

**Université de Limoges**

**ED 615 – Sciences Biologiques et Santé (SBS)**

**Laboratoire PEIRENE / Faculté des Sciences et Techniques de Limoges**

**Thèse pour obtenir le grade de**

**Docteur de l'Université de Limoges**

**Discipline / Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie**

**Présentée et soutenue par**

**Caroline Vergé**

**Le lundi 9 décembre 2019**

**Etude de l'implication des acides sialiques dans la  
régulation de la fusion myoblastique**

**Thèse dirigée par le Professeur Jean-Michel Petit**

**JURY :**

**Rapporteurs**

**Mme Anne HARDUIN-LEPERS**, Directeur de Recherche, Université de Lille

**M. Laurent MOREL**, Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne

**Examineurs**

**M. Abderrahman MAFTAH**, Professeur des Universités, Université de Limoges

**M. Jean-Michel Petit**, Professeur des Universités, Université de Limoges



A Karel,  
A mes sœurs,  
A mes parents,



*La persévérance est haute de désir et belle de courage, elle pactise avec le temps.*

Anne Barratin, philanthrope et femme de lettres, 1913.



## Remerciements

---

Une thèse ne se résume pas qu'à un manuscrit de quelques centaines de pages et à un après-midi de soutenance. C'est beaucoup plus et il est compliqué de définir ce processus en quelques lignes. Selon mon expérience, il s'agit avant tout de l'accomplissement d'un travail de longue haleine puisque la thèse de doctorat est un marathon de quatre ans (ou un peu plus) avec des hauts et des bas (plus de bas que de hauts malheureusement...). C'est aussi un enrichissement professionnel et personnel sans aucun égal. Nous apprenons à dépasser nos limites et à chercher toujours plus, sans aucune certitude sur la fin. J'ai au moins appris après ces années qu'il ne faut pas abandonner à la première difficulté, être déterminé et aller jusqu'au bout de ses ambitions.

Je souhaite remercier les personnes suivantes :

Le Professeur Anne Harduin-Lepers pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Le Professeur Laurent Morel pour avoir jugé ce manuscrit et être le rapporteur de cette thèse.

Le Professeur Abderrahman Maftah pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe "Glycosylations et différenciation", pour ses précieux conseils de correction lors de la rédaction de l'article, pour sa bienveillance lors de nos réunions d'équipe et pour avoir accepté de juger mon travail.

Le Professeur Jean-Michel Petit, directeur de cette thèse. Je vous suis reconnaissante de m'avoir transmis votre rigueur scientifique, une partie de votre savoir et votre sens du détail.

Le Professeur Vincent Sol pour m'avoir accueilli dans le laboratoire PEIRENE. Je vous remercie également de votre implication durant la fin de cette thèse pour les corrections de la publication.

L'ensemble des membres de l'ancienne Unité de Génétique Moléculaire Animale. Plus particulièrement, Fabienne, merci de m'avoir initié à la microscopie à épifluorescence et à ce fameux bruit de fond dû à l'anticorps Pax7. Nathalie, je te remercie pour les explications sur les bonnes pratiques d'hygiène et de sécurité en laboratoire et surtout merci pour tes sourires et ta gentillesse. Emilie, un énorme merci pour avoir sauvé plus d'une fois la mémoire disponible de mon ordinateur.

Odile Duval et Sylvie Laval, gestionnaires du laboratoire PEIRENE, pour leurs contributions administratives au bon déroulement de cette thèse. Merci aussi pour les agréables moments de discussion passés ensemble.

Le Docteur Fabrice Dupuy pour m'avoir confié des enseignements durant quatre années. Merci pour cette expérience très enrichissante.

Les techniciennes de « la rue de Genève ». Karine, Flo et Mamie Flo, j'ai été ravie de travailler à vos côtés lors de mes innombrables séances de travaux pratiques. Merci pour votre disponibilité de tous les instants. Vous avez répondu à mes demandes et mes questions, merci aussi pour les cafés, extrêmement réconfortants certains jours.

Le Docteur Agnès Germot et le Docteur Daniel Petit. Un grand merci de m'avoir permis de découvrir les joies des clés de détermination des oursins, étoiles de mer et gastéropodes. Depuis ces semaines de TP, la vue de la charnière de *Pecten maximus* me rappelle d'excellents souvenirs...

Le Professeur Véronique Blanquet et le Docteur Bertrand Courtioux, ancienne et actuel directeur de l'Ecole doctorale « Sciences biologiques et Santé », pour vos conseils tout au long de cette thèse et surtout dans les derniers mois.

Le Docteur Sébastien Legardinier. Merci pour tes conseils scientifiques et techniques, tes encouragements aux moments les plus durs, nos discussions sportives, nos idées de voyage, ton petit grain de folie surtout dans l'apprentissage des langues étrangères. Ne lâche rien !!

Le Docteur Laetitia Magnol et le Docteur Stéphanie Durand pour leurs « coups de boost » et leur compréhension.

Les anciens doctorants du laboratoire. Amel, un immense merci pour m'avoir si bien accueilli à mon arrivée, j'ai beaucoup appris à tes côtés sur le plan technique. Vincent, je te suis reconnaissante pour le temps que tu m'as consacré pour m'épauler notamment dans la réalisation des western blot, je ne l'oublierai pas. Merci aussi pour les chouettes soirées passées avec toi et Delphine à Saint Gence. Carole et Mélanie, merci pour vos conseils, votre bonne humeur et nos soirées.

Julien, Florian et Bruno, les habitants actuels et passés du 4/5. Julien, doctorant, je te remercie pour toute ton aide, ta bonne humeur, nos débriefs de l'ADP le mardi matin... Florian, post-doctorant, merci pour tes réponses toujours très précises à mes questions. Bonne chance aux US ! Merci les garçons pour nos pauses, vos blagues, vos discussions footballistiques et vos encouragements. Bruno, ATER, merci d'avoir été présent et à l'écoute dans des moments critiques et merci pour ton jardin !!

Tiffany, doctorante. Comment pourrais-je te remercier pour ta bonne humeur quotidienne. J'ai été ravie de partager le bureau 102 durant deux ans avec toi. Tu as été là dans les moments compliqués et ça je ne peux pas l'oublier. Tu as été un réel soutien. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la fin de ta thèse, accroche-toi !

Jess et Alexis, ancienne doctorante et ATER. Comment dire, vous avez été mes piliers durant ces quatre années, je ne sais pas si j'aurais pu tenir sans vous. Jess, nous avons débuté ensemble, depuis que tu es partie, ce n'est plus pareil... Alexis, la tornade du labo. Je vous remercie d'avoir été à mes côtés aux pires et aux meilleurs moments. Nous en avons vécu des choses, mais chut...ça reste entre nous !

Luce, tu as été l'une de mes plus belles rencontres à Limoges. Je te remercie pour tous ces moments passés en ta compagnie, nos sessions thé du samedi après-midi, ton soutien. Merci pour ta relecture. Reviens-nous vite, tu nous manques.

Les amis de Champagne, Karen et Etienne, Barbara et Quentin, Laura et Xavier, Marie-Claire, Camille, Anne-Laure. La distance n'aura pas eu raison de notre amitié. A présent, nous allons rattraper les instants perdus, croyez-moi.

Les copines limougeaudes d'Ainsi Danse. Merci les filles et merci Caro pour cette bouffée d'air du jeudi soir. Sarah, Amandinette et Cécile, vous êtes devenues de véritables amies donc merci de m'avoir soutenu. J'attends avec impatience notre weekend rétois ou parisien entre filles...

Mes (nouveaux) amis parisiens (ou anciens parisiens), Laura et Stéphane, Fabienne et Cédric, Coralie et Fouad, Fabrissa et Mathieu, Anne-Laure et Laurent, Guillaume, Paula, Julien, Sandra, Fabrice.



Ma belle-famille parisienne, poitevine et sarthoise. Odile, Florence, Jacques, Françoise, Paulette, Hélène et Mathieu. Merci pour vos encouragements, les déjeuners du dimanche, votre bonne humeur et votre humour.

Bruno et Fred. Un immense merci pour m'avoir accueilli il y a presque six ans (déjà) dans votre magnifique capitale bourguignonne. Durant quelques mois, vous avez été mes papas de substitution. Merci de m'avoir encouragé à repasser des entretiens de thèse.

Natacha et Lionel, Aurélie et Frantz. Merci de m'avoir appris à grandir et de m'avoir accompagné et aidé à devenir celle que je suis, vous y êtes tous les quatre pour quelque chose. Je n'oublie pas vos six loulous : Mariah, Lana, Tessa, Victoire, Livia et Jules qui grandissent bien trop vite et qui animent avec brio nos réunions de famille. Qu'ils continuent sur leur lancée !

Karel, je te remercie pour ton soutien indéfectible depuis quatre ans. Tu es tellement patient avec moi, parfois je ne suis pas certaine de le mériter ! Je ne sais pas si j'aurais pu tenir sans nos conversations quotidiennes. A présent, nous allons ouvrir un nouveau chapitre de notre vie rempli de nombreuses découvertes en tout genre...

Papa, Maman, comment vous remercier pour votre accompagnement et votre soutien depuis le début. Vous n'avez jamais remis mes choix en question et avez toujours été derrière moi pour me soutenir. Sans vous, toutes ces années d'études et cette thèse n'auraient pas été possibles. Ces dernières années n'auront pas été faciles pour diverses raisons mais nous avons réussi à arriver au bout et c'est avec une immense fierté que nous pouvons dire : on l'a fait.



## Communications et congrès

---

### ▪ Communications orales :

- Séminaire thématique de l'Ecole doctorale 615 Sciences Biologiques et Santé (Mars 2017, Pouligny-Notre-Dame, France)

### ▪ Communications écrites :

- Journée scientifique de l'institut GEIST (Décembre 2017, Limoges, France) :

« [Etude de l'implication des acides sialiques dans la régulation de la fonction myoblastique](#) »

Caroline Vergé, Amel Bouchatal, Paul-François Gallet, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit.

- Séminaire des doctorants du département de génétique animale de l'INRA (Mai 2015, La Rochelle, France) :

« [Involvement of sialic acids in muscle cell differentiation](#) »

Caroline Vergé, Jean-Michel Petit, Paul-François Gallet.

### ▪ Congrès :

- 29<sup>th</sup> International Carbohydrates Symposium (Juillet 2018, Lisbonne, Portugal) :

« [Involvement of  \$\alpha\$ 2,6 sialylation of glycans in the differentiation of myoblasts](#) »

Caroline Vergé, Amel Bouchatal, Paul-François Gallet, Frédéric Chirat, Yann Guérardel, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit.



## Publication

---

### **Involvement of ST6Gal I-mediated $\alpha$ 2,6 sialylation in myoblast proliferation and differentiation**

Caroline Vergé<sup>†, a</sup>, Amel Bouchatal <sup>†, a</sup>, Frédéric Chirat <sup>b</sup>, Yann Guérardel <sup>b</sup>, Abderrahman Maftah <sup>a</sup>, Jean-Michel Petit <sup>a\*</sup>

<sup>†</sup> C.V. and A.B. are considered as first co-authors and contributed equally to this work

<sup>[a]</sup> Univ. Limoges, PEIRENE, EA 7500, Glycosylation and differentiation, F-87060 Limoges

<sup>[b]</sup> Univ. Lille, UMR 8576 CNRS, F-59655 Villeneuve d'Ascq

Accepté dans FEBS Open Bio le 16 octobre 2019.



## Liste des abréviations

---

<b>ADAM</b> : A-disintegrin and metalloproteinase	<b>ERGIC</b> : Endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>FAT</b> : FKBP/ATM/TRRAP
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor
<b>ADP</b> : Adénosine diphosphate	<b>FKBP12</b> : Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
<b>ATM</b> : Ataxia-telangiectasia mutated	<b>FOXO</b> : Forkhead box protein O
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>Fuc</b> : Fucose
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>FUT</b> : Fucosyltransferase
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>GAG</b> : Glycosaminoglycane
<b>BACE</b> : $\beta$ -site APP-cleaving enzyme	<b>Gal</b> : Galactose
<b>bHLH</b> : Basic helix-loop-helix	<b>GDF8</b> : Growth and differentiation factor 8
<b>BMP</b> : Bone morphogenetic protein	<b>GDP</b> : Guanosine diphosphate
<b>CBF1</b> : Centromere binding factor 1	<b>GalNAc</b> : <i>N</i> -acétylgalactosamine
<b>CDG</b> : Congenital disorders of glycosylation	<b>GALNT</b> : <i>N</i> -acetyl- $\alpha$ - <i>D</i> -galactosaminyltransferase
<b>CDK</b> : Cyclin-dependant kinase	<b>GALT</b> : Galactosyltransferase
<b>Cer</b> : Céramide	<b>Glc</b> : Glucose
<b>CMAH</b> : Cytidine monophosphate <i>N</i> -acetylneuraminic acid hydroxylase	<b>GlcNAc</b> : <i>N</i> -acétylglucosamine
<b>CMAS</b> : CMP <i>N</i> -acetylneuraminic acid synthetase	<b>GM</b> : Growth medium
<b>CMD</b> : Congenital Muscular Dystrophies	<b>GNE/MNK</b> : UDP- <i>N</i> -acétyl 2-épimérase/ <i>N</i> -acétylmannosamine kinase
<b>CMP</b> : Cytosine monophosphate	<b>Gnt</b> : <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase
<b>Co-Smad</b> : Common Smad	<b>GPI</b> : Glycosylphosphatidylinositol
<b>CS</b> : Chondroïtine-sulfate	<b>GS</b> : Glycine, sérine
<b>CSL</b> : CBF1/Su(H)/Lag-1	<b>HD</b> : Hétérodimérisation
<b>CST</b> : CMP-Sia transporteur	<b>HGF</b> : Hepatocyte growth factor
<b>CTP</b> : Cytosine tri-phosphate	<b>Hey</b> : Hairy eyes, Y-linked
<b>DAPI</b> : 4', 6-diamino-2-phénylindole	<b>Hes</b> : Hairy/Enhancer of split
<b>Dll</b> : Delta-like	<b>HIBM</b> : Hereditary inclusion body myopathy
<b>DM</b> : Differentiation medium	<b>HS</b> : Héparane-Sulfate
<b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>ICAM</b> : Intercellular adhesion molecule
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	<b>Id3</b> : Inhibitor of DNA binding 3
<b>Dol-P</b> : Dolichol-phosphate	<b>IGF</b> : Insulin-like growth factor
<b>DOS</b> : Delta and OSM-11-like	<b>IL</b> : Interleukine
<b>DS</b> : Dermatane-sulfate	<b>I-Smad</b> : Inhibitory Smad
<b>DSL</b> : Delta/Serrate/Lag-2	<b>ITAM</b> : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>EDEM</b> : ER degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein	<b>ITIM</b> : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>KD</b> : Knockdown
<b>EOGT</b> : EGF domain specific <i>O</i> -linked <i>N</i> -acetylglucosamine transferase	<b>Kdn</b> : 2-Keto-3-deoxynononic acid
<b>ERAD</b> : ER-associated degradation	<b>KO</b> : Knockout
<b>ERK</b> : Extracellular signal regulated kinase	<b>KS</b> : Kératane-sulfate
<b>ERManI</b> : ER mannosidase I	

**Lbx1** : Ladybird homebox protein homolog 1  
**LDTF** : Lineage-determining transcription factor  
**LFNG** : O-fucosyl 3- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase  
**Lkb1** : Liver kinase b  
**LNR** : Lin-12/Notch repeat  
**MAFbx** : Muscle atrophy F-box  
**MAG** : Myelin-associated glycoprotein  
**MAML** : Mastermind-like  
**Man** : Mannose  
**ManNAc** : *N*-acetyl-*D*-mannosamine  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase  
**MCK** : Muscle creatine kinase  
**MEF2** : Myocytes enhancer factor 2  
**miRNA** : micro-RNA  
**MLC** : Myosin light chain  
**MMP** : Métalloprotéinase matricielle  
**MRF** : Myogenic Regulatory Factor  
**mRNP** : messenger ribonucleoprotein  
**mTOR** : Mammalian target of rapamycin  
**mTORC1** : mTOR complex 1  
**MuRF1** : Muscle ring finger 1  
**Myf5** : Myogenic factor 5  
**Myf6** : Myogenic factor 6  
**MyoD** : Myogenic differentiation 1  
**MyoG** : Myogénine  
**NANP** : Acide *N*-acétylneuraminique phosphatase  
**NANS** : Acide *N*-acétylneuraminique synthase  
**NBT-BCIP** : nitro blue tetrazolium chloride-5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt  
**NCAM** : Neural cell adhesion molecule  
**NECD** : Notch extracellular domain  
**NEU** : Neuraminidase  
**NeuAc** : Acide neuraminique  
**Neu5Ac** : Acide 5-*N*-acetylneuraminique  
**Neu5Gc** : Acide *N*-glycolylneuraminique  
**NFATc** : Nuclear Factor of Activated T-cells  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor- $\kappa$ -B  
**NICD** : Notch intracellular domain  
**NLS** : Nuclear localization signal  
**NRP** : Neuropiline  
**NRR** : Negative regulatory region  
**OGT** : *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase

**OST** : Oligosaccharyltransferase  
**Pax** : Paired box protein  
**PBK** : Protein kinase B  
**PCNA** : Proliferating cell nuclear antigen  
**PEST** : Proline, Glutamine, Serine, Threonine  
**PH** : Pleckstrin homology  
**PI3K** : Phosphoinositide-3-kinase  
**PIKK** : PI3K related protein kinase  
**Pofut** : Protein *O*-fucosyltransferase  
**Poglut** : Protein *O*-glucosyltransferase  
**PSA** : Polysialic acid  
**PSTD** : Domaine de polysialylation  
**RAPTOR** : Regulatory-associated protein of TOR  
**RBP-J $\kappa$**  : Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region  
**RE** : Reticulum endoplasmique  
**RICTOR** : Rapamycin-insensitive companion of TOR  
**RNase L** : Ribonucléase L  
**R-Smad** : Receptor-regulated Smad  
**SDTF** : Signal-dependent transcription factor  
**Shh** : Sonic hedgehog  
**Six** : Sine oculis-related homeobox homolog protein  
**sLe a** : sialyl Lewis a  
**sLe x** : sialyl Lewis x  
**SRF** : Serum Response Factor  
**ST** : Sialyltransférase  
**STK11** : Sérine/Thréonine kinase 11  
**SynCAM** : Synaptic adhesion molecule  
**TAD** : Transactivation domain  
**TGF $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$   
**TGF $\beta$ R** : Transforming growth factor receptor  
**TIMP** : Tissu inhibitor of metalloproteinase  
**TLR** : Toll-like receptor  
**TNF $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TRRAP** : Transactivation/transformation domain-associated protein  
**TSC** : Tuberous sclerosis complex  
**TSR** : Thrombospondin type I repeat  
**UDP** : Uridine diphosphate  
**UTR** : Untranslated region  
**Wnt** : Wingless  
**WT** : Wild-type



# Table des matières

---

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>29</b>
<b>Chapitre 1. Le muscle squelettique : Structures et acteurs moléculaires .....</b>	<b>31</b>
I-Mise en place du muscle squelettique.....	31
1) Structure et fonctions .....	31
2) Muscle squelettique embryonnaire .....	33
II-Différenciation et fusion myoblastique adulte dans un contexte de régénération musculaire .....	39
1) Activation des cellules satellites et différenciation.....	39
a) Les cellules satellites.....	39
b) La famille des MRF .....	41
c) Les protéines Pax .....	45
d) Engagement des cellules satellites.....	47
- Activation des cellules satellites .....	47
- L'auto-renouvellement de la population satellitaire .....	49
- Migration des cellules satellites activées.....	49
2) Prolifération, différenciation et fusion .....	51
a) Prolifération myoblastique .....	51
b) Différenciation myogénique.....	51
c) Fusion des myocytes .....	53
d) Maturation des myotubes et hypertrophie.....	55
3) Implication des microRNA dans la myogenèse.....	55
4) La lignée myoblastique murine C2C12.....	57
<b>Chapitre 2. Les voies des signalisation impliquées dans le processus myogénique .....</b>	<b>61</b>
I- La voie de Notch.....	61
1) Récepteurs et ligands .....	61
a) La famille des récepteurs Notch .....	63
b) Caractéristiques structurales des ligands .....	65
2) Activation de la voie canonique de Notch.....	65
a) Interactions ligands-récepteurs .....	65
b) Clivages protéolytiques du récepteur Notch .....	67
c) Mécanisme de la régulation transcriptionnelle par Notch .....	67
d) Gènes cibles de la voie.....	69
3) Rôles de Notch dans la myogenèse.....	69
II- La voie du TGF $\beta$ /Smads .....	73
1) Les protagonistes de la voie et leur mode d'action.....	73
a) Les récepteurs, structure et activation.....	73
b) Les ligands .....	75
c) Les protéines Smads : activation et transmission du signal .....	75
2) Régulation de la voie TGF $\beta$ /Smads .....	77
3) Rôles dans la myogenèse chez l'adulte .....	79
III- La voie PI3K/Akt/mTOR .....	79
1) Les acteurs de la voie .....	81
a) Les phosphoinositide-3-kinases.....	81

b) La sérine/thréonine kinase Akt ou PBK .....	81
c) Les complexes mTOR.....	81
2) Mécanismes d'activation de la voie .....	83
3) Implications dans la myogenèse .....	83
<b>Chapitre 3. Les glycosylations, des modifications post-traductionnelles fondamentales.</b>	<b>87</b>
I- Les <i>O</i> -glycosylations.....	89
1) Principaux types de <i>O</i> -glycosylations.....	89
a) <i>O</i> -glycosylation de type mucine .....	89
b) <i>O</i> -glycosylation de type <i>O</i> -GlcNAc .....	91
c) <i>O</i> -glycosylation de type protéoglycane.....	91
2) La <i>O</i> -fucosylation .....	93
3) La <i>O</i> -glucosylation.....	93
II- La <i>N</i> -glycosylation .....	95
1) Biosynthèse des <i>N</i> -glycanes et extension des branches de <i>N</i> -glycanes complexes..	95
2) Contrôle de la structure des protéines nouvellement glycosylées .....	97
III- La sialylation.....	101
1) Biosynthèse des acides sialiques .....	101
2) Principaux glycoconjugués sialylés .....	105
a) Glycoprotéines sialylées.....	105
b) Glycolipides sialylés.....	109
3) Les sialyltransférases : structures et implications physiologiques .....	111
a) L' $\alpha$ 2,3 sialylation.....	111
b) L' $\alpha$ 2,6 sialylation.....	113
- Les ST6Gal .....	113
- Les ST6GalNAc .....	117
c) L' $\alpha$ 2,8 sialylation.....	117
d) Organisation structurale des sialyltransférases .....	121
4) Les neuraminidases .....	123
5) Les lectines : exemples des Siglecs .....	123
6) Implication des acides sialiques lors de la myogenèse .....	125
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>129</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>133</b>
I- Création de clones sous exprimant <i>st6gal1</i> .....	135
1) Culture et différenciation cellulaire .....	135
a) Culture et conservation des cellules.....	135
b) Induction de la différenciation myoblastique.....	135
2) Isolement des myotubes, des cellules de réserve et myoblastes .....	135
3) Production des lentivirus et création de la lignée knockdown pour <i>st6gal1</i> .....	137
II- Caractérisation des populations clonales KD pour <i>st6gal1</i> .....	137
1) Vérification de la sous-expression de <i>st6gal1</i> par RT-PCR quantitative en temps réel .....	137
2) Cinétique de prolifération.....	139
3) Indice de fusion.....	139
III- Comparaison de l' $\alpha$ 2,3 et l' $\alpha$ 2,6 sialylation par l'utilisation de lectines.....	141
1) Marquages des cellules par lectines SNA et MAA au cours de la différenciation .	141
2) Extraction des protéines membranaires .....	143
3) Traitements enzymatiques des protéines membranaires .....	143

4) Extraction des protéines totales .....	143
5) Analyse des glycoprotéines par « lectinblots » .....	145
6) Immunomarquages des acides sialiques $\alpha$ 2,3 et $\alpha$ 2,6 liés .....	145
IV- Analyses des glycanes par spectrométrie de masse .....	147
1) Extraction et purification des <i>N</i> -glycanes .....	147
2) Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	149
3) Quantification des <i>N</i> -glycanes .....	149
V- Analyses des niveaux de transcrits et de protéines associés au knockdown du gène <i>st6gal1</i> .....	149
1) RT-PCR quantitative en temps réel de <i>myomaker</i> , <i>Pax7</i> et des gènes cibles de la voie de signalisation de Notch .....	149
2) Immunomarquages Pax7/MyoD .....	151
3) Western blot des protéines totales .....	153
VI- Tests statistiques .....	153
<b>RESULTATS .....</b>	<b>155</b>
<b>Article – Involvement of ST6Gal I-mediated-<math>\alpha</math>2,6 sialylation in myoblast proliferation and differentiation .....</b>	<b>157</b>
<b>Résultats complémentaires.....</b>	<b>175</b>
I- Analyse globale des glycoprotéines membranaires traitées à la <i>N</i> -glycosidase F et à la <i>O</i> - glycosidase .....	175
II- Evolution de l'expression de myomaker, facteur impliqué dans la fusion myogénique ...	177
III- Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de <i>Pax7</i> .....	179
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>183</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>199</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>201</b>
<b>RESUME - ABSTRACT .....</b>	<b>225</b>



## Table des figures

---

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la structure du muscle squelettique .....	32
<b>Figure 2</b> : Les signaux moléculaires envoyés par le tube neural et la notochorde permettent une polarisation des somites .....	32
<b>Figure 3</b> : La formation embryonnaire du muscle squelettique débute par la formation des somites .....	34
<b>Figure 4</b> : Les facteurs impliqués dans la délamination du dermomyotome .....	36
<b>Figure 5</b> : Localisation des cellules satellites au niveau du muscle .....	38
<b>Figure 6</b> : Acteurs et voies de signalisation impliqués dans le processus de maintien de la quiescence des cellules satellites .....	40
<b>Figure 7</b> : Structure de MyoD, un représentant de la famille des MRF .....	40
<b>Figure 8</b> : Intervention chronologique des facteurs impliqués dans le processus myogénique .....	42
<b>Figure 9</b> : Activation et devenir des cellules satellites lors de la régénération du muscle squelettique .....	46
<b>Figure 10</b> : Types de divisions des cellules satellites .....	48
<b>Figure 11</b> : Modèle théorique de la fusion myoblastique .....	52
<b>Figure 12</b> : Utilisation de la lignée cellulaire murine C2C12 pour l'étude <i>in vitro</i> des différentes étapes de la myogenèse .....	56
<b>Figure 13</b> : Structures des récepteurs Notch de Mammifères .....	62
<b>Figure 14</b> : Sites potentiels de glycosylation sur le récepteur Notch1 murin .....	62
<b>Figure 15</b> : Domaines structuraux des ligands canoniques de Notch .....	64
<b>Figure 16</b> : Voie canonique de Notch .....	66
<b>Figure 17</b> : Rôles de la voie Notch dans la vie embryonnaire et post-natale de la souris .....	70
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique d'un complexe récepteur au TGF $\beta$ .....	72
<b>Figure 19</b> : Voie du TGF $\beta$ /Smad .....	72
<b>Figure 20</b> : Régulation de la voie du TGF $\beta$ par l'association des I-Smads avec les récepteurs de type I .....	76
<b>Figure 21</b> : Structures des isoformes d'Akt .....	82
<b>Figure 22</b> : Protéines mTORC1 et mTORC2 et leurs régulateurs .....	82
<b>Figure 23</b> : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et myogenèse .....	84
<b>Figure 24</b> : Exemples de <i>N</i> et <i>O</i> -glycanes chez les Mammifères .....	86
<b>Figure 25</b> : Liaisons sucre-protéine dans le cadre des <i>N</i> et <i>O</i> -glycosylations .....	86
<b>Figure 26</b> : Les huit noyaux <i>O</i> -glycaniques de type mucines .....	88
<b>Figure 27</b> : Représentation schématique des différents types de glycosaminoglycanes et des disaccharides les constituant .....	90
<b>Figure 28</b> : Allongement séquentiel de glycanes <i>O</i> -liés présentant des motifs « EGF-like » .....	92
<b>Figure 29</b> : Synthèse du « dolichol-P-P-GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>9</sub> Glc <sub>3</sub> » et transfert à une protéine .....	94
<b>Figure 30</b> : Synthèse et maturation des <i>N</i> -glycanes .....	96
<b>Figure 31</b> : Contrôle-qualité des <i>N</i> -glycoprotéines et mécanisme de dégradation dans le reticulum endoplasmique .....	98
<b>Figure 32</b> : Formes majeures d'acides sialiques chez les Mammifères .....	100
<b>Figure 33</b> : Biosynthèse des glycoprotéines sialylées .....	102
<b>Figure 34</b> : Voie de recyclage des acides sialiques chez les Mammifères .....	104
<b>Figure 35</b> : Exemple de <i>N</i> -glycanes sialylés complexes et hybrides .....	104
<b>Figure 36</b> : Les voies de biosynthèse des gangliosides .....	108

<b>Figure 37</b> : Représentation schématique de l'extrémité 5' du gène <i>ST6Gall</i> humain et ses transcrits majoritaires .....	114
<b>Figure 38</b> : Domaines structuraux des sialyltransférases .....	120
<b>Figure 39</b> : Les sialylmotifs conservés au sein des séquences de sialyltransférases .....	120
<b>Figure 40</b> : Organisation structurale des Siglecs humaines et murines .....	124
<b>Figure 41</b> : Analyse de l' $\alpha$ 2,6 (A) et $\alpha$ 2,3 (B) sialylation de glycoprotéines membranaires de cellules traitées ou non à la <i>N</i> -glycosidase F et à la <i>O</i> -glycosidase .....	174
<b>Figure 42</b> : Expression de <i>myomaker</i> dans les cellules C2C12 et les cellules sous-exprimant le gène <i>st6gall</i> .....	176
<b>Figure 43</b> : Activation de Akt dans les C2C12 et C2C12-sh- <i>st6gall</i> en prolifération et en différenciation .....	178
<b>Figure 44</b> : Activation de p38 dans les C2C12 et C2C12-sh- <i>st6gall</i> en prolifération et en différenciation .....	178
<b>Figure 45</b> : Activation de Smad2/3 dans les C2C12 et C2C12-sh- <i>st6gall</i> en prolifération et en différenciation .....	180
<b>Figure 46</b> : Incidence de la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation des glycoprotéines de surface lors de la différenciation myogénique .....	192

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Caractérisation métabolique, fonctionnelle et structurale des différents types de fibres musculaires présentes chez l'adulte .....	30
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques et structures protéiques des membres de la famille des gènes <i>Pax</i> .....	44
<b>Tableau 3</b> : Synthèse des principaux miRNA impliqués dans la myogenèse et leurs gènes cibles .....	54
<b>Tableau 4</b> : Principaux gènes acteurs de la voie Notch chez la Drosophile et leurs homologues humains, et les fonctions des protéines associées .....	60
<b>Tableau 5</b> : Rôles de Notch lors de la myogenèse ante et post-natale .....	68
<b>Tableau 6</b> : Structures et sous-unités régulatrices des trois classes de PI3K .....	80
<b>Tableau 7</b> : Principales catégories de CDG, gènes affectés et manifestations cliniques majeures .....	100
<b>Tableau 8</b> : Structures glycaniques reconnues par les sialyltransférases et les liaisons générées .....	110
<b>Tableau 9</b> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour générer les shRNA- <i>st6gal1</i> et shRNA-mock intégrés dans le vecteur pSIREN .....	136





# AVANT-PROPOS

---

Les acides nucléiques sont déterminants dans la vie de la cellule mais une autre classe de molécules constitutives des glycoconjugués occupe une place essentielle, ce sont les glycanes, d'abord considérés au début du XX<sup>ème</sup> siècle comme une source d'énergie ou en tant que constituants structuraux. Les études sur les glycanes ont été, dans un premier temps, laborieuses en raison de la complexité de leur synthèse et de leur structure avant de prendre un tournant décisif avec l'explosion des techniques d'analyse et l'apparition d'une nouvelle discipline, la glycobiologie. Les glycanes sont particulièrement impliqués dans les interactions cellule-cellule (**Rutishauser *et al.*, 1988**), cellule-matrice extracellulaire (**Hugues et Mills, 1986**) et cellule-molécule ou encore dans les interactions entre différents organismes (par exemple un parasite et son hôte) (**Villalta et Kierszenbaum, 1987**). Ils peuvent être associés de façon covalente à d'autres molécules afin de constituer des glycoconjugués tels que les glycoprotéines et les glycolipides. Les glycanes sont ainsi impliqués lors des processus de fécondation (**Salzmann *et al.*, 1983**), de différenciation cellulaire (**Nandan *et al.*, 1990**) ou d'adhésion cellulaire (**Lowe *et al.*, 1990**).

Malgré les indéniables avancées dans la compréhension des mécanismes de biosynthèse des glycanes et de leurs rôles, une importante partie des structures glycaniques demeure inconnue. Il reste encore à ce jour à élucider comment une quantité restreinte de glycoènes impliqués dans l'élaboration des glycanes peut expliquer une telle variété de structures glycaniques. Un début de réponse a été trouvé avec l'identification et la localisation des enzymes impliquées dans les réactions de glycosylation et qui ont été nommées les glycosyltransférases. Les glycosylations sont des modifications post-traductionnelles qui permettent une maturation et une stabilité structurale des glycoprotéines. Les monosaccharides portés par les parties terminales des glycanes (galactose, fucose, acide sialique par exemple) sont en partie responsables des fonctions biologiques accomplies par les glycoprotéines comme le développement et les réponses immunitaires.

L'équipe « glycosylation et différenciation cellulaire » du laboratoire PEIRENE s'intéresse depuis plus de 20 ans aux modifications post-traductionnelles de type glycosylations, plus particulièrement à la fucosylation et la sialylation (**Oulmouden *et al.*, 1997** ; **Mercier *et al.*, 1999**). L'intérêt de l'équipe s'est porté sur l'implication des glycanes



dans la myogenèse (**Grassot et al., 2014 ; Der Vartanian et al., 2015 ; Al Jaam et al., 2016**), la différenciation adipogénique précoce (**Grassot et al., 2017**) et plus récemment le cancer colorectal (**Chabanais et al., 2018**). Concernant la myogenèse, les travaux conduits portent sur les changements des structures glycaniques durant ce processus et les conséquences sur le devenir des cellules (fusion cellulaire ou cellules de réserve par exemple). Pour ce faire, des modèles cellulaires tels que la lignée myoblastique murine C2C12 et des cellules satellites murines sont utilisés. L'étude des glycosylations est d'autant plus intéressante que la majorité des protéines membranaires des myoblastes sont *N* et/ou *O*-glycosylées (**Senechal et al., 1983**). La fusion des myoblastes est associée à des systèmes de reconnaissance cellule-cellule. Parmi ceux-ci, l'implication des glycoprotéines de surface, pouvant être modifiées par les produits des glycoènes, est cruciale. L'équipe a montré que sur un large panel de 375 glycoènes codant des glycosyltransférases, glycosidases, lectines ou sulfotransférases et exprimés dans les cellules myoblastiques murines C2C12, plus de la moitié sont dérégulés au niveau transcriptionnel lors de la différenciation. Ce travail apporte donc une preuve indéniable de réelles variations des glycoènes au cours de la différenciation myogénique. Parmi ces gènes, certains codant des sialyltransférases telles que les ST8Sia II et ST8Sia V présentent des variations d'expression durant la différenciation (**Janot et al., 2009**). Par la suite, A. Bouchatal a établi une corrélation entre la quantité d'acides sialiques périphériques liés et la différenciation myogénique. Une diminution globale de l' $\alpha$ 2,6 sialylation au cours de la différenciation myogénique des cellules C2C12 a été mise en évidence. Cette diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation est associée à la baisse de l'expression du gène codant la sialyltransférase ST6Gal I au cours de la différenciation (**Doctorat A. Bouchatal, 2015**).

A mon arrivée au laboratoire en 2014, l'équipe avait donc prouvé que la sialyltransférase ST6Gal I était impliquée dans la différenciation myogénique sans pour autant avoir statué sur les glycanes et les voies de signalisation impactés par cette baisse d' $\alpha$ 2,6 sialylation.



# INTRODUCTION

---

**Tableau 1 : Caractérisation métabolique, fonctionnelle et structurale des différents types de fibres musculaires présentes chez l'adulte.**

		<b>Type de fibres</b>		
		<b>I</b>	<b>IIA</b>	<b>IIB</b>
<b>Caractéristiques</b>	<b>Métaboliques</b>			
	- Métabolisme	Oxydatif	Oxydatif/glycolytique	Glycolytique
	- Activité ATPasique	Faible	Elevée	Elevée
	<b>Fonctionnelles</b>			
	- Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
	- Fatigabilité	Lente	Intermédiaire	Rapide
	<b>Structurales</b>			
	- Mitochondries	Nombreuses	Nombreuses	Rares
	- Réseau sanguin	Développé	Développé	Peu développé

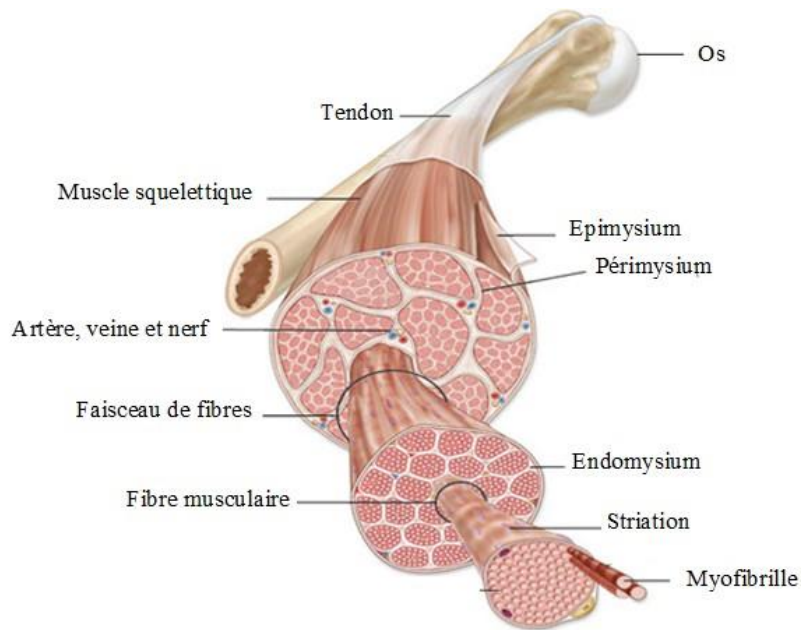
# Chapitre 1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE : STRUCTURES ET ACTEURS MOLECULAIRES

## I- Mise en place du muscle squelettique

### 1) Structure et fonctions

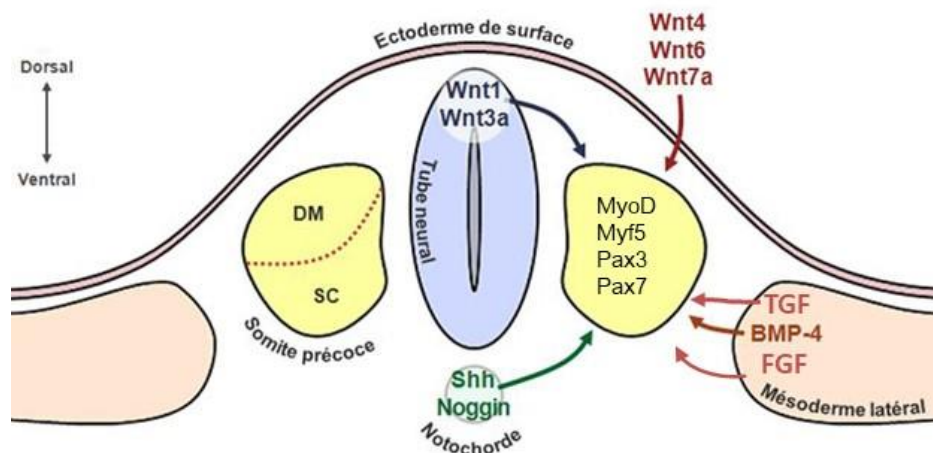
Le terme de « muscle » trouve son origine dans la langue latine, il provient du mot « musculus » qui signifie « petite souris ». Le corps humain possède plus de 600 muscles répartis en trois types : le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le muscle lisse. Ces derniers sont présents dans la paroi de certains organes creux tels que l'utérus ou l'intestin mais également dans la paroi des vaisseaux sanguins. Les muscles lisses sont constitués de cellules fusiformes mononucléées. Ces muscles présentent des contractions irrégulières et continues réalisées de façon indépendante sous le contrôle du système nerveux autonome ou système neurovégétatif. Les muscles lisses ne sont donc pas adaptés à la réalisation de mouvements précis. Le muscle strié cardiaque, ou myocarde, est quant à lui composé de cellules musculaires cardiaques, les cardiomyocytes. Son activité est continue ; son réseau de capillaires est donc bien développé. Sa contraction est involontaire et fait intervenir le système nerveux autonome. Enfin, le muscle strié squelettique se définit comme tout muscle attaché au squelette par l'intermédiaire d'un tendon et qui réalise un mouvement grâce à sa contraction. Il est dit strié car, observé en microscopie optique, il présente des striations transversales et verticales. Les myotubes constitutifs du muscle strié squelettique sont plurinucléés, ils proviennent de la fusion de plusieurs myocytes. Ils peuvent mesurer jusqu'à plusieurs centimètres de long pour un diamètre de quelques dizaines de micromètres. Le muscle strié squelettique est l'unique type de muscle à contraction délibérée soumis au contrôle du système nerveux volontaire.

Le muscle squelettique présente trois types de fibres musculaires sollicitées différemment selon le mouvement réalisé (**Tableau 1**). La classification s'établit en fonction de leur métabolisme et de leur résistance à la fatigue (**Brooke et Kaiser, 1969**). Les fibres musculaires de type I ou fibres à contraction lente sont de petite taille et présentent de nombreuses mitochondries ainsi qu'une activité ATPasique lente leur permettant de résister longtemps à l'effort. Elles sont aussi appelées fibres rouges puisqu'elles possèdent de nombreux capillaires sanguins. Les fibres de type II, fibres à contraction rapide ou fibres blanches, comprennent : (1) les fibres de type IIA, résistantes à des efforts prolongés, qui se



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure du muscle squelettique.**

Le muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissu conjonctif (épimysium, pérимыsium et endomysium). Il présente plusieurs niveaux d'organisation : il est constitué de faisceaux, eux-mêmes divisés en fibres formées de nombreuses myofibrilles (Adapté de svtmarcq.e-monsite.com).



**Figure 2 : Les signaux moléculaires envoyés par le tube neural et la notochorde permettent une polarisation des somites.**

Ces structures embryonnaires activent les protéines Wnt et Shh, considérées comme des activateurs de la myogenèse et notamment des gènes *Pax3* et *MyoD* en activant la formation du dermomyotome. BMP-4 et son inhibiteur Noggin participent également à la mise en place de ces structures. *BMP*, bone morphogenetic protein ; *DM*, dermomyotome ; *FGF*, fibroblast growth factor ; *MyoD*, myogenic differentiation 1 ; *Myf5*, myogenic factor 5 ; *Pax*, paired box protein ; *SC*, sclerotome ; *Shh*, sonic hedgehog ; *TGF*, transforming growth factor (Adapté de Yusuf et Brand Saberi, 2006).



contractent rapidement, sont qualifiées de fibres « intermédiaires » ; (2) les fibres de type IIB, grosses fibres à contraction rapide, sont cependant facilement fatigables en raison du peu de mitochondries et de capillaires qu'elles contiennent. En moyenne, les muscles possèdent 50 % de fibres I, 25 % de fibres IIA et 25 % de fibres IIB. Toutefois, ces proportions varient d'un muscle à l'autre et d'un individu à l'autre en fonction de sa condition physique et de son entraînement (**Schiaffino et Reggiani, 2011**).

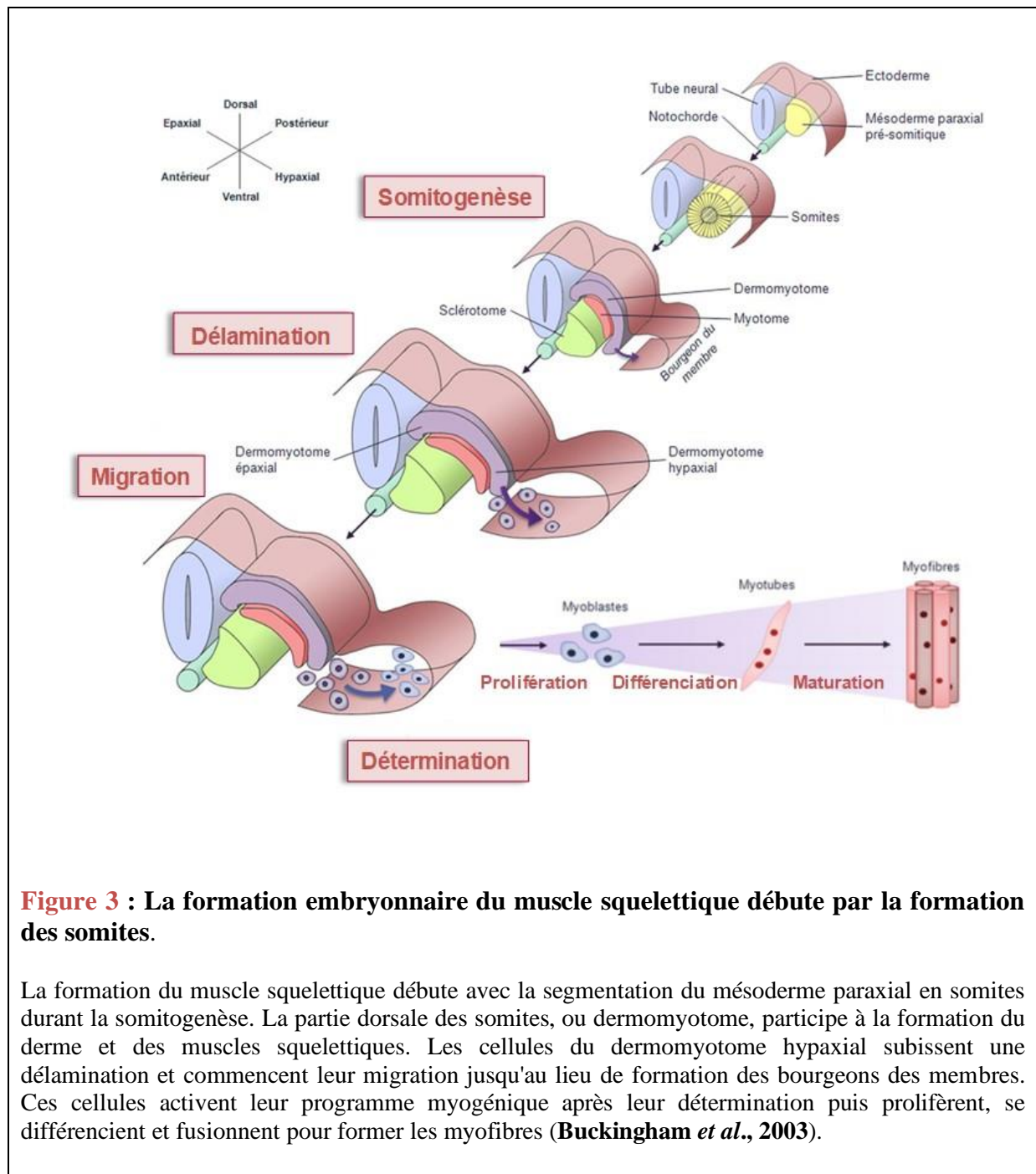
Un muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissus conjonctifs appelées épimysium, péri-mysium et endomysium permettant de maintenir les fibres musculaires dans l'axe de contraction. Le muscle squelettique est composé de faisceaux musculaires comportant chacun une vingtaine de fibres musculaires, elles-mêmes contenant un grand nombre de myofibrilles alignées (**Figure 1**). Ces dernières sont constituées d'actine et de myosine qui donnent cet aspect strié au muscle squelettique. Chaque fibre possède une innervation unique grâce à un motoneurone. L'ensemble formé par les fibres innervées et le motoneurone correspondant constitue une unité motrice.

Le muscle squelettique a la capacité d'être excitable grâce à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de l'unité motrice permettant, entre autres, une libération d'ions calciques et la contraction musculaire. L'élasticité et l'extensibilité sont les autres propriétés physiques du muscle squelettique. Les fibres musculaires peuvent en effet s'étirer et reprendre leur longueur de repos. L'élasticité amortit l'effet des variations brutales de la contraction et l'extensibilité permet aux muscles d'être étirés au-delà de leur longueur de repos.

## 2) Muscle squelettique embryonnaire

La plupart des muscles squelettiques des Vertébrés proviennent de cellules progénitrices présentes dans les somites. Ce sont des structures épithéliales transitoires issues de la segmentation rythmique du mésoderme para-axial (**Buckingham, 2001**). Ce processus de segmentation est contrôlé de façon très fine par une sorte de régulateur moléculaire agissant comme un réveil moléculaire. Ce modèle a été pour la première fois théorisé par Cooke et Zeeman en 1976 et porte le nom de « clock and wavefront » (**Cooke and Zeeman, 1976**). Au fur et à mesure de cette segmentation, l'embryon s'allonge selon un axe antéro-postérieur. Les somites à proximité de la tête sont les premiers à se former.

Ces signaux envoyés par le tube neural et la notochorde entraînent une polarisation des somites (**Figure 2**). La partie ventrale engendre le sclérotome qui évoluera en tissus osseux et



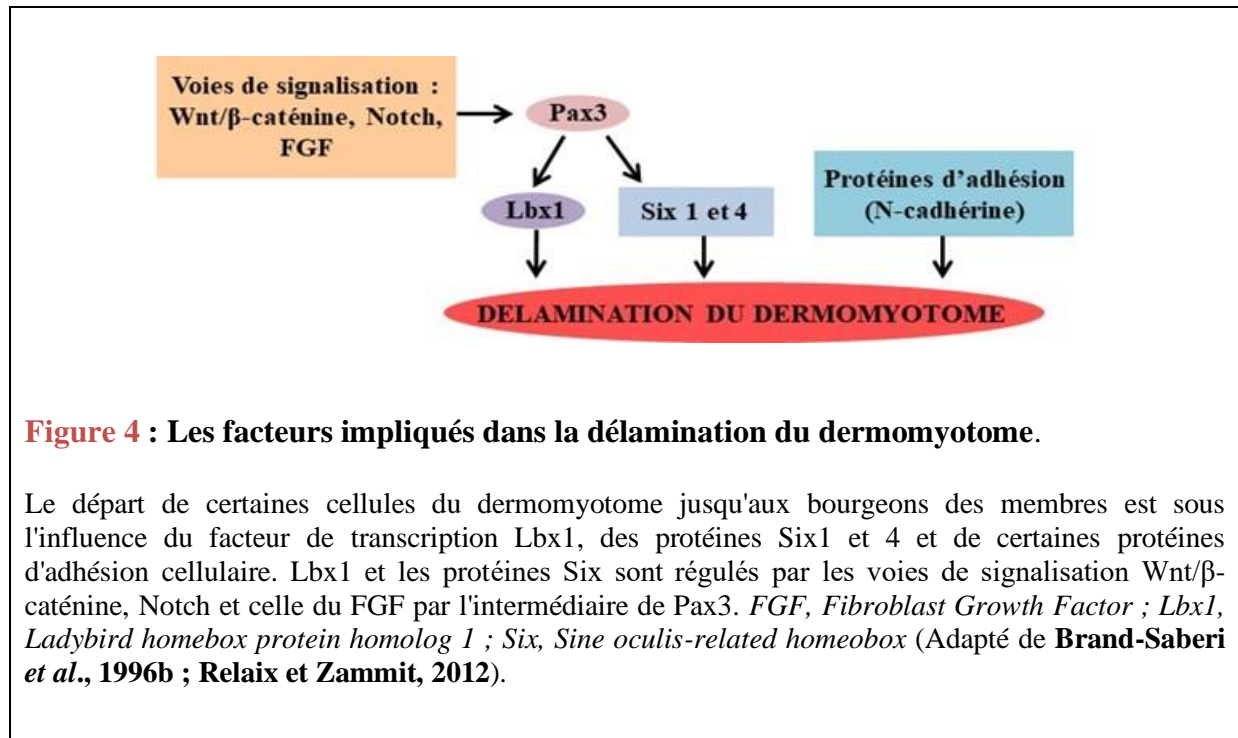
**Figure 3 :** La formation embryonnaire du muscle squelettique débute par la formation des somites.

La formation du muscle squelettique débute avec la segmentation du mésoderme paraxial en somites durant la somitogenèse. La partie dorsale des somites, ou dermomyotome, participe à la formation du derme et des muscles squelettiques. Les cellules du dermomyotome hypaxial subissent une délamination et commencent leur migration jusqu'au lieu de formation des bourgeons des membres. Ces cellules activent leur programme myogénique après leur détermination puis prolifèrent, se différencient et fusionnent pour former les myofibres (**Buckingham et al., 2003**).

cartilagineux. Le dermomyotome, domaine dorsal des somites, formera les muscles du dos, des membres et du tronc. Les cellules du dermomyotome subissent une délamination, c'est-à-dire une séparation en deux feuillets. Les cellules de l'un des feuillets migrent vers les bourgeons des membres où elles se différencieront (**Figure 3**). Après la migration des cellules progénitrices myogéniques depuis le dermomyotome, la phase de différenciation myogénique terminale commence. Ce processus est équivalent à celui ayant lieu durant la myogenèse post-natale et sera donc détaillé dans la deuxième partie de ce chapitre.

