. La signalisation NFATc2/IL-4 est décrite comme la voie principale associée à cette étape. Nous montrons que la moindre expression de *Nfatc2* dans les myotubes Po<sup>-</sup> est corrélée à une baisse de l'IL-4 sécrétée et à une faible quantité de son récepteur (IL-4Rα) présent chez les cellules de réserve qui doivent participer à la fusion avec les myotubes naissants. La neutralisation de l'IL-4Rα sur les C2C12 sauvages provoque des défauts d'accrétion myonucléaire, semblables à ceux observés pour les Po<sup>-</sup>. Ainsi, POFUT1 pourrait être un nouveau médiateur de la croissance des myotubes au cours du processus myogénique, notamment par la signalisation NFATc2/IL-4. La glycoprotéine WIF1, cible potentielle de POFUT1, est un antagoniste de la signalisation WNT via sa fixation aux protéines WNT. Cette voie est connue pour être impliquée dans la prolifération et la différenciation des myoblastes. Néanmoins, aucune donnée ne concerne le rôle de WIF1 dans le processus myogénique. Par un apport exogène de WIF1, nous avons montré l'augmentation de la prolifération et l'altération de la différenciation myoblastique des C2C12. Lors de la prolifération, une augmentation de l'expression de *Myf5* et une diminution de *MyoG* sont observées. A 7 jours de différenciation, les myotubes Po<sup>-</sup> ont un diamètre plus petit que les myotubes sauvages et ils sont plus nombreux à avoir un faible nombre de noyaux, traduisant des défauts de fusion. Nous démontrons pour la première fois, l'implication de la protéine WIF1 dans le processus myogénique. Récemment, POFUT1 a aussi été proposé comme nouveau biomarqueur pour certains cancers, mais pas évalué dans le cancer colorectal (CCR). Nous avons donc collecté des données issues de 626 tumeurs et 51 tissus adjacents non tumoraux disponibles dans FireBrowse, celles de lignées cellulaires cancéreuses colorectales et de prélèvements tumoraux provenant du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. Une surexpression de *POFUT1* est observée dès le stade I, majoritairement due à une amplification de la région 20q11.21. Elle est significativement associée aux adénocarcinomes non mucineux et à une localisation rectale. De plus, l'expression de *POFUT1* est corrélée à celles des récepteurs NOTCH ainsi qu'au processus métastatique, probablement par activation de la voie NOTCH. A ce titre, POFUT1 pourrait être considéré comme un nouveau biomarqueur pour le diagnostic du CCR.

**Mots-clés :** POFUT1, cancer colorectal, processus myogénique, voie de signalisation NOTCH, voie de signalisation NFATc2/IL-4, WIF1, voie de signalisation WNT.

## **Abstract**

The ER protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1), whose gene is located at the 20q11.21 chromosomal region in humans, catalyzes *O*-linked fucose addition to serine or threonine present in the consensus sequence (C<sup>2</sup>X<sub>4</sub>S/T<sup>3</sup>) carried by EGF-like domain of membrane or secreted glycoprotein. *Pofut1* knockdown (Po<sup>-</sup>) in murine myoblast C2C12 cell line leads to formation of elongated and thin myotubes, with a low number of nuclei and to downexpression of the late myogenic marker *Myf6*, suggesting significant defects in secondary fusion. NFATc2/IL-4 signaling is described as the main pathway associated to this step. We showed that the slightest expression of *Nfatc2* in Po<sup>-</sup> myotubes is correlated with a decrease in IL-4 secretion and a lower quantity of IL-4Rα in reserve cells, which had to fuse with nascent myotubes. IL-4Rα neutralization on wild-type C2C12 causes myonucléar accretion defects, similar to those observed in Po<sup>-</sup>. Then, POFUT1 could be a new mediator of myotube growth during myogenic process, particularly through NFATc2/IL-4 signaling. The glycoprotein WIF1, potential POFUT1 target, is an antagonist of WNT signaling via its binding to WNT proteins. This pathway is involved in proliferation and differentiation of myoblasts. However, no data are available on WIF1 role in the myogenic process. Through exogenous WIF1 treatment, we showed a proliferation increase and a myoblast differentiation impairment in C2C12. During proliferation, increase in *Myf5* and decrease in *MyoG* expressions are observed. At 7 days of differentiation, Po<sup>-</sup> myotubes have a smaller diameter than wild-type ones and are more numerous to have a small number of nuclei, reflecting fusion defects. For the first time, we demonstrate the involvement of WIF1 in the myogenic process. Recently, POFUT1 was proposed to be a new biomarker for several cancers, but not evaluated in colorectal cancer (CRC). We used data from 626 tumors and 51 adjacent non-tumor tissues available at FireBrowse, colorectal cancer cell lines and tumor samples from the Biological Resource Centre of Limoges hospital. A *POFUT1* overexpression is observed from stage I, mainly due to amplification of 20q11.21 region. It is significantly associated to non-mucinous adenocarcinoma and to rectum location. Moreover, *POFUT1* expression is correlated with those of *NOTCH* receptors as well as the metastatic process, probably by activation of the NOTCH pathway. POFUT1 could therefore be considered as a new biomarker for CRC diagnosis.

**Keywords :** POFUT1, colorectal cancer, myogenic process, NOTCH signaling pathway, NFATc2/IL-4 signaling pathway, WIF1, WNT signaling pathway.