Les différentes étapes de la formation du muscle squelettique sont sous la dépendance de plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription. Les voies de Notch, Wnt/ $\beta$ -caténine et du FGF (Fibroblast Growth Factor) sont impliquées dans le processus de segmentation (**Krol et al., 2011**). Ainsi, le tube neural et la notochorde activent les protéines Wnt et Shh (Sonic hedgehog) respectivement, identifiées comme des activateurs de la myogenèse (**Tajbakhsh et Buckingham, 2000**). L'expression des protéines Wnt1, 3a et 4 notamment entraîne l'activation de gènes codant des marqueurs dorsaux myogéniques (**Wagner et al., 2000**). A l'inverse, Notch constitue un régulateur négatif de la myogenèse. Il a en effet été montré qu'il pourrait être un antagoniste de la voie Wnt (**De Strooper et Annaert, 2001**) ainsi qu'un inhibiteur de l'expression du MRF (Myogenic Regulatory Factor) *MyoD* *in vivo* dans des somites d'embryons de poulet (**Hirsinger et al., 2001**).

Les trois voies précédemment citées sont aussi impliquées dans la polarisation des somites via l'expression de facteurs de transcription essentiels à l'établissement de la myogenèse tel que *Pax3* et *Pax7* (**Jostes et al., 1990**). *Pax3* est exprimé dans les lèvres dorsales et ventrales du dermomyotome, tandis que *Pax7* est exprimé dans sa partie ventrale (**Kassar-Duchossoy et al., 2005**). Les embryons murins *Pax3*<sup>-/-</sup> et *Pax7*<sup>-/-</sup> montrent un arrêt total de la myogenèse malgré une formation normale du myotome. Ces cellules finissent par mourir ou par s'engager dans un lignage non musculaire puisqu'elles ne peuvent activer les MRF *Myf5* ou *MyoD* (**Relaix et al., 2005**). Un défaut de *Pax3* ne peut être compensé par *Pax7* durant l'embryogenèse et durant le développement musculaire post-natal (**Relaix et al., 2004**). A l'inverse, avant la naissance, *Pax7* n'est pas indispensable à la myogenèse grâce au phénomène de compensation par *Pax3*. La migration des cellules du dermomyotome est régie par différents facteurs de transcription à homéodomaine Lbx1 (Ladybird homeobox protein homolog 1) dépendant de *Pax3* (**Mennerich et al., 1998**), de *Pax7* (**Watanabe et al., 2007**) ainsi que des protéines d'adhésion cellulaire comme la N-cadhérine (**Brand-Saberi et al., 1996a**). Il est essentiel de citer ici les gènes de la famille *Six* (Sine oculis-related homeobox)

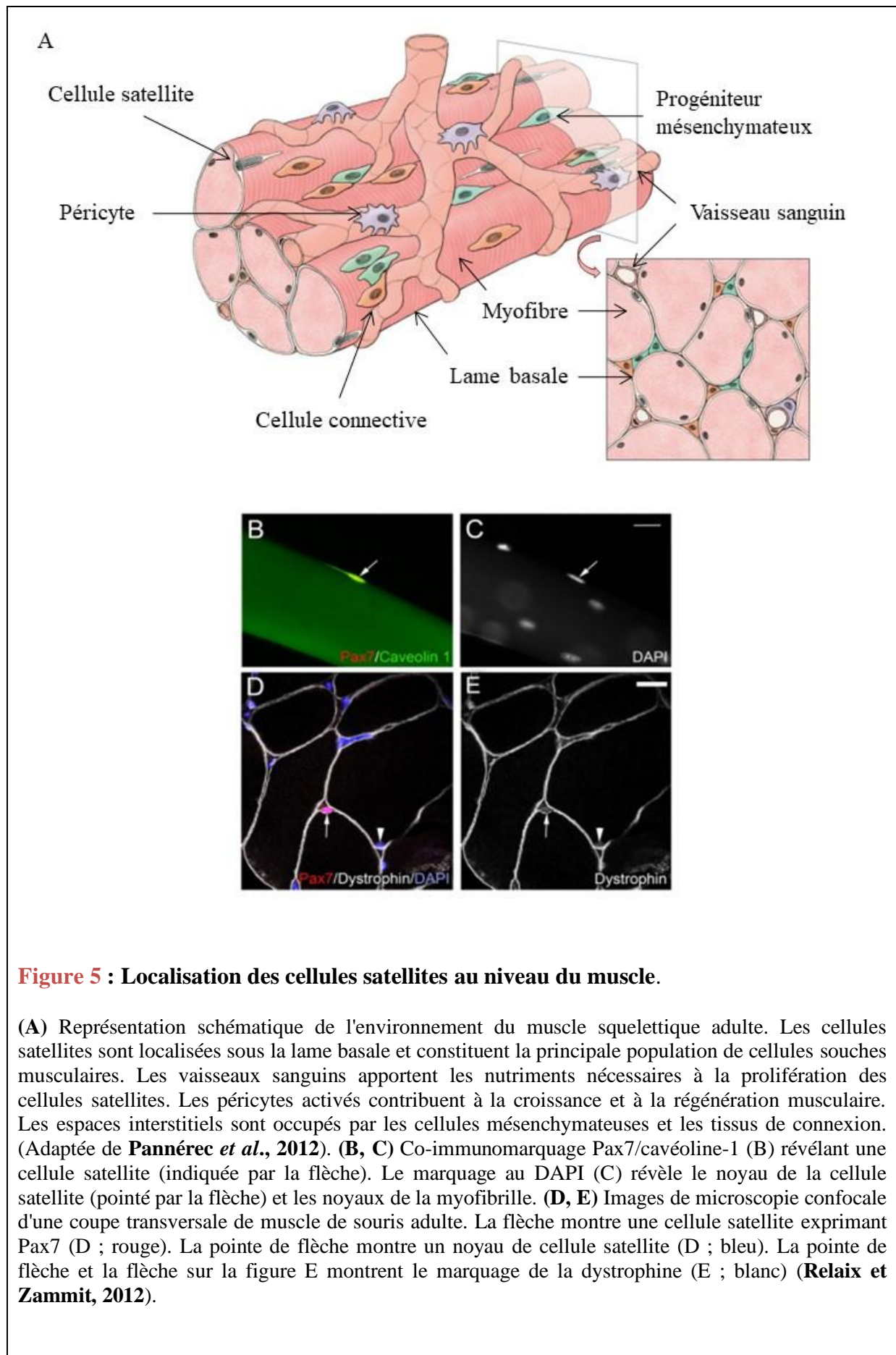


**Figure 4 :** Les facteurs impliqués dans la délamination du dermomyotome.

Le départ de certaines cellules du dermomyotome jusqu'aux bourgeons des membres est sous l'influence du facteur de transcription Lbx1, des protéines Six1 et 4 et de certaines protéines d'adhésion cellulaire. Lbx1 et les protéines Six sont régulés par les voies de signalisation Wnt/β-caténine, Notch et celle du FGF par l'intermédiaire de Pax3. *FGF*, *Fibroblast Growth Factor* ; *Lbx1*, *Ladybird homeobox protein homolog 1* ; *Six*, *Sine oculis-related homeobox* (Adapté de **Brand-Saberi et al., 1996b** ; **Relaix et Zammit, 2012**).

et plus particulièrement *Six1* et *Six4* exprimés dans le dermomyotome et qui assurent un rôle majeur dans la myogenèse du muscle squelettique. Un double knockdown murin pour *Six1* et *Six4* altère l'expression de certains MRF et empêche la présence de muscles dans les bourgeons des membres (Grifone *et al.*, 2005) (Figure 4).

En résumé, la myogenèse embryonnaire débute par la migration des précurseurs myogéniques depuis le dermomyotome puis leur prolifération et leur différenciation en myocytes. Ce phénomène s'achève par la fusion des myocytes en myotubes - cellules multinucléées - qui eux-mêmes fusionneront pour donner naissance aux fibres musculaires squelettiques.



## II- Différenciation et fusion myoblastique adulte dans un contexte de régénération musculaire

### 1) Activation des cellules satellites et différenciation

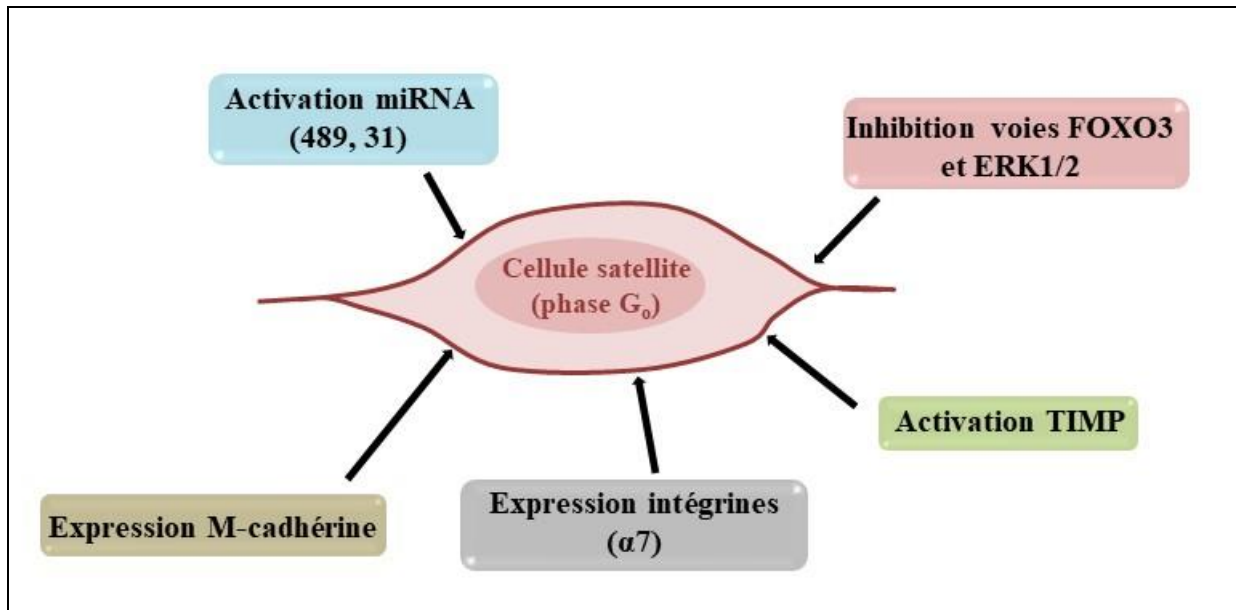
A la fin du développement fœtal murin, pendant que la plupart des cellules  $Pax3^+/Pax7^+$  expriment les MRF et démarrent leur programme myogénique, une faible partie d'entre elles prolifèrent sans exprimer les différents MRF (**Kassar-Duchossoy et al., 2005 ; Relaix et al., 2005**) et s'alignent le long des myotubes néoformés. Ces cellules prennent alors le nom de cellules satellites (**Mauro, 1961**). Les cellules satellites occupent une place indispensable dans la régénération du muscle squelettique, elles sont considérées comme les cellules souches musculaires à partir desquelles ont lieu la prolifération des myoblastes, leur différenciation en myocytes et la fusion myogénique (**Snow, 1977**).

#### a) Les cellules satellites

Localisées sous la lame basale de la fibre (**Figure 5**), les cellules satellites ne contribuent pas seulement à la régénération musculaire mais possèdent aussi la capacité d'auto-renouvellement (**Collins et al., 2005**).

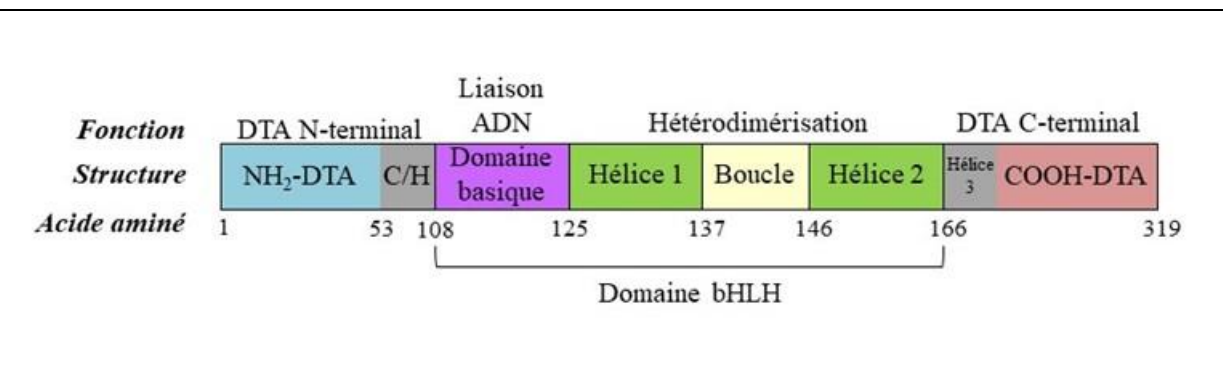
Les cellules satellites représentent 2 à 10% du nombre total de cellules myogéniques (**Rosenblatt et Parry, 1992**). Les cellules satellites ont besoin d'un environnement particulier, c'est-à-dire un réseau sanguin à proximité, pour accomplir leurs fonctions, la notion de niche de cellules satellites apparaît alors ; 80 à 90% d'entre elles sont situées à moins de quelques micromètres d'un vaisseau sanguin (**Figure 5**) (**Christov et al., 2007**). Le nombre de cellules satellites décroît après la naissance. Durant les premiers jours de vie du souriceau, la majeure partie des cellules satellites prolifèrent intensément pour engendrer de nombreux myoblastes qui fusionnent avec les fibres préexistantes. Le reste des cellules satellites entrent en quiescence, elles seront activées si besoin lors de la régénération musculaire (**White et al., 2010**).

Les cellules satellites sont aussi reconnaissables par leurs caractéristiques cellulaires, par exemple, le ratio élevé noyau/cytoplasme. De plus, de nombreuses protéines sont des marqueurs des cellules satellites : les protéines nucléaires Pax3 et Pax7 citées précédemment (**Seale et al., 2000**), des protéines membranaires telles que la M-cadhérine, l'intégrine  $\alpha7$ ,



**Figure 6 :** Acteurs et voies de signalisation impliqués dans le processus de maintien de la quiescence des cellules satellites.

Lorsque le muscle squelettique est au repos, les cellules satellites sont en quiescence. Le maintien de cet état est possible grâce à différents facteurs : l'activation de l'expression de la protéine Rb, régulateur essentiel du cycle cellulaire, l'activation de miRNA qui bloquent la transcription de certains MRF, l'inhibition de voies de signalisation telles que la voie FOXO3 et ERK1/2, l'activation de molécules d'adhésion comme la M-cadhérine et l'intégrine  $\alpha 7$ . *ERK1/2*, *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* ; *FOXO3*, *Forkhead box protein O3* ; *TIMP*, *tissue inhibitor metalloproteinase*.



**Figure 7 :** Structure de MyoD, un représentant de la famille des MRF.

Comme les autres facteurs de transcription de cette famille, MyoD possède trois domaines conservés : un premier domaine de transactivation en N-terminal, le domaine bHLH dans la région centrale accompagné de deux hélices  $\alpha$  (1 et 2), et un deuxième domaine de transactivation dans la région carboxy-terminale. Le domaine C/H et l'hélice 3 participent à la fonction de transactivation. *bHLH*, *basic helix-loop-helix* ; *C/H*, *domaine riche en cytéine et histidine* ; *DTA*, *domaine de transactivation* (Adapté de **Singh et Dilworth, 2013**).



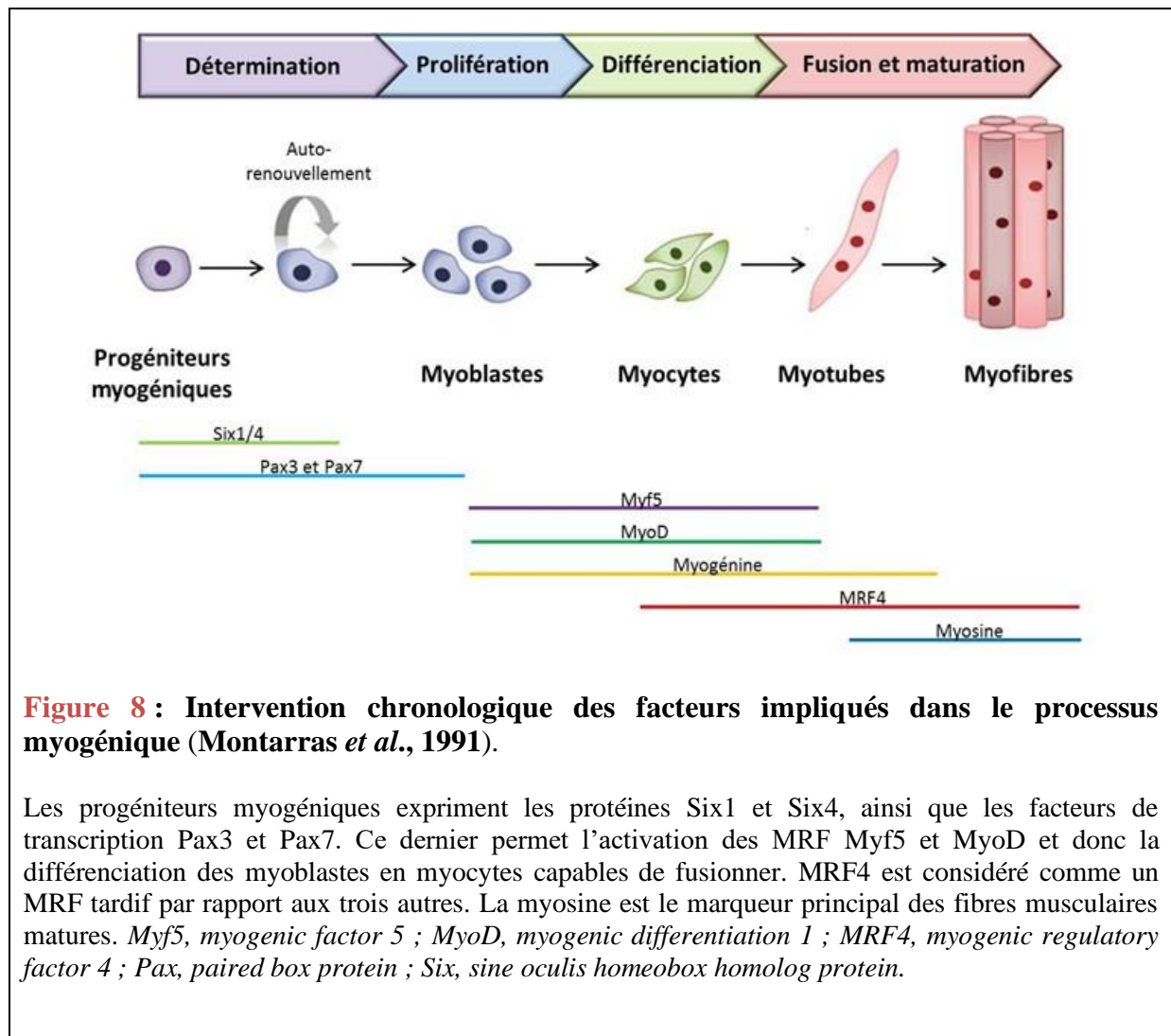
le récepteur à tyrosine kinase c-Met, les Syndécanes-3 et 4 et la NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule) (**Fukada et al., 2007 ; Gnocchi et al., 2009**).

Dans le muscle adulte au repos, les cellules satellites sont dans un état de quiescence caractérisé par un métabolisme et une synthèse d'ARN ralentis. Le microenvironnement cellulaire ainsi que la position des cellules satellites entre la lame basale et la membrane des fibres sont impliqués dans la régulation de leur quiescence. En effet, les protéines M-cadhérines (**Irintchev et al., 1994**), des molécules d'adhésion et l'expression accrue des TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) (**Pallafacchina et al., 2010**) favorisent l'intégrité de cette niche cellulaire. Des voies de signalisation impliquées dans la prolifération sont réprimées dans les cellules satellites en quiescence telles que FOXO3 et ERK1/2 via Sprouty1 (**Gopinath et al., 2014 ; Shea et al., 2010**) (**Figure 6**).

#### ***b) La famille des MRF***

L'étude de ces facteurs de transcription spécifiques à la myogenèse a débuté il y a environ 30 ans avec la découverte de *MyoD1* (Myogenic Differentiation 1) par l'équipe de Davis. Elle démontre que *MyoD1* a la capacité d'engager des fibroblastes, et d'autres cellules différenciées, vers un lignage musculaire squelettique. *MyoD1* est donc capable d'activer une transdifférenciation, c'est-à-dire la reprogrammation d'un type cellulaire (**Davis et al., 1987**). La *myogénine* ou *MyoG* active la différenciation des myoblastes qui fusionnent pour constituer des myotubes (**Brunetti et Goldfine, 1990**). Des homologies de séquence entre *MyoD* et *MyoG* permettent de mettre en évidence deux autres MRF, à savoir *Myf5* (Myogenic Factor 5) (**Braun et al., 1989**) et *Mrf4* (Myogenic regulatory factor 4) ou *MYF6* chez l'Homme (**Rhodes et Konieczny, 1989**). Ces quatre facteurs de transcription partagent la caractéristique de pouvoir activer la myogenèse dans des cellules différenciées (**Weintraub et al., 1991**). Les MRF sont impliqués dans l'homéostasie musculaire adulte via le contrôle des cellules satellites et dans la régénération musculaire en réponse à une atteinte nerveuse ou une atrophie du muscle (**Legerlotz et Smith, 2008**).

Les quatre MRF possèdent une structure protéique semblable, ce sont des protéines à hélice-boucle-hélice ou bHLH (**Figure 7**). Il s'agit de facteurs de transcription de la classe II contenant trois domaines conservés : un domaine de transactivation avec une zone riche en histidines et cystéines ; la région centrale contient le domaine bHLH et deux domaines en hélice  $\alpha$  ; un dernier domaine de transactivation, ne contenant aucune histidine ou cystéine,












dans la région carboxy-terminale (**Tapscott et al., 1988**). Le domaine basique se lie directement à la séquence consensus CANNTG des « E-box » ; néanmoins, seulement des séquences très spécifiques permettent l'activation de la transcription, par exemple CAGGTG pour *MyoD* (**Fong et al., 2012**). Les domaines HLH permettent l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de ces MRF avec d'autres protéines bHLH de classe I telles que E12 ou E47 formant ainsi des complexes protéines-ADN stables (**Blackwell et Weintraub, 1990**).

*Myf5* est le premier MRF à contribuer au maintien des cellules satellites. Si ces cellules possèdent au moins un seul allèle *Myf5* (*Myf5*<sup>+/-</sup>), elles sont aptes à la myogenèse et sur-expriment *MyoD* et *MyoG* (**Gayraud-Morel et al., 2012**). Les cellules satellites *MyoD*<sup>-/-</sup> ne peuvent réguler la myogénine et *Mrf4*, et présentent des défauts de différenciation et donc de régénération musculaire (**Cornelison et al., 2000**). Les souris adultes *MyoD*<sup>-</sup> possèdent ainsi plus de cellules satellites quiescentes que les souris *MyoD*<sup>+</sup> (**Macharia et al., 2010**). Les doubles mutants *Myf5*<sup>-</sup>/*MyoD*<sup>-</sup> n'ont pas de myoblaste, ni de cellule progénitrice musculaire (**Kassar-Duchossoy et al., 2004**). Les souris *MyoG*<sup>-/-</sup> présentent quant à elles des myoblastes mais qui ne se différencient pas (**Venuti et al., 1995**). Le knockdown de *Mrf4* chez des rats adultes entraîne une hypertrophie myofibrillaire, augmente la synthèse protéique et permet l'expression des gènes cibles de MEF2 (Myocytes enhancer factor 2) (**Moretti et al., 2016**).

*MyoD* et les autres MRF sont donc des facteurs clés de la progression myogénique et de la différenciation intervenant selon un ordre chronologique précis (**Figure 8**). *MyoD* induit la différenciation en activant des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21 et p57 (**Halevy et al., 1995 ; Reynaud et al., 2000**) ainsi que la myogénine (**Hollenberg et al., 1993**). Cette dernière cible des gènes impliqués dans la contractilité du muscle comme par exemple les chaînes légère et lourde de la myosine, la créatine kinase musculaire, l' $\alpha$ -actinine, la troponine et des canaux calciques voltage-dépendants. De la même façon, *Mrf4* est impliqué dans la différenciation tardive (**Rawls et al., 1998**).

**Tableau 2** : Caractéristiques et structures protéiques des membres de la famille des gènes *Pax*.

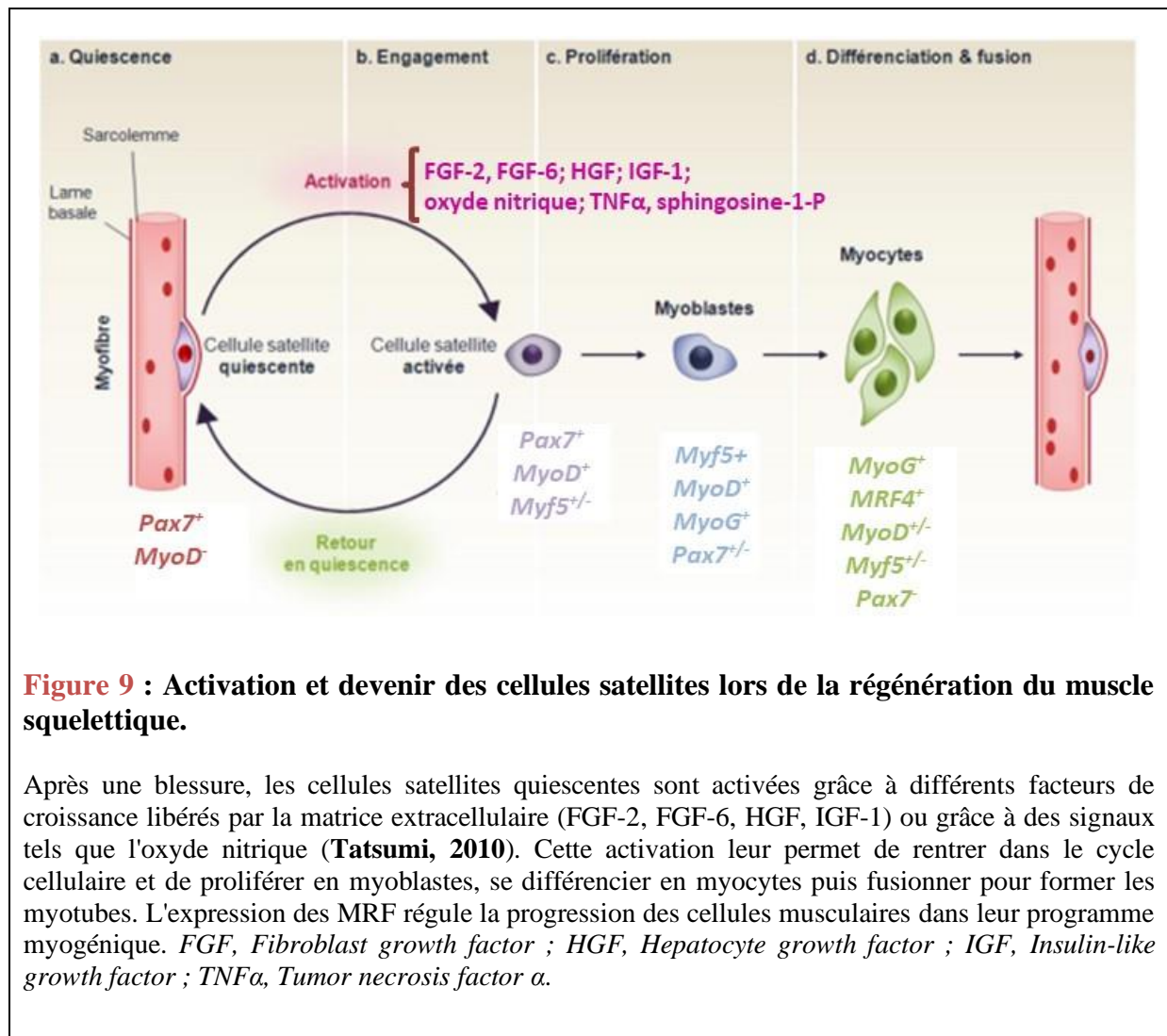
Gène	Localisation chromosomique	Structure protéique	Tissus où s'exprime le gène
<i>Pax-1</i>	20p11	N PD Oct HD C 	Sclérotome, thymus
<i>Pax-9</i>	14q12-q13		Sclérotome, mésenchyme périvertébral
<i>Pax-2</i>	10p25		Sphère urogénitale, SNC, yeux, oreille interne
<i>Pax-5</i>	9p13		Précurseurs des cellules B, SNC
<i>Pax-8</i>	2q12-q14		Thyroïde, rein, SNC
<i>Pax-3</i>	2q35		Dermomyotome, crête neurale, muscles, SNC
<i>Pax-7</i>	1p36		Dermomyotome, crête neurale, muscles, SNC
<i>Pax-4</i>	7q32		Pancréas
<i>Pax-6</i>	11p13		Yeux, pancréas, SNC

Ce tableau regroupe les gènes *Pax*, leur localisation chromosomique chez l'Homme, la structure des protéines correspondantes et leurs principaux tissus d'expression. Sur les structures protéiques, les formes ovales rouges représentent les hélices  $\alpha$  et les cercles rouges les octapeptides. Les rectangles de couleur sont les domaines « paired-type » et les homéodomains. Les gènes sont regroupés selon les quatre sous-groupes définis précédemment. *C*, extrémité C-terminale ; *HD*, Homéodomaine ; *N*, extrémité N-terminale ; *Oct*, Octapeptide ; *PD*, « Paired-type » domaine ; *SNC*, Système nerveux central (Adapté de **Wehr et Gruss, 1996**).

### *c) Les protéines Pax*

Neuf gènes, numérotés de 1 à 9, composent cette famille (**Gruss et Walther, 1992**). Ces gènes codent des protéines réparties en quatre sous-groupes de I à IV (**Tableau 2**) établis selon la présence ou l'absence d'un octapeptide et selon la présence d'un homéodomaine tronqué ou complet (**Noll, 1993**). Les protéines Pax (Paired Box) sont également caractérisées par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de 128 acides aminés. Plusieurs protéines Pax contiennent un deuxième domaine de liaison appelé homéodomaine « paired-type » (**Apuzzo et Gros, 2007**). Enfin, le domaine de transactivation, riche en prolines, thréonines et sérines situé à l'extrémité C-terminale de la protéine PAX humaine, possède un rôle régulateur de la transcription. La famille des facteurs de transcription Pax murins est impliquée dans le développement précoce embryonnaire, et dans la mise en place spécifique des différents tissus tels que le tube neural et les somites.

*Pax3* et *Pax7* sont particulièrement impliqués dans le processus de myogenèse. Durant la régénération musculaire, *Pax7* possède différentes cibles géniques au sein des cellules satellites. En plus de l'activation de *MyoD* via un site spécifique présent dans le promoteur de ce dernier (**Hu et al., 2008**), *Pax7* peut se fixer à un élément situé en amont du promoteur de *Myf5* (**Soleimani et al., 2012**). Il a été démontré que *Pax7* se fixe directement sur *Id3* (Inhibitor of DNA binding), facteur pouvant prévenir l'établissement de la myogenèse dans les cellules satellites en inhibant l'expression des gènes codant pour les protéines myogéniques de type hélice-boucle-hélice comme les MRF cités précédemment (**Kumar et al., 2009**). Plus récemment, une étude menée sur des précurseurs myogéniques, dérivés de cellules souches pluripotentes et exprimant *Pax7*, a permis d'identifier des marqueurs exprimés à la surface de ces cellules : la protéine d'adhésion intercellulaire CD54, l'intégrine  $\alpha9\beta1$  et le Syndécan-2 ; les cellules  $CD54^+\alpha9\beta1^+SDC2^+$  ont été identifiées comme impliquées dans la régénération musculaire *in vivo* (**Magli et al., 2017**). Néanmoins, le rôle de *Pax7* dans les cellules satellites est sujet à controverse. L'équipe de Lepper a prouvé que dans des mutants conditionnels adultes pour *Pax7*, les cellules satellites demeurent intactes et la régénération a lieu. L'inactivation conjointe de *Pax7* et *Pax3* aboutit au même résultat (**Lepper et al., 2009**).



**Figure 9 : Activation et devenir des cellules satellites lors de la régénération du muscle squelettique.**

Après une blessure, les cellules satellites quiescentes sont activées grâce à différents facteurs de croissance libérés par la matrice extracellulaire (FGF-2, FGF-6, HGF, IGF-1) ou grâce à des signaux tels que l'oxyde nitrique (Tatsumi, 2010). Cette activation leur permet de rentrer dans le cycle cellulaire et de proliférer en myoblastes, se différencier en myocytes puis fusionner pour former les myotubes. L'expression des MRF régule la progression des cellules musculaires dans leur programme myogénique. *FGF*, Fibroblast growth factor ; *HGF*, Hepatocyte growth factor ; *IGF*, Insulin-like growth factor ; *TNF $\alpha$* , Tumor necrosis factor  $\alpha$ .

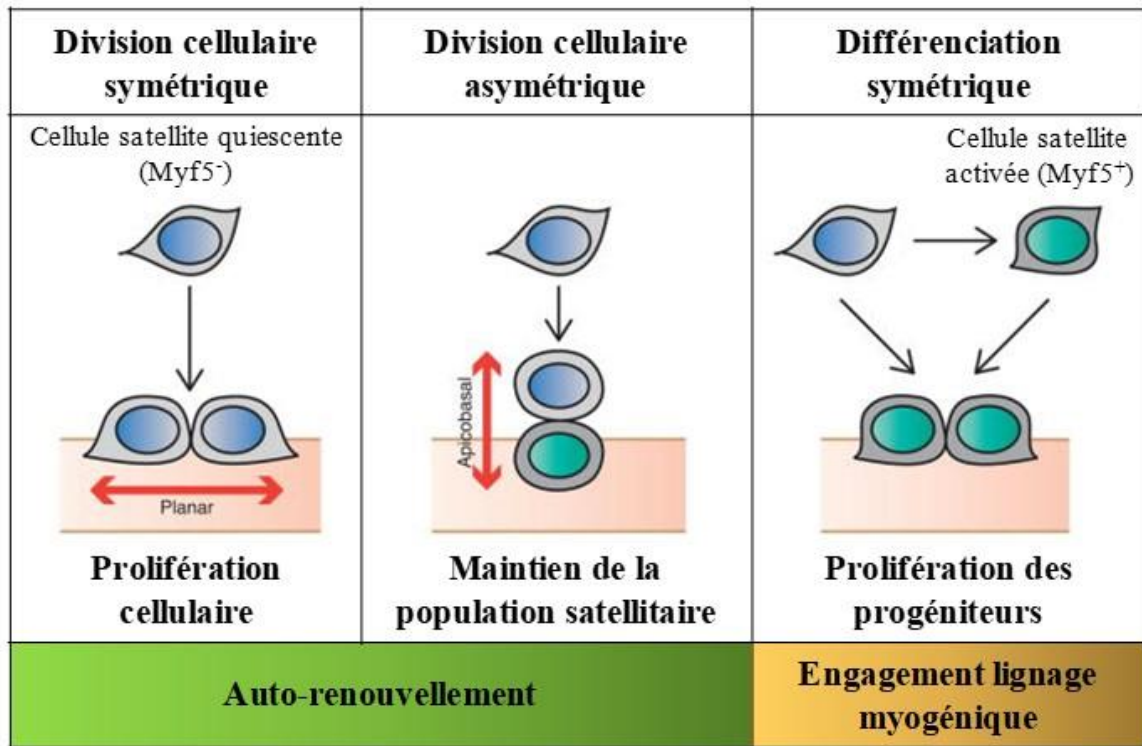
#### ***d) Engagement des cellules satellites***

Dans des conditions d'activation spécifiques, les cellules satellites quiescentes, considérées comme les cellules souches musculaires, peuvent rapidement être activées et entrer à nouveau dans le cycle cellulaire pour proliférer, se différencier en myocytes et fusionner pour générer les myotubes. Une petite partie des cellules satellites réactivées sort à nouveau du cycle cellulaire et retourne en quiescence pour maintenir le pool de cellules satellites et assurer une éventuelle nouvelle régénération. Néanmoins, le potentiel régénératif de ces cellules peut être entravé en conditions pathologiques comme les dystrophies musculaires ou la fonte du muscle liée à l'âge (**Bentzinger *et al.*, 2013**).

#### **- Activation des cellules satellites**

Parmi les facteurs de croissance libérés par la matrice extracellulaire à la suite d'une lésion musculaire, certains d'entre eux dont le FGF2 et le FGF6 (Fibroblast Growth Factor 2 et 6), interagissent avec les cellules satellites afin de stimuler leur activation (**Figure 9**). Les récepteurs aux FGF sont surexprimés à la surface des cellules satellites activées par rapport aux cellules quiescentes (**Kästner *et al.*, 2000 ; Floss *et al.*, 1997**). Un autre facteur de croissance impliqué dans l'activation des cellules satellites et libéré à la suite d'une blessure est le HGF (Hepatocyte Growth Factor) (**Tatsumi *et al.*, 1998**). L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) est également un acteur de l'activation des cellules satellites puisque l'expression d'un transgène *igf1* dans des muscles d'embryon murin permet une hypertrophie des myocytes et ainsi une augmentation de la masse musculaire après la naissance (**Musaro *et al.*, 2001**).

L'oxyde nitrique, molécule instantanément libérée après une atteinte tissulaire, stimule l'expression des MMP (Métalloprotéinase matricielle) et augmente la libération des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice, ce qui favorise l'activation des cellules satellites (**Anderson, 2000**). Une cytokine, le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), est aussi rapidement libérée suite à une blessure. Lorsque du TNF- $\alpha$  est injecté dans des muscles de souris adultes, les cellules satellites sont activées et entrent dans le cycle cellulaire (**Li, 2003**).



**Figure 10** : Types de divisions des cellules satellites.

Les cellules satellites sont capables d'auto-renouvellement grâce à une division symétrique ou asymétrique. Sur la figure, les cellules bleues correspondent aux cellules satellites (Myf5<sup>-</sup>) et les cellules vertes sont les cellules satellites progénitrices musculaires (Myf5<sup>+</sup>). La division symétrique dans le sens longitudinal génère deux cellules satellites filles strictement identiques. La division asymétrique selon l'axe apico-basal donne naissance à une cellule souche satellite et une cellule progénitrice musculaire (Myf5<sup>+</sup>). Ces dernières s'engagent dans le programme myogénique et augmentent ainsi la population cellulaire progénitrice qui participera à la régénération musculaire. (Adapté de **Chang et al., 2016**).



### - L'auto-renouvellement de la population satellitaire

Les cellules *Myf5*<sup>-</sup> sont capables d'auto-renouvellement par une division symétrique ou asymétrique. La division symétrique a lieu lorsque la cellule satellite est parallèle à la fibre musculaire et engendre deux cellules souches filles identiques. La division asymétrique, selon un plan baso-latéral, produit une cellule souche fille et une autre cellule fille engagée dans le programme myogénique (**Kuang *et al.*, 2007**) (**Figure 10**).

Des expériences de transplantation illustrent parfaitement cette capacité d'auto-renouvellement. Lorsqu'une myofibre intacte contenant peu de cellules satellites est greffée sur un muscle, ses cellules satellites peuvent engendrer jusqu'à une centaine de nouvelles fibres (**Collins *et al.*, 2005**). Les interactions physiques avec le microenvironnement cellulaire sont indispensables au bon déroulement de l'auto-renouvellement des cellules satellites. Le collagène de type VI, composant de la matrice extracellulaire, permet l'auto-renouvellement des cellules satellites. Une absence de collagène VI chez des souris *Col6a1*<sup>-/-</sup> entraîne une régénération musculaire altérée et amoindrit la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites (**Urciuolo *et al.*, 2013**).

Ajoutée à l'expansion symétrique des cellules satellites, l'hypothèse du retour des cellules différenciées à un état non différencié a été émise. Cette supposition a d'abord été vérifiée *in vitro* grâce à l'utilisation de myoblastes murins cultivés dans un milieu de différenciation pauvre en sérum. Pendant que la plupart des myoblastes se différencient, une petite population de myoblastes appelés « cellules de réserve » est incapable de se différencier et montre des taux d'expression de *MyoD* et *Myf5* réduits (**Yoshida *et al.*, 1998**).

### - Migration des cellules satellites activées

Lors d'une atteinte musculaire et après l'activation des cellules satellites, celles-ci migrent jusqu'à la lésion (**Schultz *et al.*, 1985**). Des analyses par vidéomicroscopie de cellules satellites et de fibres isolées ont montré la forte capacité migratoire des cellules satellites activées (**Siegel *et al.*, 2009**).

La liaison des cellules myogéniques à la matrice est cruciale pour leur migration. La fibronectine et les collagènes sont capables d'augmenter la migration *in vitro*, cependant la laminine est considérée comme l'inducteur majeur de la migration des cellules satellites (**Siegel *et al.*, 2009**). La sécrétion de différentes MMP par les cellules myogéniques est aussi



importante pour faciliter leur migration : MMP-1, 2 et 9 dégradent les collagènes I, II, III et IV (Kaar *et al.*, 2008 ; Kherif *et al.*, 1999). Des molécules solubles telles que TGF- $\beta$ , HGF, FGF-2 et FGF-6, libérées après un dommage musculaire, sont indispensables pour conduire les cellules satellites activées jusqu'au site lésé ; elles agissent par chimiotactisme (Bischoff, 1997 ; Neuhaus *et al.*, 2003 ; Siegel *et al.*, 2009).

## 2) Prolifération, différenciation et fusion

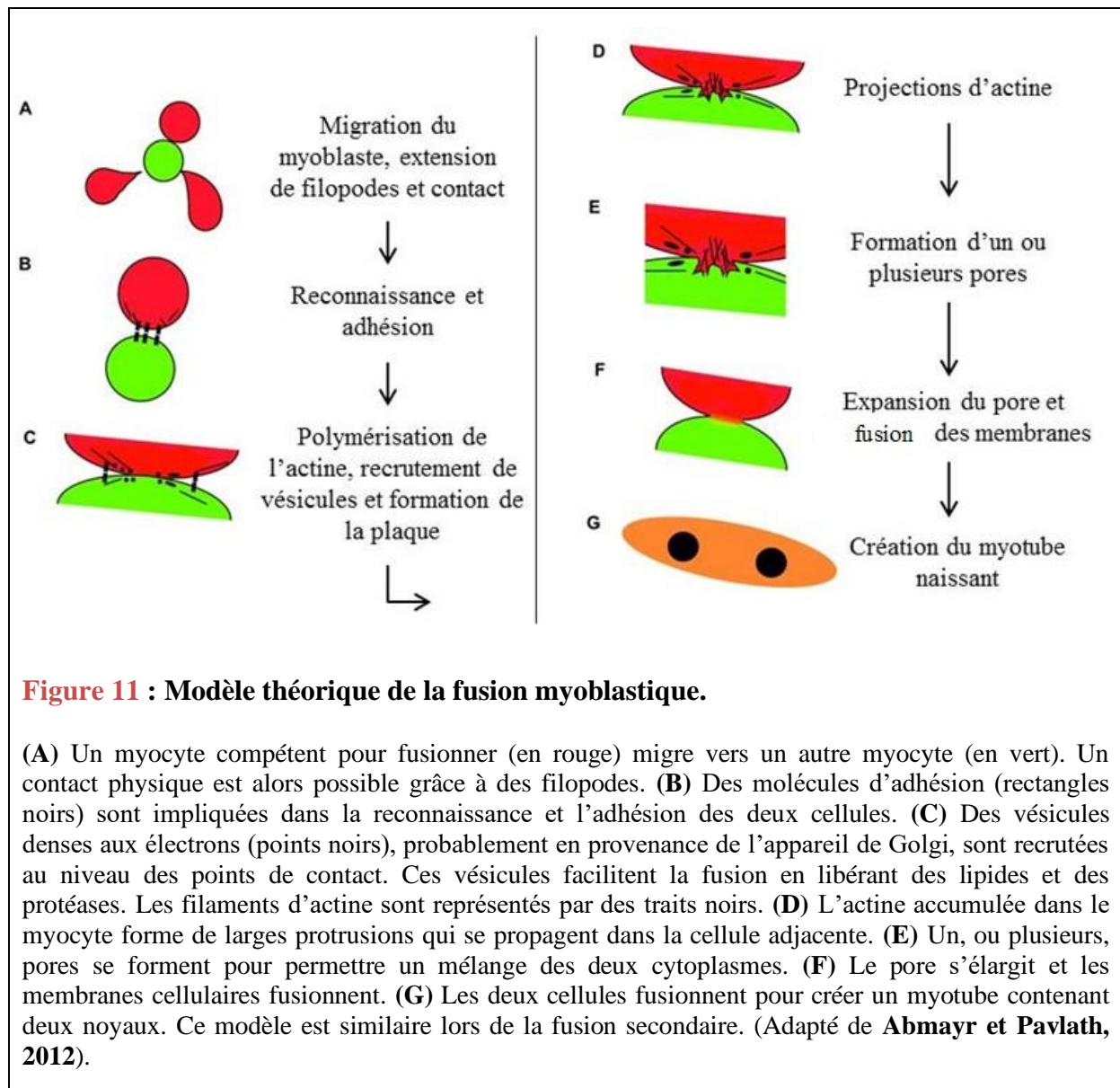
### a) Prolifération myoblastique

Les progéniteurs myogéniques activés réalisent plusieurs cycles de prolifération afin d'accroître le pool de cellules satellites nécessaires à la réparation tissulaire avant l'entrée en différenciation. La majorité des facteurs de croissance est connue pour activer les cellules satellites et faciliter leur division cellulaire. L'addition de FGF2 au milieu de culture de cellules satellites extraites de muscle de rat adulte est utilisée pour stimuler la prolifération myogénique (Yablonka-Reuveni et Rivera, 1997). L'IGF-1 joue aussi un rôle dans l'avancement des cellules satellites au travers du cycle cellulaire. La prolifération de cellules satellites est restaurée dans des muscles de rats âgés incubés avec l'IGF-1 (Chakravarthy *et al.*, 2000).

A la suite d'un dommage musculaire, des cytokines pro-inflammatoires sont libérées. Cette libération massive d'IL-6, IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  coïncide avec le début de la prolifération des myoblastes (Tidball et Villalta, 2010). L'IL-6 peut être synthétisée par les myoblastes ou les myofibres et agit de manière autocrine ou paracrine pour activer la prolifération myoblastique (Cantini *et al.*, 1995). L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  stimulent la production d'IL-6 pendant la phase précoce de la régénération (Luo *et al.*, 2003). Ces facteurs peuvent aussi directement agir sur la prolifération via la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ -B) (Otis *et al.*, 2014).

### b) Différenciation myogénique

Après plusieurs cycles de prolifération, les cellules myogéniques quittent le cycle cellulaire et démarrent leur différenciation en myocytes. Divers facteurs contrôlent le passage de l'état prolifératif à la différenciation dont les MRF décrits précédemment. Plusieurs voies de signalisation régulent l'entrée en différenciation des myoblastes. Le chapitre 2 de cet exposé sera consacré à l'étude de ces voies.



### *c) Fusion des myocytes*

A la suite de la différenciation, les cellules myogéniques démarrent la fusion, processus modifiant fortement la morphologie et les fonctions cellulaires. La fusion des myocytes a largement été étudiée chez la drosophile en raison de la facilité d'observation de ce phénomène. Chez la souris, des molécules d'adhésion telles que la néphrine, l'intégrine  $\beta 1$ , la M-cadhérine et la N-cadhérine sont impliquées dans la fusion (**Cifuentes-Dias et al., 1995 ; Sohn et al., 2009**).

Le processus de fusion peut être séparé en deux phases : la fusion précoce ou primaire et la fusion tardive ou secondaire (**Figure 11**). La première correspond à un contact myocyte-myocyte et à leur fusion, tandis que la deuxième se définit comme la fusion des myocytes avec des myotubes néoformés. Bien que partageant des caractéristiques communes, ces deux modes de fusion impliquent différentes molécules d'adhésion et voies de signalisation. La fusion primaire fait intervenir notamment les intégrines  $\beta 1$ . Les myocytes déficients pour ces intégrines adhèrent les uns avec les autres mais ne fusionnent pas (**Schwander et al., 2003**). D'autre part, des protéines comme la filamine C sont impliquées dans la fusion myocyte-myotube. Un knockdown *in vitro* du gène codant la filamine C dans des myoblastes en différenciation engendre la formation de petits myotubes ronds avec un nombre limité de noyaux par myotube (**Dalkilic et al., 2006**). C'est aussi durant la fusion secondaire que le facteur de transcription NFATc2 (Nuclear factor of activated T-cells) est surexprimé et contrôle l'expression de l'IL-4. Les myoblastes déficients pour l'IL-4 ou son récepteur sont capables de fusionner mais forment des myotubes plus petits possédant peu de noyaux. Les myotubes néoformés secrètent l'IL-4 afin de recruter davantage de myocytes et réaliser la fusion secondaire (**Horsley et al., 2003**).

Une autre protéine transmembranaire, spécifique du muscle et identifiée depuis quelques années, occupe un rôle central dans le processus de fusion myoblastique des Mammifères. Myomaker est exprimée lors de la phase de fusion puis son expression diminue (**Millay et al., 2013**). L'activation de *myomaker* est possible grâce à la fixation de MyoD et MyoG sur les « E-box » de son promoteur proximal (**Millay et al., 2014**).

**Tableau 3 : Synthèse des principaux miRNA impliqués dans la myogenèse et leurs gènes cibles** (Adapté de Wang *et al.*, 2018).

miRNA	Expression muscle spécifique	Phase d'activation	Gènes cibles
<b>miR-1</b>	Oui	Différenciation	<i>Pax3, Pax7</i>
<b>miR-31</b>	Non	Prolifération	<i>Myf5</i>
<b>miR-133</b>	Oui	Prolifération	<i>SRF</i>
<b>miR-140-3p</b>	Oui	Fusion	<i>Myomaker</i>
<b>miR-152</b>	Non	Différenciation	<i>E2F3</i>
<b>miR-206</b>	Oui	Différenciation	<i>Pax3, Pax7</i>
<b>miR-221 miR-222</b>	Non	Prolifération	<i>p27, MyoG</i>
<b>miR-486</b>	Non	Différenciation	<i>Pax7</i>
<b>miR-491</b>	Oui	Fusion	<i>Myomaker</i>

#### ***d) Maturation des myotubes et hypertrophie***

Les myotubes naissants subissent une étape de maturation pour former les myofibres matures et fonctionnelles. Cette étape de maturation correspond à l'hypertrophie physiologique du muscle squelettique définie comme l'élargissement de chaque myofibre. Au cours des trois premières semaines de vie, des cellules satellites fusionnent avec les fibres néoformées, augmentant ainsi le nombre de noyaux par myofibre. Le nombre de noyaux dans les myofibres et dans les cellules satellites est donc établi dès la troisième semaine de vie chez la souris (**White *et al.*, 2010**).

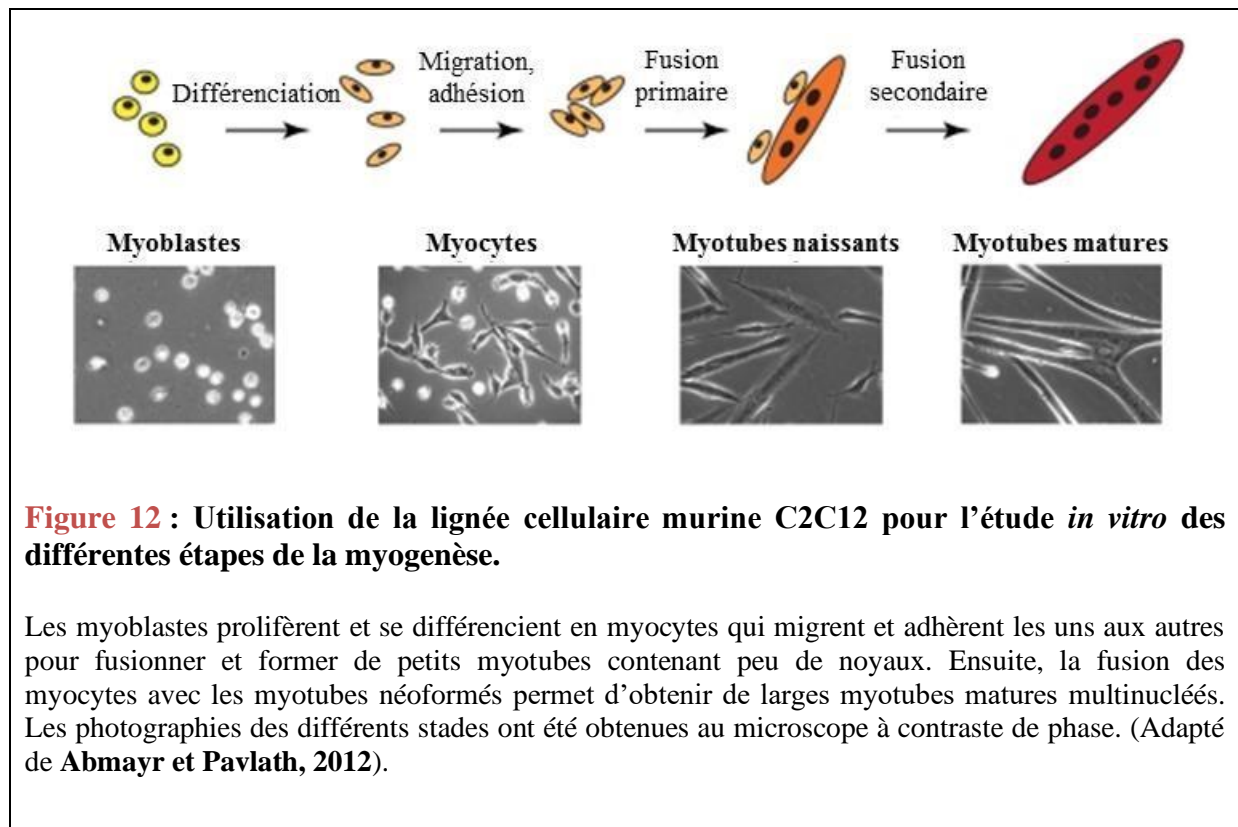
A l'âge adulte, le stock de cellules satellites reste constant grâce à leur auto-renouvellement, elles ne sont donc plus impliquées dans le processus d'hypertrophie qui s'explique alors par une augmentation de la synthèse protéique (**Sartorelli et Fulco, 2004**). L'hypertrophie a lieu après de nombreux efforts physiques intenses et répétés ou suite à la prise d'hormones spécifiques telles que des androgènes ou des agonistes  $\beta$ -adrénergiques (**Koopman *et al.*, 2010**). Selon le stade de développement, le muscle squelettique peut donc augmenter sa masse, avec ou sans l'implication des cellules satellites.

### **3) Implication des microRNA dans la myogenèse**

Les microRNA (miRNA) interviennent lors du maintien en quiescence des cellules satellites et des différentes étapes de la myogenèse ayant lieu durant de la régénération du muscle squelettique adulte des Mammifères (**Tableau 3**).

L'état de quiescence des cellules satellites est modéré au niveau post-transcriptionnel par les miRNA tels que les miR-489 et 31. Le miR-489 est fortement exprimé dans les cellules satellites en quiescence et est rapidement inhibé lorsque ces cellules sont activées. Concernant le miR-31, il est séquestré avec l'ARNm de *Myf5* dans les granules de mRNP contenu dans les cellules satellites quiescentes. C'est lors de l'activation de celles-ci que les granules se dissocient, entraînant une diminution de l'expression du miR-31 et une accumulation de la protéine *Myf5* (**Cheung *et al.*, 2012 ; Crist *et al.*, 2012**).

Les ARNm de *Pax3* et *Pax7* sont tous les deux régulés par le miR-206 et sont respectivement des cibles pour les miR-27 et miR-486. Ces trois miRNA sont présents dans les cellules myogéniques exprimant *MyoD* et *Myf5* et ils induisent la sous-expression de





*Pax3* pour le miR-27 et de *Pax7* pour les miR-206 et 486 lors de la différenciation (Crist *et al.*, 2009 ; Dey *et al.*, 2011).

Il a été montré que plusieurs miRNA interviennent durant la prolifération (Tableau 3). Par exemple, les miR-221 et miR-222 sont plus exprimés dans les myoblastes en prolifération que dans les myotubes. Ces deux miRNA inhibent *p27* et *MyoG*, permettant une sortie retardée du cycle cellulaire (Cardinali *et al.*, 2009). Le miR-133 favorise également la prolifération en inhibant le facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) impliqué dans la prolifération et la différenciation myoblastique (Chen *et al.*, 2006).

Enfin, certains miRNA sont impliqués dans le passage des myoblastes vers un état différencié. Les miR-1, miR-206 et miR-486 sont surexprimés pendant la différenciation myogénique et la formation des myotubes (Koning *et al.*, 2012). Ces miRNA améliorent la différenciation en inhibant *Pax7* de façon post-transcriptionnelle (Chen *et al.*, 2010) De plus, les miR-140-3p et miR-491 régulent négativement *myomaker* (Luo *et al.*, 2015 ; He *et al.*, 2017) (Tableau 3).

#### 4) La lignée myoblastique murine C2C12

Pour étudier les processus de prolifération et de différenciation myogénique, une lignée cellulaire est très largement utilisée comme modèle, il s'agit de la lignée C2C12. Cette lignée cellulaire a la capacité de se différencier en myocytes qui fusionnent pour former les myotubes (Figure 12). Les myoblastes C2C12 entrent en différenciation *in vitro* au moyen d'une réduction de la concentration en sérum dans le milieu de culture (Yaffe et Saxel, 1977). Les cellules C2C12, tout comme les cellules satellites, ont la capacité de se transdifférencier en adipocytes ou en ostéoblastes en raison de leur caractère multipotent et dans des conditions de culture particulières (Liu *et al.*, 2009 ; Aguiari *et al.*, 2008).

Les cellules C2C12 sont issues de la lignée C2, obtenue à partir de muscles squelettiques des pattes postérieures de souris C3H adultes. Ces cellules ont été isolées et analysées pour la première fois en 1977 par l'équipe de Saxel (Yaffe et Saxel, 1977). Les cellules C2C12 ont été utilisées par exemple pour aborder l'implication des MRF au cours de la myogenèse (Shimokawa *et al.*, 1998). Notre équipe a utilisé la lignée C2C12 pour l'étude de 375 gènes constituant plus de 60% du glyco-génome et pouvant potentiellement intervenir lors de la différenciation myoblastique. Sur ce panel de glyco-gènes analysés, plus de la



moitié est dérégulée au niveau transcriptionnel durant la différenciation (**Janot *et al.*, 2009**). Plus récemment, il a été montré que MyoG interagit avec la caténine CTNNA2 afin de contrôler la différenciation des cellules C2C12 via des interactions avec des protéines matricielles (**Malik *et al.*, 2015**).

Actuellement, la lignée C2C12 est très employée dans les études portant sur l'implication des miRNA dans la prolifération et la différenciation myogénique. Par exemple, le miR-152 inhibe la prolifération mais accélère la différenciation des myoblastes C2C12 (**Gan *et al.*, 2018**). La lignée C2C12 est aussi utilisée pour tester le rôle de nouvelles substances sur la myogenèse comme l'illustre l'utilisation de la canadine, substance alcaloïde issue d'une plante qui stimulerait la myogenèse et protégerait le muscle de l'atrophie (**Lee *et al.*, 2017**).

Plus généralement, l'utilisation des lignées cellulaires dans les études portant sur la myogenèse est essentielle puisqu'elle permet de contrôler précisément les conditions de culture. Les différentes obligations bioéthiques disparaissent grâce à l'emploi de ces lignées cellulaires. De plus, les lignées simplifient l'étude de certains processus trop souvent complexes pour être analysés dans leur globalité. Il est possible également de modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes par diverses techniques de transfection et d'en analyser les conséquences phénotypiques et génotypiques. Par exemple, une équipe de notre laboratoire a éteint par la technique de l'ARN interférent cent gènes n'ayant pas d'implication connue dans les fonctions musculaires chez la souris. Parmi ceux-ci, six gènes ont été confirmés comme étant impliqués dans toutes les étapes du processus myogénique et treize sont spécifiques de la différenciation (**Alwan *et al.*, 2017**).

**Tableau 4 :** Principaux gènes acteurs de la voie Notch chez la drosophile et leurs homologues humains, et les fonctions des protéines associées.

Gènes chez la drosophile	Homologues humains	Fonctions des protéines associées
<i>Notch (N)</i>	<i>NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4</i>	Récepteur
<i>Delta (De)</i>	<i>DLL1, DLL3, DLL4</i>	Ligand
<i>Serrate (Ser)</i>	<i>JAG1, JAG2</i>	
<i>Rumi</i>	<i>POGLUT1</i>	Glycosylations des récepteurs
<i>O-fucosyltransférase 1 (O-fut1)</i>	<i>POFUT1</i>	
<i>Fringe</i>	<i>LFNG, RFNG, MFNG</i>	
<i>EGF-domaine O-GlcNAc transférase (Eogt)</i>	<i>EOGT</i>	
<i>Furine 1 (Fur 1), Furine 2 (Fur 2)</i>	<i>FUR</i>	Clivage S1
<i>Kuzbanian (kuz)</i>	<i>ADAM10</i>	Clivage S2
<i>Préséniline (Psn)</i>	<i>PSEN1, PSEN2</i>	Clivage S3
<i>Nicastrine (nct)</i>	<i>NCSTN</i>	Endocytose ligand et récepteur
<i>Shibire (shi)</i>	<i>DNM1, DNM2, DNM3</i>	
<i>Numb</i>	<i>NUMB, NUMBL</i>	Transport du récepteur
<i>Suppressor of deltex (Su(dx))</i>	<i>ITCH, WWP1, WWP2</i>	
<i>Suppressor of Hairless (Su(H))</i>	<i>RBPJ</i>	Facteur de transcription
<i>Hairless (H)</i>	-	Co-répresseurs
-	<i>SPEN</i>	
<i>Groucho (gro)</i>	<i>TLE1, TLE2, TLE3, TLE4, TLE5, TLE6</i>	
<i>Mastermind (mam)</i>	<i>MAML1, MAML2, MAML3</i>	
Enhancer of split complex : 7 gènes répresseurs à motif bHLH	<i>HES1 à HES7</i>	Gènes cibles

Le symbole de chaque gène de drosophile est indiqué entre parenthèses dans la première colonne (**Adapté de Salaza et Yamamoto, 2018**).

## **Chapitre 2. LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE PROCESSUS MYOGENIQUE**

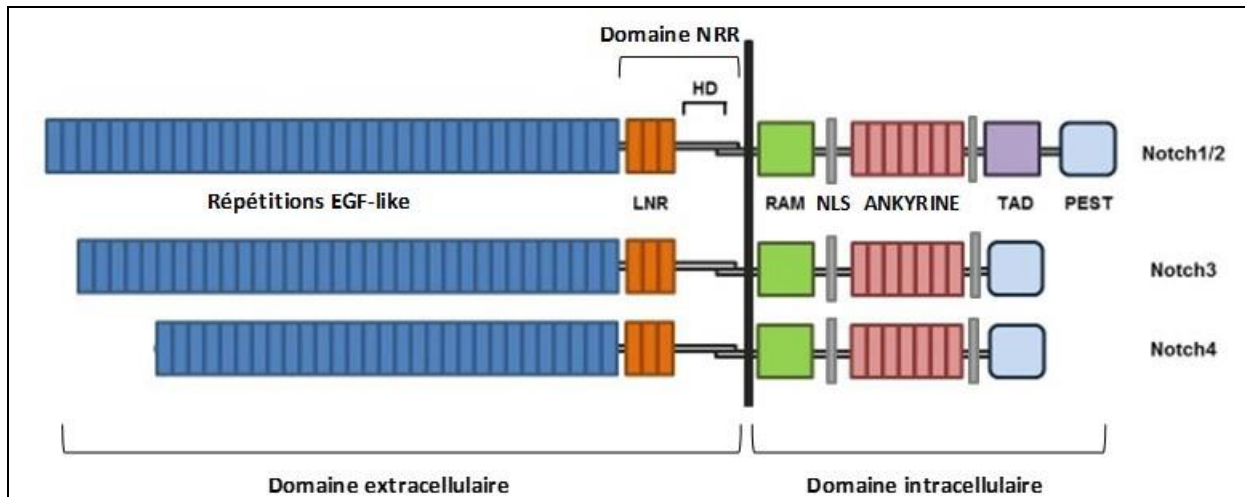
Les différentes étapes de la myogenèse sont contrôlées par des voies de signalisation cellulaire activées ou inhibées en fonction des multiples signaux. Le maintien des cellules de réserve ainsi que l'expression de *Pax7* sont contrôlés en partie par la voie de Notch. La prolifération est favorisée par l'activation de la voie TGF $\beta$ /Smad et la voie Pi3K/Akt/mTOR est impliquée dans la phase de différenciation myogénique.

### **I- La voie de Notch**

Les premières études sur Notch ont été réalisées il y a plus d'un siècle par John Dexter et Thomas Hunt Morgan en observant les ailes de la mouche des fruits *Drosophila melanogaster*. Ils ont remarqué des mouches mutantes possédant des ailes entaillées, « notched » en anglais. Le clonage du gène du récepteur Notch de la drosophile a été réalisé dans les années 1980 par les équipes de Michael Young et de Spyros Artavanis-Tsakonas (**Kidd et al., 1983 ; Wharton et al., 1985**). Le récepteur Notch interagit avec un ligand transmembranaire situé sur une cellule voisine, ce qui provoque un clivage protéolytique du récepteur. La partie carboxy-terminale du récepteur, localisée au niveau de la membrane plasmique et appelée NICD (Notch IntraCellular Domain), est alors transloquée dans le noyau où elle interagit avec le complexe CSL (C $\text{BF}$ -1 ou RBP-J $\kappa$  chez les Mammifères /  $\text{Su(H)}$  chez la drosophile /  $\text{Lag-1}$  chez *C.elegans*) afin d'activer la transcription de gènes (**Egan et al., 1998**). Le récepteur Notch est impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, du développement, du cycle cellulaire (**Ronchini et Capobianco, 2001**) (**Tableau 4**).

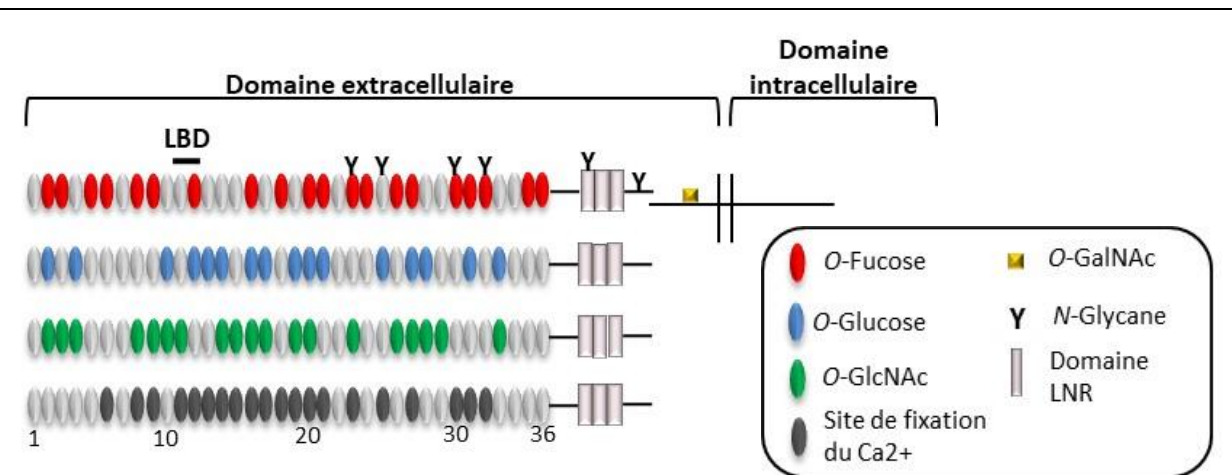
#### **1) Récepteurs et ligands**

L'activation du récepteur Notch est finement contrôlée par des ligands canoniques par le biais d'interactions directes récepteur-ligand. La nature transmembranaire de ces ligands permet de limiter la signalisation aux interactions locales et la communication avec les cellules voisines (**D'Souza et al., 2010**).



**Figure 13 : Structures des récepteurs Notch de Mammifères.**

Les récepteurs NOTCH, au nombre de quatre (Notch 1 à 4), sont organisés en hétérodimère au niveau de la membrane plasmique. Dans sa partie extracellulaire, Notch possède un domaine constitué de 36 motifs EGF-like pour les récepteurs 1 et 2, et de 34 et 29 répétitions pour les récepteurs 3 et 4. Les trois répétitions LNR jouent un rôle de modulateur entre les parties extra et intracellulaires. Le domaine NRR regroupe ces répétitions LNR et la région HD. La partie intracellulaire du récepteur est composée de sept répétitions ankyrines, d'une séquence de localisation nucléaire NLS, d'un domaine PEST (riche en Proline, Glutamate, Sérine et Thréonine) et d'un domaine de transactivation TAD présent seulement dans Notch 1 et 2. *EGF, Epidermal Growth Factor* ; *HD, hétérodimérisation* ; *LNR, Lin-12/Notch repeat* ; *NLS, Séquence de localisation nucléaire* ; *NRR, Negative Regulatory Region* ; *PEST, Proline, Glutamine, Serine, Threonine-rich* ; *RAM, RBP-J $\kappa$ /CBF-1 associated molecule* ; *TAD, Transactivation domain* (Adapté de **Fleming, 1998** ; **Lubman et al., 2004**).



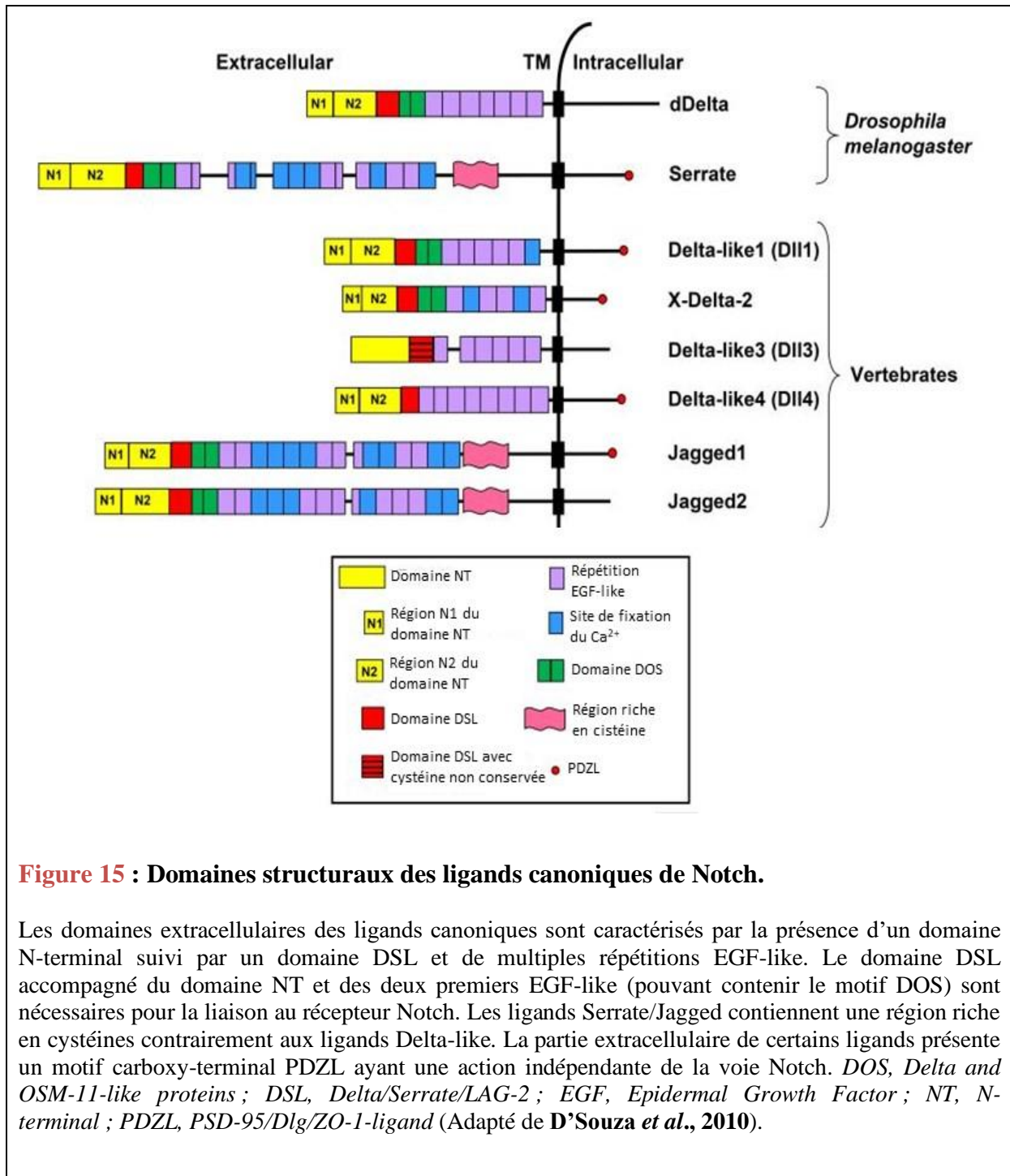
**Figure 14 : Sites potentiels de glycosylation sur le récepteur Notch 1 murin.**

La partie extracellulaire du récepteur est constituée de 36 répétitions « EGF-like » (ovales) et de trois répétitions LNR (rectangles). Les EGF-like 11 et 12 sont les sites de fixation du ligand (LBD). Les EGF-like contiennent des séquences consensus pour la fixation de O-Fucose (rouge), O-glucose (bleu) ou O-GlcNAc (vert). Les EGF-like chélateurs d'ions calciques sont représentés en noir. Des O-GalNAc peuvent se fixer dans la partie proche de la membrane plasmique et réguler le troisième clivage par la  $\gamma$ -sécrétase. *GalNAc, N-Acétalgalactosamine* ; *GlcNAc, N-Acétalglucosamine* ; *LBD, Ligand binding domain* ; *LNR, Lin12/Notch repeat* (Adapté de **Takeuchi et Haltiwanger, 2014**).

### *a) La famille des récepteurs Notch*

Chez les Mammifères, il existe quatre récepteurs Notch différents (Notch 1 à 4), tandis que la drosophile n'en possède qu'un seul et que le nématode *C. elegans* en compte deux (lin-12 et gpl-1) (Maine *et al.*, 1995). Les recherches menées sur ces organismes ont permis de faire la lumière sur les mécanismes de la voie de signalisation de Notch et ses diverses implications. Le gène *Notch* code une protéine transmembranaire composée dans sa partie extracellulaire (i) de 36 répétitions « EGF-like » dont certaines sont impliquées dans les interactions avec le ligand ; (ii) de trois répétitions juxtamembranaires LN (Lin-12-Notch) modulant les interactions entre la région extracellulaire NECD (Notch extracellular domain) et les domaines intracellulaires (Wharton *et al.*, 1985) (Figure 13). La partie intracellulaire du récepteur Notch inclut sept répétitions ankyrine accompagnées d'une séquence de localisation nucléaire, d'un domaine PEST (Proline, Glutamate, Serine, Thréonine-rich) et d'un domaine de transactivation. Les récepteurs Notch 3 et 4 possèdent moins de répétitions « EGF-like » et ne présentent pas de domaine de transactivation (Fleming, 1998 ; Lubman *et al.*, 2004). A la surface cellulaire, Notch est présent sous la forme d'un hétérodimère, formé grâce à un clivage ayant lieu au niveau de l'appareil de Golgi, qui lie de façon non-covalente le NECD et le NICD grâce à une région d'hétérodimérisation (HD) (Gordon *et al.*, 2007).

Les récepteurs Notch ont la capacité d'être glycosylés et notamment par l'ajout de *O*-fucose, *O*-glucose, *O*-GlcNAc ou *O*-xylose lors de leur passage par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Takeuchi et Haltiwanger, 2014) (Figure 14). Les *O*-fucoses sont ajoutés sur des résidus sérine et thréonine par les enzymes POFUT. Ils peuvent être allongés par des GlcNAc, addition assurée par les protéines *O*-fucosyl 3- $\beta$ -*N*-acétylglucosaminyltransférase (LFNG) ou Fringe qui sont au nombre de trois chez les Vertébrés (Lunatic Fringe, Radical Fringe et Manic Fringe) (Moloney *et al.*, 2000). Ces modifications provoquées par les enzymes Fringe ont des conséquences sur la liaison des ligands aux récepteurs Notch : Lunatic et Manic Fringe favorisent l'interaction avec les ligands Delta-like et réduisent celle avec Jagged (Brückner *et al.*, 2000). De la même façon, Radical Fringe permet la fixation des ligands Jagged et Delta-like (Xu *et al.*, 2007). Les GlcNAc sont aussi transférés sur les récepteurs Notch grâce à l'enzyme EOGT (EGF domain specific *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase). Une étude récente a montré que les *O*-GlcNAc transférés sur le récepteur sont nécessaires seulement à la liaison des ligands Delta-like, et non à celle des ligands Jagged (Sawaguchi *et al.*, 2017).





## ***b) Caractéristiques structurales des ligands***

La majeure partie des ligands de Notch appartient à la famille des ligands DSL, caractérisés par la présence de domaine DSL (Delta, Serrate et Lag 2) (**Henderson *et al.*, 1994**). Chez les mammifères, les ligands DSL sont divisés en deux classes : les ligands « Delta-like » (Dll1, Dll3 et Dll4) et les ligands « Serrate ou Jagged-like » (Jagged 1 et Jagged 2). Cette distinction est fondée sur leur homologie de séquence avec les ligands Delta et Serrate de la drosophile (**Cordle *et al.*, 2008**) (**Figure 15**). Les ligands DSL sont des protéines transmembranaires de type I qui partagent une partie extracellulaire semblable comprenant un domaine N-terminal suivi du domaine DSL et de multiples répétitions « EGF-like ». Des mutations au sein du domaine DSL sont associées à une perte de l'activation de la voie de Notch chez les Vertébrés et Invertébrés (**Henderson *et al.*, 1997**).

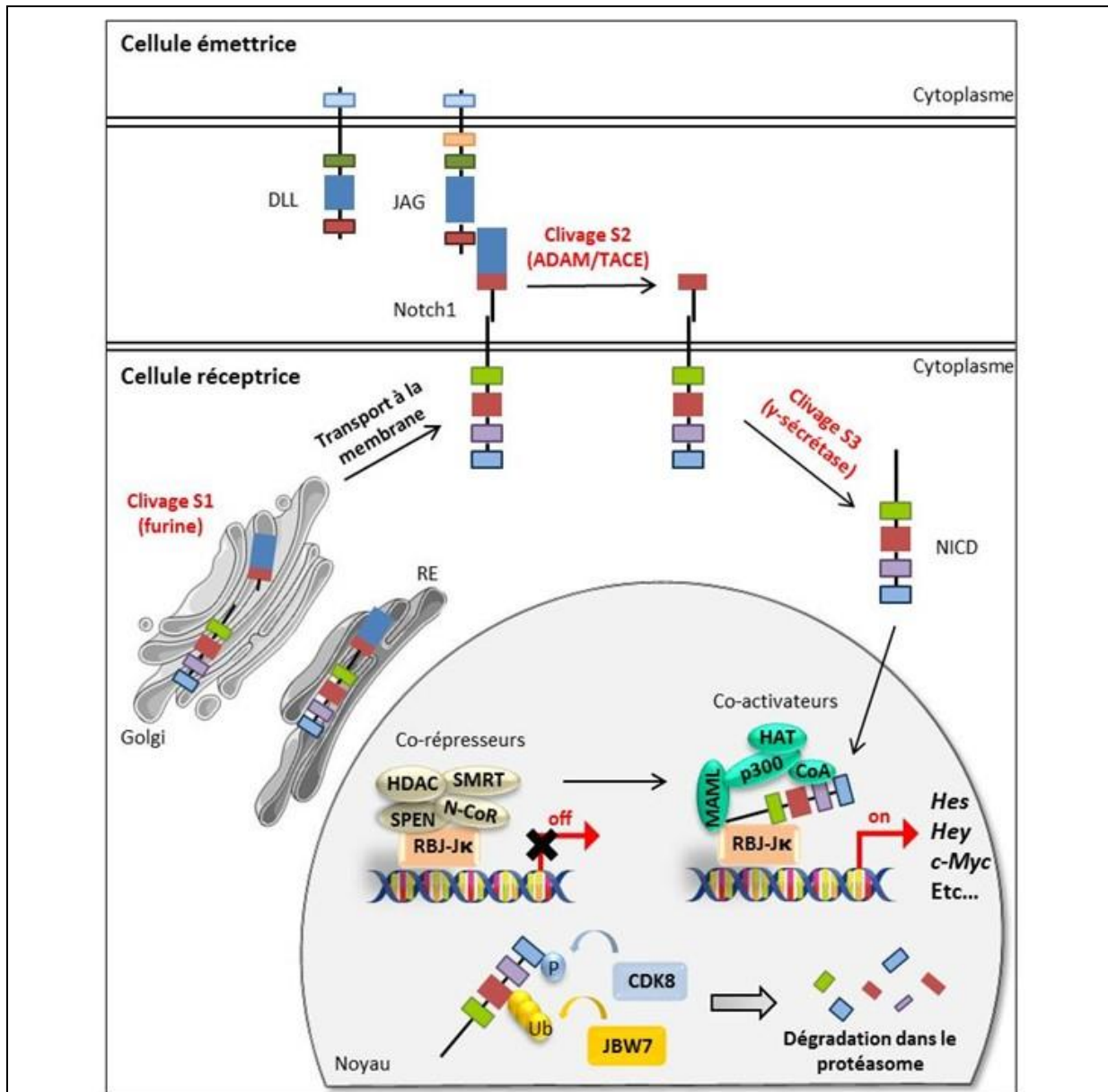
En plus de ce domaine DSL, un domaine conservé appelé DOS (Delta and OSM-11-like proteins) a été identifié dans les deux premiers EGF-like, le motif DOS coopère avec le domaine DSL (**Komatsu *et al.*, 2008**). Des études de mutagenèse dirigée indiquent que le domaine DOS intervient dans la liaison du ligand à son récepteur (**Shimizu *et al.*, 1999 ; Cordle *et al.*, 2008**). Le domaine N-terminal est un domaine partagé par les ligands du récepteur Notch. Il peut être subdivisé en deux régions distinctes suivant le contenu en cystéines : la partie N1 est riche en cystéines tandis que la partie N2 n'en contient pas. En dépit de cette organisation générale commune, des différences structurales existent entre les ligands canoniques de Notch. Par exemple, le nombre de répétitions « EGF-like » varie, Dll 1 en compte cinq tandis que Jagged 1 en contient sept (**Fleming, 1998**).

Les parties intracellulaires des ligands canoniques de Notch présentent une plus faible homologie (**Pintar *et al.*, 2007**). A l'exception du ligand Dll 3, ils contiennent de multiples résidus lysine, potentiellement modifiables par les ubiquitine-ligases E3 (**Deblandre *et al.*, 2001**).

## **2) Activation de la voie canonique de Notch**

### ***a) Interactions ligands-récepteurs***

Des analyses structurales du complexe récepteur-ligand ont révélé une liaison antiparallèle entre Notch 1 et Dll 4 (**Luca *et al.*, 2015**). Une étude récente menée sur le complexe Notch 1-Jagged 1, a montré que cette interaction a lieu au niveau des EGF-like 8 à



**Figure 16 : Voie canonique de Notch.**

Le récepteur Notch subit un premier clivage (S1) par la furine au niveau de l'appareil de Golgi. Il permet l'hétérodimérisation du récepteur. Lorsqu'un ligand Delta-like ou Jagged se lie à Notch 1, le récepteur est à nouveau clivé (clivage S2) par une métalloprotéase ADAM ou TACE et le NICD est libéré dans le cytoplasme grâce au clivage S3 par la  $\gamma$ -sécrétase puis est transloqué dans le noyau. Le NICD favorise le déplacement d'un complexe, constitué des protéines HDAC, SMRT, SPEN et N-CoR, répresseur de la transcription des gènes cibles de la voie. Des co-activateurs (MAML, p300, HAT) viennent se fixer au complexe NICD-RBP-J $\kappa$ , l'expression des gènes cibles est alors possible. Le NICD peut être ubiquitinylé et reconnu par le protéasome pour dégradation. ADAM, *A-Disintegrin-And-Metalloproteinase* ; CDK8, *Cyclin-dependant kinase* ; CoA, *Co-Activateur* ; DLL, *Delta-like* ; FBW7, *F-box and WD repeat domain containing 7* ; HAT, *Histone Acétyltransférase* ; HDAC, *Histone désacétylase* ; JAG, *Jagged* ; MAML, *Mastermind-like* ; N-CoR, *nuclear receptor co-repressor* ; RBP-J $\kappa$ , *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region* ; RE, *reticulum endoplasmique* ; SMRT, *Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors* ; SPEN, *Split-ends* ; TACE, *TNF $\alpha$  converting enzyme* (Adapté de Lee *et al.*, 2015).

12 de Notch 1 d'une part, et des domaines C2, DSL et EGF-like 1 à 3 de Jagged 1 d'autre part. De plus, Jagged 1 change de conformation au contact du récepteur (Luca *et al.*, 2017).

Dans de nombreuses cellules, ligands et récepteurs sont exprimés simultanément. Dans le cadre de la voie de Notch, les cellules sont à la fois émettrices et réceptrices du signal. Le mode d'interaction le plus courant entre le ligand et le récepteur Notch est l'interaction en *trans*, entre deux cellules voisines, elle conduit à l'activation du récepteur. En revanche, l'interaction entre un récepteur Notch et un ligand sur la même cellule entraîne une inhibition de la cascade de signalisation, via un processus d'inhibition en *cis* (Glittenberg *et al.*, 2006). Néanmoins, cette inhibition paraît être essentielle au maintien de la polarité cellulaire (Becam *et al.*, 2010). La compétition entre l'activation en *trans* et l'inhibition en *cis* révèle la capacité du ligand à activer ou inhiber la voie de Notch. Le passage d'un état d'activation à celui d'inhibition est dépendant d'une forte proportion de ligands-*cis* et de récepteurs mais aussi d'une faible quantité de ligands-*trans* (Sprinzak *et al.*, 2010).

#### ***b) Clivages protéolytiques du récepteur Notch***

L'interaction du ligand avec le récepteur entraîne deux clivages protéolytiques successifs du récepteur Notch : le premier, extracellulaire, par les métalloprotéinases ADAM ou TACE, appelé le clivage S2 suivi d'un second, intracellulaire, par le complexe  $\gamma$ -sécrétase appelé le clivage S3 (Logeat *et al.*, 1998 ; Brou *et al.*, 2000) (Figure 16). Ces clivages sont essentiels dans le processus d'activation du récepteur. La fixation du ligand modifie certaines structures du domaine NRR (Negative regulatory region) grâce à l'application de forces mécaniques, rendant ainsi accessibles les sites de clivage par les métalloprotéinases ADAM et permettant l'endocytose du ligand (Gordon *et al.*, 2015). Le devenir du domaine extracellulaire commence à être compris. Chez la drosophile, la partie extracellulaire du récepteur est *trans*-endocyté dans la cellule portant le ligand et sera finalement dégradé dans les lysosomes de cette même cellule (Hansson *et al.*, 2010).

#### ***c) Mécanisme de la régulation transcriptionnelle par Notch***

L'interaction en *trans* du récepteur Notch avec son ligand entraîne la translocation du NICD de la membrane plasmique au noyau grâce à son peptide signal de localisation nucléaire (NLS). Dans le noyau, le NICD s'associe avec le complexe CSL (CBF-1 appelé aussi RBPJ, Suppressor of Hairless, Lag-1) et recrute des co-activateurs tels que la protéine Mastermind-like (MAML) et l'histone acétyltransférase p300 responsables de l'activation de

**Tableau 5 : Rôles de Notch lors de la myogenèse ante et post-natale (Adapté de Koch et al., 2013)**

Principales étapes du développement myogénique	Lieu d'expression de Notch	Rôle de Notch	Gènes et processus régulés
<b>Somitogenèse</b>	Mésoderme pré-somitique	Formation des somites à l'origine du tissu musculaire squelettique	Oscillations « Clock and wavefront »
<b>Myogenèse embryonnaire</b>	Dermomyotome	Détermination et prolifération des précurseurs embryonnaires	<i>Pax3</i> et <i>Pax7</i> activés, MRF inhibés
<b>Myogenèse fœtale</b>	Progéniteurs musculaires	Auto-renouvellement des progéniteurs musculaires fœtaux	<i>Pax7</i> , <i>Hes</i> et <i>Hey</i> activés
<b>Myogenèse post-natale</b>	Cellules satellites	Maintien en quiescence des cellules satellites	<i>Pax7</i> et <i>MyoD</i> activés

la transcription des gènes cibles de la voie (**Oswald et al., 2001**). L'activation transcriptionnelle médiée par Notch est aussi régulée par la dégradation du NICD. Ce dernier peut être phosphorylé au niveau des motifs PEST et TAD (Transactivation domain) par la kinase CycC-CDK8 recrutée par la protéine MAML et ainsi être ubiquitinylé afin d'être dégradé par le protéasome (**Fryer et al., 2004**). En absence de NICD, des co-répresseurs sont recrutés, tels que KyoT2 et des histones désacétylases, afin de stopper l'activation transcriptionnelle médiée par le complexe CSL (**Tanigushi et al., 1998**) (**Figure 16**).

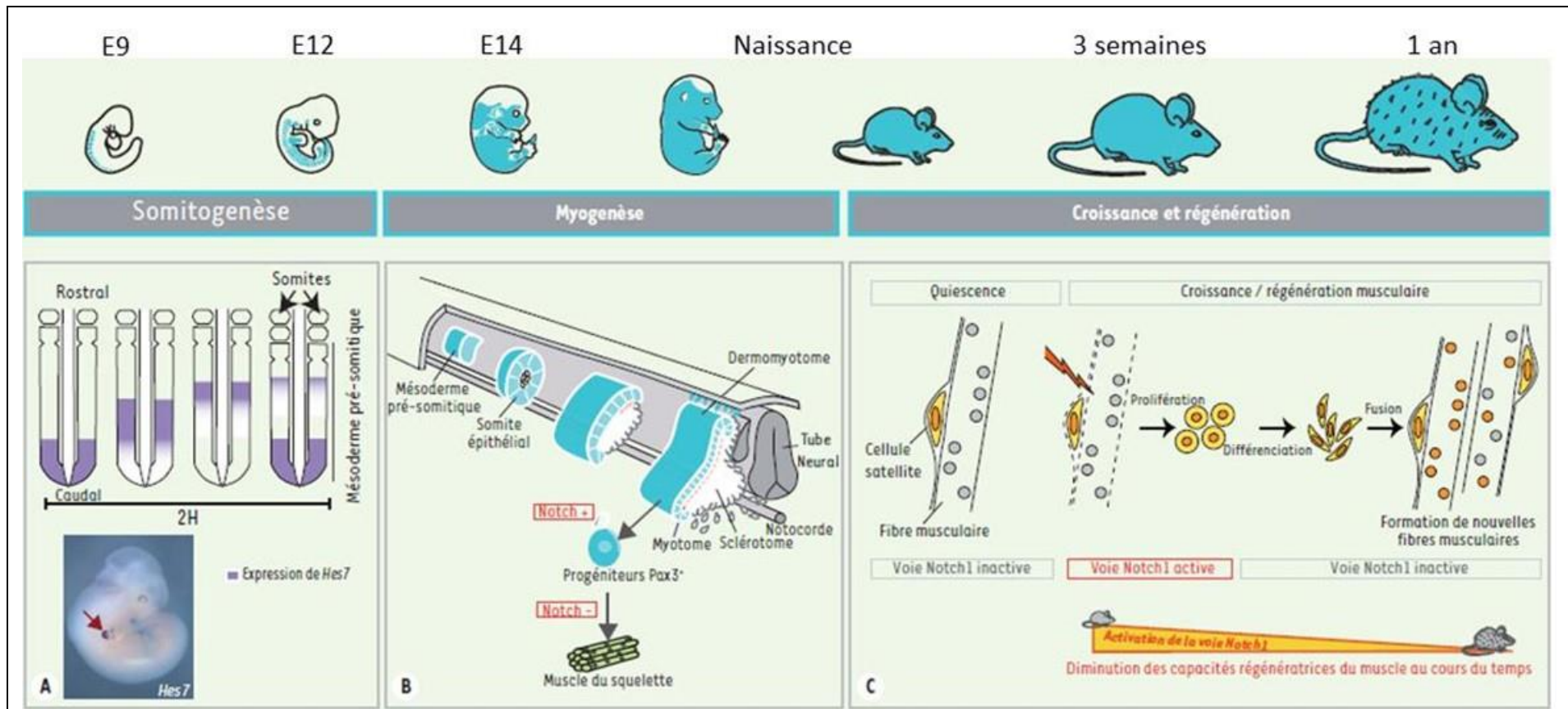
#### *d) Gènes cibles de la voie*

Les gènes *Hes* et *Hey* représentent les cibles principales de la voie de signalisation de Notch. *Hes* et *Hey* sont les homologues mammaliens des gènes *Hairy* et *Enhancer-of-split* (*E(spl)*) de la drosophile. *Hes* et *Hey* codent des régulateurs de la transcription de la famille des facteurs bHLH agissant principalement comme répresseurs (**Dawson et al., 1995**). Chez la souris et le rat, il existe sept gènes *Hes* (*Hes1* à 7) (**Sasai et al., 1992**) et trois gènes *Hey* (*Hey1, 2* et *L*) (**Leimeister et al., 1999**). Les protéines *Hes* se fixent préférentiellement sur les séquences des boîtes N (CACNAG) des promoteurs des gènes cibles et peuvent également se lier aux boîtes E (CANNTG) (**Ohsako et al., 1994 ; Jennings et al., 1999**). *Hes1, Hes5* et *Hes7* peuvent être activés par le NICD (**Ohtsuka et al., 1999**), tandis que *Hes2, Hes3* et *Hes6* (**Nishimura et al., 1998 ; Koyano-Nakagawa et al., 2000**) sont indépendants de la voie de Notch ; tous les membres de la famille *Hey* peuvent être activés par Notch (**Leimeister et al., 1999**). La principale différence structurale entre les protéines *Hes* et *Hey* est l'absence du térapeptide WRPW au sein du complexe répresseur des protéines *Hey*. Ce térapeptide permet le recrutement du co-répresseur Groucho (**Fisher et al., 1996**).

### **3) Rôles de Notch dans la myogenèse**

La voie de Notch est impliquée à la fois durant la somitogenèse, le devenir des cellules satellites, la myogenèse post-natale ainsi que la régénération du muscle squelettique. L'activation de la voie de Notch concourt à la prolifération des cellules satellites, en revanche elle inhibe la différenciation myogénique.

Au cours de la somitogenèse chez la souris, *Hes7*, gène cible de la voie Notch, est exprimé de façon cyclique et contribue à la formation d'une paire de somites toutes les deux heures (**Bessho et al., 2001**) (**Tableau 5 et figure 17**). Le rôle de Notch 1 dans les cellules progénitrices musculaires a été longuement étudié. Lors de la myogenèse embryonnaire, un



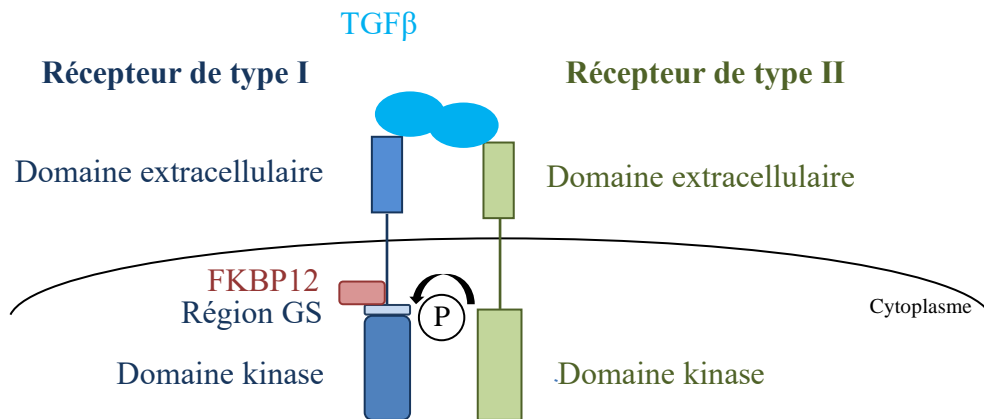
**Figure 17 : Rôles de la voie Notch dans la vie embryonnaire et post-natale de la souris. (A) Formation cyclique des somites chez l'embryon.** Notch est impliqué lors de la somitogenèse en activant l'expression du gène *Hes7* (expérience d'hybridation *in situ* montrée sur la photographie de l'embryon, la flèche indique l'expression de *Hes7* au niveau d'un somite). **(B) Myogenèse embryonnaire et détermination des progéniteurs musculaires.** Les cellules du dermomyotome qui expriment Pax3 dérivent en progéniteurs musculaires grâce à l'activation de la voie Notch. **(C) Activation des cellules satellites lors de la croissance et de la régénération du muscle squelettique.** Lorsque les cellules satellites reçoivent un stimulus pour la croissance ou la régénération, les ligands de Notch sont exprimés et la voie est activée, les cellules satellites sortent de leur état de quiescence pour proliférer. Lors de la différenciation et de la fusion, la voie Notch est à nouveau inactive. Enfin, son activation diminue en même temps que la capacité régénératrice du muscle avec l'âge. (Adapté de **Mayeuf et Relaix, 2011**).

progéniteur exprimant *Pax3* peut aussi bien évoluer en cellule musculaire ou vasculaire, cette décision est contrôlée par Notch. Le clivage du récepteur Notch dans une cellule progénitrice *Pax3*<sup>+</sup> permet d'obtenir une cellule de muscle lisse (**Mayeuf-Louchart et al., 2014**). La perte de la signalisation par Notch, due à un allèle *Dll 1* hypomorphe ou à la perte du complexe protéique CSL, engendre une perte des progéniteurs *Pax3*<sup>+</sup> ou *Pax7*<sup>+</sup> (**Schuster-Gossler et al., 2007**).

Pendant la myogenèse post-natale, la signalisation par Notch 1 est essentielle pour le maintien des cellules satellites dans un état indifférencié (**Bjornson et al., 2012**). Un des ligands du récepteur Notch, Delta-1, est présent à la surface de la fibre et interagit avec les récepteurs présents à la surface de la cellule satellite (**Conboy et Rando, 2002**). Le clivage du NICD diminue l'expression de *MyoD*, augmente celle de *Pax7* et favorise l'auto-renouvellement des cellules satellites (**Wen et al., 2012**). L'inhibition de la voie de Notch engendre l'activation et la différenciation spontanée des cellules satellites (**Mourikis et al., 2012**) (**Tableau 5 et figure 17**).

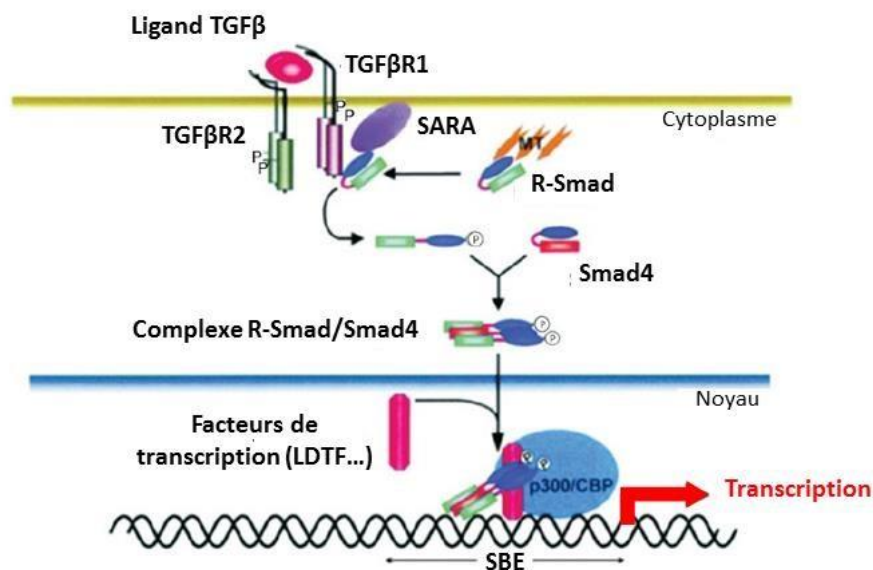
Dans les cellules C2C12, l'activation des récepteurs Notch 1 et 2 et du complexe CSL inhibe la différenciation myogénique et diminue l'expression des MRF *MyoD* et *Myf5* (**Kopan et al., 1994**). Il a d'abord été considéré que *Hes1* et *Hey1* étaient les éléments clés de cette inhibition par leur hétérodimérisation avec le MRF *MyoD*. Cependant, des expériences de knockdown sur *Hes1* ou *Hey1* suggèrent que le mécanisme d'inhibition de la myogenèse par Notch fait intervenir de multiples acteurs. Des chercheurs américains ont identifié 82 gènes exprimés lorsque des myoblastes de C2C12 sont mis en culture avec le ligand *Dll 4* (**Buas et al., 2009**). Plusieurs gènes et facteurs ont été identifiés comme régulateurs du devenir des cellules satellites et des myoblastes via une action sur la voie de Notch 1.

Les fonctions de Notch 1 lors de la fusion des myocytes ont aussi été récemment explorées *in vivo* par Bi et son équipe (**Bi et al., 2016**). Premièrement, ils ont généré un modèle de souris (MLC-N1ICD) dans lequel le gène codant la myosine (MLC, Myosin Light Chain) est exprimé de manière constitutive et l'activation de Notch est également constitutive. Ces souris présentent une masse musculaire amoindrie, des performances à l'effort médiocres et une létalité post-natale élevée. Les cellules satellites *Pax7*<sup>+</sup> sont aussi retrouvées en plus grand nombre et la régénération musculaire est plus faible. Dans un second temps, des souris MCK-N1ICD ont été créées afin d'expliquer le rôle de Notch 1 dans la fusion secondaire, le NICD et la créatine kinase musculaire (MCK, Muscle Creatine Kinase) sont activés de manière constitutive. Ces souris possèdent ainsi une meilleure régénération musculaire que les



**Figure 18 : Représentation schématique d'un complexe récepteur au TGFβ.**

La fixation du TGFβ sur le domaine de liaison extracellulaire du récepteur entraîne l'hétérodimérisation d'un récepteur de type I (en bleu) avec un récepteur de type II (en vert). Les domaines kinases de chaque récepteur se rapprochent alors pour permettre une transphosphorylation. La région GS riche en glycines et sérines est la cible de phosphorylation du récepteur de type I par le type II. La région GS est stabilisée grâce à la protéine de liaison FKBP12. *FKBP12*, 12 kDa FK-506 binding protein ; *GS*, glycine-sérine ; *P*, phosphorylation ; *TGF*, transforming growth factor (Adapté de **Yadin et al., 2016**).



**Figure 19 : Voie du TGFβ/Smad.**

Un ligand de la famille du TGFβ vient se fixer, entraînant ainsi l'hétérodimérisation des récepteurs de type I et II. Le TGFβRII phosphoryle le domaine GS du TGFβRI afin de l'activer. Ce dernier active les R-Smads par phosphorylation au niveau du motif SSXS (Ser-Ser-X-Ser, X pour n'importe quel acide aminé). Les R-Smads forment alors un complexe avec Smad 4 pour être transloqués dans le noyau, se lier à des facteurs de transcription et des co-activateurs tels que p300/CBP. Cet ensemble se fixe au niveau des éléments de liaison des Smads (SBE) des gènes cibles pour finalement activer la transcription de ceux-ci. *CBP*, CREB-binding protein ; *LDTF*, Leverage-determining transcription factor ; *R-Smad*, Receptor-regulated Smad ; *SARA*, Smad anchor for receptor activation ; *SBE*, Smad-binding element ; *TGFβ*, Transforming growth factor ; *TGFβRI et II*, Transforming growth factor receptor I and II (Adapté de **Singh et al., 2011**).



souris WT après plusieurs blessures, ce qui indique que Notch 1 permet, potentiellement la régénération du muscle squelettique. Pour finir, ils ont regardé les effets de l'activation de Notch 1 sur les capacités régénératives de souris âgées et atteintes de dystrophies musculaires. Chez les souris MCK-NIICD âgées, la régénération et les performances sont améliorées. Ceci s'explique par une augmentation de l'expression des ligands Dll 4 et Jagged 2 dans les myofibres qui à leur tour permettent une activation accrue de la voie Notch dans les cellules satellites voisines. L'activité du récepteur Notch est donc inversement corrélée à l'âge. La voie de Notch est modulée en cas de blessure mais elle peut aussi être activée lors de l'activité musculaire : la contraction du muscle active la voie, et au contraire une immobilisation prolongée conduit à une inactivation de Notch durant la période fœtale (**Esteves de Lima et al., 2016**).

## II- La voie du TGF $\beta$ /Smads

### 1) Les protagonistes de la voie et leur mode d'action

#### a) Les récepteurs, structure et activation

Les génomes de Mammifères codent pour sept récepteurs de type I et cinq récepteurs de type II (**Shi et Massagué, 2003**). Les récepteurs TGF $\beta$  de type I et II (TGF $\beta$ R I et II) présentent des structures similaires (**Figure 18**). Les récepteurs sont présents à la surface cellulaire sous forme de monomère, homodimère ou hétérodimère : la liaison du TGF $\beta$  au dimère de TGF $\beta$ RII permet le recrutement du TGF $\beta$ RI et ainsi l'assemblage d'un complexe récepteur hétérotétramérique (**Franzén et al., 1993**).

Le modèle général proposé pour l'activation des récepteurs au TGF $\beta$  est le suivant (**Figure 19**) : la liaison du ligand TGF $\beta$  induit l'activation d'un récepteur de type II qui phosphoryle un résidu sérine et/ou thréonine dans le domaine GS (Glycine, Sérine) juxtamembranaire d'un récepteur de type I, conférant par la même à ce dernier une conformation active (**Wrana et al., 1994**). La phosphorylation de ce domaine GS engendre celle des protéines Smads qui sont activées. Les kinases des récepteurs du TGF $\beta$  ont à l'origine été classées dans le groupe des kinases sérine/thréonine puisqu'elles phosphorylent des résidus sérine au sein des protéines Smads (**Wrana et al., 1992**). Cependant, il est apparu



que cette spécificité n'est pas absolue. En effet, le TGF $\beta$ RII peut s'autophosphoryler sur des sérines, thréonines ou tyrosines (**Lawler et al., 1997**).

### ***b) Les ligands***

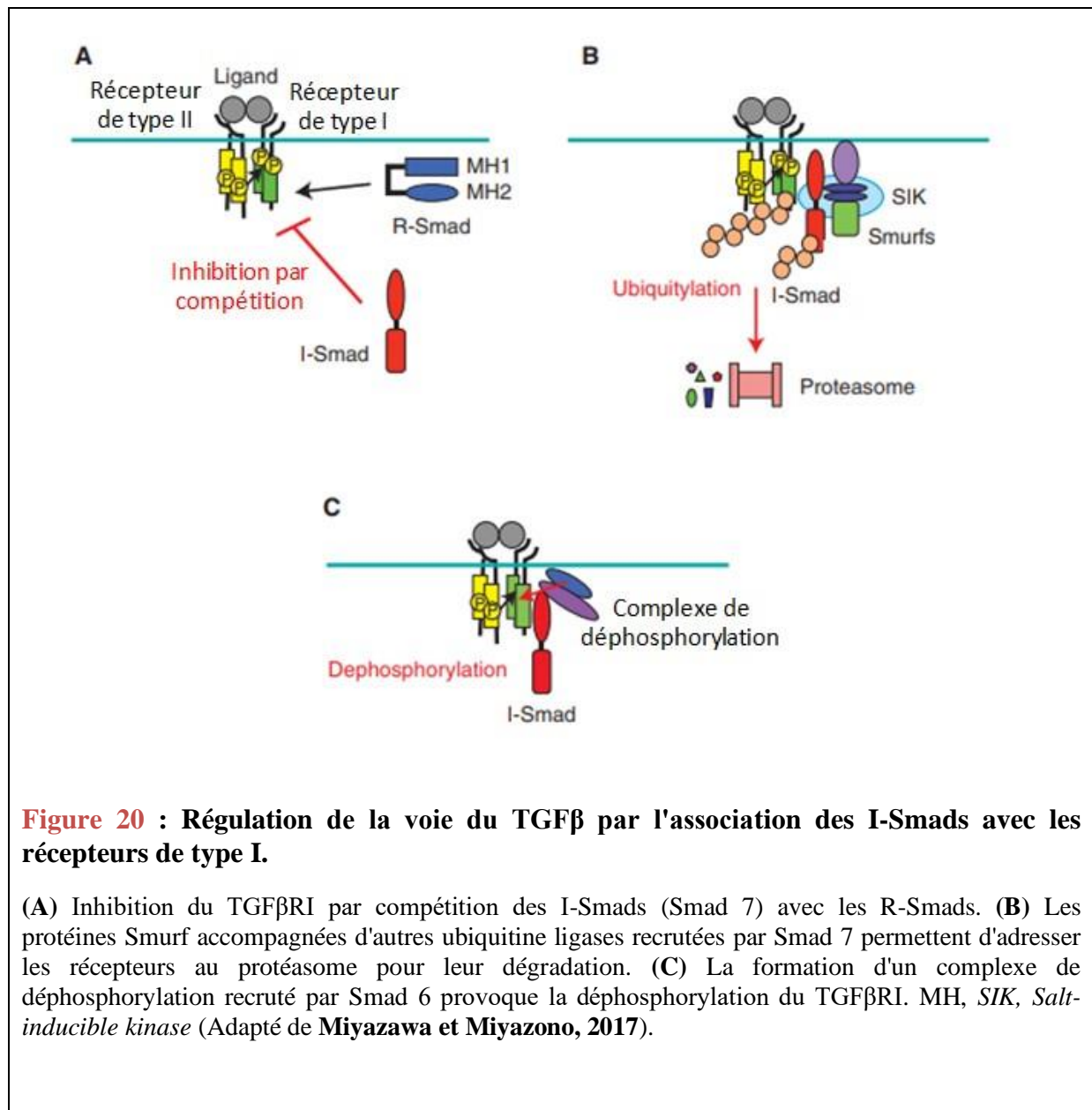
La famille du TGF $\beta$  est constituée de 32 membres séparés en deux grandes sous-familles : celle du TGF $\beta$  et celle des BMP (Bone Morphogenetic Protein). La sous-famille du TGF $\beta$  comprend les TGF $\beta$  1, 2 et 3 ; les activines A et B ; Nodal ; la myostatine, connue aussi sous le nom de GDF8 (Growth and Differentiation Factor 8) et plusieurs autres membres. Généralement, les membres de cette première sous-famille sont actifs durant le développement embryonnaire et sont impliqués dans l'organogenèse, l'homéostasie tissulaire (**Dünker et Krieglstein, 2000**) et la régulation immunitaire (**Li et al., 2006**). Par exemple, GDF8 agit pendant le développement embryonnaire sur la régulation de l'expression de *Pax7* afin de déterminer la destinée et le nombre de progéniteurs musculaires (**Brun et al., 2014**). La sous-famille des BMP, comprenant plus d'une douzaine de membres, possède des propriétés aussi étendues que celles des TGF $\beta$  mais très souvent en opposition à celles-ci.

Du point de vue de leur structure, les ligands TGF $\beta$  ont deux caractéristiques communes : ils sont synthétisés sous la forme d'un grand précurseur appelé pré-proprotéine et qui comprend un peptide signal, un large prodomaine intervenant dans le repliement correct de la protéine et une région fonctionnelle (**Dubois et al., 1995**).

Deuxièmement, la partie mature des ligands TGF $\beta$  contient un « nœud » composé de six cystéines qui façonnerait la structure et stabiliserait la protéine ligand (**Yadin et al., 2016**). Les ligands TGF $\beta$  sont des homodimères dont les deux monomères sont reliés par un pont disulfure et s'assemblent pour obtenir une forme générale de papillon.

### ***c) Les protéines Smads : activation et transmission du signal***

Il existe huit protéines Smads chez les Mammifères, cinq d'entre elles ont une fonction d'effecteur (Smad 1 à 3, Smad 5 et Smad 8) et sont appelées les R-Smads (Receptor-regulated Smads), tandis que les deux dernières sont inhibitrices (Smad 6 et 7) et se nomment les I-Smads (Inhibitory Smads). Enfin, Smad 4 est appelée Co-Smad (Common Smad). Les protéines Smad 1, 2, 3, 5 et 8 servent de substrats à Smad 4 (**Heldin et al., 1997**). Smad 2 et Smad 3 sont phosphorylées par les récepteurs de type I de la sous-famille des ligands TGF $\beta$ ,



alors que Smad 1, Smad 5 et Smad 8 sont en priorité phosphorylées par les récepteurs de type I des ligands BMP (**Shi et Massagué, 2003**).

Une fois phosphorylés, les récepteurs ciblent deux résidus sérine de la région C-terminale des R-Smads, générant ainsi un fragment acide qui participe à l'oligomérisation entre une R-Smad et Smad 4, essentielle pour activer la transcription des gènes cibles (**Wu et al., 2001**). D'autres facteurs sont à l'origine de la spécificité d'activation des protéines Smad 1/5 d'une part et de Smad 2/3 d'autre part. Ces facteurs de transcription, activés par les Smads déterminent l'engagement et la différenciation cellulaire et sont nommés les LDTF (Lineage-Determining Transcription Factor) (**Mullen et al., 2011**). Néanmoins, les Smads peuvent se lier à d'autres facteurs que les LDTF, appelés les SDTF (Signal-Driven Transcription Factor). En partenariat avec ces derniers, les Smads contrôlent divers processus tels que la progression dans le cycle cellulaire (**Qing et al., 2000**).

## 2) Régulation de la voie TGFβ/Smads

Le premier palier de régulation a lieu au niveau du ligand. Le TGFβ reste lié à son prodomaine, formant ainsi un complexe latent ne pouvant pas se fixer au récepteur. Ce complexe peut demeurer dans l'environnement extracellulaire (**Ge et Greenspan, 2006**). Il en est de même pour les FDG7 à 11 et BMP9 (**Harrison et al., 2011**).

Concernant les récepteurs, l'enzyme peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (FKBP12) verrouille les récepteurs de type I dans un état basal, ils conservent donc leur conformation inactive (**Wang et al., 1996**). Smad 6 et Smad 7 sont des protéines inhibitrices agissant sur la phosphorylation ou l'oligomérisation des Smads en aval des récepteurs. Smad 6 se lie à Smad 4, empêchant son hétérodimérisation avec Smad 2 (**Imamura et al., 1997**). Smad 7 recrute l'ubiquitine ligase Smurf2 afin d'envoyer le récepteur au protéasome pour sa dégradation (**Kavsak et al., 2000**) (**Figure 20**).

Enfin, la phosphorylation des R-Smads est régulée par des protéines endosomales et par l'endofine qui servent d'adaptateurs à la phosphorylation des Smads (**Chen et al., 2007**). Une fois dans le noyau, les R-Smads peuvent subir une déphosphorylation au niveau de leur extrémité C-terminale et contribuer ainsi au recyclage des Smads.



### 3) Rôles dans la régénération du muscle squelettique

Les blessures musculaires initient une série d'évènements finement régulés et qui aboutissent à une réparation efficace du tissu endommagé. Parmi ceux-ci, la voie du TGF $\beta$  est impliquée dans l'activation des cellules satellites.

Les membres de la famille des TGF $\beta$  sont impliqués dans la régulation de la différenciation myogénique et sont présentés comme des inhibiteurs potentiels de ce phénomène. L'ajout de TGF $\beta$  exogène à des myoblastes de rat prévient la différenciation, la fusion et la formation des myotubes (**Yablonka-Reuveni et Rivera, 1997**). Le ligand TGF $\beta$ 1 augmente la prolifération des myoblastes de la lignée C2C12 via Smad 2. De plus, le TGF $\beta$  stimule la prolifération grâce à une modification de la localisation cellulaire de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), qui devient alors nucléaire, entraînant ainsi une augmentation de la division cellulaire et le maintien des cellules dans le cycle cellulaire (**Schabort et al., 2009**).

Le TGF $\beta$  régule négativement la différenciation myoblastique en diminuant l'expression protéique de la myogénine (**Brennan et al., 1991**). Les évènements menant à la diminution de l'expression des MRF et à l'inhibition de la différenciation et de la fusion sont en partie en lien avec la répression transcriptionnelle médiée par Smad 2/3. En effet, Smad 3 interagit avec le domaine bHLH de MyoD, prévenant ainsi la dimérisation de ce MRF et donc sa liaison à l'ADN (**Liu et al., 2001**). Smad 3 a aussi la capacité de se lier à MEF2 pour empêcher son association avec le dimère MyoD/E-47 et par conséquent l'expression de la myogénine (**Liu et al., 2004**).

### III- La voie PI3K/Akt/mTOR

Les phosphoinositide-3-kinases (PI3K) et leurs effecteurs Akt et mTOR sont les principaux constituants de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR régulant les processus prolifératif et métabolique de la cellule. Les rôles directs des PI3K peuvent être divisés, d'une part les PI3K des classes I et II se chargent préférentiellement des fonctions de signalisations cellulaires, d'autre part celles des classes II et III du trafic cellulaire.

**Tableau 6 : Structures et sous-unités régulatrices des trois classes de PI3K.**

Classe	Enzymes	Protéines kinases	Sous-unités régulatrices
Classe I	p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$		p85 $\alpha$ , p85 $\beta$
	p110 $\gamma$		
			p84, p101
Classe II	PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$ , PI3KC2 $\gamma$		
Classe III	Vps34		Vps15

ABD, Adaptor binding domain ; BH, Breakpoint-cluster region homology domain ; CB, Clathrin binding ; HEAT, Huntingtin, Elongation factor 3, protein phosphatase A, TOR1 ; PX, Phox homology ; RBD, Ras-binding domain ; SH2, Src homology 2 domain ; SH3, Src homology 3 domain ; WD, Tryptophan-aspartic acid (Adapté de **Jean et Kiger, 2014**).



## 1) Les acteurs de la voie

### *a) Les phosphoinositide 3-kinases*

La famille des PI3K est présente seulement chez les Eucaryotes (**Brown et Auger, 2011**). Tous les représentants des trois classes ajoutent un phosphate d'une molécule d'ATP sur le carbone 3 de la partie inositol d'un phosphatidylinositol afin de générer un phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. L'ensemble des PI3K présente une structure caractéristique qui consiste en l'assemblage d'un domaine C2, d'un domaine en hélice  $\alpha$  et enfin d'un domaine catalytique kinasique (**Stoyanov et al., 1995**). La classification des PI3K en trois classes (I, II et III) est principalement fondée sur la présence de domaines protéiques supplémentaires et sur leurs interactions avec des sous-unités régulatrices (**Tableau 6**).

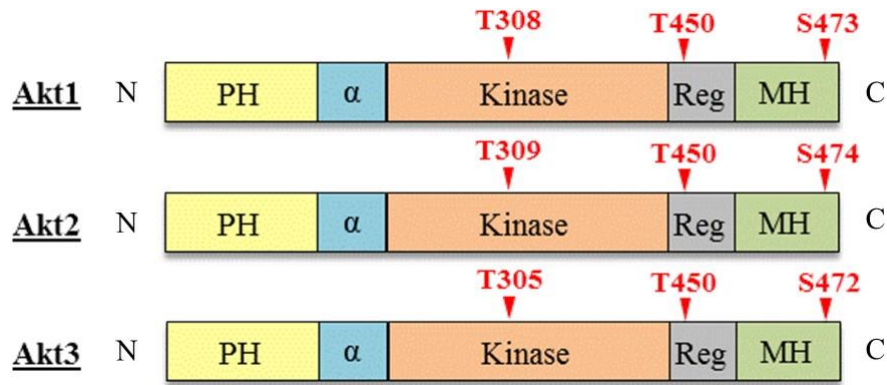
### *b) La sérine/thréonine kinase Akt ou PBK*

La kinase Akt/PBK (Protein Kinase B) occupe une place centrale en tant qu'effecteur majeur de la voie de la PI3K et régule donc des fonctions cellulaires clés telles que la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération et la survie.

Akt est présente en trois isoformes : Akt1 ou PKB $\alpha$ , Akt2 ou PKB $\beta$  et Akt3 ou PKB $\gamma$ , codées chacune par trois gènes distincts localisés sur trois chromosomes différents. Avec plus de 80% d'homologie de séquence, les isoformes d'Akt partagent une architecture commune consistant en un domaine catalytique entouré d'un domaine PH (Pleckstrin Homology) et d'un domaine régulateur carboxy-terminal (**Calleja et al., 2012**) (**Figure 21**). Les interactions intramoléculaires du domaine PH avec la région kinase sont essentielles pour le maintien d'Akt dans un état inactif. Entre ces deux domaines se trouve une petite région de liaison en hélice  $\alpha$ . Des phosphorylations au sein de sa région kinase et de son domaine hydrophobe stabilisent Akt et la protègent de la dégradation, elles ont été définies comme l'étape initiale de l'activation d'Akt (**Chan et Tsichlis, 2001**).

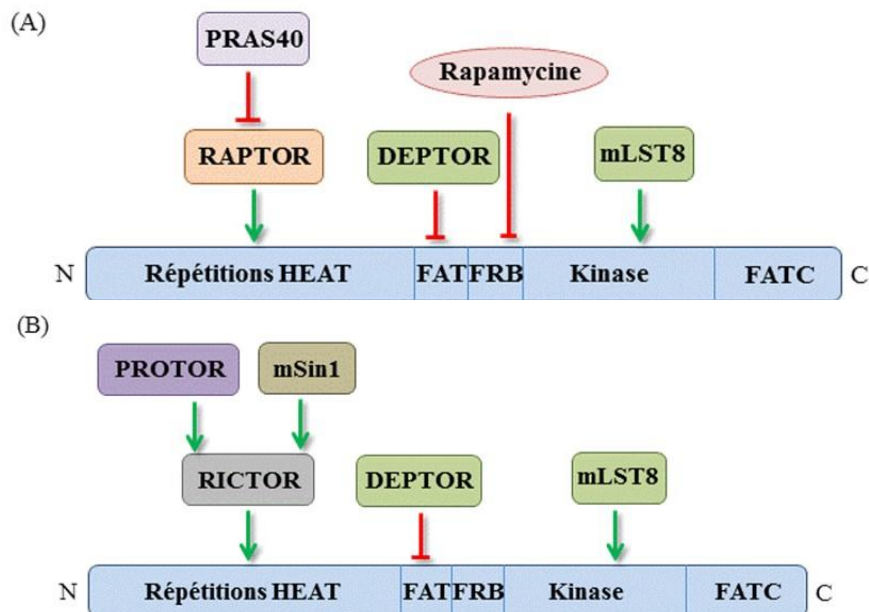
### *c) Les complexes mTOR*

Chez les Mammifères, la voie de signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin) est contrôlée par deux larges complexes mTORC1 et mTORC2 qui diffèrent par leurs sous-unités régulatrices respectives. Ces sous-unités affectent la localisation, la spécificité et l'activité du substrat en réponse aux diverses conditions environnementales.



**Figure 21 : Structures des isoformes d'Akt.**

Toutes les formes d'Akt possèdent un domaine catalytique kinasique (Kinase) entouré de part et d'autre d'un domaine PH (domaine de liaison à la membrane plasmique) et d'une région régulatrice carboxy-terminale (Reg). Les sites de phosphorylation (triangles rouge) se situent dans la boucle du domaine kinase, dans le domaine régulateur ainsi qu'au sein de la région hydrophobe (MH).  $\alpha$ , région de liaison en hélice  $\alpha$  ; MH, Motif hydrophobe ; PH, Pleckstrin homology ; Reg, domaine régulateur ; S, Sérine ; T, Thréonine (Adapté de **Toker et Marmiroli, 2014**).



**Figure 22 : Domaines de mTOR et interactions avec mTORC1 (A) et mTORC2 (B).**

La protéine mTOR (en bleu) est formée des domaines HEAT, FAT, FRB, FATC et d'un domaine kinase. RAPTOR/RICTOR et mLST8 activent mTOR, tandis que DEPTOR possède une action inhibitrice sur les complexes. mSin1 et PROTOR agissent comme régulateurs négatifs de mTORC2. La rapamycine peut inhiber mTORC1. ATM, ataxia-telangiectasia mutated ; DEPTOR, DEP domain-containing mTOR-interacting protein ; FAT, FKBP/ATM/TRRAP ; FATC, FRAP/ATM/TRRAP/Carboxy terminal ; FKBP, FK-506-binding protein-12 ; FRAP, FKBP-rapamycin associated protein ; FRB, FKBP, rapamycin-binding ; HEAT, Huntingtin/Elongation factor 3/A subunit of protein phosphatase-2A/TOR1 ; mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein 8 ; mSin1, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 ; mTOR, mechanistic target of rapamycin ; mTORC1, mTOR complex 1 ; mTORC2, mTOR complex 2 ; PRAS40, prolin-rich Akt substrate 1 40 kDa ; PROTOR, protein observed with Rictor ; RAPTOR, regulatory-associated protein of TOR ; RICTOR, rapamycin-insensitive companion of TOR ; TRRAP, transactivation/transformation domain-associated protein (Adapté de **Martelli et al., 2018**).

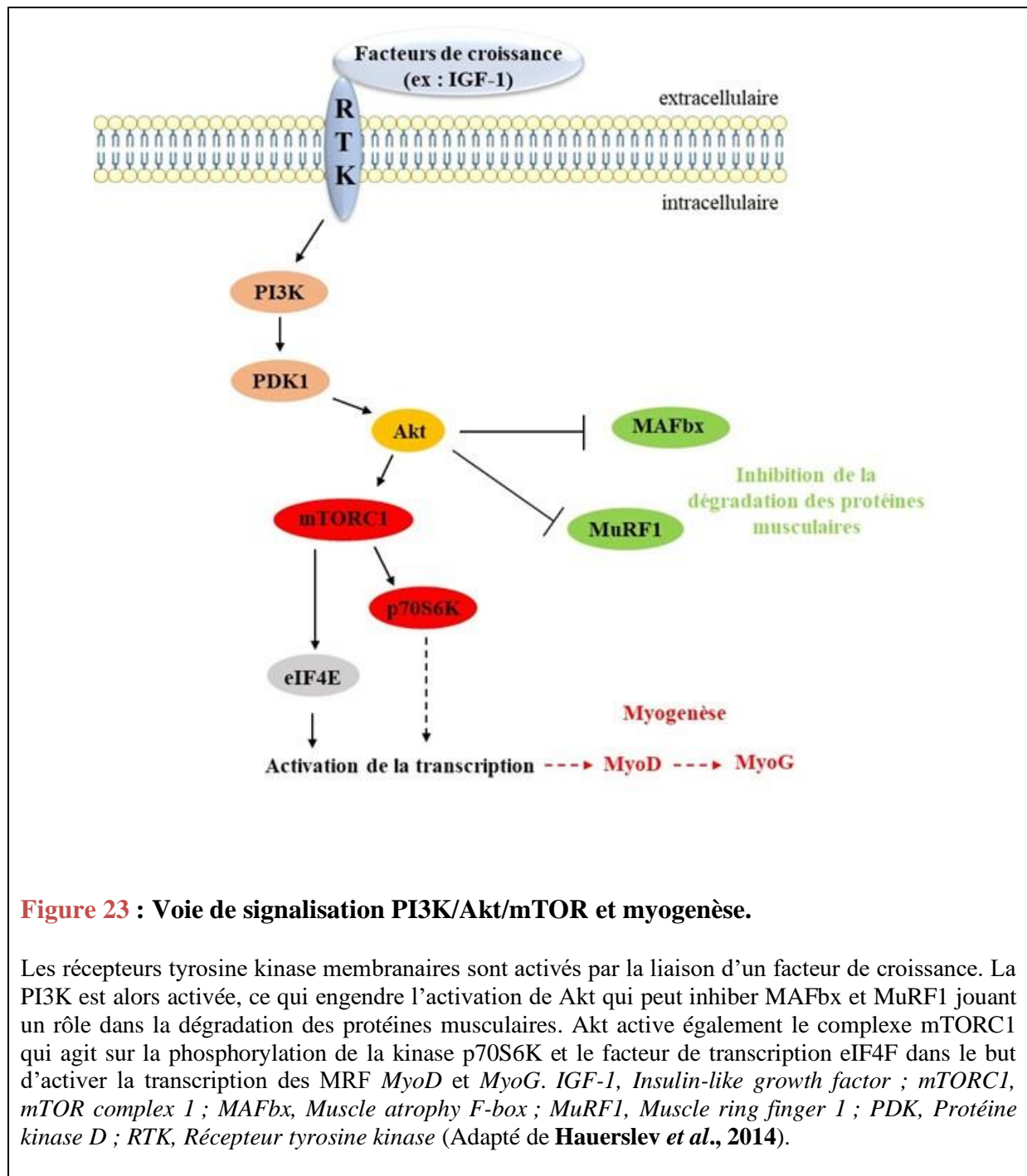
La protéine mTOR de 289 kDa, est considérée comme la sous-unité catalytique des complexes précédemment cités. Sa région catalytique est une kinase PIKK (PI3K related protein kinase). La partie N-terminale de cette kinase est constituée d'une répétition d'hélices (**Figure 22**). Adjacent au domaine catalytique, le domaine FAT (FKBP/ATM/TRRAP) en hélices  $\alpha$  est essentiel dans l'intégrité structurale et l'activité de mTOR (**Bosotti et al., 2000**). RAPTOR (Regulatory-associated protein of TOR) est la protéine d'interaction du complexe mTORC1 avec mTOR, et RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of TOR) celle du complexe mTORC2. RAPTOR et RICTOR sont indispensables à la mise en place de ces complexes (**Hara et al., 2002**).

## 2) Mécanismes d'activation de la voie

Grâce à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par divers facteurs de croissance tels que l'insuline, la PI3K phosphoryle l'inositol d'un phosphoinositide. En retour, un phosphatidylinositol triphosphate est généré et va se lier au domaine PH de la protéine Akt. Cette liaison permet une relocalisation de Akt du cytoplasme à la membrane plasmique, un changement conformationnel et ainsi la phosphorylation d'Akt sur la Thr308 et la Ser473 (**Andjelkovic et al., 1997**). Une fois Akt activée, elle va phosphoryler la protéine TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), protéine à activité GTPase qui fonctionne en association avec TSC1 afin d'activer mTORC1 (**Tee et al., 2003 ; Inoki et al., 2002**). mTORC1 activé contrôle différentes fonctions anaboliques cellulaires à travers la phosphorylation de la kinase p70S6K1 et du facteur initiateur de la transcription 4E-BP1 (**Bilanges et al., 2007**). Les cibles géniques de mTORC1 sont pour la plupart impliquées dans la survie et la prolifération.

## 3) Implications dans la myogenèse

Une perte de poids ou un exercice intense peuvent entraîner l'activation de la voie PI3K/Akt grâce à l'expression directe de l'IGF-1 par le muscle (**DeVol et al., 1990**). L'activation de cette voie aboutit à l'activation de la transcription des MRF MyoD et MyoG. Cette augmentation d'IGF-1 est également suffisante pour induire l'hypertrophie du muscle, comme le montrent des expériences sur des souris transgéniques dans lesquelles *Igf1* est surexprimé dans le muscle squelettique (**Musaro et al., 2001**). Un mutant murin exprimant de manière constitutive le gène codant Akt présente une hypertrophie du muscle squelettique (**Lai et al., 2004**). De la même façon, une activation accrue d'Akt durant deux à trois semaines suffit pour induire un doublement de la taille des muscles squelettiques causé par



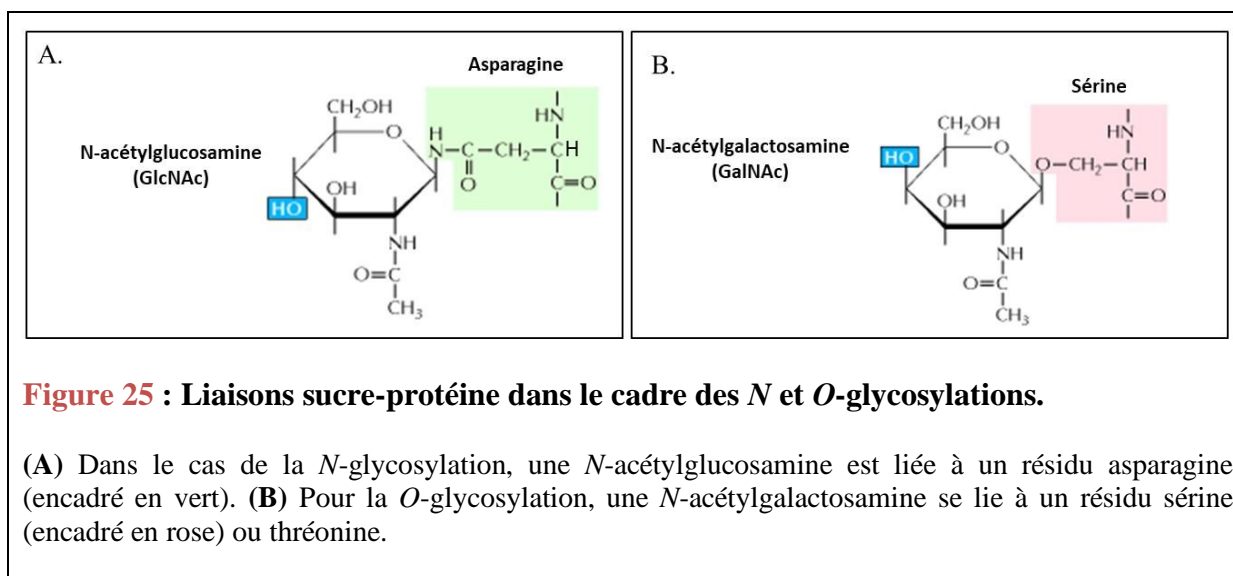
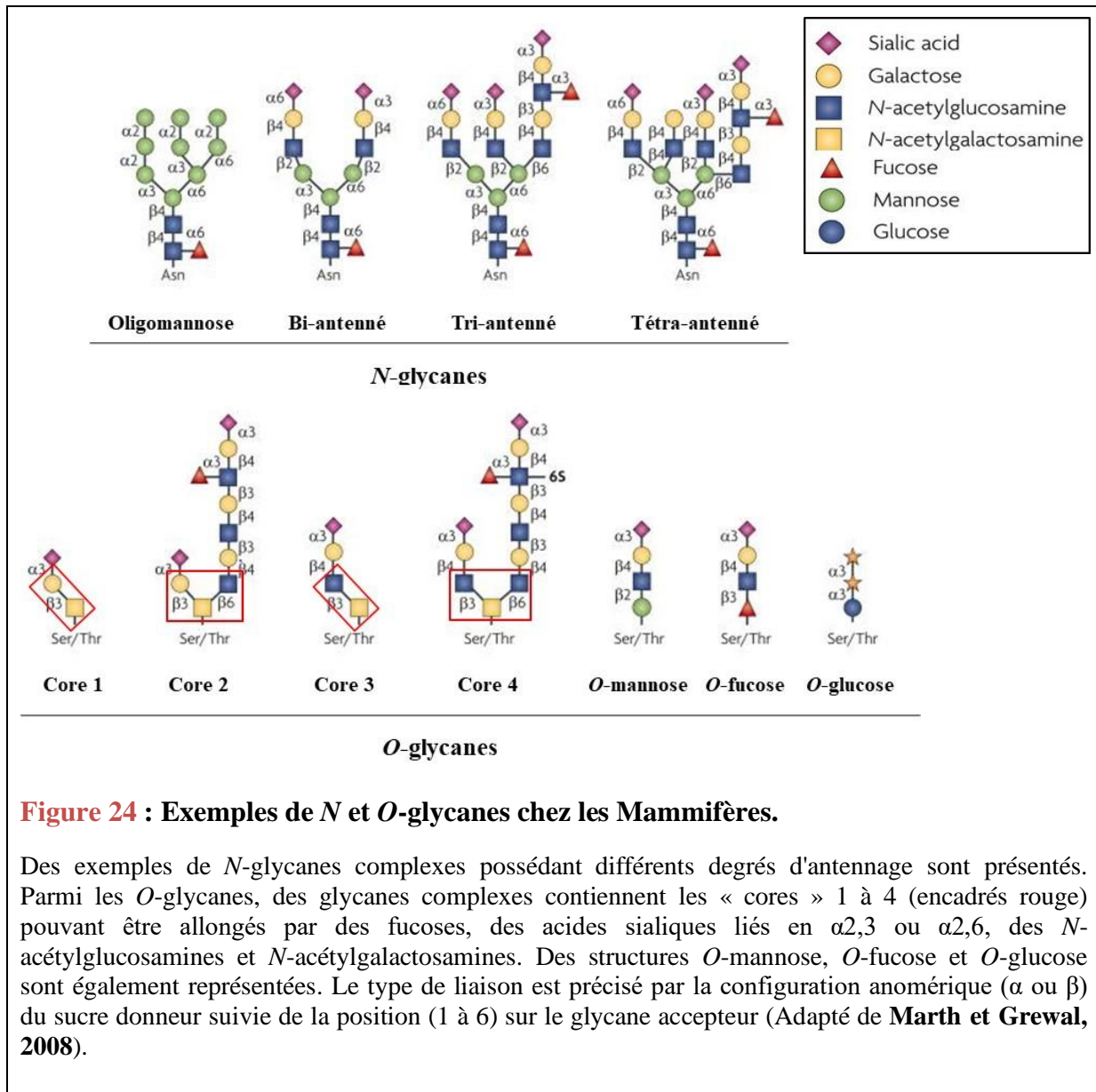
**Figure 23 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et myogenèse.**

Les récepteurs tyrosine kinase membranaires sont activés par la liaison d'un facteur de croissance. La PI3K est alors activée, ce qui engendre l'activation de Akt qui peut inhiber MAFbx et MuRF1 jouant un rôle dans la dégradation des protéines musculaires. Akt active également le complexe mTORC1 qui agit sur la phosphorylation de la kinase p70S6K et le facteur de transcription eIF4F dans le but d'activer la transcription des MRF *MyoD* et *MyoG*. *IGF-1*, *Insulin-like growth factor* ; *mTORC1*, *mTOR complex 1* ; *MAFbx*, *Muscle atrophy F-box* ; *MuRF1*, *Muscle ring finger 1* ; *PDK*, *Protéine kinase D* ; *RTK*, *Récepteur tyrosine kinase* (Adapté de **Hauerslev et al., 2014**).

une augmentation de la voie de synthèse protéique mTORC1/p70S6K (**Pallafacchina et al., 2002**). Akt inhibe la dégradation protéique en empêchant la transcription des facteurs FOXO. Ceux-ci sont nécessaires à la régulation transcriptionnelle des protéines MAFbx (Muscle Atrophy F-box) et MuRF1 (Muscle Ring Finger 1), impliquées dans l'ubiquitylation et la dégradation via le protéasome de la myosine et d'autres protéines musculaires (**Li et al., 2007**) (**Figure 23**).

Appliquée sur des myotubes en culture, la rapamycine (agent pharmacologique inhibiteur de mTOR) atténue la prolifération, la survie, la différenciation et l'hypertrophie. Ceci indique que la protéine mTOR participe au programme de développement musculaire à différents niveaux (**Ohanna et al., 2005**).

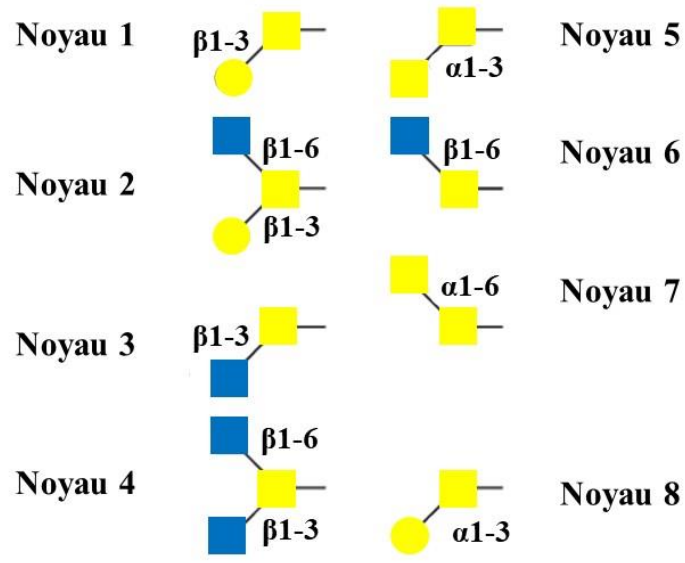
La régénération musculaire n'est pas seulement activée par des facteurs de croissance qui peuvent avoir des effets négatifs tels qu'une dérégulation de l'homéostasie, elle peut également être activée en présence de certains métaux comme le zinc. En effet, la différenciation myogénique de cellules C2C12 peut être induite en présence de concentrations croissantes en  $Zn^{2+}$  qui stimule la prolifération des myoblastes, leur différenciation et enfin la maturation des fibres. Ce processus a lieu via la voie PI3K/Akt grâce à une activation du transporteur du zinc, la protéine Zip7. En effet, une altération de ce transporteur génère une réduction d'activité de la voie PI3K/Akt ainsi qu'une réduction des myofibres (**Mnatsakanyan et al., 2018**).



### **Chapitre 3. LES GLYCOSYLATIONS, DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES FONDAMENTALES**

Les glycosylations représentent les modifications post-traductionnelles les plus répandues et les plus nombreuses. Plus de 80% des protéines membranaires sont glycosylées. Elles se définissent comme des ajouts de glycanes sur les protéines ou les lipides et qui ont lieu lors de leur passage, après traduction pour les protéines, dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Malgré la grande diversité structurale des glycanes, leurs mécanismes de synthèse et de régulation sont bien conservés chez les Mammifères (**Ohtsubo et Marth, 2006**). Les glycanes possèdent des rôles variés, ils assurent par exemple la conformation et la stabilité des glycoprotéines destinées à être secrétées ou intégrées à la membrane plasmique. Ils facilitent les interactions entre protéines lors de l'adhésion cellulaire et de la différenciation (**Varki, 1993 ; Ervasti et Campbell, 1993**). Cette diversité résulte de l'existence de liaisons entre les composés monosaccharidiques et de leur arrangement au sein des *N* et *O*-glycanes pouvant contenir jusqu'à une centaine de monosaccharides (**Figure 24**). Les monosaccharides incluent les oses, les dérivés d'oses neutres, les osamines qui peuvent être acétylées, les acides uroniques et les acides sialiques. Neuf d'entre eux sont principalement utilisés lors des processus enzymatiques de glycosylation chez les Mammifères : le galactose, le glucose, le mannose, le fucose, le xylose, la glucosamine, la *N*-acétylglucosamine, la *N*-acétylgalactosamine et l'acide *N*-acétyl neuraminique. Les monosaccharides sont associés les uns aux autres par liaison covalente, la liaison osidique, générée par des enzymes spécifiques. Ce type de liaison s'établit également pour greffer un glycanes à une protéine (glycoprotéine) ou un lipide (glycolipide). Le transfert des monosaccharides sur une structure est catalysé par les glycosyltransférases. Les glycosidases catalysent la réaction inverse, l'hydrolyse des liaisons osidiques.

Selon l'ancrage du glycanes sur la glycoprotéine, on distingue deux types de glycosylation : la *N* et la *O*-glycosylation (**Figure 25**). La *N*-glycosylation se définit comme la liaison d'une GlcNAc sur le groupement amide d'une asparagine. La *O*-glycosylation correspond à la liaison d'une GalNAc ou de plusieurs autres oses sur l'hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine.



**Figure 26 :** Les huit noyaux O-glycaniques de type mucines.

Le type de liaison liant les monosaccharides est précisé (Adapté de *Jensen et al., 2010*).



## I- Les *O*-glycosylations

Les *O*-glycosylations sont des modifications post-traductionnelles toutes particulières pour trois raisons : il n'existe aucune séquence consensus pour ce type de réaction sur les protéines, hormis pour la *O*-fucosylation, la *O*-glucosylation, la *O*-GlcNAcylation sur les motifs EGF like ; aucune enzyme universelle ne permet de libérer les *O*-glycanes ; la densité de sites de *O*-glycosylation peut être très importante. La liaison *O*-glycosidique s'effectue entre un résidu sérine ou thréonine et un glucose, un fucose, un mannose, un xylose ou des dérivés d'oses acétylés.

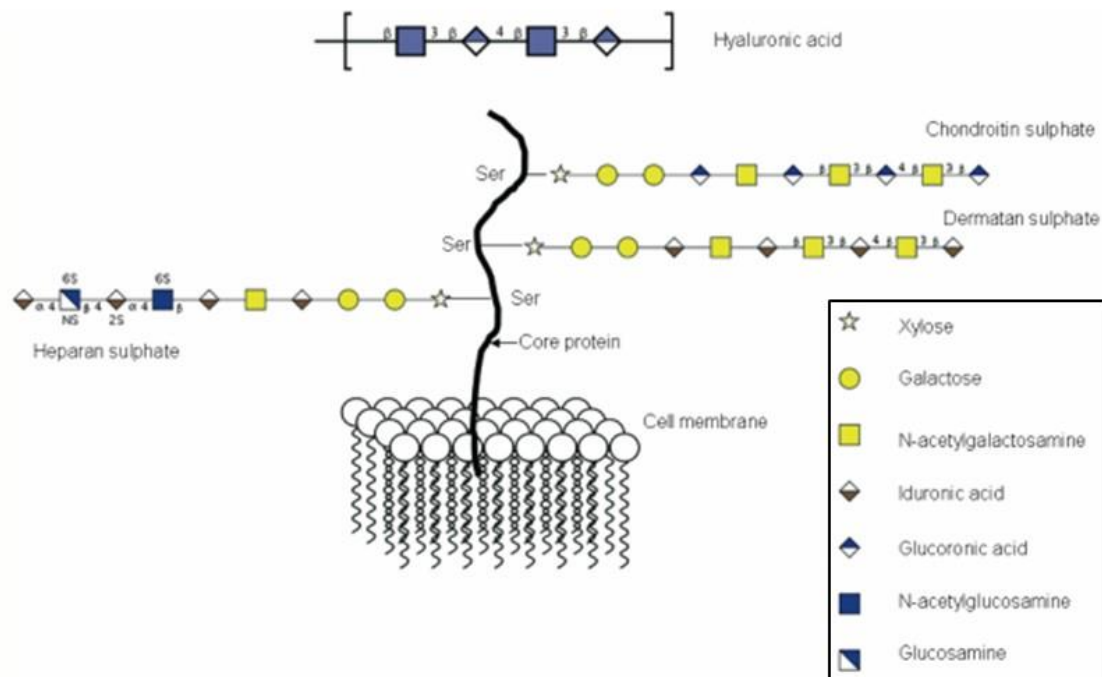
### 1) Principaux types de *O*-glycosylations

#### a) *O*-glycosylation de type mucine

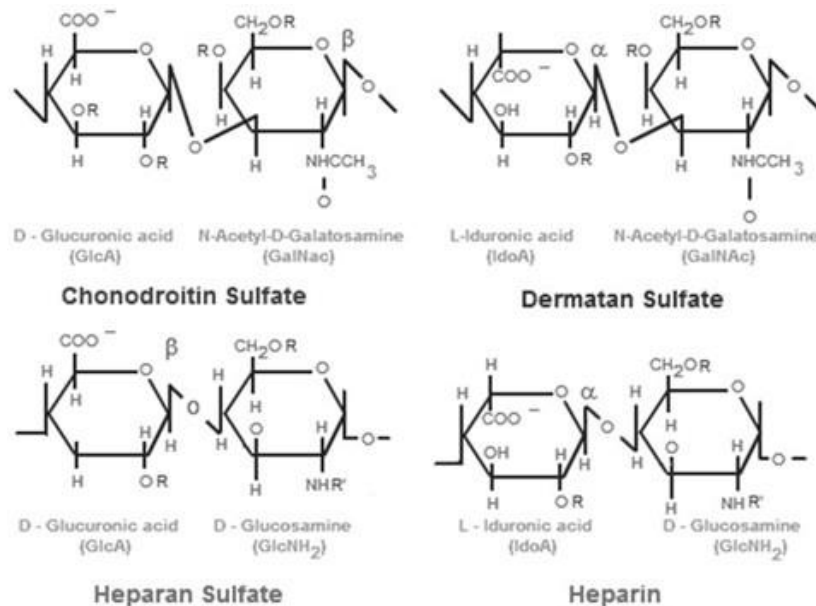
Ce type de glycosylation est présent dans de nombreuses glycoprotéines membranaires comme par exemple les mucines. Ce sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire retrouvées dans les membranes des muqueuses. Ces glycosylations sont caractérisées par le transfert d'un GalNAc d'un UDP-GalNAc sur une sérine ou une thréonine et sont catalysées par les enzymes *N*-acétyl- $\alpha$ -D-galactosaminyltransférases (GALNT) dans l'appareil de Golgi (**Hanisch, 2001**). Ces enzymes, bien conservées à travers les espèces, ont des expressions tissu-spécifiques, modulables à travers le temps (**Schwientek et al., 2002**). Il existe actuellement 20 gènes différents de GALNT chez l'humain selon la base de données HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Ces gènes appartiennent à la famille de glycosyltransférases n°27 de la classification CAZy (Carbohydrate Active enZYmes). Cette dernière distingue les différentes familles d'enzymes impliquées dans la synthèse, la dégradation et les modifications des liaisons glycosidiques.

Les monosaccharides portés par le résidu GalNAc peuvent être sialylés, fucosylés, acétylés ou méthylés. Les *O*-glycanes de type mucine sont construits à partir de huit types de « cores » ou noyaux qui représentent le point d'ancrage à la protéine (**Figure 26**). Généralement, les noyaux 1 et 2 sont présents dans l'espèce humaine. Les glycanes possédant un noyau 1 sont très régulièrement simplement sialylés, tandis que ceux possédant un noyau 2 sont de structure plus complexe en raison d'un allongement par greffage d'oses (**Jensen et al., 2010**). Des altérations des *O*-glycosylations de type mucine entraînent divers effets chez l'animal : défauts du développement, maladies du système sanguin, etc... (**Zhang et Ten Hagen, 2011**).

A.



B.



**Figure 27 : Représentation schématique des différents types de glycosaminoglycanes et des disaccharides les constituant.**

(A) Les principaux glycosaminoglycanes sont attachés à un résidu sérine d'une protéine cœur membranaire. L'acide hyaluronique est non fixé à une protéine et est composé du disaccharide répété acide glucuronique et *N*-acétylglucosamine. (B) Les glycosaminoglycanes sont constitués d'unités disaccharidiques répétées d'acides glucuroniques ou iduroniques et d'hexosamines *N*-acétylées (glucosamine ou galactosamine) plus ou moins sulfatées. Les kératanes-sulfates (non représentés sur la figure) sont constitués du motif répété suivant : un galactose plus ou moins sulfaté lié à une glucosamine sulfatée ou non. Cette chaîne se termine par un acide sialique (**Gandhi et Mancera, 2008 ; chemistry.tutorvista.com**).

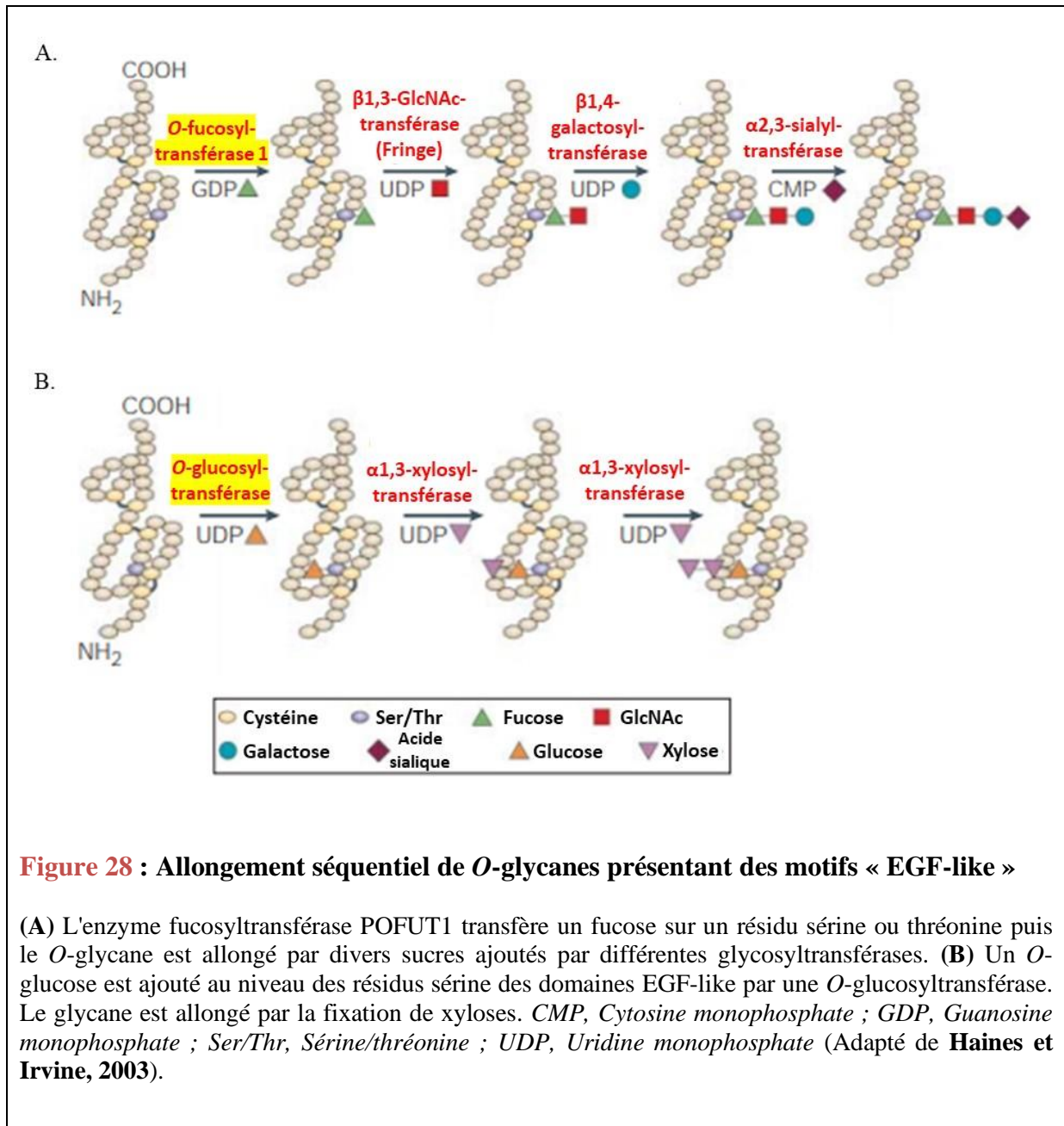
### ***b) O-glycosylation de type O-GlcNAc***

Elle se définit comme la liaison d'un résidu GlcNAc sur un résidu sérine ou thréonine de protéines cytosoliques ou nucléaires. Elle est catalysée par l'enzyme *O*-linked *N*-acetylglucosamine transférase (OGT). Ce type de glycosylation est impliqué dans la régulation de l'expression génique (**Sinclair *et al.*, 2009**) et celle du métabolisme cellulaire (**Issad *et al.*, 2010**). La particularité de cette glycosylation réside dans le fait que le GlcNAc est l'unique constituant de la partie glucidique de ce type de glycoprotéine (**Hart *et al.*, 2007**).

### ***c) O-glycosylation de type protéoglycane***

Les protéoglycanes sont des macromolécules glucidiques de la matrice extracellulaire et des lames basales utiles pour l'assemblage et le maintien de la matrice, et nécessaires pour la prolifération cellulaire, la différenciation ou la migration. Ils sont constitués de chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), longues chaînes linéaires composées de disaccharides répétés, liées par une liaison *O*- $\beta$ -glycosidique entre un xylose et un résidu sérine de la protéine cœur (**Figure 27**).

Selon la nature et le mode de fixation des disaccharides, les GAG appartiennent à cinq grandes familles : les chondroïtines-sulfates (CS), les héparanes-sulfates (HS), les kératanes-sulfates (KS), les dermatanes-sulfates (DS) et l'acide hyaluronique. Les CS, DS et HS sont fixés à la protéine via le tétrasaccharide « Glc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl $\beta$ 1-Ser/Thr » (**Bourdon *et al.*, 1985**). Les KS sont liés à la protéine via un *N* ou un *O*-glycane de type O-GalNAc ou O-Man (**Krusius *et al.*, 1986**). Les KS de type I (groupement sulfaté porté par le galactose) sont liés aux *N*-glycanes et les KS de type II et III (groupement sulfaté porté par le GlcNAc) le sont sur les *O*-glycanes. La spécificité des KS de type III réside dans la liaison sucre-protéine qui se fait via l'intermédiaire d'un résidu mannose (**Funderburgh *et al.*, 2000**). Les KS présentent aussi des ramifications sur la chaîne polysaccharidique. Par conséquent, certaines glucosamines peuvent être fucosylées et de l'acide sialique  $\alpha$ 2,3 lié est régulièrement retrouvé à l'extrémité des chaînes de KS (**Gonzalez-Gil *et al.*, 2018**).



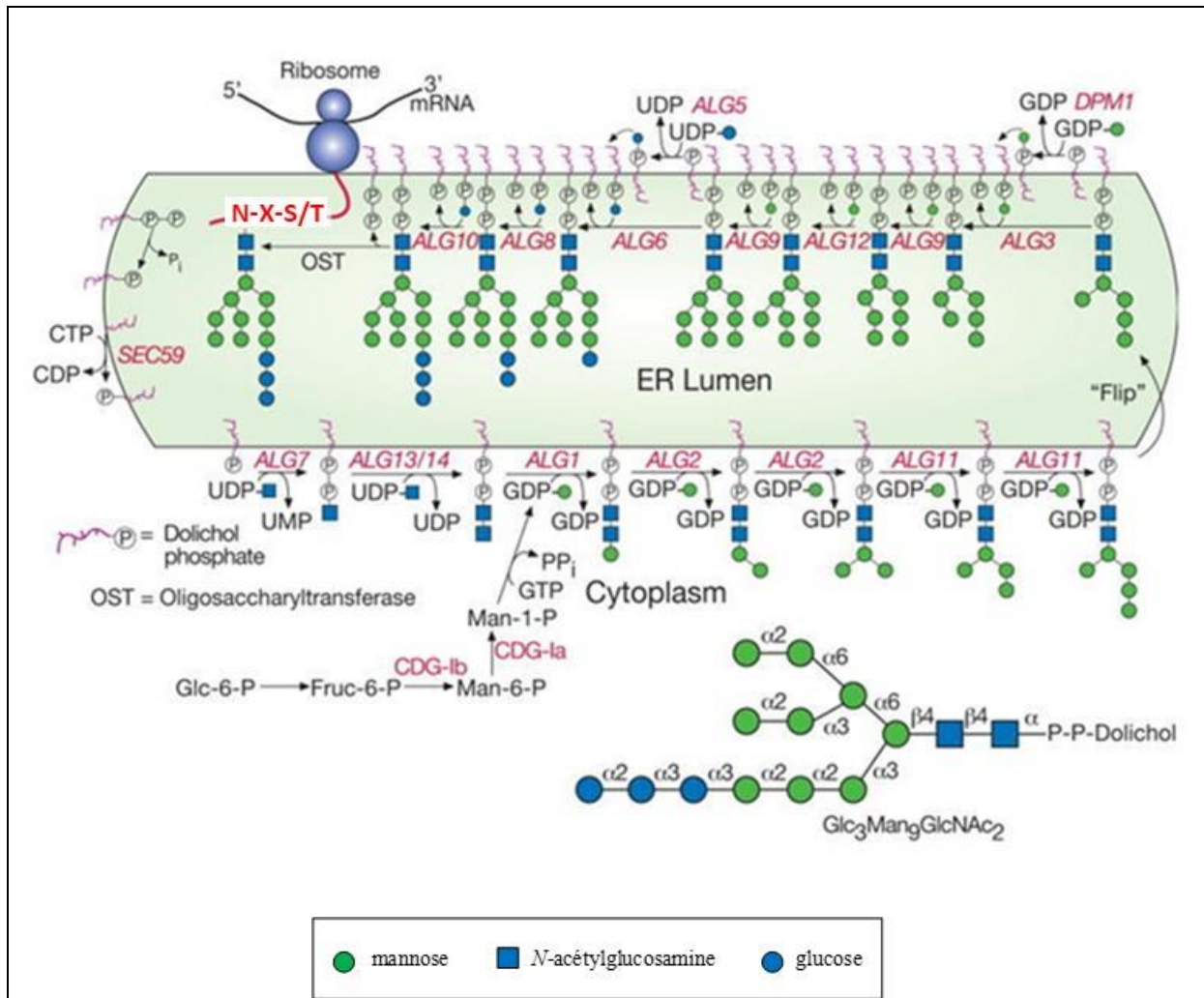
## 2) La *O*-fucosylation

Deux enzymes fucosylent directement des protéines, elles sont appelées *O*-fucosyltransférases 1 et 2 (POFUT1 et 2). Elles transfèrent un fucose sur un résidu sérine ou thréonine présent dans des séquences protéiques riches en cystéines. POFUT1 réalise la *O*-fucosylation sur les répétitions EGF (Epidermal Growth Factor) au sein de la séquence consensus C<sup>2</sup>-X<sub>4-5</sub>-(S/T)-C<sup>3</sup> (C<sup>2</sup> et C<sup>3</sup> correspondent aux deuxième et troisième cystéines du domaine EGF-like, X est n'importe quel acide aminé autre qu'une cystéine) (**Harris et Spellman, 1993**) (**Figure 28**). POFUT2 effectue la *O*-fucosylation sur les répétitions TSR (Thrombospondin type I repeats) contenant des résidus sérine/thréonine localisés dans les séquences C<sup>1</sup>-X-X-S/T-C<sup>2</sup> ou C<sup>2</sup>-X-X-S/T-C<sup>3</sup> (**Luo et al., 2006**).

Actuellement, une centaine de protéines possédant des répétitions EGF sont susceptibles d'être *O*-fucosylées bien que peu d'entre elles ont été confirmées. Les récepteurs Notch sont parmi les substrats de POFUT1 les plus étudiés. La *O*-fucosylation des motifs EGF-like du récepteur Notch par l'enzyme POFUT1 favorise le clivage de sa partie intracellulaire, et l'expression des gènes cibles de la voie (**Rampal et al., 2005**). Les *O*-fucosyl glycanes portés par Notch pourraient être sialylés en  $\alpha$ 2,6 par la sialyltransférase ST6Gal I. L'ajout d'un GlcNAc à un fucose porté par le récepteur Notch 1 par les *O*-fucosyl 3- $\beta$ -*N*-acétylglucosaminyltransférases Fringe permet la reconnaissance spécifique du ligand Delta (**Xu et al., 2007**). Malgré la cinquantaine de protéines identifiées, les connaissances sur la *O*-fucosylation des motifs TSR par POFUT2 sont très faibles.

## 3) La *O*-glucosylation

La *O*-glucosylation est une modification post-transcriptionnelle rare ayant lieu au niveau de répétitions EGF-like possédant la séquence consensus C<sup>1</sup>-X-S-X-P-C<sup>2</sup> (**Harris et Spellman, 1993**). Le glucose *O*-lié est ajouté sur le résidu sérine entre les cystéines 1 et 2 de la séquence consensus (**Figure 28**). Ce glucose *O*-lié sur les EGF-like a d'abord été découvert dans les facteurs de coagulation bovins VII et IX puis a été trouvé sur plusieurs autres protéines dont des protéines de la coagulation et le récepteur Notch 1 des Mammifères. La protéine *O*-glucosyltransférase 1 (POGLUT1) est un exemple de *O*-glucosyltransférase qui ajoute un *O*-glucose aux répétitions EGF-like de Notch, régulant ainsi la structure, le transport du récepteur et la cascade de signalisation (**Acar et al., 2008**).



**Figure 29** : Synthèse du « dolichol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> » et transfert à une protéine.

Le dolichol phosphate est d'abord localisé sur la face cytoplasmique de la membrane du RE où un GlcNAc-1-P est fixé pour générer un Dol-P-P-GlcNAc. Ce dernier composé est allongé en Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> qui est basculé au travers de la membrane du RE pour arriver dans la lumière. A ce niveau, quatre résidus mannose et trois résidus glucose sont ajoutés afin de synthétiser le produit Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub> qui est alors transféré sur un résidu asparagine de la séquence consensus N-X-S/T d'une protéine grâce à l'enzyme oligosaccharyltransférase (OST). *N*, asparagine ; *S*, sérine ; *T*, thréonine (Adapté de Freeze *et al.*, 2014).

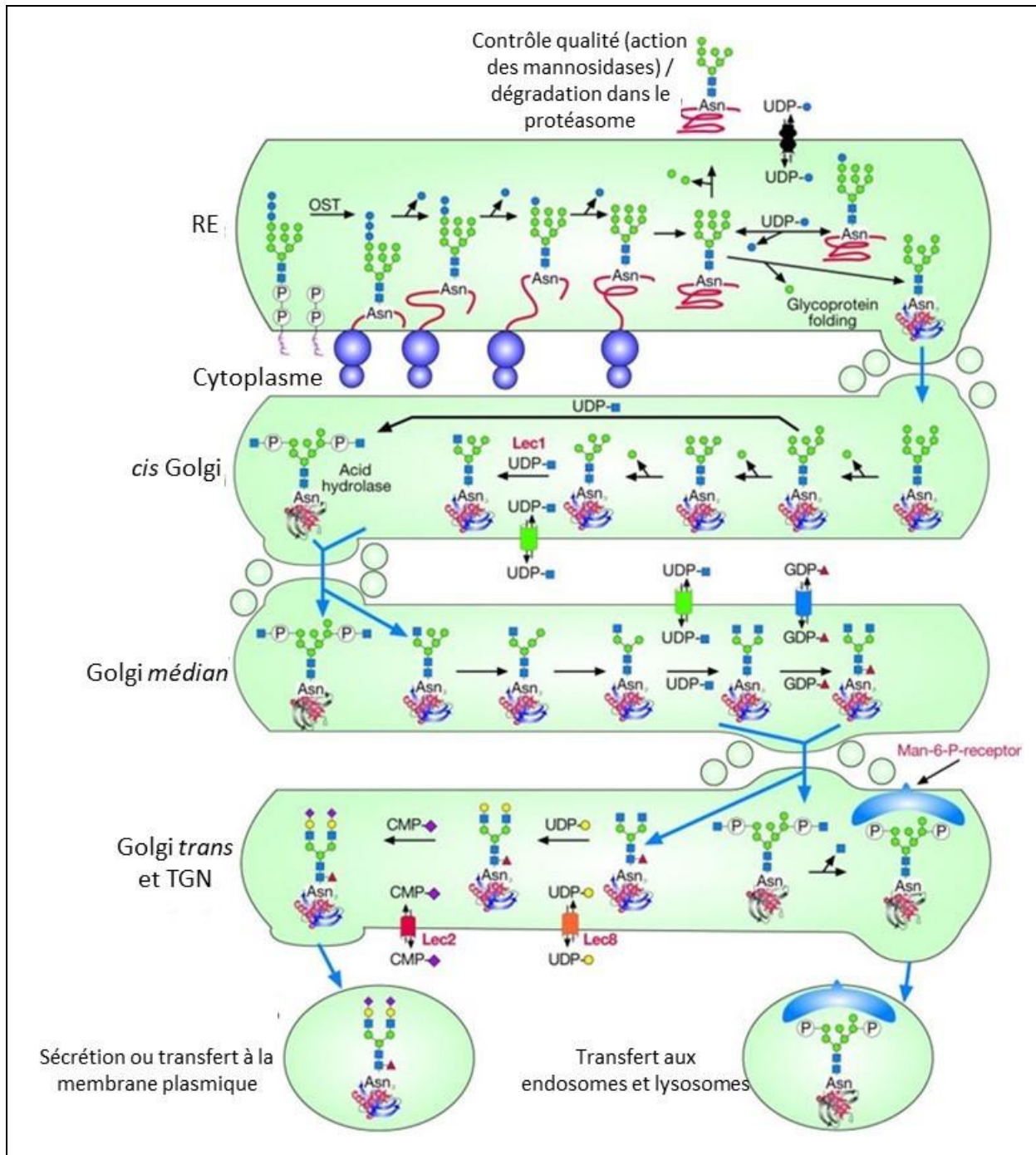
Il existe deux autres types de *O*-glycosylation assez peu représentés chez les Mammifères. La première est principalement portée par des protéines fibreuses et des collagènes de la matrice extracellulaire et consiste en la liaison d'un galactose sur une hydroxylysine (Song et Mechref, 2013). La seconde, nommée *O*-mannosylation, est présente surtout au niveau de l' $\alpha$ -dystroglycane, protéine impliquée dans de multiples dystrophies musculaires congénitales (Beltran-Valero de Bernabé *et al.*, 2002).

## II- La *N*-glycosylation

La glycosylation sur des résidus asparagine constitue des modifications essentielles pour les protéines eucaryotes telles que les protéines sécrétées, la majorité des protéines membranaires et les protéines de la lumière du réticulum endoplasmique (RE), du Golgi, du noyau et des lysosomes. Les glycanes *N*-liés sont importants pour le repliement et la stabilité des glycoprotéines, leur contrôle qualité, leur trafic intracellulaire ainsi que leurs fonctions physiologiques. Les protéines non correctement repliées sont reconnues et sont ensuite dégradées. Chez les organismes métazoaires, l'oligosaccharyltransférase (OST) est l'enzyme clé des réactions de *N*-glycosylation puisqu'elle transfère l'oligosaccharide précurseur commun de tous les *N*-glycanes sur des résidus asparagine de la séquence consensus de *N*-glycosylation (Mohorko *et al.*, 1985).

### 1) Biosynthèse des *N*-glycanes et extension des branches de *N*-glycanes complexes

Le dolichol-phosphate (Dol-P) est un substrat clé de la *N*-glycosylation des protéines, il est généralement synthétisé *de novo* et est recyclé dans le cytoplasme (Figure 29). La première étape de l'allongement du Dol-P démarre avec la liaison d'un GlcNAc-1-P pour former un « GlcNAc-P-P-Dol ». Cette étape a lieu sur la partie cytosolique du réticulum endoplasmique rugueux. Un second GlcNAc et cinq résidus mannose viennent ensuite s'ajouter, afin de former le « Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol ». Une flippase permet d'orienter l'oligosaccharide côté lumière du RE. Sur celui-ci, sont greffés successivement quatre mannoses puis trois glucoses. Ce nouveau composé est le « Glc<sub>3</sub>-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol », précurseur commun à l'ensemble des *N*-glycanes. Ce dernier est alors greffé sur un résidu asparagine par le complexe OST composé d'une sous-unité catalytique et d'autres sous-unités accessoires (Kelleher and Gilmore, 1994).



**Figure 30 : Synthèse et maturation des N-glycanes.**

Le « Glc<sub>3</sub>-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol » est transféré sur un résidu asparagine d'une protéine dans le RE. Des glucosidases et mannosidases interviennent pour retirer des résidus glucose et mannose. Ces modifications déterminent la conservation ou la dégradation de la glycoprotéine. Pour la plupart des glycoprotéines, des résidus mannose supplémentaires sont enlevés dans le *cis* Golgi et des UDP-GlcNAc sont ajoutés jusqu'à générer le « GlcNAc-Man<sub>5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-Asn ». C'est dans le Golgi médian que la N-acétyl-glucosaminyltransférase I initie la formation de la première branche du N-glycane et qu'une mannosidase retire à nouveau deux résidus mannose pour créer un glycane bi-antenné. Dans le Golgi médian et le *trans* Golgi, ce N-glycane est allongé par l'ajout de fucoses, galactoses ou d'acides sialiques et devient alors un N-glycane complexe (Adapté de **Kornfeld R et Kornfeld S, 1985**).



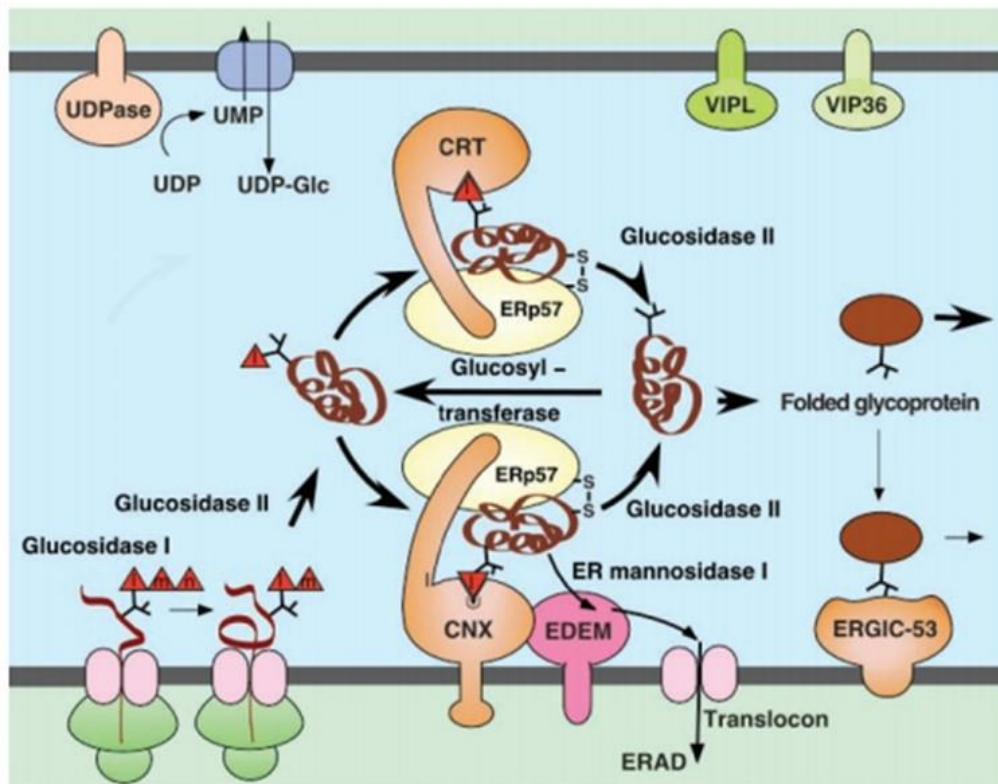
La séquence consensus de *N*-glycosylation est N-X-S/T (N est l'asparagine, X représente n'importe quel acide aminé autre que la proline, S la sérine et T la thréonine). Cette nouvelle structure est alors modifiée par l'action de glucosidases et de mannosidases afin d'obtenir la structure « Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-Asn-protéine ». La *N*-glycoprotéine est alors transportée dans le *cis* Golgi (**Burda et Aebi, 1999**). Cette nouvelle structure est alors modifiée par l'action de glucosidases I et II et de la mannosidase du REG afin d'obtenir la structure « Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-Asn-protéine ». La glucosidase I clive le premier glucose en  $\alpha$ 1,2 du glycane naissant, tandis que la glucosidase II clive les deux glucoses internes liés en  $\alpha$ 1,3 (**Pelletier et al., 2000**).

Après le transfert, le *N*-glycane nouvellement synthétisé est à nouveau réduit de manière séquentielle par des mannosidases, des GlcNAc sont aussi ajoutés pour générer le composé « GlcNAc-Man<sub>5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-Asn-protéine » dans le *cis* Golgi, précurseur des *N*-glycanes (**Figure 30**).

Pour générer des *N*-glycanes hybrides et complexes, des *N*-acétyl-glucosaminyltransférases I et II (MGAT1 et MGAT2) agissent sur la structure « Man<sub>5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> » dans le Golgi *médian* afin de créer un glycane complexe bi-antenné. De nouvelles branches sont ajoutées par les *N*-acétyl-glucosaminyltransférases IV et V (GnT-IV et V) afin de former des complexes glycaniques tri et tétra-antennés. Dans le *trans* Golgi, d'autres étapes de maturation peuvent avoir lieu. Parmi celles-ci, des résidus galactose sont transférés à l'extrémité non-réductrice du *N*-glycane, des résidus fucose sont ajoutés en  $\alpha$ 1,6 sur le GlcNAc ou bien des acides sialiques sont fixés sur les chaînes branchées du glycane (**Schachter, 2000**). Les enzymes assurant ces additions sont localisées dans différentes régions de l'appareil de Golgi. Les *N*-acétyl-glucosaminyltransférases et les mannosidases sont localisées dans le *cis* et *trans* Golgi. Les fucosyltransférases (FUT), galactosyltransférases (GALT) et *N*-acétylgalactosyltransférases se situent dans le *médian* et *trans* Golgi. Enfin, les sialyltransférases sont retrouvées dans le *trans* Golgi et le réseau trans-golgien (**Bergeron et al., 1985**).

## 2) Contrôle de la structure des protéines nouvellement glycosylées

Plusieurs points de contrôle sont nécessaires pour évaluer le bon assemblage et le bon repliement des glycoprotéines, des voies de dégradation existent dans le cas où la protéine présenterait un défaut de glycosylation.



**Figure 31 : Contrôle-qualité des *N*-glycoprotéines et mécanisme de dégradation dans le réticulum endoplasmique.**

Le précurseur oligosaccharidique « Glc-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> », fixé à un résidu asparagine d'une protéine naissante, subit l'action des glucosidases I et II pour retirer les glucoses terminaux. La *N*-glycoprotéine se lie à la calnexine ou la calréticuline. La glucosidase II retire le dernier résidu de glucose présent sur le glycane, empêchant ainsi la liaison de la protéine avec la calréticuline ou la calnexine. Si la glycoprotéine est correctement repliée, elle sort du RE pour poursuivre sa maturation. Si sa structure est incorrecte, des résidus de glucose peuvent être de nouveau attachés à la glycoprotéine grâce à une glucosyltransférase. Enfin, si le repliement protéique n'est pas optimal, une mannosidase clive un résidu mannose, ce qui permet à la protéine d'être reconnue par une lectine (EDEM) et d'être dégradée. *CNX*, Calnexine ; *CRT*, Calréticuline ; *EDEM*, *ER degradation-enhancing α-mannosidase-like protein* ; *ERAD*, *ER-associated protein degradation* ; *ERGIC*, *ER-Golgi intermediate compartment* ; *ERp37*, *ER protein 37* ; *VIP36*, *vesicular integrin protein 36* ; *VIPL*, *VIP36-like protein* (Helenius et Aebi, 2004).

Après le greffage du glycanes sur la chaîne polypeptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase, la glycoprotéine se lie alors à la calnexine ou à la calréticuline via ce glycanes monoglucosylé. La liaison de la protéine à l'oxydoréductase ERp57 aide à la formation de ponts disulfures corrects et à son bon repliement. Afin de dissocier le complexe glycoprotéine-calnexine ou calréticuline, l'enzyme glucosidase II clive le dernier glucose présent sur le glycanes. Trois possibilités s'offrent alors à la protéine : (1) si son repliement est correct, elle quitte le RE et continue son cheminement vers l'appareil de Golgi ; (2) si sa structure est incomplète, elle est glucosylée à nouveau par une glucosyltransférase (UDP-Glc : glycoprotein glucosyltransferase) et pourra ainsi se lier une nouvelle fois à la calnexine ou la calréticuline ; (3) si la glycoprotéine incorrecte a stationné un certain temps dans le RE et qu'elle a perdu un résidu mannose par l'action de l'ER mannosidase I, elle est reconnue par la lectine EDEM (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein) qui facilite sa rétrotranslocation et sa dégradation ERAD (ER-Associated Degradation) par le protéasome (**Figure 31**) (**Helenius et Aebi, 2004**).

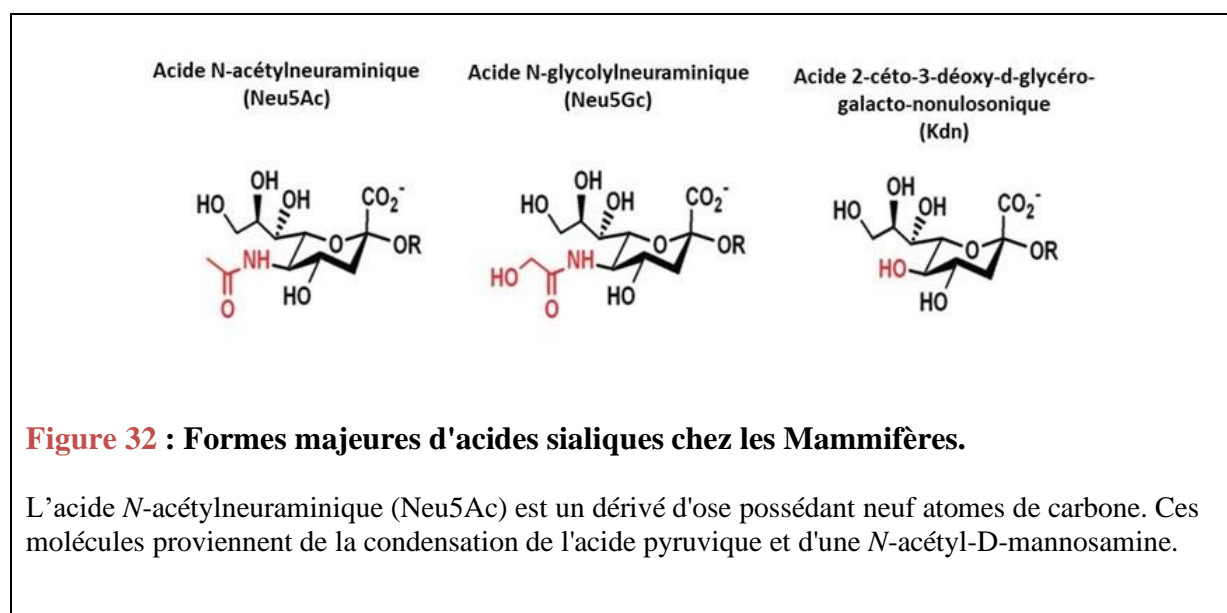
Chez les Mammifères, les mannosidases impliquées dans la reconnaissance et la dégradation des glycoprotéines tronquées sont très complexes et ont à la fois un rôle dans la dégradation ERAD mais également dans la maturation des glycanes complexes (**Hosokawa et al., 2003 ; Lal et al., 1994**).

Des défauts du métabolisme glycanique, souvent liés à la *N*-glycosylation sont à l'origine de pathologies humaines appelées CDG (Congenital Disorders of Glycosylation ou Carbohydrate Deficient Glycoprotein). Ces maladies se répartissent en deux principaux groupes selon l'étape de la biosynthèse des glycanes affectée par cette anomalie. Concernant les seize CDG de type I (classées de CDG-Ia à CDG-Ip), les mutations touchent des gènes impliqués dans la biosynthèse et/ou le transfert de précurseurs oligosaccharidiques, étapes ayant lieu dans le RE. Ces maladies sont caractérisées par une hyperglycosylation des *N*-glycoprotéines. Les CDG de type II (CDG-IIa à CDG-IIh) sont au nombre de huit et se caractérisent par des altérations des produits assurant la maturation des *N*-glycanes dans l'appareil de Golgi. Parmi les CDG, d'autres sont spécifiques du tissu musculaire et sont appelées les CMD (Congenital Muscular Dystrophies). La glycosylation de l' $\alpha$ -dystroglycane est affectée dans de nombreuses CMD (**Schachter et Freeze, 2009**).

Les CDG sont très souvent liées à un déficit en phosphomannomutase (PMM) causé par une mutation du gène *PMM2*. Les signes classiques observables sont un retard psychomoteur, une atrophie cérébelleuse, des anomalies squelettiques et des troubles de la coagulation (**Stibler et**

**Tableau 7 : Principales catégories de CDG, gènes affectés et manifestations cliniques majeures** (Adapté de Chang *et al.*, 2018).

Type de glycosylation affectée	Exemple de pathologie associée	Phénotype	Principaux symptômes
<b>N-glycosylation</b>	PMM2-CDG	CDG de type Ia	Retard du développement, invalidité, strabisme
	MPI-CDG	CDG de type Ib	Hypotonie, ataxie, neuropathie périphérique
	ALG6-CDG	CDG de type Ic	
<b>O-glycosylation</b>	EXT1/EXT2-CDG	Exostoses multiples de type I/II	Retard du développement, dystrophie musculaire, glaucomes, dysplasie cutanée
	B3GLCT-CDG	Syndrôme de Peters	
	GALNT3-CDG	Calcinoses hyperphosphatémiques familiales	
<b>N et O-glycosylations</b>	TMEM 165-CDG	CDG de type Ik	Retard du développement, cardiomyopathie, dysmorphie



*al.*, 1996). La CDG-Ic est un exemple de CDG de type I. Elle est associée à une mutation du gène *hALG6* qui entraîne un déficit en dolichol-P-Glc (de Zegher et Jaeken, 1995). Concernant les CDG de type II, la CDG-IIif est causée par un défaut du transporteur du nucléotide donneur CMP-NeuAc et se traduit par des glycoprotéines plaquettaires anormales (Freeze et Aebi, 2005).

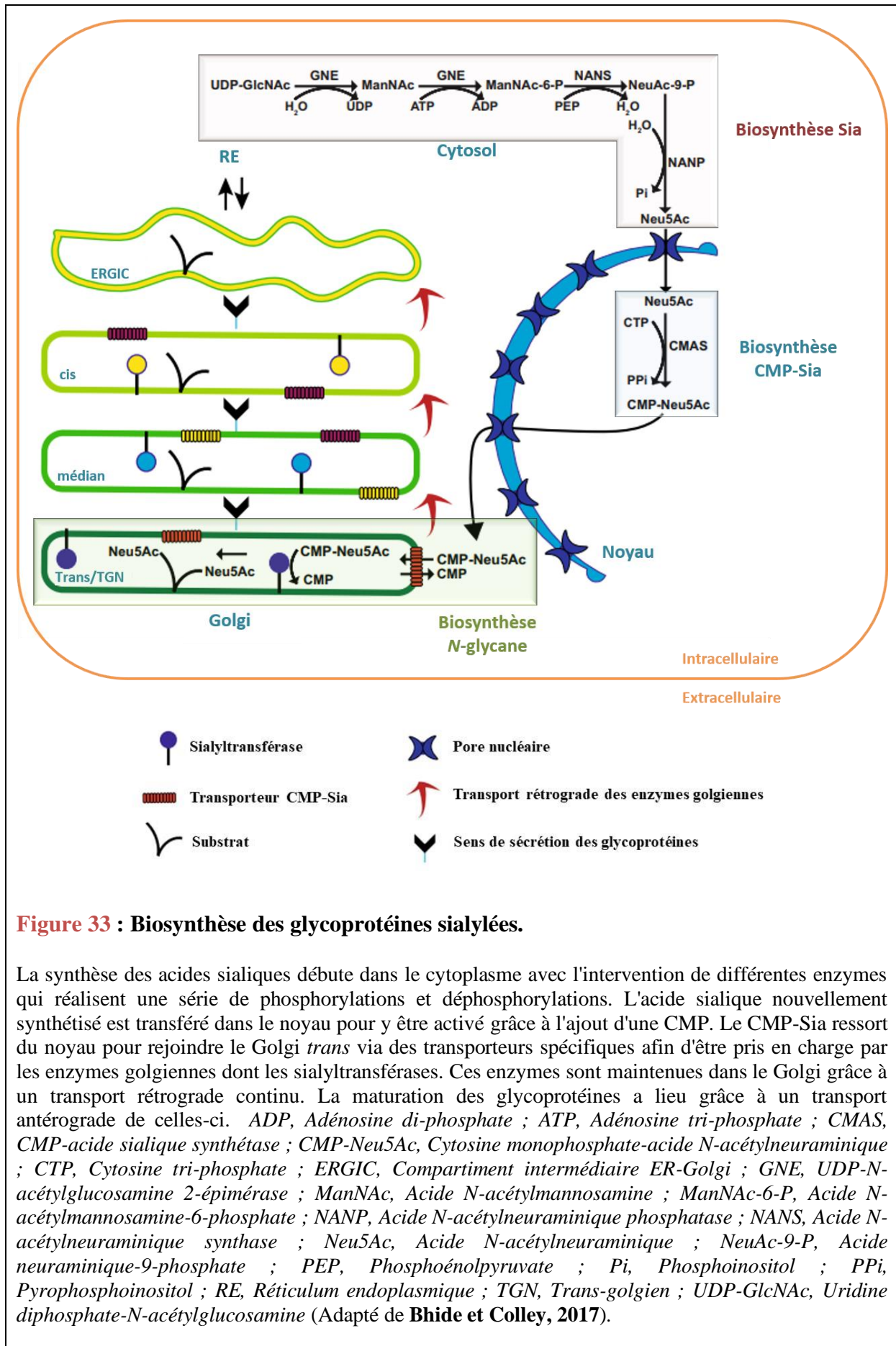
Enfin, certaines CDG affectent la *O*-glycosylation : par exemple, les gènes codant les *O*-mannosyltransférases 1 et 2 (POMT1, POMT2) et la *O*-mannosyl  $\beta$ 1,2-N-acétylglucosaminyltransférase 1 (POMGNT1) (Francisco *et al.*, 2019) (Tableau 7).

### III- La sialylation

Les acides sialiques sont synthétisés de manière spécifique dans différents compartiments de la cellule et jouent des rôles essentiels dans les processus de reconnaissance cellule-cellule, de reconnaissance de pathogènes et de développement des cellules cancéreuses. Le transfert des acides sialiques sur les glycanes est catalysé par des enzymes particulières appelées les sialyltransférases qui se distinguent par leur spécificité de substrat et le type de liaison réalisée (Tsuji, 1996). À l'inverse, les neuraminidases (ou sialidases) sont chargées du clivage de l'acide sialique.

#### 1) Biosynthèse des acides sialiques

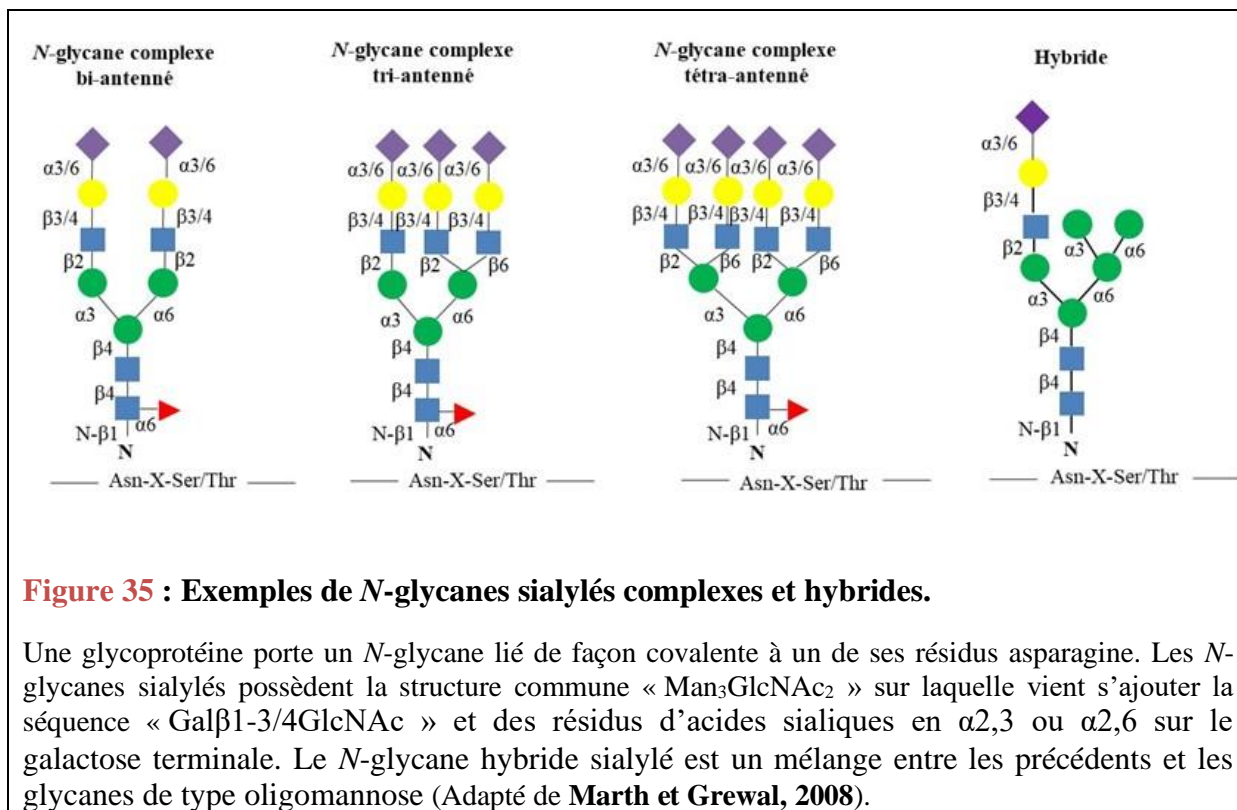
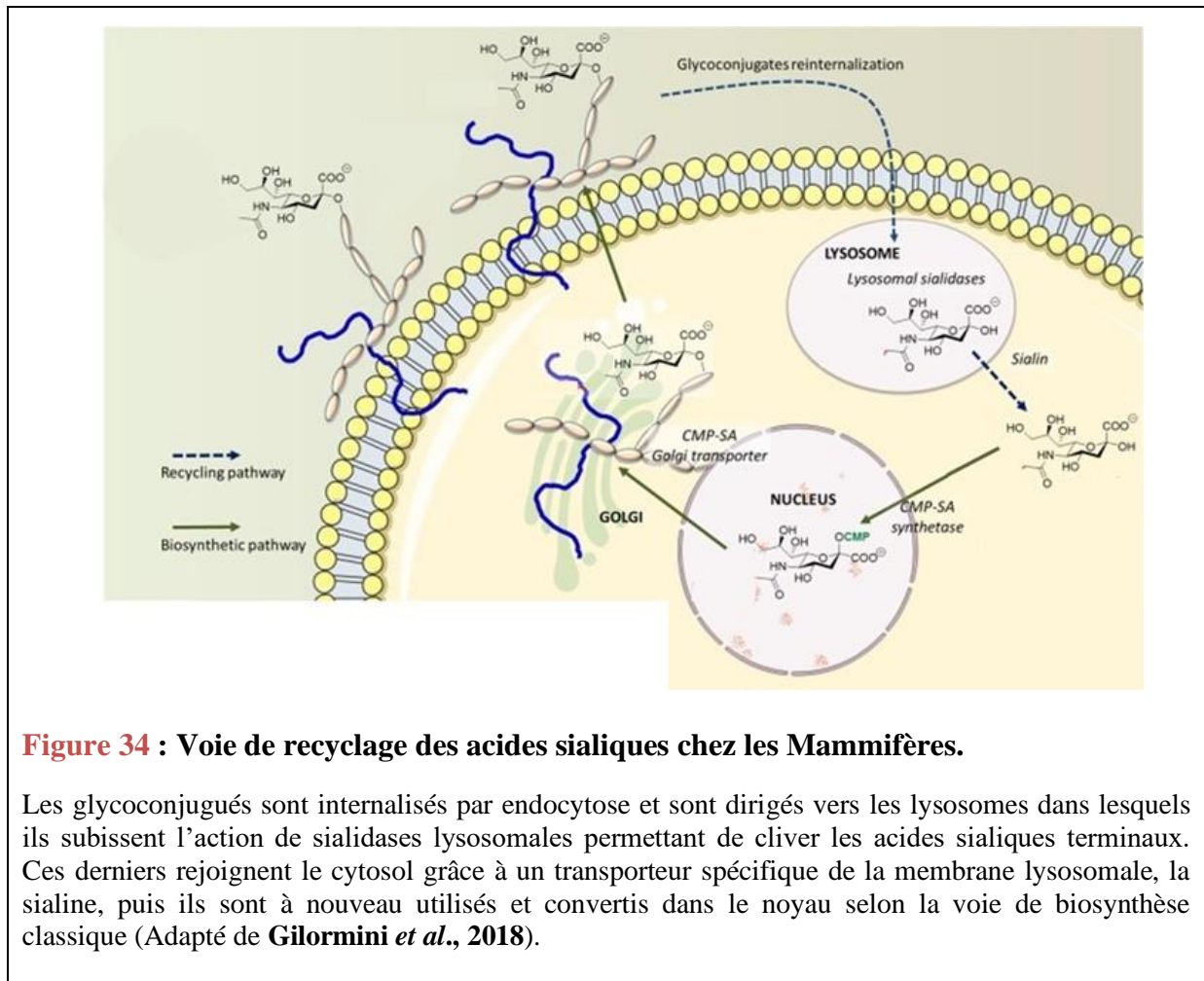
Chez les Mammifères, les acides sialiques les plus abondants sont l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (Figure 32). Au fur et à mesure de l'évolution, l'Homme a perdu la capacité de synthèse du Neu5Gc en raison d'une délétion au sein de la séquence de l'enzyme cytidine monophosphate *N*-acétylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) (Chou *et al.*, 1998). Cependant, le Neu5Gc provenant de l'alimentation, par exemple de la viande rouge, peut être ajouté aux sialoglycoprotéines et gangliosides humains. À la suite de cette incorporation, il est reconnu comme un antigène étranger et peut donc initier une réaction inflammatoire (Samraj *et al.*, 2015). Le Kdn (2-Keto-3-deoxynononic acid) est une autre forme d'acide sialique possédant un groupement hydroxyle à la place de l'amine acétylée au niveau du carbone n°5 (Nadano *et al.*, 1986).



La première étape de la biosynthèse des acides sialiques a lieu dans le cytoplasme où l'enzyme glucosamine (UDP-*N*-acetyl)-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (GNE/MNK) catalyse la conversion de l'UDP-GlcNAc en forme libre ManNAc. Dans un second temps, la *N*-acetylmannosamine est phosphorylée en ManNAc-6-phosphate par cette même enzyme. La synthèse du Neu5Ac sous forme libre cytosolique à partir du ManNAc-6-P s'effectue alors en deux étapes : (1) l'enzyme *N*-acetylneuraminate synthase (NANS) catalyse la condensation du ManNAc-6-P avec le phosphoénol pyruvate afin de former le NeuAc-9-P ; (2) l'enzyme *N*-acetylneuraminate phosphatase (NANP) clive le groupement phosphate du NeuAc-9-P (Varki et Schauer, 2009) (Figure 33).

L'acide sialique passe dans le noyau par simple diffusion où il est activé par transfert d'une CMP (cytidine monophosphate) d'une CTP (cytidine triphosphate) sur le groupe hydroxyle du carbone n°2 grâce à la CMP *N*-acetylneuraminic acid synthetase (CMAS). Contrairement aux autres enzymes activatrices des sucres situées dans le cytosol, la CMAS est localisée dans le noyau (Sellmeier *et al.*, 2015). Après sa synthèse dans le noyau, le CMP-Sia passe dans le cytoplasme, puis est transporté dans l'appareil de Golgi grâce à des transporteurs spécifiques. Par exemple, le transporteur SLC35A1 (Solute carrier family 35 member A1), protéine transmembranaire de type III localisée dans le *trans* Golgi (extrémité *N*-terminale de la protéine dans la lumière golgienne), fonctionne comme un antiport afin d'importer le CMP-Sia en échange d'un CMP. Néanmoins, il n'existe à ce jour que peu de connaissances sur les mécanismes de localisation des transporteurs d'acides sialiques au niveau de l'appareil de Golgi.

Associée à la voie de biosynthèse des acides sialiques, il existe une voie de récupération. Les glycanes présents sur les glycoprotéines de surface peuvent être internalisés par endocytose puis dirigés vers les lysosomes où des sialidases lysosomales clivent les acides sialiques terminaux. Ces derniers sortent des lysosomes grâce à un transporteur spécifique de la membrane lysosomale, la sialine (protéine transmembranaire de type I), afin de rejoindre le cytosol et être réutilisés et convertis dans le noyau (Litvinov et Hilkens, 1993) (Figure 34). Cette voie de récupération explique l'incorporation du Neu5Gc et du Kdn.





## 2) Principaux glycoconjugués sialylés

Un glycoconjugué est défini comme l'association covalente d'une protéine ou d'un lipide avec un ou plusieurs glycanes. Les structures de glycoconjugués sialylés sont très variables en fonction du type de liaison réalisée et de la nature de l'accepteur. Cette diversité leur confère de nombreuses fonctions biologiques dans différents processus tels que le développement ou la reprogrammation des cellules somatiques. Les acides sialiques sont retrouvés au niveau de l'extrémité non réductrice des oligosaccharides et peuvent être liés en  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$  sur un  $\beta$ -D-galactosylpyranose (Gal), ou liés en  $\alpha 2,6$  sur un résidu de  $\beta$ -D-N-galactosamine (GalNAc) ou de  $\beta$ -D-N-glucosamine (GlcNAc). Ces types de liaison sont couramment rencontrés au sein des glycoprotéines (**Hakomori, 1989**). Les acides sialiques sont aussi liés en  $\alpha 2,8$  à d'autres acides sialiques dans les gangliosides et les acides polysialiques, homopolymères d'acides sialiques retrouvés dans plusieurs glycoprotéines dont les NCAM (**Finne et al., 1983**). Enfin, les acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,8$  liés sont fréquemment retrouvés dans les gangliosides (**Basu et al., 1984**).

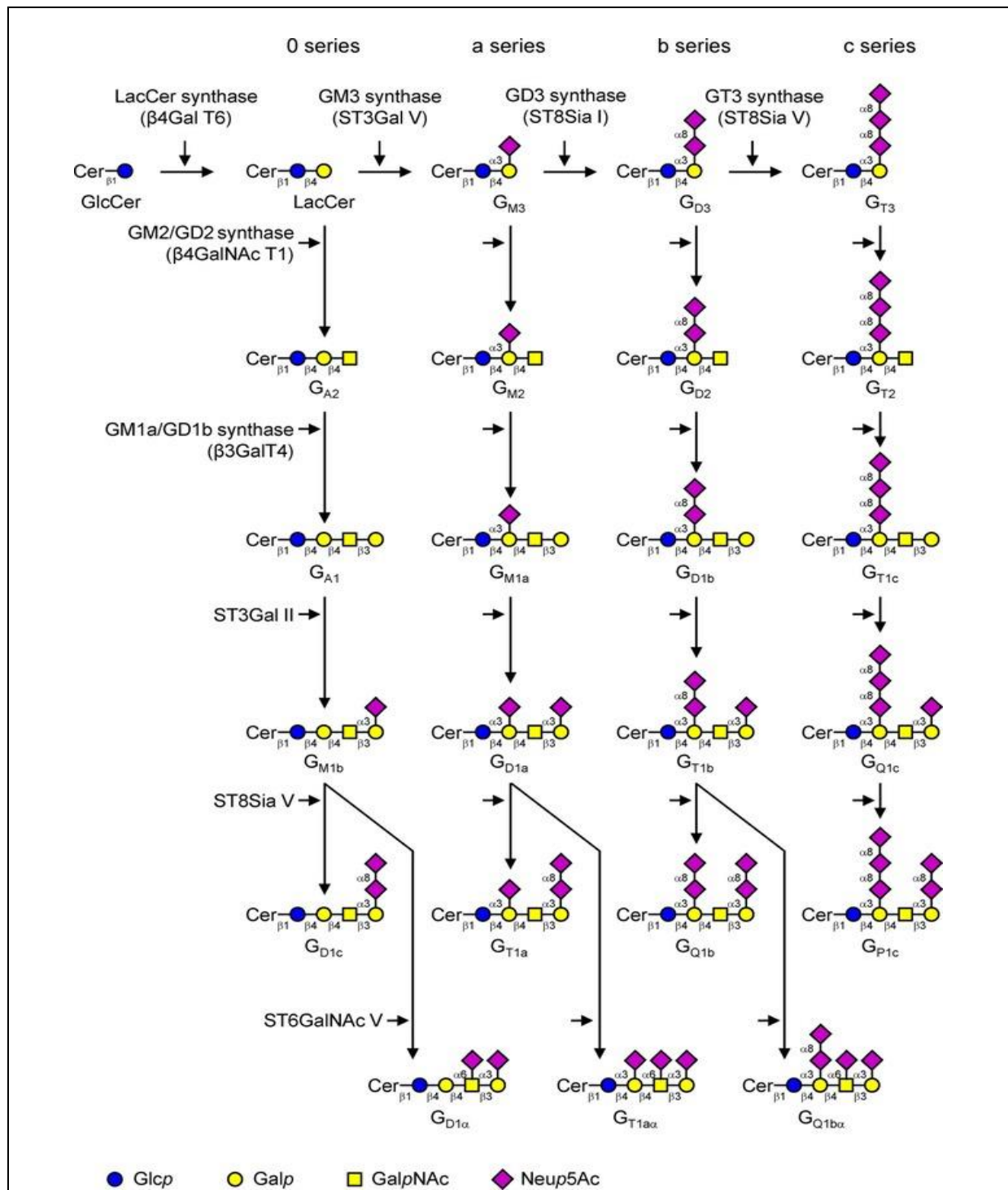
### a) Glycoprotéines sialylées

Les glycoprotéines sont des glycoconjugués dont la partie protéique porte un ou plusieurs oligosaccharides *O*- et/ou *N*-liés au niveau d'un atome d'oxygène d'un résidu de sérine ou thréonine pour les *O*-glycoprotéines et d'un atome d'azote d'un résidu d'asparagine pour les *N*-glycoprotéines (**Angata et Varki, 2002**). Dans les *N*-glycanes complexes et hybrides, les résidus GlcNAc sont majoritairement allongés par un galactose lié en  $\beta 1,4$  afin de constituer une structure de type 2 appelée LacNAc (Gal $\beta 1,4$ GlcNAc). Ces antennes ainsi obtenues peuvent être allongées par l'addition de LacNAc supplémentaires, aboutissant ainsi à la création de structures polylactosaminiques. Les GlcNAc peuvent aussi être allongés par un galactose en  $\beta 1,3$ , formant une structure de type 1 nommée Néo LacNAc (Gal $\beta 1,3$ GlcNAc) (**Bakker et al., 1997**). C'est à ce stade que la sialylation peut avoir lieu. Le résidu galactose externe des antennes LacNAc peut être substitué par un acide sialique en  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$  ou  $\alpha 2,8$  (**Figure 35**). Les *O*-glycanes possèdent des structures plus simples et linéaires que celles des *N*-glycanes mais peuvent cependant être de grande taille et contenir plus d'une centaine de monosaccharides comme dans les protéoglycanes. L'allongement du *O*-glycane s'effectue à partir de « cores » ou noyaux conservés déjà cités dans le paragraphe sur les *O*-glycosylations de type mucine (**Gooley and Williams, 1994**) (**Figure 26**).



La sialylation est une glycosylation ayant, ont lieu de manière post-traductionnelle. La sialylation des protéines nouvellement synthétisées est impliquée dans l'adressage, la maturation ainsi que la possible sécrétion de celles-ci. Les acides sialiques étant chargés négativement, ils empêchent l'adhésion cellulaire. Par exemple, la sialylation des protéines ICAM-2 (Intercellular adhesion molecule) endothéliale et plaquettaire est différente. En effet, l'équipe de Weber a montré que le point isoélectrique, donc la charge, est inférieur dans des cultures de plaquettes. Cette différence de charge est supprimée par un traitement à la neuraminidase, par conséquent elle est due à une modification de la sialylation des glycoconjugués de surface des cellules plaquettaires. Ceci se traduit par une capacité d'adhésion aux cellules T plus importante pour les cellules endothéliales (**Weber *et al.*, 2004**).

Néanmoins, les acides sialiques constituent aussi des récepteurs pour des ligands spécifiques tels que les Siglecs et les sélectines et sont donc impliqués dans la transduction du signal. Les sélectines sont impliquées dans l'adhésion et le mouvement des leucocytes sur le site de l'inflammation, le recrutement des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la migration des plaquettes sur le site de l'hémorragie. La reconnaissance par les sélectines des structures sialylées et fucosylées sialyl-Lewis x est un élément essentiel dans l'activation des sélectines (**Phillips *et al.*, 1990**). Les sialyltransférases ST3Gal IV et ST3Gal VI sont impliquées dans la synthèse de ces motifs et sont donc essentielles au bon fonctionnement des sélectines. En effet, un knockout combiné de ces deux enzymes entraîne une baisse de la fixation des neutrophiles sur les sélectines E et P, ainsi qu'un ralentissement de la migration des neutrophiles (**Yang *et al.*, 2012**). La sialylation intervient également lors du développement neuronal. La polysialylation est spécifique de plusieurs protéines impliquées dans les fonctions neurologiques telles que les NCAM, la molécule d'adhésion synaptique (SynCAM-1) et la neuropiline-2 (NRP-2) (**Mühlenhoff *et al.*, 2013**). En particulier, les NCAM polysialylées sont des molécules pivots de la plasticité synaptique dans les processus de mémorisation (**Kochlamazashvili *et al.*, 2010**). Enfin, les glycoprotéines sialylées sont essentielles pour l'établissement et le maintien de la pluripotence cellulaire. En effet, la sialyltransférase ST6Gal I présente des niveaux d'expression plus importants dans des cellules souches pluripotentes humaines que dans des cellules non-pluripotentes (**Wang *et al.*, 2015**).



**Figure 36 : Les voies de biosynthèse des gangliosides**

La synthèse des gangliosides se compose de l'addition successive de monosaccharides sur la partie céramide. Le lactosylcéramide (LacCer) est formé par l'extension du glucosylcéramide (GlcCer) grâce à l'enzyme GlcCer  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase ou LacCer synthase. Les GM3 synthase, GD3 synthase et GT3 synthase agissent pour synthétiser les précurseurs des gangliosides des séries a, b et c. Les gangliosides de la série 0 sont directement synthétisés à partir du lactosylcéramide. L'élongation du glycanes est réalisée par l'action séquentielle des enzymes  $\beta$ 4GalNAc T1,  $\beta$ 3Gal T4 et des sialyltransférases ST3Gal II, ST8Sia V et ST6GalNAc V (Groux-Degroote *et al.*, 2017).

### ***b) Glycolipides sialylés***

Chez les organismes supérieurs, la plupart des glycolipides sont des glycosphingolipides mais d'autres types existent tels que glycosylphosphatidylinositols (GPI) attachés de manière covalente aux protéines et servant d'ancrage membranaire à celles-ci, ou plus rarement les glyco glycérolipides.

Les glycosphingolipides se définissent comme des lipides complexes possédant une partie céramide hydrophobe constituée d'une sphingosine liée à un acide gras et une partie glucidique. Les premiers sucres liés en  $\beta$  à la moitié céramide sont généralement un galactose ou un glucose. La plupart du temps, le glucose est substitué d'un galactose pour former la structure « Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer ». D'autres extensions du glycane génèrent une série de structures à la base de la nomenclature des glycosphingolipides. Enfin, ils peuvent être aussi neutres, sialylés ou sulfatés, ce qui constitue des sous-classes. Traditionnellement tous les glycosphingolipides sialylés sont appelés gangliosides. La biosynthèse des gangliosides se déroule dans l'appareil de Golgi et débute par la liaison d'acides sialiques sur un lactosylcéramide par des sialyltransférases spécifiques (ST3Gal V ou GM3 synthase, ST8Sia I ou GD3 synthase et ST8SiaV ou GT3 synthase) afin de synthétiser les précurseurs des différentes séries de gangliosides (séries O, a, b et c). Enfin, des résidus GalNAc, Gal et d'acides sialiques sont ajoutés aux précurseurs grâce à diverses glycosyltransférases (**Zeng et Yu, 2008**) (**Figure 36**). La majeure partie des gangliosides portent le Neu5Ac mais 10% d'entre eux possèdent le Kdn (**Glebov et Nichols, 2004**). Le Neu5Gc est habituellement présent dans les gangliosides de certaines tumeurs (**Marquina et al., 1996**). Les gangliosides constituent donc une large famille de composés qui varient en fonction du type de sucre, de la liaison et de la nature de la partie hydrophobe. Une trentaine de gangliosides ont à ce jour été identifiés.

Les gangliosides sont très impliqués dans les processus cérébraux. Ainsi durant le développement embryonnaire du système nerveux, leur composition va varier. Les gangliosides GD3 et GM3 sont par exemple impliqués lors de la formation du tube neural et du développement du système nerveux central (**Yu et al., 2012**). Le GD3 est aussi le ganglioside dominant des cellules souches neurales embryonnaires (**Yanagisawa et al., 2004**). Les gangliosides sont particulièrement abondants dans les membranes cellulaires des neurones (**Sonnino et al., 2007**).

**Tableau 8 : Structures glycaniques reconnues par les sialyltransférases et les liaisons générées.**

Les sialyltransférases sont regroupées par famille. En gras au niveau de l'accepteur, l'ose sur lequel se fixe l'acide sialique. Pour certaines sialyltransférases, il existe plusieurs accepteurs (Adapté de **Datta, 2009**).

Famille de sialyltransférases	Sialyltransférase	Accepteur	Liaison formée
ST3Gal	ST3Gal I	<b>Gal</b> $\beta$ 1,3GalNAc	Neu5A $\alpha$ 2,3Gal
	ST3Gal II	<b>Gal</b> $\beta$ 1,3GalNAc	
	ST3Gal III	<b>Gal</b> $\beta$ 1,3/4GlcNAc	
	ST3Gal IV	<b>Gal</b> $\beta$ 1,3GalNAc ou <b>Gal</b> $\beta$ 1,3/4GlcNAc	
	ST3Gal V	<b>Gal</b> $\beta$ 1,4Glc-Cer	
	ST3Gal VI	<b>Gal</b> $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	
ST6Gal	ST6Gal I	<b>Gal</b> $\beta$ 1,4GlcNAc	Neu5A $\alpha$ 2,6Gal
	ST6Gal II	<b>Gal</b> $\beta$ 1,4GlcNAc	
ST6GalNAc	ST6GalNAc I	<b>GalNAc</b>	Neu5A $\alpha$ 2,6GalNAc
	ST6GalNAc II	<b>Gal</b> $\beta$ 1,3 <b>GalNAc</b>	
	ST6GalNAc III	Neu5A $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3 <b>GalNAc</b>	
	ST6GalNAc IV	Neu5A $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3 <b>GalNAc</b>	
	ST6GalNAc V	Neu5A $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3 <b>GalNAc</b> $\beta$ 1,4 Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	
	ST6GalNAc VI	Neu5A $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3 <b>GalNAc</b> $\beta$ 1,4 Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	
ST8Sia	ST8Sia I	<b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer ou <b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,8 <b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,3 <b>Gal</b> $\beta$ 1,4Glc-Cer	Neu5A $\alpha$ 2,8Neu5A $\alpha$
	ST8Sia II	( <b>Neu5Ac</b> )n-N-Glycane	
	ST8Sia III	<b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	
	ST8Sia IV	( <b>Neu5Ac</b> )n-N-Glycane	
	ST8Sia V	<b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4 (Neu5A $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer ou <b>Neu5A</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(Neu5A $\alpha$ 2,8Neu5A $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer ou Neu5A $\alpha$ 2,8Neu5A $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer	
	ST8Sia VI	<b>NeuA</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc ou <b>NeuAc</b> $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3 (NeuAc 2,6)GalNAc ou <b>NeuA</b> $\alpha$ 2,6(3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	

Ils peuvent aussi être réunies au sein des membranes nucléaires tels que les gangliosides GM3 et GD1a (**Ledeen et Wu, 2011**). Ils ont donc un rôle dans l'architecture et l'élasticité des membranes biologiques.

L'antigène sialyl-Lewis a (sLe<sup>a</sup>) a été caractérisé en tant que monosialoganglioside grâce à la technique de chromatographie sur couches minces d'extraits lipidiques issus de cellules de carcinome colorectal (**Magnani et al., 1981**). L'antigène sialyl-Lewis x (sLe<sup>x</sup>) a été décrit pour la première fois grâce à l'utilisation de gangliosides isolés de rein humain (**Rauvala, 1976**). Cet épitope est également présent dans des lactosaminoglycanes purifiés à partir de neutrophiles humains (**Fukuda et al., 1984**). La biosynthèse du motif sialyl-Le<sup>a</sup> fait intervenir plusieurs enzymes dont des fucosyltransférases et la sialyltransférase ST3Gal III pour sialyler le précurseur de type 1 « Galβ1,3GlcNAc » (**Mare et Trinchera, 2004**). Les ST3Gal IV et ST3Gal VI se chargent de sialyler le précurseur de type 2 « Galβ1,4GlcNAc » porté par des glycolipides, afin de générer le motif sialyl-Le<sup>x</sup> (**Salo et al., 2005**). L'antigène sialyl-Le<sup>a</sup> est un marqueur pronostique de l'apparition de métastases dans les cancers du pancréas, les mélanomes et les cancers colorectaux (**Willett et al., 1996 ; Kageshita et al., 1995 ; Wang et al., 2002**) tandis que l'antigène sialyl-Le<sup>x</sup> est un marqueur des cancers gastriques (**Nakagoe et al., 2002**).

### 3) Les sialyltransférases : structures et implications physiologiques

Chez l'Homme et la souris, les familles de sialyltransférases comportent 20 glycosyltransférases liées à la membrane de l'appareil de Golgi. Ces enzymes se répartissent en quatre classes en fonction de leurs spécificités de substrat et de liaison (**Tableau 8**).

#### a) L' $\alpha$ 2,3 sialylation

Ce type de sialylation est réalisée par six enzymes différentes appelées les  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,3 sialyltransférases, notées ST3Gal I à VI, qui ajoutent un acide sialique lié en  $\alpha$ 2,3 sur des résidus galactose de glycoprotéines ou glycolipides.

Les ST3Gal I et II permettent le transfert d'acides sialiques sur le carbone 3 d'un galactose d'un motif « Galβ1-3GalNAc » trouvé sur un glycolipide ou une glycoprotéine (**Giordanengo et al., 1997**). La ST3Gal III agit préférentiellement sur le motif « Galβ1-3GlcNAc ». Elle peut aussi catalyser la sialylation sur le motif « Galβ1-4GlcNAc » avec toutefois une efficacité moindre.





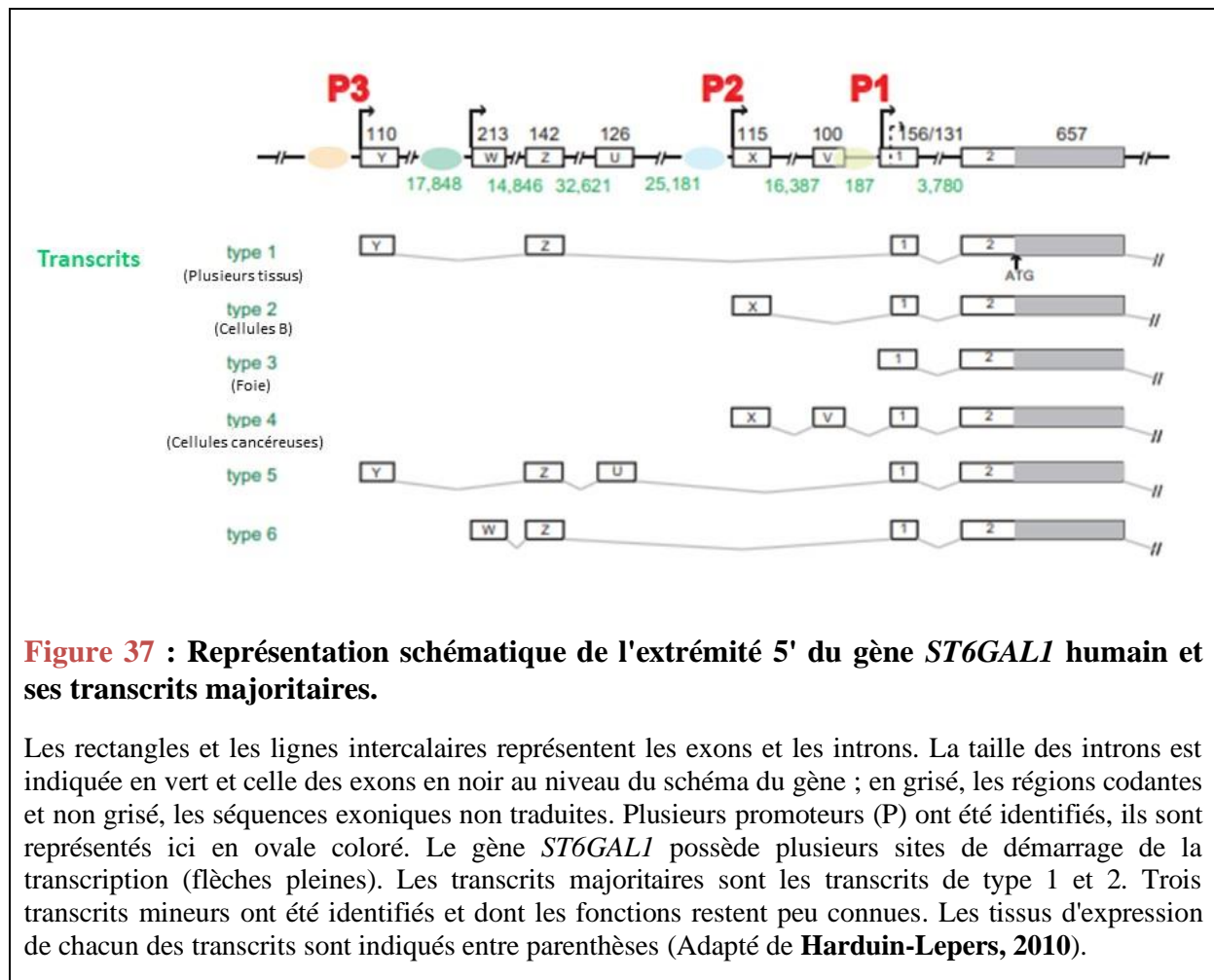
Le gène codant la ST3Gal III possède une expression tissu-spécifique : le transcrit majoritaire est détecté dans tous les tissus exceptés les reins et le colon. L'ensemble des transcrits est notamment retrouvé en grande quantité dans le tissu musculaire (**Grahn et al., 2002**). Les ST3Gal IV, V et VI présentent 35 à 41% d'homologie. La ST3Gal IV est connue pour sialyler le motif « Gal $\beta$ 1-4GlcNAc » des *N*-glycanes, le core 2, 3 ou 4 des *O*-glycanes et le motif « Gal $\beta$ 1-3GalNAc » (**Sasaki et al., 1993**). La ST3Gal V humaine utilise seulement le lactosylcéramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Cer) comme substrat accepteur afin de synthétiser le ganglioside GM3 (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ -Cer) et porte donc le nom de GM3 synthase (**Ishii et al., 1998**), tandis que la ST3Gal V du rat présente une plus large spécificité car elle utilise à la fois les lactosylcéramides et dans une moindre mesure les galactosylcéramides et les asialogangliosides GA2 (**Preuss et al., 1993**). Le gène *ST3GAL5* est exprimé de manière tissu-spécifique avec une expression prédominante dans le cerveau, les muscles squelettiques et les testicules. Enfin, la ST3Gal VI utilise l'accepteur « Gal $\beta$ 1-4GlcNAc » et présente une spécificité supplémentaire pour les glycoprotéines (**Okajima et al., 1999a**).

Remarquons que les enzymes ST6Gal I et II d'une part, et ST3Gal III, IV et VI d'autre part présentent un substrat accepteur identique, ce qui les met en compétition les unes avec les autres. Le niveau d' $\alpha$ 2,6 et d' $\alpha$ 2,3 sialylation est alors dépendant du niveau d'expression de chacune de ces sialyltransférases.

### ***b) L' $\alpha$ 2,6 sialylation***

#### **- Les ST6Gal**

C'est en 1977 qu'une  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransférase utilisant le motif « Gal $\beta$ 1,4GlcNAc », appartenant à un oligosaccharide de type lactosaminique, comme accepteur pour le transfert d'un acide sialique sur le carbone 6 d'un galactose a été isolée et caractérisée à partir de colostrum bovin (**Paulson et al., 1977**). Cette enzyme sera appelée plus tard la ST6Gal I. Le rat est la première espèce chez qui la structure du gène et de ses transcrits a été précisément étudiée. Il se situe sur le chromosome 11 et possède cinq transcrits (**Paulson et Colley, 1989**). Chez la souris, le gène *st6gal1* est localisé sur le chromosome 16 et trois transcrits ont été mis en évidence : le transcrit majoritaire retrouvé de façon ubiquitaire, un deuxième transcrit spécifique des lymphocytes B et un dernier transcrit hépatique (**Wuensch et al., 2000**).



Chez l'Homme, le gène *ST6GAL1* est localisé sur le bras long du chromosome 3. Ce gène possède des régions promotrices lui permettant d'être spécifiquement régulé. Associés à un épissage alternatif, six transcrits principaux sont générés et ont été identifiés initialement chez l'Homme (**Kitagawa et Paulson, 1994**) (**Figure 37**).

Le clonage de la ST6Gal I à partir de la séquence codante d'ADNc de rat a révélé sa séquence en acides aminés et a confirmé qu'une forme soluble est trouvée dans les fluides corporels. Ces formes solubles de la ST6Gal I ne présentent pas de domaine transmembranaire (**Weinstein et al., 1987**). Des études ultérieures ont suggéré que des formes solubles de ST6Gal I sont retrouvées dans la circulation sanguine après clivage protéolytique par des protéases telles que la cathepsine D et la  $\beta$ -sécrétase BACE1 ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1) (**Kitazume-Kawaguchi et al., 1999**).

L'expression de la ST6Gal I est régulée par de multiples promoteurs (**Svensson et al., 1992**). Un promoteur constitutif maintient l'expression de la ST6Gal I à un niveau faible mais stable. D'autres promoteurs plus spécifiques modifient les niveaux d'expression de l'enzyme (**Figure 37**). Le promoteur inductible P1, spécifique du foie, augmente l'expression de la ST6Gal I lors de l'inflammation et ainsi le taux d'enzyme circulante dans le sang (**Appenheimer et al., 2003**). Cependant, des questions demeurent quant à l'origine des CMP-acides sialiques servant de donneurs dans ces réactions ayant lieu dans le sérum. Une étude de 2014 a démontré que des plaquettes activées libèrent ces CMP-acides sialiques utilisables pour la ST6Gal I circulante (**Lee et al., 2014**). Une autre preuve de l'existence de ST6Gal I circulante a été apportée par une équipe américaine : des cellules B déficientes pour la ST6Gal I expriment des immunoglobulines sialylées par une ST6Gal I hépatique (**Jones et al., 2016**).

Une seconde  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransférase a été clonée et caractérisée, elle porte le nom de ST6Gal II (**Takashima et al., 2002**). Cette enzyme utilise également les structures « Gal $\beta$ 1,4GlcNAc » des oligosaccharides de type lactosaminique comme accepteurs. Néanmoins, la ST6Gal II montre une faible activité pour les glycanes des glycoprotéines et glycolipides. Elle a une préférence pour le disaccharide libre. Le gène de la ST6Gal II est situé sur le chromosome 2 chez l'Homme et le chromosome 17 chez la souris, sa région codante contient cinq exons. Cette enzyme est majoritairement présente dans le cerveau humain. Un seul transcrit a été trouvé chez la souris (**Krzewinski-Rechhi et al., 2003**) et deux chez l'Homme (**Takashima et al., 2002**), trois transcrits chez le bovin qui diffèrent par leurs



régions 5' non traduites (**Laporte et al., 2009**). Les fonctions biologiques de la ST6Gal II sont assez peu connues.

Les séquences des ST6Gal I et II montrent un pourcentage d'homologie de 48%, cependant ces deux enzymes partagent l'organisation structurale des autres glycosyltransférases golgiennes que nous détaillerons ultérieurement.

### - Les ST6GalNAc

La deuxième famille de sialyltransférases réalisant l' $\alpha$ 2,6 sialylation regroupent les six enzymes *N*-acétylgalactosaminide  $\alpha$ 2,6-sialyltransférases (ST6GalNAc I à VI) qui se chargent de transférer par une liaison en  $\alpha$ 2,6 un acide sialique sur une *N*-acétylgalactosamine d'un glycane. Ces enzymes peuvent agir aussi bien sur les *O*-glycoprotéines pour les ST6GalNAc I, II et IV que sur les glycolipides pour les ST6GalNAc III, V et VI (**Harduin-Lepers et al., 2001**). ST6GalNAc I transfère un acide sialique sur les structures : « GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr et Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr » ; ST6GalNAc II agit quant à elle sur : « Gal $\beta$ 1,3GalNAc-Ser/Thr » et « NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr » (**Samyn-Petit et al., 2000**). Les quatre autres enzymes présentent une spécificité de substrat plus importante, en effet leur unique substrat accepteur est la structure « NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc » portée par des glycolipides (**Okajima et al., 1999b**). Les ST6GalNAc IV, V et VI concourent à la création des motifs disialyl Lewis a (**Tsuchida et al., 2003**).

### c) L' $\alpha$ 2,8 sialylation

La polysialylation, catalysée par les six enzymes alpha-*N*-acétyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransférase (ST8Sia I à VI) chez les Mammifères, occupe une place importante dans les processus de migration des cellules et de plasticité du cerveau durant le développement du système nerveux. Cette spécificité d'expression est maintenue à l'âge adulte, les ST8Sia sont en effet retrouvées dans des zones particulières du cerveau telles que l'hippocampe, le bulbe olfactif et l'hypothalamus (**Hildebrandt et al., 1998**). La polysialylation pourrait être impliquée dans la régénération des neurones après un dommage (**El Maarouf et al., 2006**) ainsi que dans celle du foie (**Tsuchiya et al., 2014**).

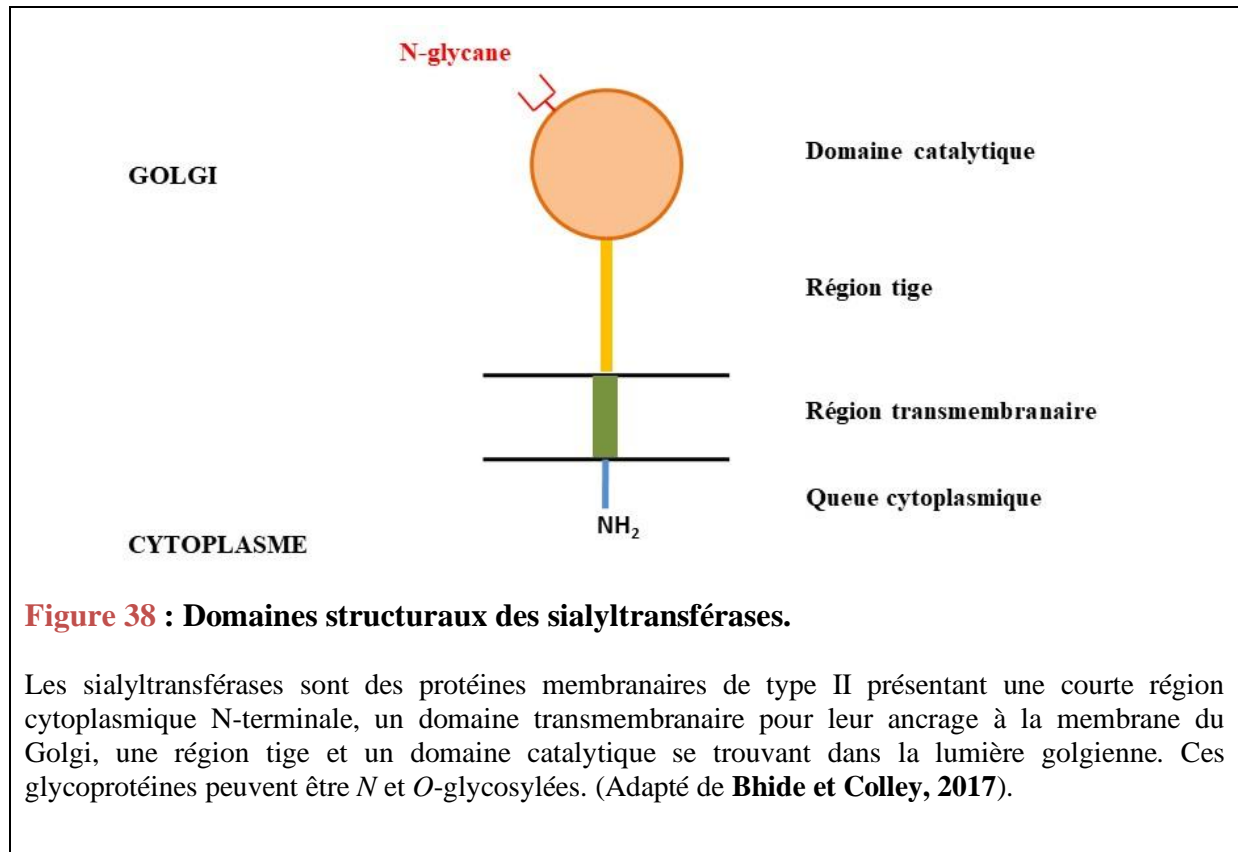
Les ST8Sia catalysent le transfert d'une acide sialique en le liant en  $\alpha$ 2,8 sur un autre acide sialique. L'action de certaines ST8Sia peut aboutir à la création de longues chaînes d'acides sialiques (PSA, PolySialic Acids) pouvant atteindre plus de 400 résidus à l'extrémité



des *N* et *O*-glycanes (**Angata et al., 2000**). La famille des ST8sia est scindée en deux groupes : d'une part les ST8Sia I, V et VI ou mono- $\alpha$ 2,8-sialyltransférases et d'autres part les ST8Sia II, III et IV ou poly- $\alpha$ 2,8-sialyltransférases (**Harduin-Lepers et al., 1995**). Les enzymes de la seconde sous-famille sont capables de réaliser de la polysialylation ou oligosialylation, c'est-à-dire un allongement des acides sialiques en position terminale des glycanes. Chez les Mammifères, les exemples typiques de protéines présentant ces structures caractéristiques sont les NCAM.

La ST8Sia I humaine réalise la synthèse des gangliosides GD3 et GT3 et est aussi nommée la GD3 synthase (**Haraguchi et al., 1994**). Cette sialyltransférase est exprimée tout particulièrement dans le cerveau et les reins fœtaux et dans une moindre mesure dans le cœur, le thymus et le cerveau adulte (**Angata et al., 1997**). La ST8Sia V permet de synthétiser les gangliosides GM1b, GD1a, GT1b et GD3 (**Kono et al., 1996**). Chez la souris, le gène codant la ST8Sia V est fortement exprimé chez l'adulte dans le cerveau, le foie, les poumons, le placenta et la rate. Pour finir, la ST8Sia VI, identifiée chez l'homme et la souris, possède comme accepteur la séquence « NeuAc $\alpha$ 2,3-Gal $\beta$ 1,3GalNAc » des *O*-glycoprotéines et des glycolipides (**Teinturier-Lelièvre et al., 2005**).

Les ST8Sia II et IV possèdent 67% d'homologie de séquence entre elles et interviennent dans la polysialylation des glycoprotéines avec un avantage certain pour ST8Sia IV qui polymériserait de plus grandes chaînes que ST8Sia II (**Angata et al., 2002**). Ces deux sialyltransférases interviennent dans la plasticité neuronale pour ST8Sia IV et dans les processus de mémorisation pour la seconde. La ST8Sia III humaine recombinante exprimée dans des cellules COS-7 montre une importante capacité de transfert d'un acide sialique sur la fétuine (**Yoshida et al., 1995**). La ST8Sia III est exprimée dans le cerveau durant le développement. La ST8Sia IV est retrouvée dans le cerveau, les reins et les poumons fœtaux et chez l'adulte dans la rate, le thymus, le cœur et l'intestin grêle.



**Figure 39 : Les sialylmotifs conservés au sein des séquences de sialyltransférases.**

Des alignements de séquence des régions les plus conservées dans les vingt sialyltransférases connues ont été réalisés. Les résidus strictement identiques sont représentés en blanc surligné en noir. Les autres résidus identiques pour plusieurs sialyltransférases sont surlignés en gris. Les sialylmotifs sont numérotés de 1 à 4 sauf pour le troisième qui s'écrit III ; la correspondance avec les lettres L, S et VS est indiquée. Toutes les séquences sont humaines. Ces motifs sont impliqués dans la liaison du glycane et du nucléotide donneur de l'acide sialique. *L*, large ; *S*, small ; *VS*, very small (**Jeanneau et al., 2004**).

sialylmotifs	L		S	VS	
	motif 1		motif 2	motif III	motif 4
ST6Gal I	181-WGRCAVAVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFNQAPTAN-FQQDVGTKTT<92>		PSSGMLGIIMMTLCDDVDIYEF<10>	YYDQ <12>HPLLYE	
ST6Gal II	293-LRSCAVVMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNQAPTAN-FQQDVGTKTT<93>		PSSGFTGILIMMSKCREVHVVEY<10>	HYHE <12>HPLLYE	
ST6GalNAc I	362-CITCAVAVGNGGILNNSHMGEIDSHDYVFRLLSGALIKG-YEQDVGTRTS<109>		PTTGALLLLTALQLCDDQVSAYGF<10>	HYDQ <11>HDFKLE	
ST6GalNAc II	148-CIRCAVAVGNGGILNGSRQGNIDAHDYVFRLLNGAVIKG-FERDVGTKTS<107>		PSTGALMLLTALHTCDDQVSAYGF<10>	HYFE <11>HDLSE	
ST6GalNAc III	77-CDLCAIVSNSSGQVGVQKVGNEIDRSSCIWRMNNAPTKG-YEEDVGRMTM<90>		LSTGWFTFLLAMDACYGHHVYGM<16>	HYFE <19>HREITE	
ST6GalNAc IV	73-CRSCAVVSSSGQMLGSGLGAEIDSAECVFRMNQAPTVG-FEADVGQRTT<90>		LSTGWFTMILALELCEEVVYGM<16>	HYFE <20>HREITE	
ST6GalNAc V	93-CRDCALVSSGHLHSRQGSQIDQTECVIRMNDAPTRG-YGRDVGNRTS<90>		LSTGWFTMTIALELCCORINVYGM<16>	HYFE <21>HREITE	
ST6GalNAc VI	71-CHCCVIVSSSSHLGTLKLPETIERAECTIRMNDAPTTG-YSDVGNKTT<89>		LSTGWFTMVIIVLCEVHVYGM<17>	HYFE <21>HREITE	
ST3Gal I	139-CRRCAVAVGNSGNLRESSYCPEDIDSHDFVLRMNAKPTAG-FEADVGTKTT<80>		PSTGILSVIFSMHWCDEVLYGF<9>	HYWE <13>HDADE	
ST3Gal II	149-CRRCAVAVGNSGNLRGSGYQDDVGHNFIMRMNAPTVG-FEQDVGSRIT<80>		PSTGMLVLFVFFALHWCDEVNVYGF<9>	HYWE <13>HDADE	
ST3Gal III	157-CRRCLIVGNGGVLANKSLGSRIDDDYIVVRLNSAPVKG-FEKDVGSKTT<95>		PTLGSVAVTMALHGCDDEVAVAGF<11>	HYFE <12>HNIQRE	
ST3Gal IV	116-CRRCAVAVGNGHRLRNSSLGDAINKYDVVIRLNNAPVAG-YEGDVGSKTT<94>		PTTGLLAITLALHLCDLVHLAGF<12>	HYFE <11>HNVSC	
ST3Gal V	136-CRRCAVAVGNGGILHGLELGHITLNQFDVVIRLNSAPVEG-YSEHVGKTT<99>		PTIGVIAVVLATHLCDEVSLAGF<11>	HYED <12>HNVTE	
ST3Gal VI	115-CKKCAVAVGNGGVLKKNKTLCEKIDSYDVIIRMNNGVFLG-HEEAVGRRTT<94>		PTTGLLAITLAFYICREVHLAGF<11>	HYYG <12>HNVTE	
ST8Sia I	120-LKPCAVVAVGNGGILKKSQCGRQIDEANFVRCNLPPLSSEYTKDVGSKSQ<89>		LSTGLFLVSAALGLCEEVAIYGF<14>	HYDQ <8>HAMPPE	
ST8Sia II	154-FGTCAVAVGNSGVLLNSGCGQEIIDASHFVIRCNLAPVQE-YARDVGLKTD<91>		PTTGLLMYTLATRFCKQIYLYGF<14>	HYDQ <12>HTMPLE	
ST8Sia III	159-YNICAVVAVGNSGILTFIQCGREIDKSDVFVRCNFAPESEA-FQDVGKRTN<92>		LSTGILMYTLASATCEEIHLYGF<15>	HYDQ <13>HQLPPE	
ST8Sia IV	139-FKTCVAVVAVGNSGILLDSECKEIDSHNFVIRCNLAPVVE-FAADVTKSD<91>		PSTGLLMYTLATRECDIEHLYGF<14>	HYDQ <12>HMPLE	
ST8Sia V	161-FKPCAVVAVGNGGILKNSRCGREINSADFVFRNLPPISEKYTMVGVKTD<89>		ISTGLILVTAALELCEEVHLYGF<14>	HYDQ <8>HAMPPE	
ST8Sia VI	183-YNCCAVVAVGNGGILNKSLCGETIDKSDVFVRCNLPPTTGDVSKDVGSKTN<89>		LSTGLMITSVALELCKRNVKLYGF<14>	HYDQ <8>HMPPE	



#### *d) Organisation structurale des sialyltransférases*

La découverte de la structure primaire de la ST6Gal I et le clonage des séquences codantes des autres sialyltransférases ont permis de définir la structure des domaines de ces enzymes ainsi que l'identification de régions conservées. Les sialyltransférases, et toutes les glycosyltransférases golgiennes impliquées dans la *N*-glycosylation, sont des protéines membranaires de type II possédant une courte région cytoplasmique (extrémité N-terminale de la protéine) suivie d'un domaine transmembranaire, d'une région tige et d'un domaine luminal catalytique (**Paulson et Colley, 1989**) (**Figure 38**). Des séquences conservées appelées « sialylmotifs » ont été identifiées dans les différentes familles de sialyltransférases au sein du domaine catalytique. Ils interviennent dans la reconnaissance des CMP-acide sialiques et de leurs accepteurs ainsi que dans le mécanisme catalytique (**Datta et al., 2001**) (**Figure 39**). Par exemple, le motif L (large sialylmotif) participe à la liaison de l'acide sialique, tandis que le motif S (small sialylmotif) concourt aux interactions de l'acide sialique et du substrat. Le motif VS (very small sialylmotif) est impliqué dans la réaction catalytique (**Geremia et al., 1997**). Un autre motif a été identifié et a été nommé le motif III. Il aide à la reconnaissance de l'accepteur et à l'activité catalytique de l'enzyme ST3Gal I (**Jeanneau et al., 2004**).

Les enzymes ST8Sia présentent deux motifs supplémentaires spécifiques. Le premier, d'environ 10 acides aminés, se situe en aval du motif L (**Patel et Balaji, 2006**). Le second est le motif « C-term » car il se situe en position C-terminale (**Harduin-Lepers et al., 2008**). Il est constitué de dix acides aminés dont une cystéine qui va former avec une autre cystéine du motif L un pont disulfure intramoléculaire essentiel au repliement correct des ST6Sia et à leur activité (**Angata et al., 2001**). Des motifs spécifiques à la sous-famille des ST8Sia II, III et IV ont été mis en évidence. Les ST8Sia II et IV possèdent un motif de 32 acides aminés appelé le domaine de polysialylation (PSTD) localisé en amont du sialylmotif S. Il intervient dans l'allongement des chaînes linéaires d'acides sialiques (**Nakata et al., 2006**). Ce motif n'est pas retrouvé au sein des ST8Sia III, cependant un motif semblable a été découvert en amont du motif S, il s'agit du motif III-2 (**Harduin-Lepers et al., 2008**). Les ST8Sia III présentent enfin un motif supplémentaire spécifique, le sialylmotif III-1 en amont du motif L.



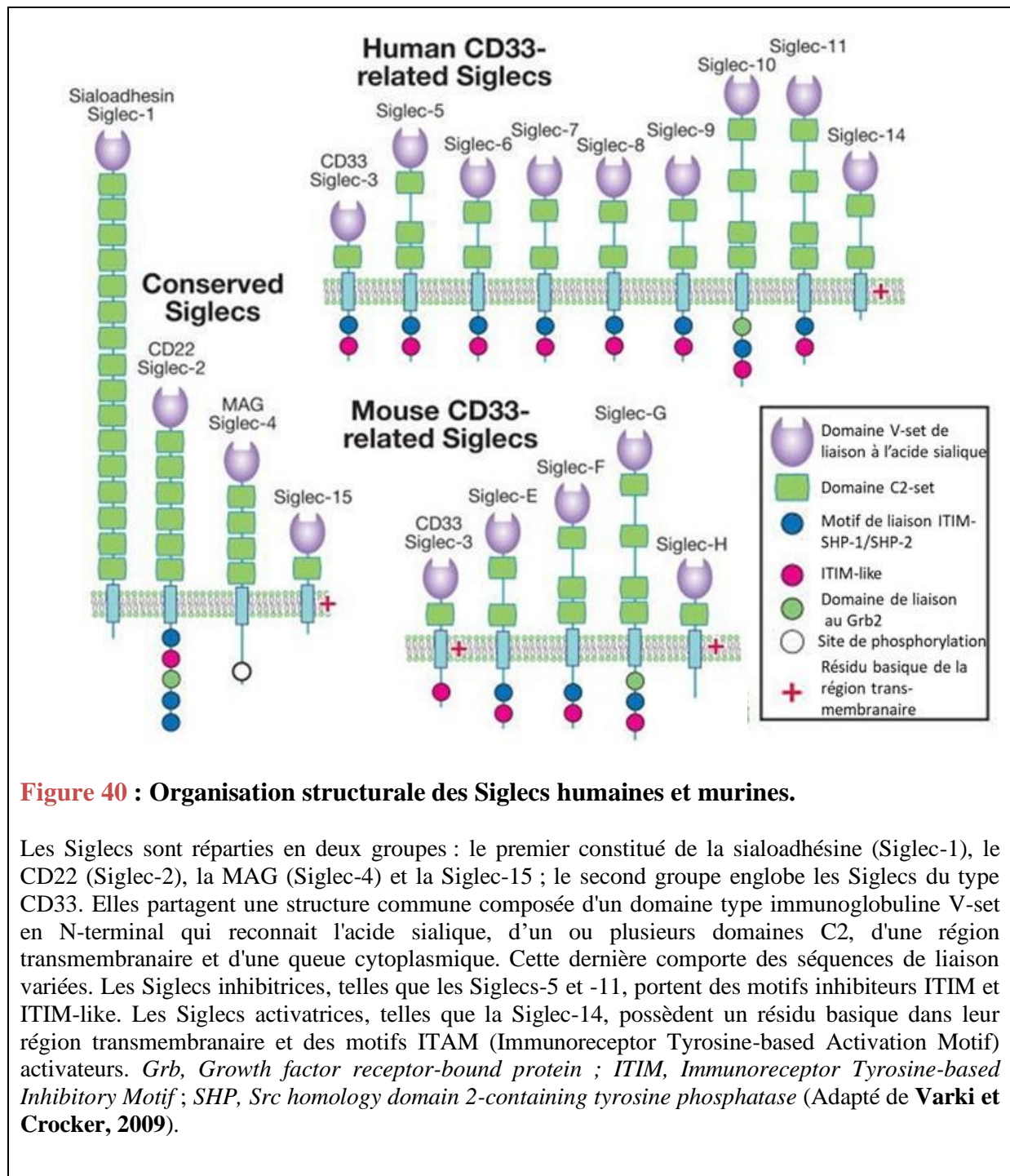
#### 4) Les neuraminidases

Les N-acétylneuraminosyl-glycohydrolases ou sialidases ou neuraminidases hydrolysent les liaisons entre un acide sialique  $\alpha$ -lié et le glycane sur lequel il est fixé. Quatre neuraminidases (NEU1, 2, 3 et 4) ont été identifiées chez les Mammifères. NEU1, la plus représentée des quatre, est lysosomale. Elle agit uniquement sur les glycoprotéines et clive préférentiellement les acides sialiques  $\alpha$ 2,3 liés (**Miyagi et Tsuiki, 1984**). NEU1 contrôle l'exocytose des lysosomes (**Machado et al., 2015**). Elle régule en partie la réponse immunitaires en désialylant par exemple des molécules d'adhésion et le TLR-4 (Toll-like receptor 4) impliqués dans le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation (**Amith et al., 2010**). La neuraminidase NEU2 est située dans le cytosol où elle agirait sur les quelques N-glycanes complexes libres (**Miyagi et Tsuiki, 1985**). NEU3 est localisée dans la membrane plasmique et hydrolyse exclusivement les acides sialiques des gangliosides, principalement ceux liés en  $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,8 des gangliosides GM3 et GD3. Elle intervient dans la croissance des axones et la régénération neuronale. Enfin, NEU4 est située dans les lysosomes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique dans différents tissus. Elle agit sur les gangliosides ainsi que sur les antigènes sialyl-Lewis x et a dans des cellules cancéreuses de colon (**Shiozaki et al., 2011**).

#### 5) Les lectines : exemple des Siglecs

La première description scientifique de l'activité des lectines remonte à 1860. Une goutte de venin de serpent est mise en contact avec une goutte de sang de pigeon, les deux substances se mélangent instantanément. Il s'agit alors de la première observation d'agglutination des érythrocytes. Des études suivantes sur la sélectivité des groupes sanguins ont permis de formuler le terme de « lectine ». W.C Boyd définit la lectine comme une protéine présentant une action spécifique mais qui n'est pas un anticorps. La lectine diffère également d'une glycosyltransférase, des transporteurs de sucres libres et d'un récepteur bactérien. Ces quatre critères d'exclusion constituent la définition d'une lectine.

Parmi les lectines connues, les Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-types lectins) sont une famille de lectines se liant aux acides sialiques et impliquées dans divers processus immunitaires. Les Siglecs constituent ainsi des protéines membranaires de type I de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) (**Macauley et al., 2014**).



Les Siglecs sont aussi classées parmi les lectines de type I. Un grand nombre de Siglecs ont été identifiées chez les Mammifères, deux groupes ont donc été créés selon les similitudes de séquence et la conservation parmi les espèces étudiées. Le premier groupe comporte la sialoadhésine (Sn ou Siglec-1), le CD-22 (ou Siglec-2), la MAG (Myelin-associated glycoprotein ou Siglec-4) et la Siglec-15. Le deuxième groupe est constitué de la grande famille des Siglecs CD33 (**Varki et Crocker, 2009**) (**Figure 40**).

La plupart des cellules expriment deux paires de Siglecs, chaque paire présente la même liaison aux glycanes mais avec des activités fonctionnelles opposées. Les queues cytoplasmiques des Siglecs « inhibitrices » contiennent des motifs inhibiteurs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) qui régulent de façon négative les voies de signalisation. Au contraire, les Siglecs « activatrices » ont des résidus chargés positivement dans leur région transmembranaire pouvant se lier aux protéines adaptatrices pour les ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) et donc activer les voies adéquates (**Blasius et Colonna, 2006**).

## 6) Implication des acides sialiques lors de la myogenèse

La myopathie héréditaire à corps d'inclusion (HIBM2 : Hereditary Inclusion Body Myopathy) a été décrite pour la première fois en 1984. Il s'agit de la première preuve de l'implication de la sialylation lors du processus myogénique. Lors de cette pathologie révélée à l'âge adulte, le sujet présente une faiblesse musculaire progressive et lente. Les fibres dégénèrent lentement et le patient ne parvient pas à les régénérer. En analyses histologiques, les myofibres sont atrophiés et des inclusions sont visibles dans le cytoplasme ou les noyaux. (**Argov et Yarom, 1984**). Des analyses moléculaires ont montré que la cellule musculaire présentait une hypo-sialylation générale (**Hinderlich et al., 2004**). Plusieurs mutations responsables de cette maladie ont été identifiées, il s'agit de trois mutations faux-sens du gène codant la GNE/MNK (**Darvish et al., 2002 ; Hinderlich et al., 2004**). Néanmoins, la diminution globale de la sialylation observée n'est pas due qu'à ces mutations.

Pour tenter de mettre en lien la sialylation et cette perte de fonction des fibres, les scientifiques ont étudié l'impact d'une baisse de l'activité de l'enzyme GNE/MNK. Lors de cette diminution, la perméabilité cellulaire au calcium est augmentée. Dans ce sens, les acides sialiques seraient susceptibles de favoriser la fixation des ions calciques à la surface cellulaire grâce à leurs charges négatives. Le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Na}^{2+}$  sont des espèces ioniques indispensables au



bon enchaînement de la contraction des fibres musculaires (**Bennett et al., 1997**). De plus, les protéines membranaires constitutives des canaux sodiques voltage-dépendants sont glycosylées et sialylées. Lorsqu'une telle protéine est déglycosylée, l'activité du canal associé est modifiée et l'apport de sodium est donc altéré (**Bennett, 2002**).

En conditions physiologiques, lorsque la poly-sialylation des protéines NCAM est augmentée dans des myoblastes de la lignée cellulaire C2C12, la formation de myotubes est réduite. A l'inverse, quand la polysialylation est inhibée, les cellules C2C12 se différencient (**Suzuki et al., 2003**). L'équipe de Fanzani a, en 2003, travaillé sur le rôle des sialidases lors de la fusion myoblastique. Durant la fusion myoblastique, il a été montré que la neuraminidase NEU2 est surexprimée. Lorsque cette enzyme est surexprimée dans des cellules C2C12, la capacité proliférative des cellules diminue et les cellules ont même tendance à entrer en différenciation de manière précoce (**Fanzani et al., 2003**). Cette même équipe a ensuite cherché à déterminer quelles voies de signalisation étaient impliquées. Lors d'une hypertrophie musculaire induite par l'IGF-1, la synthèse de NEU2 est augmentée par activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Pendant la prolifération myoblastique, l'activation de la voie ERK1/2 régule négativement l'activité de NEU2 (**Fanzani et al., 2006**). De plus, NEU2 est sous-exprimée dans des cellules de rhabdomyosarcome humaines présentant un défaut de différenciation myogénique (**Stoppani et al., 2009**). Enfin, la neuraminidase NEU3 est elle aussi impliquée dans la différenciation musculaire squelettique car un knockdown de son gène inhibe la formation des myotubes (**Anastasia et al., 2008**).

L'implication de la sialylation lors de la myogenèse adulte apparaît donc comme primordiale pour comprendre et expliquer les mécanismes de différenciation et de fusion. Des interrogations demeurent quant à la caractérisation des glycoprotéines et des glycolipides sialylés et des voies de signalisation cellulaire favorisant ou au contraire bloquant la différenciation myogénique.





# Objectifs

---

La compréhension des mécanismes régissant la myogenèse, dont les modifications post-traductionnelles des glycoprotéines de surface, est d'une importance capitale pour appréhender la régénération du muscle squelettique à la suite d'une blessure ou lors d'une pathologie. La myogenèse se caractérise par une phase de prolifération des myoblastes, leur différenciation en myocytes puis leur fusion pour donner des myotubes.

Le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à l'étude de la myogenèse dans différents modèles. Notre équipe s'est focalisée sur l'implication des processus de glycosylation, dont la sialylation et la *O*-fucosylation, au cours de la myogenèse. Nous avons cherché à comprendre de quelle manière les structures glycaniques sont modifiées durant la myogenèse aux moyens de modèles cellulaires tels que la lignée myoblastique murine C2C12 et des cellules satellites murines. Une étude menée au sein de notre équipe a consisté à analyser l'expression de 375 glyco-gènes par la technique de RT-PCR quantitative. Parmi ces 375 gènes, 37 sont dérégulés d'un facteur 4 au niveau transcriptionnel, dont deux codent les sialyltransférases ST8Sia II et ST8SiaV et un code la Siglec g (**Janot *et al.*, 2009**).

Notre équipe a établi une corrélation entre la quantité d'acides sialiques périphériques liés et la différenciation myogénique des cellules myoblastiques murines C2C12 : la quantification de la liaison des lectines SNA et MAA, associées respectivement à l' $\alpha$ 2,6 et l' $\alpha$ 2,3 sialylation, durant la différenciation myogénique a été réalisée. L' $\alpha$ 2,6 et l' $\alpha$ 2,3 sialylation décroissent au cours de la différenciation. La diminution d' $\alpha$ 2,6 sialylation est plus rapide et plus régulière sur les 96 premières heures de la différenciation myogénique (**Doctorat A. Bouchatal, 2015**). De plus, le nombre de sialyltransférases ST6Gal étant bien inférieur à celui des sialyltransférases ST3Gal, nous avons choisi de poursuivre le travail sur l' $\alpha$ 2,6 sialylation. Cette diminution d' $\alpha$ 2,6 sialylation est associée pour partie à la baisse de l'expression du gène codant la sialyltransférase ST6Gal I au cours de la différenciation. L'enzyme ST6Gal II a été écartée de notre analyse, étant principalement associée à la sialylation dans le cerveau et les ganglions lymphatiques, ainsi qu'aux phénomènes inflammatoires (**Takashima *et al.*, 2002 ; Groux-Degroote *et al.*, 2008**).

C'est pourquoi, mon travail de doctorat s'est orienté vers *st6gal1*, et l' $\alpha$ 2,6 sialylation, et son implication dans la fusion des myoblastes. Pour ce faire, il est nécessaire de créer des



clones sous-exprimant *st6gal1* à partir de la lignée C2C12. Sur les clones obtenus sous-exprimant *st6gal1*, une étude phénotypique a été conduite en analysant leur vitesse de prolifération et leur indice de fusion.

Une étude des voies de signalisation a été effectuée afin d'associer la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation au « comportement » des cellules. Parmi ces voies, celle de Notch via Pax7 et des Smads sont associées à la prolifération, alors que celles d'Akt et p38-MAPK sont associées à la différenciation et la fusion cellulaire. L'étude de ces voies a permis d'expliquer l'incidence d'une diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation sur le faible taux de cellules de réserve.

Une autre partie du travail était consacrée à l'analyse des *N*-glycanes afin d'identifier ceux qui portent les structures sialylées et de corrélérer leur présence à l'état des cellules (prolifération, différenciation, myotubes, cellules de réserve). Il est également envisagé de caractériser les glycoprotéines qui les portent.

Du point de vue de la méthodologie, nous avons utilisé la technique du shRNA afin de sous exprimer *st6gal1* dans les cellules C2C12. L'analyse des voies de signalisation a été effectuée au moyen des techniques de RT-PCR quantitative en temps réel et de western blot. Enfin, les *N*-glycanes et les glycoprotéines ont été caractérisés par spectrométrie de masse et par l'utilisation de « lectin-blots ».



# **MATERIELS ET METHODES**

---



## I- Création de clones sous exprimant *st6gal1*

### 1) Culture et différenciation cellulaire

#### a) Culture et conservation des cellules

Les cellules de la lignée myoblastique murine C2C12, issue des muscles squelettiques du membre postérieur d'une souris adulte C3H (ATCC – CRL-1772, Manassas, VA, USA) (Yaffe et Saxel, 1977), sont cultivées sous 5% de CO<sub>2</sub> à une température de 37°C dans un milieu de croissance (GM, growth medium) composé de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Carlsbad, CA, USA) accompagné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio, Courtaboeuf, France) et de pénicilline-streptomycine (100 µg/mL-100 unités/mL, Gibco). A 70-80% de confluence, les cellules sont lavées avec du PBS (Tampon Phosphate Salin, Gibco) puis décollées par traitement à la trypsine (0,125% trypsine (v/v), 0,125 mM EDTA). La suspension cellulaire est centrifugée 5 minutes à 2500 rpm. Les cellules sont alors comptées sur lame de Malassez avant d'être ensemencées dans de nouvelles flasques ou plaques à raison de 5000 cellules par cm<sup>2</sup>.

Les cellules C2C12 sont conservées dans l'azote. A 70% de confluence, une trypsination est effectuée, les cellules sont comptées, centrifugées puis mises en suspension dans du milieu de congélation (5% DMSO, 95% GM) à la concentration de 10<sup>6</sup> cellules/mL et réparties dans des cryotubes pour être stockées dans de l'azote liquide.

#### b) Induction de la différenciation myoblastique

Pour induire la différenciation myoblastique, le milieu de croissance GM est remplacé par du milieu de différenciation (DM) défini comme du milieu DMEM complété avec 2% (v/v) de sérum de cheval (Gibco) et de la pénicilline-streptomycine (100 unités/mL-100 µg/mL). Les cellules sont cultivées dans ce milieu durant toute la cinétique de différenciation ; le milieu est changé quotidiennement.

### 2) Isolement des myotubes, des cellules de réserve et myoblastes

Les myotubes sont décollés du support par trypsination ménagée (Kitzmann *et al.*, 1998) : une étape de trypsination (0,1% trypsine, 0,1 mM EDTA) pendant 30 secondes est effectuée afin de décoller seulement les myotubes qui sont récupérés après centrifugation (2500 g pendant 5 minutes) du milieu d'extraction. Les cellules encore adhérentes, cellules de réserve et myoblastes, sont récoltées par une trypsination de 5 minutes puis centrifugation à

**Tableau 9** : Séquences des oligonucléotides utilisés pour générer les shRNA-*st6gal1* et shRNA-mock intégrés dans le vecteur pSIREN

Nom du shRNA	Séquence (5'-3')
sh1- <i>st6gal1</i> -F	GATCCGCGGAACTATCTGAACATGAATAAAGTTCTCTTATC ATGTTTCAGATAGTTCCCTCTTTTTTACGCGTG
sh1- <i>st6gal1</i> -R	AATTCACGCGTAAAAAAGAGGAACTATCTGAACATGAATAA GAGAACTTTATTCATGTTTCAGATAGTTCCGCG
sh-mock-F	GATCCGGGAATCTCATTTCGATGCATACAAGTTCTCTGTATGCA TCGAATGAGATTCTCTTTTTTACGCGTG
sh-mock-R	AATTCACGCGTAAAAAAGAGAATCTCATTTCGATGCATACAGA GAACTTGTATGCATCGAATGAGATTCCCG

Les sites de restriction des enzymes *EcoRI* (rouge) et *BamHI* (bleu) ont été ajoutés aux extrémités des séquences des shRNA.



2500 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires récoltés sont ensuite lyophilisés durant 24 heures.

### 3) Production des lentivirus et création de la lignée knockdown pour *st6gal1*

Les séquences des shRNA (**Tableau 9**) ont été déterminées d'après la séquence d'ARNm du gène cible *st6gal* murin. De plus à leurs extrémités, des séquences correspondant aux sites de restriction pour *EcoRI* et *BamHI* ont été ajoutées. Les shRNA ciblant l'ARNm de la sialyltransférase ST6Gal I (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) ont été intégrés dans le vecteur d'expression pSIREN (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) au niveau des sites de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Une séquence codant un shRNA ne ciblant aucune région du gène *st6gal1* a également été introduit dans un vecteur pSIREN. L'expression des shRNA est sous la dépendance du promoteur U6 (promoteur humain de l'ARN polymérase III) présent dans le pSIREN. Ce dernier possède un gène de résistance à la puromycine pour la sélection des clones. Des cellules embryonnaires humaines de rein HEK293T ont été transfectées avec le pSIREN afin de créer des lentivecteurs. Après 48 heures, le milieu de culture contenant les particules virales est collecté, filtré et utilisé pour la transfection des cellules C2C12 (**Le Cam et al., 2006**). Ces dernières sont incubées pendant 24 heures en présence des particules virales contenant les séquences des shRNA. Les cellules C2C12 ayant intégré les séquences apportées par les particules virales sont sélectionnées grâce à l'ajout de puromycine (Gibco) à une concentration de 10 µg/mL. Les populations clonales sont cultivées de la même manière que les C2C12, excepté la puromycine maintenue à une concentration de 2 µg/mL.

Deux clones ont été sélectionnés et ont été nommés C2C12-sh-C11 et C2C12-sh-C12. Après la sélection de ces deux clones, les cellules restantes, donc résistantes à la puromycine et présentant des niveaux de sous-expression hétérogènes, ont été collectées et regroupées afin de constituer la population C2C12-sh-pool.

La même démarche a été appliquée pour créer les cellules contrôles C2C12-sh-Mock.

## II- Caractérisation des populations clonales KD pour *st6gal1*

### 1) Vérification de la sous-expression de *st6gal1* par RT-PCR quantitative en temps réel

Des ARN totaux de chaque sous-population cellulaire ont été extraits grâce au kit « RNeasy mini kit » (QiagenInc, Hilden, Allemagne) et en appliquant le protocole fourni par



Qiagen. Les ARN sont quantifiés en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Une transcription inverse a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN au moyen du kit « high capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) selon le programme suivant : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C, 5 minutes à 85°C.

La quantité relative de transcrits de *st6gal1* est déterminée en utilisant 20 ng de produit de rétrotranscription, issus de la transcription inverse, pour chacun des échantillons ainsi qu'une sonde TaqMan spécifique (Applied Biosystems) pour *st6gal1* (sonde TaqMan : Mm00486119\_m1) ; le gène *gapdh* (sonde TaqMan : Mm99999915\_m1) est utilisé comme gène de référence. La fluorescence est mesurée à l'aide de l'appareil « QuantStudio 3 real-time PCR systems » (Applied Biosystems) et du logiciel « QuantStudio Design and Analyse Software v1.3 » (Applied Biosystems). Le programme d'amplification est le suivant : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C pour la dénaturation, 40 répétitions de 15 secondes à 95°C et de 1 minute à 60°C. La méthode de comparaison des  $\Delta\Delta Ct$  (threshold cycle) a été utilisée pour quantifier les quantités relatives de chaque ARNm (Livak et Schmittgen, 2001). Les valeurs de  $\Delta\Delta Ct$  représentent le  $\Delta Ct$  pour chaque gène dans une condition donnée auxquelles est retranchée la valeur de  $\Delta Ct$  du même gène en condition contrôle (C2C12-sh-Mock). Les quantifications relatives (RQ, relative quantifications) des transcrits d'un échantillon expriment les changements d'expression par rapport à l'échantillon contrôle, après normalisation par rapport au gène de référence *gapdh*. Les calculs de RQ sont effectués par le logiciel « QuantStudio Design and Analyse Software v1.3 » (Applied Biosystems) et n'ont été effectués que pour des valeurs de Ct inférieures à 37.

## 2) Cinétique de prolifération

Les cellules clonales et contrôles ont étéensemencées dans du milieu de croissance en plaque 6 puits à raison de 72 000 cellules par puits. A chaque temps de la cinétique de prolifération, les cellules sont décollées par trypsination (1% trypsine (v/v), 0.5 mM EDTA pendant 5 minutes), centrifugées et comptées sur lame de Malassez. Les analyses ont été réalisées en duplicat pour chaque temps et une moyenne des valeurs a été calculée.

## 3) Indice de fusion

Les cellules clonales et contrôles ont étéensemencées en plaques 6 puits à raison de 72 000 cellules par puits. A 70-80% de confluence, on remplace le milieu de prolifération par du milieu de différenciation. A différents temps de différenciation, les cellules sont lavées avec



1 mL de PBS et fixées dans du PBS-PFA 4% (v/v) (Paraformaldéhyde ; Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes, à température ambiante. Après trois lavages avec 1 mL de PBS, de l'éthanol 70% (v/v) est introduit dans chaque puits. Après une nuit à 4°C, ces cellules, déshydratées, ont été colorées au Jenner-Giemsa (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'indice de fusion est établi comme suit : pour douze champs observés à l'objectif x40, les noyaux présents dans les myotubes et le nombre total de noyaux observés par champ ont été comptés. Le pourcentage de fusion est calculé, il correspond au rapport : (Nombre de noyaux dans les myotubes/Nombre total de noyaux) x100.

### III- Comparaison de l' $\alpha$ 2,3 et l' $\alpha$ 2,6 sialylation par l'utilisation de lectines

#### 1) Marquages des cellules par lectines SNA et MAA au cours de la différenciation

Les cellules C2C12 sont cultivées en plaque 12 puits et la différenciation est initiée une fois que les cellules ont atteint 70-80% de confluence. Pour chaque point de la cinétique de différenciation, le milieu de différenciation est enlevé, les cellules sont lavées trois fois dans 1 mL de PBS et fixées dans du PBS-PFA 4% (v/v) pendant 20 minutes. Après lavage avec du PBS, les cellules sont incubées dans une solution de saturation (Roche, Pentzberg, Allemagne) pendant 30 minutes à température ambiante afin d'augmenter la spécificité du marquage. Après deux lavages avec 1 mL de tampon lectine n°1 (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> dans une solution de TBS (« Tris Buffered Saline »), pH 7,5), les cellules sont incubées avec 200 µL de lectines (lectines couplées à l' $\alpha$ -digoxigénine, kit « DIG glycan differentiation », Roche) pendant une heure à température ambiante. Les lectines utilisées sont la SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) (0,125 mg/mL) qui se lie préférentiellement aux acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,6 à un galactose ou une GalNAc et la MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) (0,125 mg/mL) reconnaissant un acide sialique lié en  $\alpha$ 2,3 à un galactose appartenant à un N ou O-glycane. Les cellules sont ensuite rincées trois fois au TBS et incubées avec l'anticorps anti- $\alpha$ -digoxigénine-phosphatase alcaline qui reconnaît l' $\alpha$ -digoxigénine couplée aux lectines (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, kit « DIG glycan differentiation », Roche) pendant une heure à température ambiante. Deux lavages au tampon lectine n°2 (0,1 M Tris, 0,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NaCl, pH 9,5) sont effectués, l'activité de la phosphatase alcaline est révélée par ajout de 50 µL par puits d'une solution de NBT-BCIP (« nitro blue tetrazolium chloride – 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt ») (dilution 1/50<sup>ème</sup> dans le tampon lectine n°2, Roche) pendant 30 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée grâce à 200 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'absorbance est



mesurée à 550 nm avec le lecteur de microplaque multimodes à système de filtres pour l'absorbance « Fluostar Omega » (BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne).

## **2) Extraction des protéines membranaires**

L'extraction des protéines membranaires est réalisée à l'aide du kit « Mem-PER eukaryotic membrane protein extraction reagent kit » (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les culots cellulaires sont solubilisés dans 150 µL de tampon A (fourni avec le kit) auxquels sont ajoutés des inhibiteurs de protéases (« Complete protease inhibitor cocktail », Roche). Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, 225 µL de réactif B et 225 µL de réactif C ainsi que des inhibiteurs de protéases sont ajoutés aux cellules lysées. Les tubes sont placés dans la glace durant 30 minutes et sont vortexés toutes les cinq minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 g. Les surnageants contenant les protéines sont transférés dans de nouveaux tubes et sont incubés dans un bain-marie à 37°C pendant 20 minutes. Une dernière centrifugation (10 000 g, 5 minutes) permet de distinguer la phase hydrophile de la phase hydrophobe qui contient les protéines membranaires. La phase hydrophile est retirée et la phase hydrophobe est transférée dans de nouveaux tubes qui seront conservés à -20°C. Les protéines sont alors dosées par la méthode BCA (Bicinchoninic acid assay, ThermoScientific, Rockford, IL, USA).

## **3) Traitements enzymatiques des protéines membranaires**

Les protéines membranaires précédemment extraites et dosées sont traitées à la *N*-glycosidase F ou à la *O*-glycosidase (kit « Enzymatic protein deglycosylation », Sigma-Aldrich) qui éliminent respectivement les *N*-glycanes et une partie des *O*-glycanes. Les protéines membranaires (25 µg) sont dissoutes dans 7,5 µL d'eau stérile auxquels sont ajoutés 10 µL de tampon de réaction (fourni dans le kit) et 2,5 µL de solution de dénaturation (fournie dans le kit). Les tubes sont placés sur une plaque chauffante à 100°C pendant 5 minutes. Du Triton X-100 (2,5 µL) et 1 µL d'enzyme sont ensuite ajoutés dans chacun des tubes qui sont placés durant une nuit à 37°C.

## **4) Extraction des protéines totales**

Les culots cellulaires sont solubilisés dans un tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% sodium déoxycholate, 1% NP-40, 0,1% SDS, pH 8) accompagné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche) pendant 1h30 à 4°C en rotation continue. Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C, les surnageants





contenant les protéines sont récupérés. Les protéines sont alors dosées par la méthode BCA (Bicinchoninic acid assay, ThermoScientific).

### 5) Analyses des glycoprotéines par « lectinblots »

Les protéines (25 µg) sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10% p/v) en conditions dénaturantes (migration à 20 mA pendant 1h30). Après transfert sur une membrane de nitrocellulose (Premium 0,2 µm NC, GE Healthcare-Life Sciences, Little Chalfont, Royaume-Uni) à 130 mA pendant 1h30, la membrane est saturée dans une solution de PBS et de réactif saturant à 10% (v/v) (Roche) pendant 30 minutes à température ambiante. Après trois lavages au TBS pour le marquage SNA et au TBS et tampon lectine n°1 pour le marquage MAA, les membranes sont incubées en présence de SNA couplée à la streptavidine (5 µg/mL, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ou de MAA couplée à l' $\alpha$ -digoxigénine (125 µg/mL, kit « DIG glycan differentiation », Roche). Puis trois lavages de 10 minutes au PBS-Tween-20 0,05% (v/v) pour la SNA et au TBS 1X pour la MAA sont réalisés. La membrane SNA est incubée dans une solution de streptavidine-HRP (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Sigma-Aldrich) et la membrane MAA dans une solution de phosphatase alcaline couplée à l' $\alpha$ -digoxigénine (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Roche) pendant une heure afin de reconnaître spécifiquement les acides sialiques  $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,6 liés. Deux glycoprotéines contrôles ont aussi été utilisées : la carboxypeptidase Y (protéine non sialylée) comme contrôle négatif et la fétuine (protéine sialylée) pour le contrôle positif. Avant analyse, trois lavages de 10 minutes au PBS-Tween-20 0,05% pour la SNA et au TBS 1X pour la MAA sont effectués. Le marquage de la SNA est révélé grâce à un substrat chimioluminescent (« BM chemiluminescence blotting substrate, POD », Roche) et à une caméra CCD de chimioluminescence (Caméra Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Pour la lectine MAA, la membrane est incubée dans une solution de NBT-BCIP diluée dans le tampon lectine n°2 (dilution 1/500<sup>ème</sup>, kit « DIG glycan differentiation », Roche).

### 6) Immunomarquages des acides sialiques $\alpha$ 2,3 et $\alpha$ 2,6 liés

Les cellules ont étéensemencées sur des lames Lab-Tek à quatre compartiments (Sigma-Aldrich) à raison de 28 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les C2C12-sh-Mock et de 40 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les C2C12-sh-C12. Après 24 heures de culture, les cellules sont lavées trois fois dans 1 mL de PBS et sont fixées au PBS-PFA 4% (v/v) pendant 20 minutes. Les cellules ont été traitées à la *N*-glycosidase F (dilution 1/600<sup>ème</sup> dans PBS 1X, Roche) pendant 1h30 à



37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules non traitées ont été incubées dans du DPBS dans les mêmes conditions. Après trois lavages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante dans une solution de saturation (solution de PBS accompagnée de 10 % (v/v) de sérum de chèvre, 1% (p/v) d'albumine bovine et 0,1% de Triton X-100), puis incubées la nuit dans la solution de lectine SNA couplée à la streptavidine (5 µg/mL, Vector Laboratories) ou de MAA couplée à l'α-digoxigénine (50 µg/mL, Roche) à 4°C. Ensuite, elles sont lavées trois fois avec 1 mL de PBS-Tween-20 0,1% (v/v), puis mises en contact avec un anticorps anti-streptavidine couplé à l'Alexa 568 (dilution 1/200<sup>ème</sup>, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pour le marquage SNA, et un anticorps anti-α-digoxigénine couplé à l'Alexa 488 (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Vector Laboratories) pour le marquage MAA. Après marquage au DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole) des noyaux (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, ThermoFischer, Waltham, MA, USA) pendant 15 minutes, puis trois lavages avec 1 mL de PBS-Tween-20 0,1% (v/v), une solution de Mowiol (Mowiol 4-88 9,6%, glycérol 12%, Tris HCl pH 8,5 0,1 M) est appliquée lors du montage entre la lame et la lamelle. Les cellules sont observées au microscope inversé à épifluorescence Leica DMI6000B (Wetzlar, Allemagne) aux grossissements x10 et x40. Pour détecter la fluorescence, trois longueurs d'onde ont été choisies (345 nm pour le DAPI, 499 nm pour l'Alexa 488, 579 nm pour l'Alexa 568) avec pour chacune un ajustement du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse. L'acquisition des images est réalisée à raison de cinq prises de vue par compartiment et par grossissement grâce au logiciel MetaMorph (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). Pour finir, les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ (NIH).

#### **IV- Analyses des glycanes par spectrométrie de masse**

##### **1) Extraction et purification des N-glycanes**

Les culots cellulaires sont repris dans une solution de PBS-Triton X-100 1% (v/v) puis subissent une sonication pendant 30 minutes afin de lyser les cellules. Les débris cellulaires et la fraction insoluble sont culotés par centrifugation (13 000 rpm, 10 minutes, 4°C) et le surnageant est retiré. Afin de prévenir la formation de ponts disulfures, les cellules sont incubées dans 10 mM de dithiothréitol (DTT) pendant une heure à 37°C. De l'iodoacétamide 0,5 M est ensuite ajouté afin d'empêcher l'action de certaines peptidases ; les cellules sont conservées pendant une heure dans l'obscurité à 37°C. Les protéines alkylées par l'action de l'iodoacétamide sont précipitées dans une solution d'acide trichloroacétique 10% (v/v) pendant 30 minutes à -20 °C. Ces protéines sont ensuite centrifugées (13 000 rpm, 10 minutes, 4 °C) et



le surnageant est écarté. Trois lavages des culots protéiques sont réalisés avec 1 mL d'acétone froid et les culots sont centrifugés entre chaque lavage (13 000 rpm, 10 minutes, 4°C). Les échantillons sont incubés avec de la trypsine (Sigma-Aldrich) et 50 mM de bicarbonate d'ammonium (pH 8,4) pendant une nuit à 37 °C. L'action de la trypsine est stoppée en chauffant les culots à 100°C pendant 5 minutes. Les *N*-glycanes sont libérés par traitement à la *N*-glycosidase F (BioLabs, Ipswich, MA, USA) durant 24 heures à 37 °C. Les *N*-glycopeptides sont séparés par chromatographie C<sub>18</sub> Sep-Pak (Waters, Milford, MA, USA). Les colonnes ont été activées par de l'acétonitrile et équilibrées avec une solution d'acide acétique 5% (v/v) qui a permis d'éluer les *N*-glycanes.

## 2) Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les *N*-glycanes extraits doivent être perméthylés (Ciucanu et Kerek, 1984) avant d'être analysés en spectrométrie de masse. Les échantillons sont incubés dans une solution de DMSO/NaOH/ICH<sub>3</sub> pendant 2 heures sous agitation. La dérivation est stoppée par l'ajout d'eau et les glycanes perméthylés sont extraits dans du chloroforme et lavés au moins huit fois à l'eau. Ils sont ensuite solubilisés dans de l'acétonitrile et mélangés avec une solution matrice d'acide dihydroxybenzoïque (10 mg/mL) dissout dans de l'acétonitrile et de l'eau (dilution 7:3 (v/v)) avant d'être chargés sur la plaque MALDI. Les acquisitions des spectres s'effectuent sur le spectromètre de masse Axima Resonance MALDI-QIT-TOF-MS (Shimadzu, Kyoto, Japon).

## 3) Quantifications des *N*-glycanes

Les quantifications sont obtenues en ajoutant les valeurs de voltage (mV) aux trois isotopes majeurs de chacune des structure glycanique identifiée. Pour chaque échantillon, les pourcentages individuels de chaque glycane sont calculés.

## V- Analyses des niveaux de transcrits et de protéines associés au knockdown du gène *st6gal1*

### 1) RT-PCR quantitative en temps réel de *Myomaker*, *Pax7* et des gènes cibles de la voie de signalisation de Notch

Les ARN sont extraits à partir de culots cellulaires à l'aide du kit « RNeasy mini kit » (QiagenInc) et la transcription inverse est réalisée comme citée dans le paragraphe II-1). Des sondes spécifiques Taqman (Applied Biosystems) sont utilisées pour les gènes suivants : *Pax7* (sonde Taqman : Mm03053796\_m1), *Myomaker* (sonde Taqman : Mm00481256\_m1), *Hes1*



(sonde Taqman : Mm00468601\_m1), *Heyl* (sonde Taqman : Mm00468865\_m1), *Hes6* (sonde Taqman : Mm00517097\_g1), *Rbpj* (sonde Taqman : Mm00770450\_m1) ; *gapdh* (sonde Taqman : Mm99999915\_m1) est utilisé comme gène de référence. La fluorescence est quantifiée de la même façon que précédemment et le logiciel « QuantStudio Design and Analyse Software v1.3 » (Applied Biosystems) est à nouveau utilisé afin de comparer les différentes valeurs de Ct et de calculer les valeurs de RQ.

## 2) Immunomarquages Pax7/MyoD

Ce double marquage est réalisé afin d'estimer la proportion de cellules de réserve dans chaque sous-population cellulaire. Les cellules clonales et contrôles ont été ensemencées dans des chambres Lab-Tek (Sigma-Aldrich) comme pour les immunomarquages avec les lectines. Après 24 heures, les cellules sont lavées trois fois dans 1 mL de PBS 1X et fixées dans du PBS-PFA 4% (v/v) pendant 20 minutes à température ambiante. Après un lavage supplémentaire au PBS, les cellules sont perméabilisées au moyen d'un tampon Hepes-Triton (20 mM Hepes, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 7,4) pendant 30 minutes à 4°C puis elles sont lavées à trois reprises dans du PBS. Après traitement avec la solution de saturation, les cellules sont ensuite incubées pendant une nuit en présence des anticorps primaires à 4°C : anticorps anti-Pax7 (100 µg/mL, Developmental Studies Hybridoma Bank, Université de l'Iowa, Iowa City, IO, USA), anticorps anti-MyoD C-20 (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA). Les anticorps secondaires sont mis en contact des cellules pendant 15 minutes à l'obscurité à 37°C : l'anticorps de chèvre anti-souris est couplé à l'Alexa Fluor 488 (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, ThermoFischer Scientific) pour le marquage Pax7 et l'anticorps de chèvre anti-lapin, couplé à l'Alexa Fluor 546 (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, ThermoFischer Scientific) pour le marquage MyoD. Pour finir, les noyaux sont marqués au DAPI (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, ThermoFischer Scientific) pendant 15 minutes à l'obscurité et à 37°C. Les observations et photographies sont effectuées au moyen du microscope à épifluorescence Leica DMI 6000B (grossissement x10) et du logiciel MetaMorph (Molecular devices). Pour détecter la fluorescence, trois longueurs d'onde identiques à celles de l'immunomarquage lectines ont été choisies avec pour chacune un ajustement du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse. L'acquisition des images est réalisée à raison de sept prises de vue par compartiment. Les différents comptages cellulaires (cellules Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup> ; Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup> ; Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>) ont été effectués à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) et les valeurs ont été exprimées en termes de pourcentage.





### 3) Western blot des protéines totales

Des quantités identiques de protéines (100 µg par puits) sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (10% p/v) en conditions dénaturantes et réductrices grâce à la présence de SDS (10% v/v, Sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich). Les conditions de migration et de transfert sur membrane de nitrocellulose sont identiques à celles des « lectin blots ». La saturation des membranes est réalisée grâce à une solution de TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20-lait 5% (p/v) ou de TBST-BSA 5% (p/v) (Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich) pendant une heure à température ambiante sous agitation légère. Les membranes sont ensuite incubées dans les solutions d'anticorps primaires durant une nuit à 4°C sous agitation légère. Les anticorps primaires, dilués dans du TBST-lait 2,5% (p/v) ou du TBST-BSA 2,5% (p/v), sont les suivants : Pax7 (dilution 1/100<sup>ème</sup>, Developmental Studies Hybridoma Bank), NICD (dilution 1/500<sup>ème</sup>, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Akt (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), phospho-Akt (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems), Smad2/3 (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems), phospho-Smad2/3 (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems), p38 (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems), phospho-p38 (dilution 1/500<sup>ème</sup>, R&D Systems), GAPDH (dilution 1/1000<sup>ème</sup>, R&D Systems). L'incubation avec l'anticorps primaire est suivie de trois lavages de cinq minutes dans du TBST 0.1%. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans du TBST 0,1% - lait ou BSA 2,5% pendant une heure à température ambiante sous agitation légère. Après trois lavages supplémentaires au TBST 0.1%, les protéines sont visualisées grâce à un substrat chimioluminescent (« POD », Roche) et à une caméra de détection de chimioluminescence (Caméra Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences). Toutes les intensités ont été normalisées par rapport à celle de la GAPDH.

### VI- Tests statistiques

Pour les tests statistiques, le test de Student a été réalisé grâce au logiciel Prism, version 7 (GraphPad, San Diego CA, USA). Le test de significativité est déterminé selon les p-values suivantes : \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001.



# RESULTATS

---



## Article

---

Les cellules satellites activées sont capables de proliférer, se différencier puis fusionner pour former les myotubes, ceci constitue les principales étapes de la myogenèse qui sont sous l'influence des facteurs de transcription spécifiques du muscle MRF et de Pax7. L'entrée en différenciation dépend également de l'état de glycosylation des myoblastes, et notamment de la sialylation des *N*-glycanes régie par les enzymes sialyltransférases. Notre travail s'est concentré sur l' $\alpha$ 2,3 et l' $\alpha$ 2,6 sialylation, les deux types de sialylation les plus fréquemment rencontrés. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de la différenciation et notamment la voie de Notch, connue pour empêcher l'expression du MRF MyoD et l'établissement de la différenciation.

Nous avons donc cherché à déterminer l'implication de l' $\alpha$ 2,6 sialylation dans la différenciation myogénique.

Une partie des résultats présentés dans cet exposé a fait l'objet d'un article publié dans le journal FEBS Open Bio :

### **Involvement of ST6Gal I – mediated $\alpha$ 2,6 sialylation mediated in myoblast proliferation and differentiation**

Caroline Vergé, Amel Bouchatal, Frédéric Chirat, Yann Guérardel, Abderrahman Maftah,  
Jean-Michel Petit

## Involvement of ST6Gal I-mediated $\alpha$ 2,6 sialylation in myoblast proliferation and differentiation

Caroline Vergé<sup>1</sup>, Amel Bouchatal<sup>1</sup>, Frédéric Chirat<sup>2</sup>, Yann Guérardel<sup>2</sup>, Abderrahman Maftah<sup>1</sup>   
and Jean-Michel Petit<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> PEIRENE, EA 7500, Glycosylation and Cell Differentiation, University of Limoges, France

<sup>2</sup> UGSF, UMR 8576, CNRS, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France

### Keywords

myoblastic fusion; *N*-glycans; *Pax7*; sialylated glycoproteins; sialyltransferases

### Correspondence

J.-M. Petit, Faculty of Sciences and Technology, 123, av. Albert Thomas 87060 Limoges Cedex, France  
Tel: +33555457671  
E-mail: jean-michel.petit@unilim.fr

Caroline Vergé and Amel Bouchatal are considered as cofirst authors and contributed equally to this work.

(Received 7 August 2019, revised 24 September 2019, accepted 16 October 2019)

doi:10.1002/2211-5463.12745

Myogenesis is a physiological process which involves the proliferation of myoblasts and their differentiation into multinucleated myotubes, which constitute the future muscle fibers. Commitment of myoblasts to differentiation is regulated by the balance between the myogenic factors *Pax7* and *MyoD*. The formation of myotubes requires the presence of glycans, especially *N*-glycans, on the cell surface. We examined here the involvement of  $\alpha$ 2,6 sialylation during murine myoblastic C2C12 cell differentiation by generating a *st6gal1*-knockdown C2C12 cell line; these cells exhibit reduced proliferative potential and precocious differentiation due to the low expression of *Pax7*. The earlier fusion of *st6gal1*-knockdown cells leads to a high fusion index and a drop in reserve cells (*Pax7*<sup>+</sup>/*MyoD*<sup>-</sup>). In *st6gal1*-knockdown cells, the Notch pathway is inactivated; consequently, *Pax7* expression is virtually abolished, leading to impairment of the proliferation rate. All these results indicate that the decrease in  $\alpha$ 2,6 sialylation of *N*-glycans favors the differentiation of most cells and provokes a significant loss of reserve cells.

During vertebrate development, myogenesis begins with the formation and the migration of progenitor cells. Subsequently, their proliferation and fusion lead to the formation of myofibers. On the periphery of myofibers, satellite cells are considered as muscle stem cells since they can engage differentiation in response to an injury or during pathological processes [1,2]. When activated, satellite cells proliferate, then differentiate into myotubes, and mature into myofibers [3,4]. The fate of satellite cells is determined by the basic helix–loop–helix myogenic regulatory factors (MRFs) [5]; these transcription factors play essential roles during postnatal growth, repair and regeneration of skeletal muscle [6]. As hetero- or homodimers, they bind

the E-box (consensus sequence CANNTG) and activate the transcription of skeletal muscle-specific genes [7]. Satellite cells express other upstream transcription regulators belonging to the family of paired box proteins such as *Pax3* and *Pax7*. *Pax7* holds a central position in satellite cell maintenance, since the knockdown of this gene results in the disappearance of satellite cells shortly after birth as well as in skeletal muscle atrophy [8,9].

Myoblastic fusion depends on the glycosylation state of myoblasts. Among the glycogenes expressed in the murine myoblast cell line C2C12 and in satellite cells, several genes are transcriptionally deregulated during differentiation [10,11]. These results highlight the

### Abbreviations

EGF, epidermal growth factor; MAA, maackia amurensis agglutinin; MRF, myogenic regulatory factor; NICD, notch intracellular domain; PNGase F, *N*-glycosidase F; Pofut1, protein O-fucosyltransferase 1; Rbpj, recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region; SNA, sambucus nigra amurensis.

implication of glycans, and particularly of sialic acids in myoblast fusion and differentiation.

Sialic acids terminate glycan chains commonly found in cell surface glycoconjugates [12]. Sialic acids play two main functions: (a) acting as biological masks, as some antirecognition agents [13]; (b) being biological recognition sites as they are ligands for several molecules such as hormones or lectins [14]. Glycan sialylation is under the control of sialyltransferases. At least twenty human sialyltransferases have been identified so far. They are classified into four groups according to the type of linkage and the nature of the acceptor: ST3Gal (ST3Gal I–VI), ST6GalNAc (I–VI), ST8Sia (I–VI), and ST6Gal (I and II) transferases [15]. We focused on the latter group since ST6Gal I is the only  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase expressed in human skeletal muscle [16].

Several signaling pathways have been shown to be implicated in the regulation of muscle cell differentiation. Among them, the Notch pathway and the *O*-glycosylation of the receptor Notch epidermal growth factor (EGF)-like repeats by the enzyme protein *O*-fucosyltransferase 1 (Pofut1) are essential for the initiation of differentiation [17]. Activation of the Notch signaling results in the release of notch intra cellular domain (NICD) into the cytosol, its translocation and binding to recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (Rbpj) in nucleus, and the subsequent transcription of downstream genes such as *Hes* and *Hey* [18]. The products of these latter genes share the ability to prevent the heterodimerization of several MRF and notably *MyoD* [19], thus inhibiting myogenic differentiation.

In the present study, we created C2C12 clones in which the gene *st6gal1* encoding the ST6Gal I sialyltransferase is downregulated. We evidenced a reduced proliferative potential of *st6gal1*-knockdown cells, due to a low expression of *Pax7*. These cells present an earlier differentiation and a decrease in the number of reserve cells. During differentiation of the control cells, we showed a global decrease in  $\alpha$ 2,6 sialylation, which concerns more particularly the *N*-glycans. We concluded that  $\alpha$ 2,6 sialylation mediated by ST6Gal I is required for the activation of *Pax7*, limits the fusion of C2C12 myoblasts, and allows the upkeep of satellite cells.

## Methods

### Cell culture

C2C12 mouse myoblasts were grown to confluency under 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in growth medium (GM) consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (v/v)

FBS (EuroBio, Courtaboeuf, France) and penicillin–streptomycin (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>–100 units·mL<sup>-1</sup>; Gibco). To differentiate, cells were then switched to differentiation medium consisting of DMEM supplemented with 2% (v/v) horse serum (Gibco) and penicillin–streptomycin (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>–100 units·mL<sup>-1</sup>) for different durations (from 24 to 336 h). Medium was routinely changed every 24 h.

When cells are confluent, they are trypsinized (0.125% trypsin and 0.125 mM EDTA) and harvested. At 120 h of differentiation, myotubes were isolated using a short trypsinization (0.1% trypsin and 0.1 mM EDTA; 30 s) that specifically left only reserve cells adherent to the flask [20].

### Proliferation assay

Cells were seeded at 72 000 cells per well in GM or GM with puromycin into six-well plates. The cells were trypsinized (1% trypsin, 0.5 M EDTA; 5 min) and counted at each time point of the proliferation kinetics (0, 12, 24 and 48 h) with a Malassez chamber. Two replicates were analyzed at each time point, and an average of the values was calculated.

### Differentiation assay

At different stages of differentiation, cultured cells were washed twice with 1 mL PBS and fixed in 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 20 min at room temperature. Cells were then washed three times with 1 mL PBS before being dehydrated overnight at 4 °C in 70% (v/v) ethanol. Dehydrated cells were Jenner–Giemsa stained, and fusion index scoring was done as previously reported [21]. Nuclei were counted in twelve randomly chosen microscope fields at a magnification of  $\times$ 400. One microscope field usually contained between 100 and 200 nuclei. Fusion (%) was defined as [(number of nuclei in myotubes)/(number of total nuclei in myoblasts and myotubes)]  $\times$  100.

### Lentivirus production and *st6gal1* knockdown in C2C12 cells

A mouse *st6gal1* shRNA lentiviral transfer vector was produced by annealing the primers presented in Table 1. A control shRNA was also created by annealing the primers sh-mock-UP and sh-mock-DN (Table 1). The annealed products were cloned into the *EcoRI* and *BamHI* sites of RNAi-Ready pSIREN (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and lentiviral particles were produced in HEK-293T cells according to the manufacturer's instructions. After 48 h, the culture medium containing particles was recovered, filtered, and immediately used for C2C12 infection [22]. C2C12 cells were incubated for 24 h with the retrovirus, and recombinant cells were selected in the presence of puromycin (Gibco) at a concentration of 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>. The clonal populations were recovered and

**Table 1.** Sequences of the primers used to create the *st6gal1* shRNA vectors.

shRNA	Sequence (5'-3')
sh1- <i>st6gal1</i> -UP	GATCCGCGGAACATCTGAACATGAATAAAGTTCTCTTATTCATGTTTCAGATAGTTCTCTTTTTACGCGTG
sh1- <i>st6gal1</i> -DN	AATTCACGCGTAAAAAGAGGAACTATCTGAACATGAATAAAGAGAACTTTATTCATGTTTCAGATAGTTCCGCGG
sh-mock-UP	GATCCGCGGAATCTCATTTCGATGCATACAAAGTTCTCTGTATGCATCGAATGAGATTCTTTTTACGCGTG
sh-mock-DN	AATTCACGCGTAAAAAGAGAACTCATTTCGATGCATACAGAACTTGTATGCATCGAATGAGATTCCCG

cultured separately in the same medium as C2C12 cells, except that puromycin was present at a final concentration of  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Two clonal populations were selected and named C2C12-sh-C11 and C2C12-sh-C12. The same protocol was followed to create C2C12-sh-Mock cells.

### Release and purification of N-glycans

Cells were resuspended in Triton X-100 extraction buffer (1% Triton X-100 in PBS buffer) and sonicated for 30 min. Debris and insoluble fraction were pelleted down by centrifugation at  $18\,900\text{ g}$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ ;  $0.1\text{ M}$  dithiothreitol was added to the supernatant (final concentration  $10\text{ mM}$ ), and the mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h; addition of  $0.5\text{ M}$  iodoacetamide (final concentration  $50\text{ mM}$ ) was followed by 1-h incubation in the dark at  $37^\circ\text{C}$ . The reduced/alkylated glycoproteins were precipitated with 1/9 volume of 100% trichloroacetic acid at  $-20^\circ\text{C}$  for 30 min. The pellet obtained by centrifugation at  $18\,900\text{ g}$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  was resuspended and washed with 1 mL of cold acetone and then centrifuged at  $18\,900\text{ g}$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ ; this step was repeated three times. Sample was incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$  with trypsin (Sigma-Aldrich) in  $50\text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8.4. The reaction was stopped by boiling at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min. N-glycans were released by N-glycosidase F (PNGase F; BioLabs, Ipswich, MA, USA) digestion at  $37^\circ\text{C}$  for 1 day; N-glycans and O-glycopeptides were separated by  $\text{C}_{18}$  Sep-Pak Chromatography (Waters, Milford, MA, USA).  $\text{C}_{18}$  Sep-Pak was activated in pure acetonitrile (ACN), equilibrated in 5% aqueous acetic. Sample was loaded on the  $\text{C}_{18}$  Sep-Pak, and the released N-glycans were eluted with 5% aqueous acetic acid.

### Mass spectrometry analysis of glycans

Glycans were permethylated according to the method of Ciucanu and Kerek prior to mass spectrometry analysis [23]. Briefly, samples were incubated with DMSO/NaOH/ $\text{ICH}_3$  during 2 h under agitation. The derivatization was stopped by addition of water, and the permethylated glycans were extracted in  $\text{CHCl}_3$  and washed at least eight times with water. Permethylated glycans were solubilized in ACN and mixed with 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution [ $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dissolved in ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (7 : 3, v/v)] and spotted on MALDI plate. MALDI-TOF mass spectra were acquired on Shimadzu, AXIMA Resonance MALDI-QIT-TOF-MS (Shimadzu, Kyoto, Japan).

### Quantification of N-glycans

Quantification was carried out by adding voltage values (in mV) of the three major isotopes of each glycan structure. For each sample, percentages of individual glycan were then calculated.

### Quantitative real-time RT-PCR

RNA was isolated from cells with the RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany). RNA amounts were measured using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). cDNA was synthesized from  $2\text{ }\mu\text{g}$  of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Levels of transcripts for specific genes were quantified in triplicate using  $20\text{ ng}$  of cDNA for each sample, and TaqMan qRT-PCR with specific probes and primers (Applied Biosystems) for *st6gal1* (Mm00486119\_m1), *Pax7* (Mm03053796\_m1), *Hes1* (Mm00468601\_m1), *Hey1* (Mm00468865\_m1), *Hes6* (Mm00517097\_g1), and *Rbpj* (Mm00770450\_m1). *Gapdh* (Mm99999915\_m1) was used as a reference gene. All probes and primers were purchased from Applied Biosystems.

Fluorescence was monitored on the QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) and quantified by the QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.3 (Applied Biosystems). The comparative threshold cycle ( $C_t$ ) method ( $\Delta\Delta C_t$ ) was used to quantify the relative abundance of each mRNA [24]. Comparative gene expression  $\Delta\Delta C_t$  represents the  $\Delta C_t$  for each gene in a given condition (C2C12-sh-C12 cells) minus  $\Delta C_t$  value of the same gene in the exogenous control condition (C2C12-sh-Mock) serving as a calibrator. Relative quantification of the transcripts in a sample reflects expression changes in the sample of interest compared to the calibrator sample, after normalization with *gapdh* as reference.

### Immunofluorescent staining

Cells were seeded into a 4-well Lab-Tek II chamber slide (Sigma-Aldrich). After 24 h, cells were washed three times in  $1\text{ mL}$   $1\times$  PBS and fixed with 4% PFA-PBS for 20 min. Cells were treated with PNGase F (1 : 600; Roche) for 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$  under 5% of  $\text{CO}_2$ . Untreated cells were incubated in PBS for 1.5 h in the same culture conditions. Cells were washed thrice in  $1\times$  PBS, permeabilized with



HEPES–Triton buffer [20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 7.4] for 30 min at 4 °C, then three 5-min washes in 1× PBS were done. Cells were blocked for 1 h at room temperature in blocking buffer consisting of 10% goat serum, 1% BSA, and 0.1% Triton X-100 in 1× PBS solution. Cells were incubated with a primary antibody overnight at 4 °C and then washed three times with 1 mL of 1× PBS–0.1% Tween-20 solution. An appropriate secondary antibody was then added, and incubation was continued for 15 min in the dark at 37 °C in a wet environment. Cells were then stained with DAPI (1 : 1000; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and finally washed three times with 1 mL of 1× PBS–0.1% Tween-20 solution. A slice was mounted with Mowiol solution, and the images were acquired with a LEICA inverted epifluorescence microscope (DMI 6000B) using identical exposure settings with the METAMORPH software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Individual images were taken and assembled with MetaMorph software. Primary antibodies used were against: Pax7 (100 µg·mL<sup>-1</sup>, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) and MyoD C-20 (1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Secondary antibodies were goat anti-mouse Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (1 : 1000; Thermo Fisher Scientific) and goat anti-rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 (1 : 1000; Thermo Fisher Scientific) for Pax7 and MyoD, respectively.

#### Lectin labeling

A fluorescent labeling with maackia amurensis agglutinin (MAA) and sambucus nigra amurensis (SNA) lectins was also performed as described above except that the digoxigenin-labeled lectin was used at 50 µg·mL<sup>-1</sup> (for MAA) and at 5 µg·mL<sup>-1</sup> (for SNA) and that it was detected with DyLight 488 Anti-DIG (green for MAA; 1 : 1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate (red for SNA; 1 : 200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

#### Protein preparation and western blotting

Total cell extracts were prepared by solubilizing cell pellets in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% SDS] and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged (12 000 g for 30 min at 4 °C). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay procedure (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Equal amounts of proteins (100 µg) were resolved on a 10% polyacrylamide gel under denaturing and reducing conditions (migration at 20 mA for 1.5 h). The proteins were transferred onto a nitrocellulose blotting membrane (Premium 0.2 µm NC; GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) at 48 mA for 1.5 h. Then, membranes were blocked using 5%

nonfat dry milk or BSA (Sigma-Aldrich; w/v) in TBST (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature, followed by incubation overnight at 4 °C with specific primary antibodies diluted in 2.5% nonfat dried milk or BSA (w/v) in TBST. The following antibodies were used for immunoblotting: Pax7 (1 : 100; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), NICD (1 : 500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and gapdh (1 : 1000; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Incubation in primary antibodies was followed by three washes of 5 min each in 0.1% TBST. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody in 2.5% nonfat dry milk or BSA in 0.1% TBST for 1 h at room temperature. After three additional washes in TBST, reactive proteins were visualized with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD; Roche Applied Science) and the Amersham Imager 600 chemiluminescence detection camera (GE Healthcare Life Sciences). Band intensities were measured using the aforesaid system and its software. All bands were normalized to the corresponding gapdh band intensity.

#### Glycoprotein analysis using lectin blot

Membrane glycoproteins were detected by lectin blot. Proteins were extracted with a RIPA buffer and were treated with PNGase F (Enzymatic Protein Deglycosylation Kit; Sigma-Aldrich). An electrophoresis analysis was performed as explained below except that only 25 µg of proteins was loaded. After transfer on nitrocellulose blotting membrane (Premium 0.2 µm NC; GE Healthcare Life Sciences) at 130 mA for 1.5 h, a treatment was applied with PBS supplemented with 10% (v/v) blocking reagent (Roche) for 30 min at room temperature. After three washings with TBS and lectin buffer 1 for MAA lectin or with TBS (for SNA binding), membranes were incubated with lectins MAA (125 µg·mL<sup>-1</sup>, DIG glycan differentiation kit; Roche) and SNA (5 µg·mL<sup>-1</sup>; Vector Laboratories). Then, we performed three washes of 10 min in TBS for MAA and PBS–0.05% Tween-20 for SNA. We incubated the MAA membrane in  $\alpha$ -digoxigenin-alkaline phosphatase or SNA membrane in streptavidin-HRP during 1 h. We finished by three 10-min washes in TBS 1X for MAA and PBS–0.05% Tween-20 solution for SNA.

Two control glycoproteins were also used: carboxypeptidase Y (an asialoprotein) as a negative control and fetuin (a sialylated protein) as a positive control.

## Results

### A lower expression of st6gal1 leads to an increase in the fusion rate of cells

Because the  $\alpha$ ,3 linkage of sialic acids depends on six different  $\alpha$ ,3 sialyltransferases (ST3Gal I–VI),

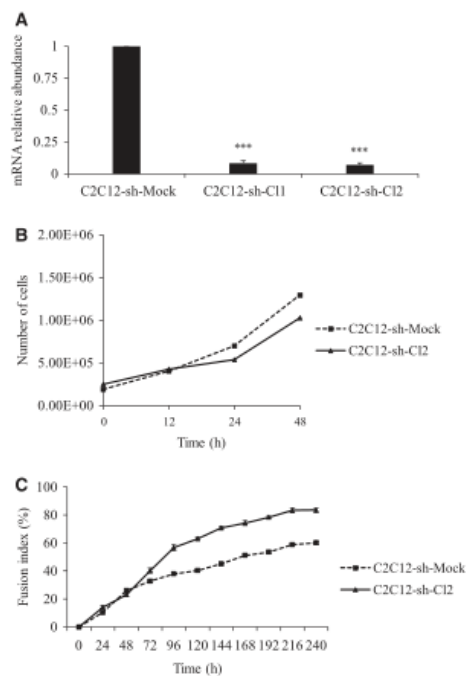
and  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids are added by only two  $\alpha$ 2,6 sialyltransferases (ST6Gal I and II), we chose to work on  $\alpha$ 2,6 sialylation. Since ST6Gal II is not expressed in C2C12 cells, we focused our study on the  $\alpha$ 2,6 linkage of sialic acids by ST6Gal I.

We generated C2C12 clones which expressed shRNA targeting the *st6gal1* transcript and measured the expression level of *st6gal1* by quantitative RT-PCR (Fig. 1A). Compared with mock cells, the level of *st6gal1* mRNA decreased at least by a factor 12 in clones 1 and 2. The trends observed during the proliferation time course and the fusion index were almost the same for the two clones (Fig. S1). This confirms the cellular phenotype associated with *st6gal1* knockdown. We retained for further studies the clone 2. The proliferation time course has been carried out for 48 h (Fig. 1B). We observed a significant 25% decrease in cell proliferative capacity of clone 2 compared to mock cells. The fusion index followed until 240 h (Fig. 1C) revealed a more important fusion for *st6gal1*-knockdown cells (C2C12-sh-C12 cells). During the first 72 h of differentiation, fusion rates of *st6gal1*-knockdown cells and mock cells were quite similar, then after, the fusion rate of control cells slowed down, contrary to *st6gal1*-knockdown cells. At 96 h of differentiation, fusion indices were about 38% for control cells and about 50% for *st6gal1*-knockdown cells. At 240 h, it reached ~60% for mock cells and 80% for *st6gal1*-knockdown cells.

#### Knockdown of *st6gal1* induces a drop in $\alpha$ 2,6-linked structures attached to glycans

To confirm the decrease in  $\alpha$ 2,6 sialylation during the differentiation of *st6gal1*-knockdown cells, we have performed immunocytochemistry and lectin-blot analyses during proliferation and differentiation of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells.

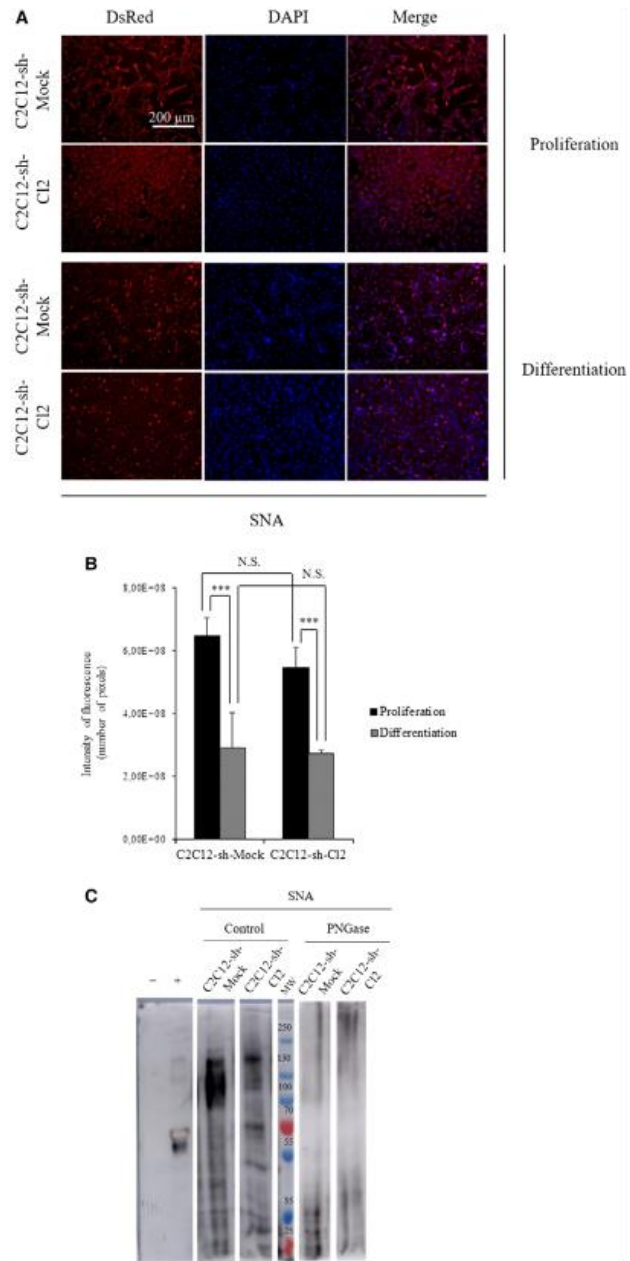
We looked for terminal  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids with DsRed-SNA (Fig. 2A), and we observed, during cell proliferation, a decrease of around 16% in SNA binding in C2C12-sh-C12 cells compared with C2C12-sh-Mock cells. During cell differentiation, SNA binding decreased in both conditions; however, its level remained slightly lower in C2C12-sh-C12 cells compared with C2C12-sh-Mock cells (Fig. 2B). These two results were confirmed by lectin-blot analyses of membrane glycoproteins of proliferating cells (Fig. 2C). Mainly glycoproteins of molecular weight higher than 55 kDa seem to possess  $\alpha$ 2,6 sialylated *N*-glycans. We observed a decrease in the  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids in C2C12-sh-C12 cells compared with



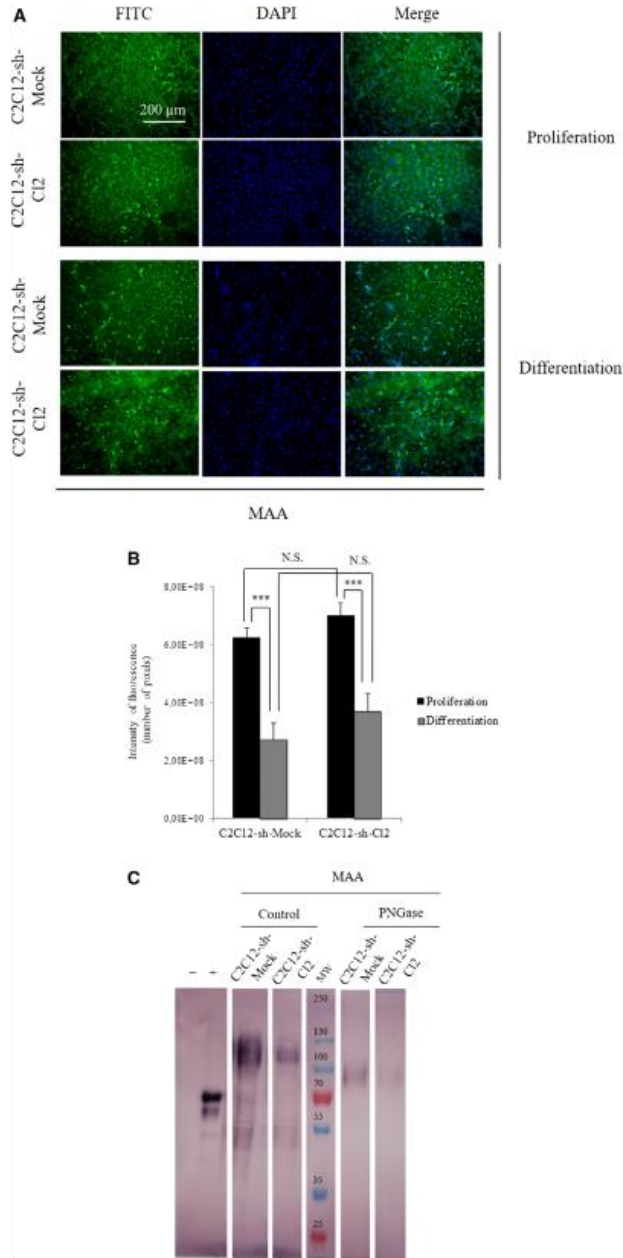
**Fig. 1.** *st6gal1* knockdown modifies the proliferation rate and the differentiation rate. (A) Gene expression of *st6gal1* in C2C12 cells infected with mock shRNA (C2C12-sh-Mock) and C2C12 cells infected with *st6gal1*-shRNA (C2C12-sh-C11, C2C12-sh-C12). *st6gal1* expression in C2C12-sh-Mock was used as reference. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the ratio of  $C_t$  values for sh-treated cells and  $C_t$  values for C2C12-sh-Mock cells and normalized against the expression of *gapdh* transcripts. Experiments have been done three times ( $n = 3$ ). Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed *t*-test, with a significant level of  $***P < 0.001$ ). (B) Proliferation rate of C2C12-sh-Mock cells (dotted line) and C2C12-sh-C12 cells (solid line). Two different sets of measures are shown ( $n = 2$ ), and the average curve is represented. (C) Differentiation rate of C2C12-sh-Mock (dotted line) and C2C12-sh-C12 cells (solid line). Cell fusion was measured at various times by Jenner-Giemsa staining and expressed as fusion index (%). Vertical bars denote SEM for twelve observation fields of the same experience ( $n = 1$ ).

C2C12-sh-Mock cells. In order to check the specificity of SNA binding, PNGase F was used to remove *N*-glycans. This treatment greatly reduced the staining of all the glycoproteins (Fig. 2C).

Then, we evaluated the  $\alpha$ 2,3-linked sialic acids with FITC-MAA (Fig. 3A). The staining was less intense



**Fig. 2.** Knockdown of *st6gal1* reduced the  $\alpha$ 2,6 sialylation at the cell surface. (A) Immunocytochemistry of  $\alpha$ 2,6 sialylation in proliferating or differentiating cells. Photographs are organized from left to right: lectin labeling for proliferation or differentiation cells with lectin coupled to DsRed, nuclear staining with DAPI, and merge (lectin and DAPI stainings). (scale bar: 200  $\mu$ m). (B) Quantifications of fluorescence intensities of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12. The fluorescence levels are measured with the software IMAGEJ (NIH, Bethesda, MD, USA) on three different fields. Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed *t*-test, with a significant level of \*\*\**P* < 0.001). (C) Lectin-blot analysis of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 in proliferation treated or not with PNGase F using SNA. The negative control is carboxypeptidase Y (molecular weight: 63 kDa), and the positive control is fetuin (molecular weight: 68 kDa). The different bands and the controls come from the same blot, but some bands have been cut to conserve only the interesting ones. Each experiment has been performed three times (*n* = 3).



**Fig. 3.** Knockdown of *st6gal1* did not modify significantly the  $\alpha$ 2,3 sialylation at cell surface. (A) Immunocytochemistry of  $\alpha$ 2,3 sialylation in proliferating or differentiating cells. Photographs are organized from left to right: lectin labeling for proliferation or differentiation cells with lectin coupled to FITC, nuclear staining with DAPI, and merge (lectin and DAPI stainings). (scale bar: 200  $\mu$ m). (B) Quantification of fluorescence intensities of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12. The fluorescence levels are measured with the software IMAGEJ on three different fields. Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed t-test, with a significant level of \*\*\* $P$  < 0.001). (C) Lectin-blot analysis of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 in proliferation treated or not with PNGase F using MAA. The negative control is carboxypeptidase Y (molecular weight: 63 kDa), and the positive control is fetuin (molecular weight: 68 kDa). The different bands and the controls come from the same blot, but some bands have been cut to conserve only the interesting ones. Each experiment has been performed three times ( $n = 3$ ).

during differentiation than during proliferation in clone 2 compared with control. FITC-MAA staining is 10% stronger in C2C12-sh-C12 cells compared to C2C12-sh-Mock control cells during myoblast proliferation and differentiation (Fig. 3B). According to the lectin-blot results (Fig. 3C), before PNGase F treatment, MAA staining was slightly lower in C2C12-sh-C12 cells compared with control cells, which is different from the lectin labeling presented in Fig. 3A. This discrepancy could be due to the fact that glycoproteins and glycolipids are detected in whole cells while lectin-blot analyses only detect membrane glycoproteins. For the two cell populations, the labeling was more intense with high molecular weight glycoproteins (> 55 kDa). After PNGase F treatment, MAA staining decreased in a comparable manner for the two cell types. We conclude that the inhibition of *st6gal1* in C2C12 cells induced a strong drop in  $\alpha$ 2,6 sialylation of *N*-glycans borne by high molecular weight glycoproteins (> 55 kDa).

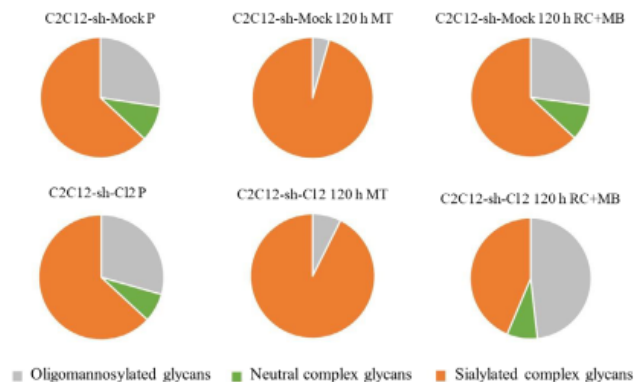
To confirm the type of *N*-glycans on which sialic acids are preferentially linked, C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells were treated with PNGase F in order to remove *N*-glycans. Treated C2C12-sh-Mock cells present a weaker labeling of  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids compared with untreated mock cells (Fig. S2A). This observation confirms that  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids are preferentially linked to *N*-glycans. Difference in  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid staining is less important after PNGase treatment whatever the cell population (Fig. S2B). This result agrees with the lectin-blot analysis of PNGase-treated cells (Fig. 3). This may be due to the presence of large amounts of sialylated glycolipids and of *O*-glycans as well.

#### Analysis of *N*-glycans borne by glycoproteins during myoblastic differentiation

We have performed mass spectrometry analyses of *N*-glycans in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells during proliferation and after 120 h of differentiation. In these experiments, myotubes were isolated following a short trypsinization after which reserve cells and myoblasts were collected. Twenty *N*-glycans were identified according to their molecular mass (Fig. S3) and classified according to their nature (oligomannosides and complex glycans; see Fig. S4). *N*-glycans were extracted from equal numbers C2C12-sh-C12 and C2C12-sh-Mock cells, and their respective amounts were evaluated (Fig. S4). During proliferation, there was no change in the percentage of sialylated glycans in both C2C12-sh-C12 and C2C12-sh-Mock cells (Fig. 4, Table 2).

We have focused on the percentage of each type of sialylated and nonsialylated *N*-glycans among the total *N*-glycans during myogenic differentiation (Fig. 4, Table 2, Fig. S5). The study of the percentages showed that the glycans (*m/z*: 2792, 3037, 3242, 2822, 2778, 3023, 3228) were more present in control than in clone 2 (1.4-fold more in Mock cells in comparison with clone 2; Fig. 4, Table 2); the percentage of the biantennary bisialylated glycan (*m/z*: 2792) in C2C12-sh-Mock myotubes was 1.3 times higher than in C2C12-sh-C12 myotubes.

At 120 h of differentiation, the percentage of sialylated complex *N*-glycans in the reserve cells (a mix of reserve cells and myoblasts) of clone 2 was 1.5 times less than in the reserve cells of the Mock (Fig. 4, Table 2). The most affected *N*-glycans were the tri- and tetrasialylated *N*-glycans (1.58- and 2.19-fold



**Fig. 4.** Distribution of sialylated and/or fucosylated *N*-glycans in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells. Distribution of the sialylated and nonsialylated *N*-glycans compared to the total *N*-glycans in proliferating myoblasts (P), in myotubes (MT), and in a mix of reserve cells (RC) and myoblasts (MB) at 120 h for C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12. Mass spectrometry experiment has been done one time (*n* = 1).

drops, respectively, between clone 2 and mock reserve cells), in contrast to oligomannoses, which increased 1.83-fold (Fig. 4, Table 2).

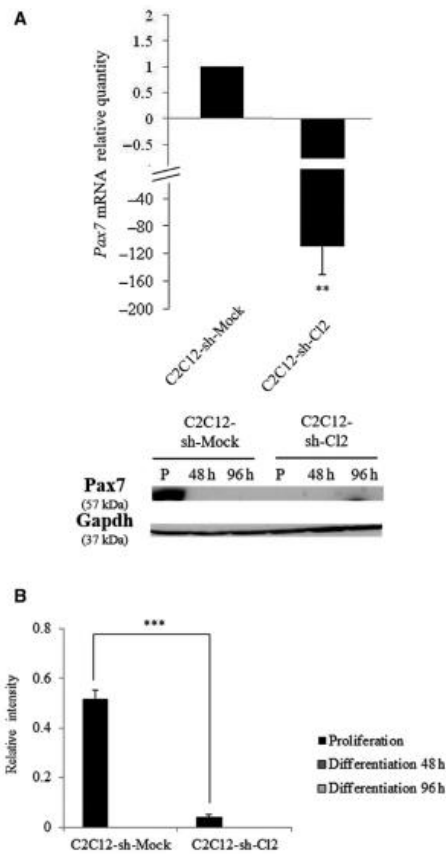
In addition, during this study, we have also compared the distribution of glycans in proliferative and reserve cells in clone 2 and in control cells. Proliferative and differentiated C2C12-sh-Mock cells do not present any significant difference in their respective distribution of glycans (Fig. 4, Table 2) except that abundance of three triantennary structures significantly evolved during cell differentiation, that is:  $m/z$  3604 presented a 1.3-fold drop, while  $m/z$  3023 and 3228 showed a 2.7-fold increase. In contrast, differentiation of clone 2 led to a marked increase of oligomannoses (1.8-fold) and to a decrease of the sialylated glycans (1.4-fold) in the population containing reserve cells than in C2C12-sh-Mock cells whereas for the last they represented about the same percentage of total *N*-glycans (Fig. 4, Table 2).

#### A strong drop in Pax7 expression is observed in st6gal1-knockdown cells and is associated with a drop in the number of reserve cells

During C2C12 differentiation, a population of reserve cells is maintained in an undifferentiated state, due to the expression of *Pax7* [25]. *Pax7* expression level dramatically drops by 130-fold in C2C12-sh-C12 in comparison with C2C12-sh-Mock (Fig. 5A). These results were confirmed by western blot analysis of cells during proliferation and at 48 and 96 h of differentiation (Fig. 5B). Protein Pax7 was virtually absent in *st6gal1*-knockdown cells, either proliferative or differentiated. To determine which cells are actually impacted by this sharp fall in Pax7 expression, a dual staining of Pax7 and MyoD was performed on cells during proliferation (Fig. 6A). About 70% of the C2C12-sh-Mock cells were Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup> (self-renewing cells also called

**Table 2.** Classification of sialylated and/or fucosylated *N*-glycans identified by MS/MS spectrometry. The identified glycans are classified according to their structure (oligomannosylated, neutral complex or sialylated complex glycans) and to their sialylated level (mono-, bi-, tri- or tetra-sialylated). Mass spectrometry experiment has been done one time ( $n = 1$ ). Cells of three independent cultures have been pooled before *N*-glycans extraction and analyses.

	Mass ( $m/z$ )	C2C12-sh-Mock			C2C12-sh-C12			
		Proliferation	Differentiation		Proliferation	Differentiation		
			120 h MT	120 h RC + MB		120 h MT	120 h RC + MB	
Oligomannosylated glycans	1579	9.89	1.50	7.16	7.63	2.41	9.52	
	1783	6.37	1.46	7.53	9.40	3.05	16.31	
	1988	3.83	0.47	3.58	4.39	0.87	6.74	
	2192	3.74	0.55	4.44	4.76	1.09	8.19	
	2395	3.57	0.49	4.47	3.22	0.00	7.46	
	Total	27.40	4.47	27.18	29.41	7.43	48.22	
Neutral complex glycans	2519	3.08	0.00	2.79	3.45	0.00	3.67	
	2693	3.11	0.00	3.54	4.01	0.00	4.48	
	2839	3.40	0.00	3.38	0.00	0.00	0.00	
	Total	9.59	0.00	9.71	7.46	0.00	8.15	
Sialylated complex glycans	Mono-sialylated	2605	4.98	4.11	5.25	4.04	6.45	7.64
		3053	0.00	0.00	1.02	0.00	0.00	1.17
		2778	6.87	11.64	6.26	5.94	11.06	3.72
		2822	3.48	8.48	2.77	3.54	7.66	0.00
		3023	0.00	2.56	1.91	0.00	0.00	0.00
		Total	17.35	30.26	23.04	15.26	28.06	14.42
	Bi-sialylated	2792	13.70	30.91	11.92	13.40	23.52	10.07
		3037	0.00	2.80	0.00	1.71	0.00	0.00
		3242	4.09	8.56	2.98	4.44	5.74	2.08
		2966	2.53	2.06	2.55	2.29	3.50	4.68
		Total	20.31	44.33	17.45	21.84	32.76	16.83
	Tri-sia	3604	20.14	16.79	16.14	21.43	26.13	9.60
	Tetra-sia	3966	5.20	4.15	6.47	4.59	5.62	2.78
Total		63.01	95.53	63.11	63.13	92.57	43.62	



**Fig. 5.** Knockdown of *st6gal1* reduced Pax7 expression. (A) Expression of Pax7 in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 in proliferation. Fold changes are expressed relative to C2C12-sh-Mock cells. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the ratio of  $C_t$  values for C2C12-sh-C12 cells and  $C_t$  values for C2C12-sh-Mock cells and normalized against the expression of *gapdh* transcript. Experiments have been done three times ( $n = 3$ ).  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ . (B) Relative Pax7 amounts determined by western blot using total cell proteins isolated from C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 in proliferation (P) and differentiation at 48 and 96 h. Protein levels were determined in comparison with *gapdh* loading control. Experiments have been done three times ( $n = 3$ ). Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed *t*-test, with a significant level of  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ).

reserve cells), 25% were Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup> (proliferating cells), and 5% were Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup> cells (differentiating cells; Fig. 6B). On the contrary, 75% of the C2C12-sh-C12 cells were found in a differentiated

state (Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>). The weak amount of Pax7<sup>+</sup> cells accounts for the virtual absence of Pax7 signal in the western blot (Fig. 5B).

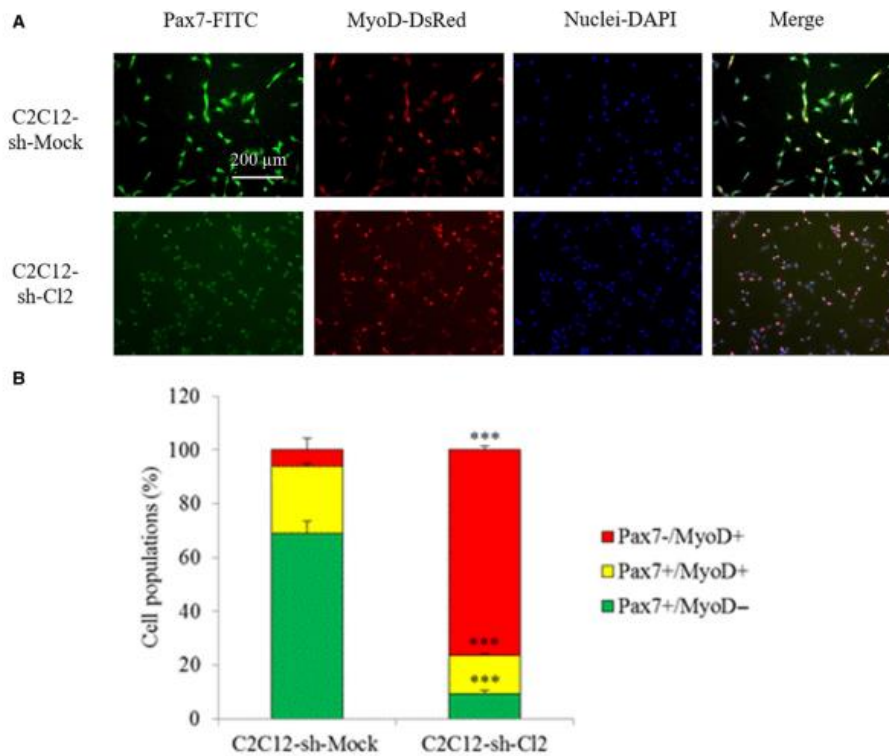
### The loss of $\alpha$ 2,6 sialylation impairs activation of the Notch signaling pathway

The Notch signaling pathway controls the transcription of Pax7 and allows satellite cell renewal [26]. It contributes to the expression of the *Hes* and *Hey* genes, which in turn inhibit *MyoD* expression and thus cell differentiation [27].

To know whether, and to which extent, the Notch signaling pathway is modified in *st6gal1*-knockdown cells, the amount of NICD (the cleaved form of the Notch receptor) was evaluated by western blot analysis on C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells during proliferation (Fig. 7A). We observed a decrease of about 70% of NICD in C2C12-sh-C12 compared with C2C12-sh-Mock. Consequently, the weak activation of this pathway in *st6gal1*-knockdown cells could imply their earlier entry into differentiation. To confirm the decrease in Notch signaling, we studied the expression of two genes under the control of Notch: *Hey1* and *Hes1* encoding myogenic differentiation repressors. *Hes6* is considered here as a control because its expression is independent of the Notch pathway [28]. *Rbpj* is a transcription factor that, after its binding to NICD, activates the transcription of target genes such as *Hes1* and *Hey1* [18]. We have performed a quantitative RT-PCR on C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells in proliferation (Fig. 7B). In C2C12-sh-C12 cells, we observed a decrease in expression of *Hey1* and *Hes1* by 35% and 30%, respectively, and the expression of *Hes6* did not vary. *Rbpj* was also expressed in clone 2. Altogether, these results confirm the decrease in the Notch activation pathway, the decrease in Pax7 expression and the earlier differentiation of *st6gal1*-knockdown clone.

### Discussion

Sialic acids play important roles in the stabilization of macromolecules and membranes, as well as in modulating interactions of the cells with their environment [13]. The roles of sialic acids in development are also documented. Unlike other tissues, the role of sialylation in muscle or during muscle development is currently poorly documented. Nevertheless, Suzuki and coworkers showed that, during myogenesis, the polysialylation of *N*-glycans attached to neural cell adhesion molecule prevents myoblast fusion [29], but nothing has been reported about the  $\alpha$ 2,6 sialylation.



**Fig. 6.** Effect of *st6gal1* knockdown on cell fate. (A) Co-immunostaining of Pax7 (green) and MyoD (red) in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells during proliferation. The exposure times were identical for a same staining between the two cell types (1000 ms for Pax7-FITC and 500 ms for MyoD-DsRed); scale bar: 200  $\mu$ m. (B) Percentages of Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>, Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>, and Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup> cell populations during proliferation. Percentages are the mean of counting on seven fields by condition. Experiments have been done three times ( $n = 3$ ). Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed *t*-test, with a significant level of \*\*\* $P < 0.001$ ).

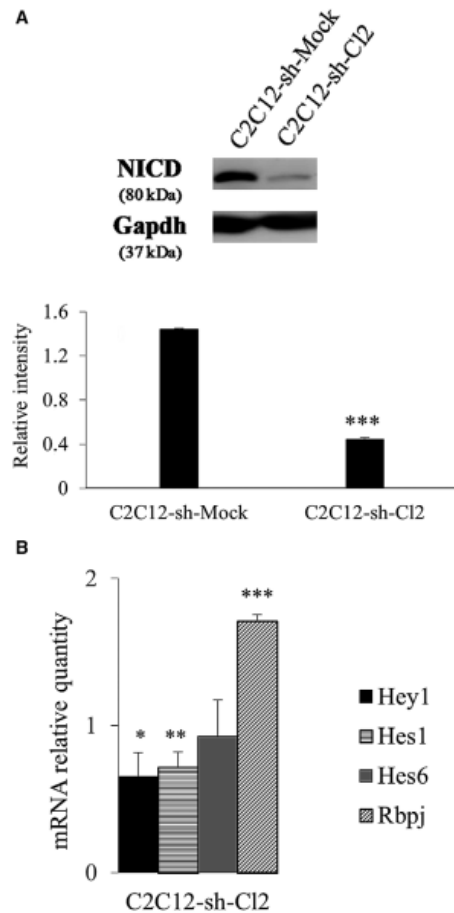
We have reported in previous studies that changes in the expression levels of glycosylation-related genes occurred during myogenic differentiation of C2C12 cells and murine satellite cells [10,11]. Among these genes, we have observed a deregulation of genes implicated in the Notch signaling pathway. In a first time, researches were focused on *Pofut1* and protein *O*-glucosyltransferase 1, which respectively catalyze the *O*-fucosylation and *O*-glucosylation of EGF-like domains, necessary for Notch activation during C2C12 cell proliferation [17,30]. A study about the implication of  $\alpha$ 2,6 sialylation during myoblast differentiation has not been studied yet.

We chose to knockdown *st6gal1* in C2C12 cells since among the two genes encoding for  $\alpha$ 2,6 sialyltransferases, it is the only one to be expressed in C2C12

cells. We have excluded the six *st6galNAc* genes whose products ensure  $\alpha$ 2,6 sialylation on *N*-acetylgalactosamine residues. To get further information about the role of  $\alpha$ 2,6 sialylation in muscle development, we knocked down *st6gal1* in C2C12 cells. We found that the proliferation of *st6gal1*-knockdown cells was slowed down, due to a generation time twice as long as control cells; however, these cells presented an increased fusion index (80% against 60% for control cells at 240 h of differentiation).

To improve our knowledge about the involvement of  $\alpha$ 2,6 sialylation during C2C12 cell differentiation and to determine which glycan structures are modified by the knockdown of *st6gal1*, we have in a first time evaluated the  $\alpha$ 2,3 and  $\alpha$ 2,6 linkages of sialic acids in mock and *st6gal1*-knockdown cells. These observations





were done during proliferation and differentiation conditions in order to appreciate the evolution of sialic acid amounts during myogenesis. The knockdown of *st6gal1* induced a significant decrease in  $\alpha$ 2,6-linked sialic acids borne by *N*-glycans on high molecular weight glycoproteins (> 55 kDa).

Mass spectrometric analyses revealed no modification of the proportions of sialylated *N*-glycans between Mock and clone cells. It suggests that the *st6gal1* knockdown does not modify significantly the proportion of sialylated *N*-glycans. After the myoblast differentiation, the *N*-glycosylation profile of myotubes was completely modified; myotubes presented much more sialylated glycans, while the

**Fig. 7.** The expression of target genes of Notch, *Hey1* and *Hes1*, decreased in *st6gal1*-knockdown cells. (A) Relative amounts of NICD (the active form of Notch which binds to Rbpj in order to transcriptionally activate target genes as *Hes1* and *Hey1*) determined by western blot using total proteins from proliferating C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells. Protein levels were determined in comparison with *gapdh* loading control. This experiment has been performed three times ( $n = 3$ ). (B) Expression of Notch target genes *Hey1* and *Hes1* (encoding transcriptional repressors regulating myogenesis), *Hes6* whose expression is not under the control of Notch signaling (encoding an independent protein of the Notch signaling pathway) and *Rbpj* (encoding a transcription factor) in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells in proliferation. Fold changes are expressed relative to C2C12-sh-Mock cells. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the ratio of  $C_t$  values for C2C12-sh-C12 cells and  $C_t$  values for C2C12-sh-Mock cells and normalized against the expression of *gapdh* transcript. Statistical analyses of gene expression were performed by comparison with the C2C12-sh-Mock (which was set as 1) for three independent experiments ( $n = 3$ ). Means  $\pm$  SEMs are shown (two-tailed *t*-test, with a significant level of \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

oligomannosylated glycans dramatically dropped. The five sialylated and nonfucosylated glycans are less represented in the C2C12-sh-C12 reserve cells compared to those in proliferation. We observed a similar trend for Mock cells, excepted for the tetrasialylated glycan ( $m/z$ : 3966), which increased in the reserve cells compared to the proliferative condition. As their amounts decreased in reserve cells, these sialylated and nonfucosylated structures would not be involved in the maintenance of these cells.

Despite the loss of sialylation, the percentage of fucosylated structures did not change between cell types during proliferation. However, sialylated and bifucosylated glycans ( $m/z$ : 2778, 2822, 3023, 3228) overall slightly decreased by 1.2-fold in myotubes of *st6gal1*-knockdown cells, compared with myotubes of Mock cells.

Biantennary bisialylated ( $m/z$ : 2792), triantennary bisialylated ( $m/z$ : 3242), and biantennary bifucosylated monosialylated ( $m/z$ : 2778, 2822) glycans were systematically found in a larger amount in myotubes in comparison with proliferating cells and reserve cells. These sialylated species could promote the myocyte fusion and the formation of myotubes. In contrast, the fucosylated and nonsialylated glycan ( $m/z$ : 2693) identified in this study might be an inhibitor of myogenic fusion since it has not been found in myotubes of the two cell types whereas it was always present in proliferating and reserve cells.

We have highlighted a drop in proliferative capacity linked to a decrease in  $\alpha$ 2,6 sialylation. To explain this phenomenon, we have analyzed the

transcriptional and protein levels of *Pax7*. *Pax7*<sup>+</sup> cells can be activated to initiate the myogenic differentiation program or stay in a quiescence state as reserve cells [8,9]. We showed that the expression level of *Pax7*, which is required for cell proliferation of C2C12 myoblasts [31], is very low in *st6gal1*-knockdown cells; this could explain the more important fusion index of these cells as also observed by Der Vartanian *et al.* when *Pax7* expression was repressed in C2C12 cells [17].

*Pax7* depends on the Notch pathway, and Notch signaling targets genes that control the behavior of satellite cells [32]. The lower amount of NICD, corresponding to the cleaved form of Notch, observed when  $\alpha 2,6$  sialylation decreased, reflects a downregulation of Notch signaling. Thus, the loss of  $\alpha 2,6$  sialylation induced a decrease in Notch pathway activation, which was confirmed by the decrease in expression of the Notch target genes *Hes1* and *Hey1* in *st6gal1*-knockdown cells. *Hes1* and *Hey1* encode repressors of myogenic differentiation, which inactivate the expression of MRF as MyoD. Notch pathway activation controls the ratio *Pax7*/MyoD in favor of *Pax7*. When  $\alpha 2,6$  sialylation decreases, the weak Notch signaling induces a strong decrease in *Pax7* expression, and so, the differentiation of cells is promoted. We hypothesize that the decrease in sialylation may affect receptors that would be involved in the Notch signaling pathway (or other pathways) that results in reduced expression level of *Pax7*.

In conclusion, we have observed that the *st6gal1*-knockdown promotes C2C12 cell differentiation. This may be due to a decrease in Notch signaling and finally to a decrease in *Pax7* expression. Moreover, the lower expression of *st6gal1* induces a lower proliferation of *st6gal1*-knockdown cells in relation with a poor expression of *Pax7*. Three types of *N*-glycans seem to be required for myogenic differentiation: biantennary bisialylated, triantennary bisialylated, and biantennary monosialylated bifucosylated. The early fusion of *st6gal1*-knockdown cells and its high level explain the drop in self-renewing cells *Pax7*<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>. This study showed the consequences of  $\alpha 2,6$  knockdown on Notch signaling. However, we cannot exclude that other receptors could be impacted by the decrease in  $\alpha 2,6$  sialylation. In conclusion,  $\alpha 2,6$  sialylation (a) seems mandatory for *Pax7* activation and so for cellular proliferation; (b) contributes to keep up the pool of reserve cells; and (c) limits myoblastic fusion.

### Acknowledgements

The authors are indebted to Prof. Vincent Sol and Prof. Michel Guilloton for their help in manuscript

editing. This work was supported by a French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowship to CV and a Limousin Regional Council doctoral fellowship to AB.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

JMP and AM conceived and designed the project. CV, AB, FC, and YG acquired the data. CV, FC, YG, and JMP drafted the manuscript. AM critically revised the manuscript.

### References

- 1 Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K and Nabeshima Y (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* **111**, 769–779.
- 2 Olguin HC and Pisconti A (2012) Making the tempo of myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Med* **16**, 1013–1025.
- 3 Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S and Holtzer H (1990) MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 7988–7992.
- 4 Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB and Miller AD (1991) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5434–5438.
- 5 Parker MH, Seale P and Rudnicki MA (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* **4**, 497–507.
- 6 Zanou N and Gailly P (2013) Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci* **70**, 4117–4130.
- 7 Moncaut N, Rigby PW and Carvajal JJ (2013) Dial M (RF) for myogenesis. *FEBS J* **280**, 3980–3990.
- 8 Relaix F, Montarras D, Zafrán S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A and Buckingham M (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* **172**, 91–102.
- 9 Kuang S, Kuroda K, Le Grand F and Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **125**, 999–1010.
- 10 Janot M, Audfray A, Lorient C, Germot A, Maftah A and Dupuy F (2009) Glycogenome expression dynamics

- during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genom* **10**, 483.
- 11 Grassot V, Da Silva A, Saliba J, Maftah A, Dupuy F and Petit JM (2014) Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis. *BMC Genom* **15**, 621.
  - 12 Varki NM and Varki A (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* **87**, 851–857.
  - 13 Schauer R (2009) Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 507–514.
  - 14 Varki A and Gagneux P (2012) Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann NY Acad Sci* **1253**, 16–36.
  - 15 Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S and Delannoy P (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727–737.
  - 16 Lehoux S, Groux-Degroote S, Cazet A, Dhaenens CM, Maurage CA, Caillet-Boudin ML, Delannoy P and Krzewinski-Recchi MA (2010) Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells. *Glycoconj J* **27**, 99–114.
  - 17 Der Vartanian A, Audfray A, Al Jaam B, Janot M, Legardinier S, Maftah A and Germot A (2015) Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol Cell Biol* **35**, 391–405.
  - 18 Mayeuf A and Relaix F (2011) Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle. *Med Sci* **27**, 521–526.
  - 19 Kopan R, Nye JS and Weintraub H (1994) The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix–loop–helix region of MyoD. *Development* **120**, 2385–2396.
  - 20 Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ and Fernandez A (1998) The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* **142**, 1147–1159.
  - 21 Velica T and Bunce CM (2011) A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Nerve* **44**, 366–370.
  - 22 Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, Triboulet R, Bossis G, Shmueli A, Rodriguez MS et al. (2006) E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* **127**, 775–788.
  - 23 Ciucanu I and Kerek F (1984) Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr A* **284**, 179–185.
  - 24 Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402–408.
  - 25 Olguin HC and Olwin BB (2004) Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* **275**, 375–388.
  - 26 Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C and Kuang S (2012) Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* **32**, 2300–2311.
  - 27 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.
  - 28 Cossins J, Vernon AE, Zhang Y, Philpott A and Jones PH (2002) Hes6 regulates myogenic differentiation. *Development* **129**, 2195–2207.
  - 29 Suzuki M, Angata K, Nakayama J and Fukuda M (2003) Polysialic acid and mucin type-O-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem* **278**, 49459–49468.
  - 30 Pélisse M, Der Vartanian A, Germot A and Maftah A (2018) Protein O-glycosyltransferase 1 expression influences formation of differentiated myotubes in C2C12 cell line. *DNA Cell Biol* **37**, 359–372.
  - 31 Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan JE and Zammit PS (2009) Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS ONE* **4**, e4475.
  - 32 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 stem cell state. *Stem Cells* **30**, 243–252.

### Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Fig. S1.** Validation of the *st6gal1* knockdown phenotype with another clone.

**Fig. S2.** Treatment by PNGase reduced SNA and MAA binding.

**Fig. S3.** MS profiles of sialylated and nonsialylated N-glycans of C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells.

**Fig. S4.** Structures of N-glycans identified by MS/MS spectrometry.

**Fig. S5.** Distribution relative of N-glycans in C2C12-sh-Mock and C2C12-sh-C12 cells.



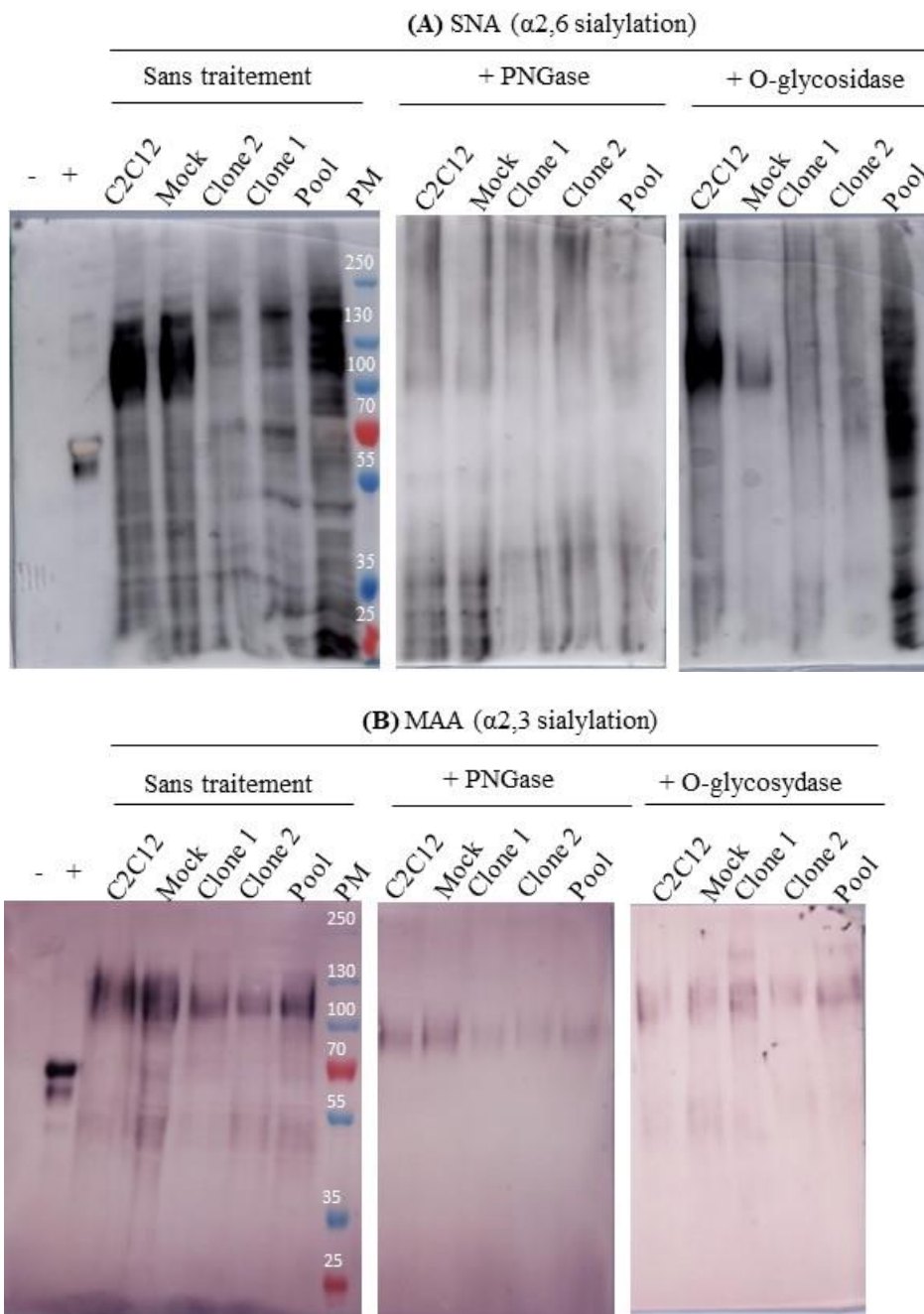
Certains des résultats présentés dans l'article ont été complétés dans le but de confirmer ou d'apporter dans une première approche des informations supplémentaires sur les glycoprotéines porteuses de glycanes modifiés par la baisse de l' $\alpha$ 2,6 sialylation, et également sur les voies de signalisation régulant l'expression de *Pax7*.

Les analyses par spectrométrie de masse ont permis de déterminer quels types de glycanes étaient impactés par la sous expression de *st6gal1*. Nous avons donc cherché par la suite à définir quels « ensembles » de glycoprotéines portent ces glycanes, et ceci grâce à la technique des « lectin-blots » sur protéines membranaires de cellules traitées aux glycosidases.

Nous avons également montré que les cellules du clone *st6gal1* ont une tendance accrue à la différenciation. Afin de renforcer cette constatation, nous avons cherché une protéine caractéristique de la fusion des myocytes qui n'est exprimée que durant ce processus, myomaker, dont nous avons analysé l'expression des transcrits.

L'augmentation de l'indice de fusion des cellules sous exprimant *st6gal1* est due à une diminution de l'activation de la voie de Notch et une diminution de l'expression de *Pax7*. Nous avons cherché à savoir si la voie de Notch était la seule voie de signalisation impliquée dans la régulation de l'expression de *Pax7* et ainsi la seule voie dont la diminution d'activation est liée à l'augmentation de l'indice de fusion des clones *st6gal1*. Nous nous sommes alors intéressés aux voies Pi3K/Akt/mTOR et p38 connues pour intervenir lors de la différenciation cellulaire (**Erbay et al., 2003 ; Zetser et al., 1999**).

A l'inverse, le knockdown de *st6gal1* entraîne une baisse de la capacité proliférative en lien avec la faible expression de *Pax7*. Par conséquent, nous nous sommes interrogés sur l'existence d'une voie impliquée dans la prolifération cellulaire et qui serait moins activée lors de la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation. Notre étude s'est alors portée sur la voie TGF $\beta$ /Smad (**Ono et al., 2011**).



**Figure 41** : Analyse de l' $\alpha 2,6$  (A) et  $\alpha 2,3$  (B) sialylation de glycoprotéines membranaires de cellules traitées ou non à la *N*-glycosidase F et à la *O*-glycosidase.

Lectin-blots sur les protéines membranaires de cellules C2C12, C2C12-sh-Mock et C2C12-sh-*st6gal1* en prolifération. Le contrôle négatif (-) est la carboxypeptidase de *E. coli* et le contrôle positif est la féuine bovine (+). Les poids moléculaires (PM) sont exprimés en kDa.

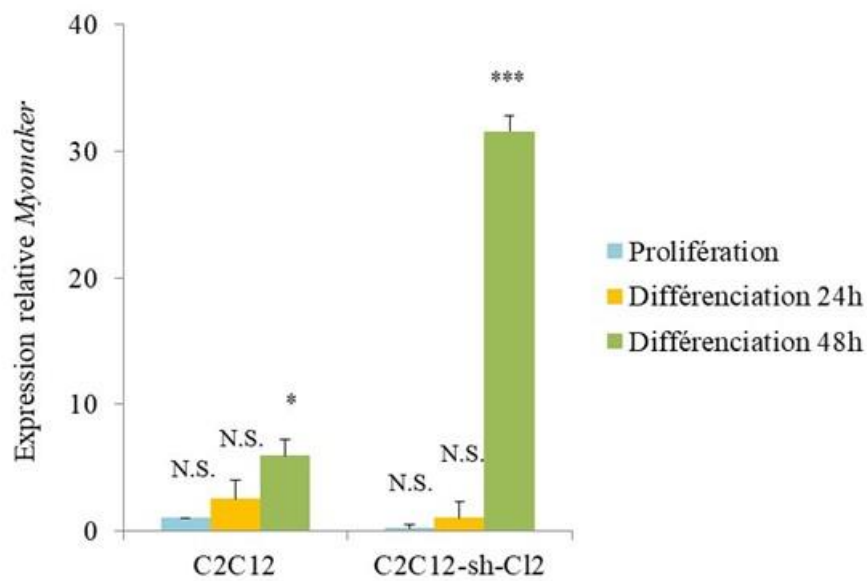
## Résultats complémentaires

---

### I- Analyse globale des glycoprotéines membranaires traitées à la *N*-glycosidase F et à la *O*-glycosidase

Pour identifier de manière globale les glycoprotéines membranaires impactées par la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation, nous avons entrepris des traitements enzymatiques des cellules à la *N*-glycosidase F et à la *O*-glycosidase. La *N*-glycosidase F ou PNGase F clive les glycanes *N*-liés aux glycoprotéines en coupant la liaison amide entre la *N*-acétylglucosamine la plus interne d'un oligosaccharide et un résidu asparagine d'une glycoprotéine (**Plummer *et al.*, 1984**). La *O*-glycosidase, aussi connue sous le nom d'endo- $\alpha$ -*N*-acétylgalactosaminidase, catalyse la libération du disaccharide Gal $\beta$ 1,3GalNAc ou GlcNAc $\beta$ 1,3GalNAc fixé sur un résidu sérine ou thréonine d'une glycoprotéine (**Umemoto *et al.*, 1978**). Les cellules C2C12 et mock ainsi que les deux clones ont été traitées à la *N*-glycosidase F ou à la *O*-glycosidase. Après traitement, les protéines sont analysées par lectin-blots pour leur niveau d' $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,6 sialylation.

Nous observons une diminution du marquage SNA ( $\alpha$ 2,6 sialylation) pour les clones par rapport aux cellules mock (**Figure 41.A**). Le marquage SNA est plus intense dans les cellules issues du pool que dans les clones en raison d'un niveau d'expression de *st6gal1* un peu plus important dans les cellules du pool. On constate un plus fort marquage pour les glycoprotéines de masse supérieure à 55 kDa. Après traitement à la PNGase F (**Figure 41.A**), l'intensité du marquage diminue pour l'ensemble des glycoprotéines, mais principalement pour celles de poids moléculaire élevé qui seraient porteuses de *N*-glycanes  $\alpha$ 2,6 sialylés. Lorsque les cellules des clones sont traitées à la *O*-glycosidase (**Figure 41.A**), le marquage SNA, associé à la présence de *O*-glycanes  $\alpha$ 2,6 sialylés, disparaît principalement pour les protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 100 kDa). Le pool montre à nouveau un marquage plus prononcé que les cellules KD pour *st6gal1*. Nous avons par la suite étudié l' $\alpha$ 2,3 sialylation dans les cellules traitées avec ces mêmes enzymes. Avant traitement avec les enzymes (**Figure 41.B**), le marquage MAA est légèrement diminué dans les clones par rapport aux cellules mock, ce qui diffère du marquage MAA présenté dans l'article où une augmentation de 10% a été constatée dans les cellules du clone 2 en prolifération. Cette différence peut provenir des extractions protéiques réalisées, l'une est une extraction de



**Figure 42** : Expression de *myomaker* dans les cellules C2C12 et les cellules sous-exprimant le gène *st6gal1*.

Les valeurs correspondent à des quantités relatives d'ARNm, déterminées par rapport aux cellules C2C12-sh-Mock. Les résultats ont été normalisés avec le contrôle endogène *gapdh*. Les mesures ont été réalisées deux fois et la moyenne des deux valeurs pour chaque échantillon a été calculée. Les valeurs obtenues pour les cellules mock ont été utilisées comme référence pour réaliser les t-tests de Student. \*,  $P < 0,05$  ; \*\*,  $P < 0,01$  ; \*\*\*,  $P < 0,001$  ; N.S pour non significatif.



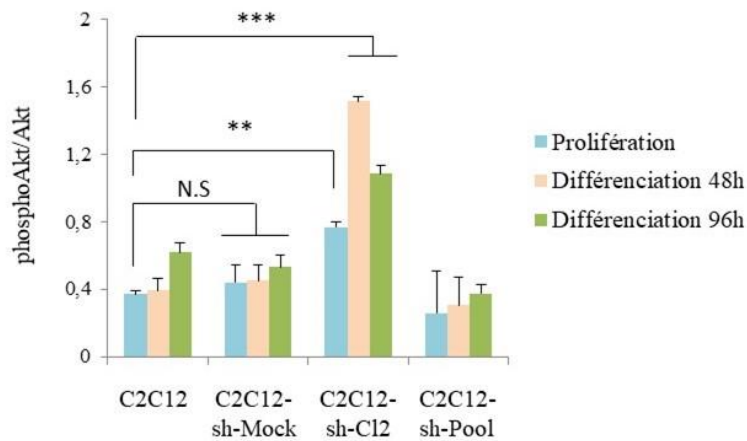
protéines totales et l'autre permet d'extraire seulement les protéines membranaires. Pour l'ensemble des sous-populations cellulaires, le marquage MAA est plus intense pour les glycoprotéines de poids moléculaire supérieur à 100 kDa. Après traitement à la PNGase (**Figure 41.B**), le marquage MAA diminue pour les glycoprotéines porteuses de *N*-glycanes  $\alpha$ 2,3 sialylés de façon similaire pour les cinq types cellulaires, ce qui est cohérent avec le fait que la sous-expression de *st6gal1* impacte seulement l' $\alpha$ 2,6 sialylation. Lorsque les cellules sont traitées avec la *O*-glycosidase (**Figure 41.B**), l'intensité du marquage MAA diminue pour les glycoprotéines supérieures à 100 kDa par rapport à la condition contrôle (sans traitement), ce qui semble logique puisqu'elles seules sont détectées. Elles seraient donc porteuses de *O*-glycanes  $\alpha$ 2,3 sialylés.

L'inactivation de *st6gal1* entraîne donc au niveau des *N*-glycanes une perte de l' $\alpha$ 2,6 sialylation des glycanes portés par les glycoprotéines de haut poids moléculaire (supérieur à 55 kDa) et une légère perte de l' $\alpha$ 2,3 sialylation des protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 100 kDa). Concernant les *O*-glycanes, la sous-expression du gène codant ST6Gal I engendre une perte de l' $\alpha$ 2,6 sialylation et un gain d' $\alpha$ 2,3 sialylation au niveau des glycoprotéines de haut poids moléculaire (supérieur à 100 kDa).

## II- Evolution de l'expression de *myomaker*, facteur impliqué dans la fusion myogénique

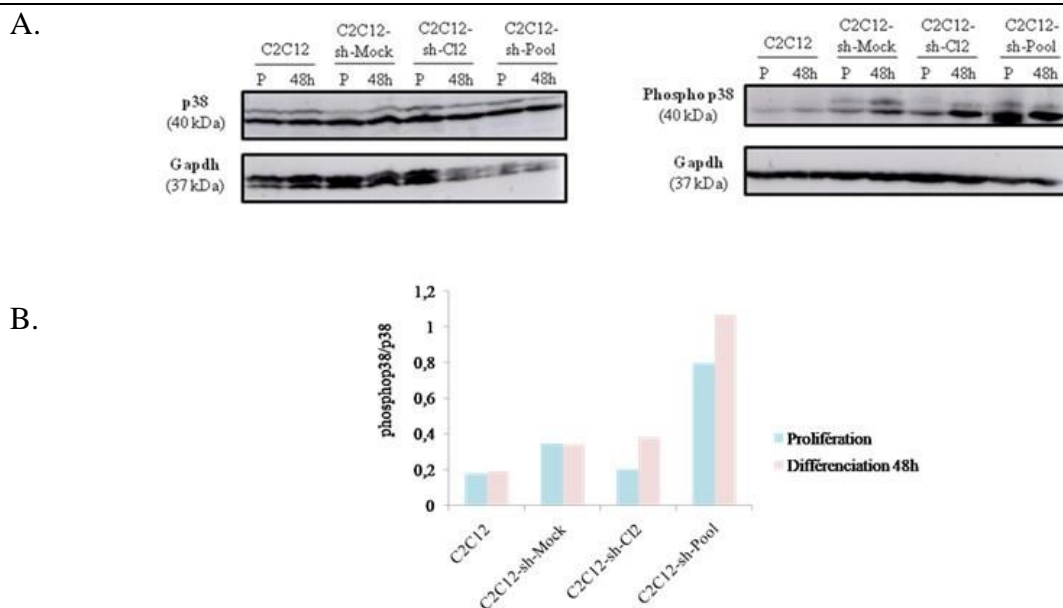
Nous avons montré précédemment que les cellules sous exprimant *st6gal1* présentent un indice de fusion plus important puisqu'à 96 heures de différenciation, la moitié de ces cellules sont différenciées tandis que seulement 38 % des cellules mock le sont. C'est pourquoi, nous avons cherché à étudier l'expression du gène *myomaker*, qui code une protéine transmembranaire, spécifique du muscle et qui intervient dans la fusion des myocytes (**Millay et al., 2013**).

Nous avons analysé les niveaux d'expression de *myomaker* dans les cellules C2C12 et dans les cellules C2C12-sh-C12 en prolifération ainsi qu'en différenciation à 24 et 48 heures par RT-PCR quantitative (**Figure 42**). Lorsque les cellules sont en prolifération, *myomaker* n'est quasiment pas exprimé quel que soit le type cellulaire. En revanche, à 48 heures de différenciation, les cellules du clone 2 montrent une expression cinq fois plus importante de *myomaker* par rapport aux cellules C2C12. Cette augmentation peut être corrélée avec l'indice de fusion important des cellules sous exprimant *st6gal1*. En effet, ces cellules possèdent un nombre plus important de noyaux par myotubes puisqu' à 240 heures de différenciation, la



**Figure 43 : Activation de Akt dans les C2C12 et C2C12-sh-*st6gal1* en prolifération et en différenciation.**

Quantification relative pAkt/Akt par rapport à gapdh dans les cellules C2C12, C2C12-sh-Mock, C2C12-sh-C12 et C2C12-sh-Pool à 48 et 96 de différenciation. Les histogrammes représentent le ratio phosphoAkt/Akt. La lignée C2C12 en prolifération a été utilisée pour réaliser les t-tests de Student. \*, P<0,05 ; \*\*, P<0,01 ; \*\*\*, P<0,001 ; N.S pour non significatif.



**Figure 44 : Activation de p38 dans les C2C12 et C2C12-sh-*st6gal1* en prolifération et en différenciation.**

(A) Analyse par western blot de l'expression de p38 et phosphop38 dans les cellules C2C12, C2C12-sh-Mock, C2C12-sh-C12 et C2C12-sh-Pool en prolifération et à 48 heures de différenciation. La gapdh est utilisée comme protéine de référence. Les tailles attendues des différentes protéines sont indiquées entre parenthèses. (B) Quantification relative pp38/p38 par rapport à gapdh. Les histogrammes représentent les ratios phosphop38/p38. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois d'où l'absence d'écart-type.

proportion de myotubes du clone 2 présentant plus de dix noyaux est supérieure à celle des cellules contrôles (**Thèse A. Bouchatal**).

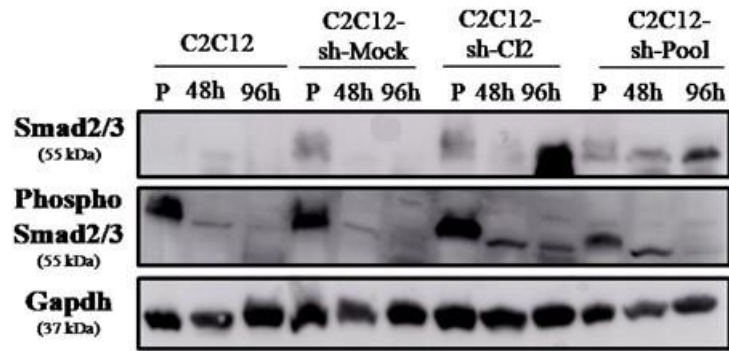
### III- Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de *Pax7*

Un certain nombre de voies de signalisation ont été montrées comme étant impliquées dans la régulation de la différenciation et de la fusion myogénique. Parmi celles-ci, la voie PI3K/Akt/mTOR est connue pour être activée 48 heures après le début de la différenciation (**Tureckova et al., 2001**). Pour étudier l'implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la myogenèse, nous avons analysé l'activation de Akt lors de la différenciation (**Figure 43**). Pour les cellules du clone 2 qui sous-expriment *st6gall*, le rapport phosphoAkt/Akt en prolifération est doublé par rapport aux cellules mock. A 48 et 96 heures de différenciation, il est multiplié par 4 et par 1,7 par rapport aux cellules mock à ces mêmes temps de différenciation. La voie Akt semble donc plus fortement activée lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation diminue. Cette activation pourrait être en relation avec la capacité des cellules du clone à se différencier plus rapidement.

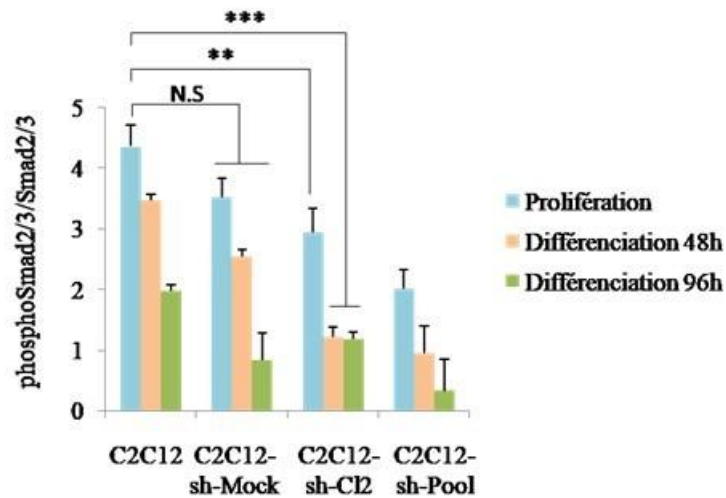
La voie p38-MAPK agit elle aussi lors de la différenciation via l'activation du facteur de transcription MEF2C qui lui-même active l'expression de MyoD (**Zetser et al., 1999**). Les résultats rapportés ici méritent d'être confirmés puisque cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et la différenciation n'a été menée que jusque 48 heures. L'activation de p38 est augmentée d'environ 50% pour les cellules *st6gall*<sup>-</sup> par rapport à celle des cellules C2C12 à 48 heures de différenciation (**Figure 44**). La voie p38-MAPK serait activée de manière accrue lors de la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation, ce qui favoriserait la différenciation de ces cellules.

A l'inverse, le TGF $\beta$  est un facteur répresseur de la myogenèse via la phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 qui, combinées à certains facteurs de transcription, régulent l'expression génique des MRF et notamment celle de MyoD (**Liu et al., 2001**). Concernant la voie des Smads (**Figure 45**), nous constatons que l'activation de Smad2/3 diminue de 30% pour le clone 2 en prolifération par rapport à celle observée dans les cellules mock. En différenciation à 48 et 96 heures dans les cellules *st6gall*<sup>-</sup>, la diminution de l'activation de Smad2/3 est encore plus prononcée puisque les ratios phosphoSmad2/3/Smad2/3 diminuent de 65% et 41% (par rapport aux cellules mock) aux deux temps de différenciation étudiés ici. Par conséquent, dans les cellules sous-exprimant *st6gall*, cette voie est moins activée ce qui pourrait expliquer leur prolifération plus lente.

A.



B.



**Figure 45** : Activation de Smad2/3 dans les C2C12 et C2C12-sh-*st6gall* en prolifération et en différenciation.

(A) Analyse par western blot de l'expression de Smad2/3 et phosphoSmad2/3 dans les cellules C2C12, C2C12-sh-Mock, C2C12-sh-C12 et C2C12-sh-Pool en prolifération et à 48 et 96 heures de différenciation. La gapdh est utilisée comme protéine de référence. Les tailles attendues des différentes protéines sont indiquées entre parenthèses. (B) Quantification relative pSmad2/3/Smad2/3 par rapport à gapdh. Les histogrammes représentent les ratios phosphoSmad2/3/Smad2/3. La lignée C2C12 en prolifération a été utilisée pour réaliser les t-tests de Student. \*, P<0,05 ; \*\*, P<0,01 ; \*\*\*, P<0,001 ; N.S pour non significatif.

La différenciation plus importante des cellules *st6gall<sup>-</sup>* est donc probablement favorisée par une activation accrue de la voie Akt et probablement de la voie p38. Au contraire, la diminution de la capacité proliférative des cellules sous exprimant *st6gall* s'expliquerait par une baisse de l'activation de la voie Smad 2/3.



# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---





## Discussion

---

La myogenèse est un processus multi-étapes caractérisé par l'expression des MRF et d'autres facteurs de transcription tels que ceux de la famille Pax et Six. Leur chronologie d'expression et leurs interactions avec d'autres protéines attestent de la complexité du phénomène *in vivo*. Pour étudier ce processus *in vitro* et s'affranchir de certaines contraintes liées au microenvironnement cellulaire (cellules voisines non musculaires, influence de la matrice extracellulaire, etc, ...), la lignée myoblastique murine C2C12 constitue un modèle très pertinent. En effet, ces cellules peuvent, sous des conditions de culture appropriées, mimer les principales étapes de la myogenèse, à savoir la prolifération cellulaire, la différenciation myoblastique et la fusion des myocytes pour former les myotubes.

La fusion des myoblastes en particulier est liée à des systèmes de reconnaissance cellule-cellule. Parmi ceux-ci, les *N* et *O*-glycosylations des protéines de surface sont essentielles. L'équipe a analysé une partie de l'expression du glycogénome, à savoir des facteurs de transcription myogéniques, des facteurs de croissance fibroblastiques embryonnaires, des cadhérines et des immunoglobulines associées aux cadhérines, et ses modifications lors de la différenciation des myoblastes C2C12 (**Janot et al., 2009**). Cette étude, bien que fondatrice, ne révèle pas avec précision le type de structures glycaniques de surface modifiées, hormis des réarrangements de la structure des glycosphingolipides et de possibles modifications de la sialylation et de la fucosylation des glycanes des glycoprotéines et glycolipides. Amel Bouchatal lors de son doctorat s'est concentrée sur le niveau de sialylation des glycoconjugués de surface durant la différenciation myoblastique des cellules de la lignée C2C12. Une baisse significative de la sialylation a été constatée et entre autres de l' $\alpha$ 2,6 sialylation. De plus, les neuraminidases Neu1, Neu2 et Neu3 voient leur expression augmentée au cours de la différenciation (**Thèse de doctorat A. Bouchatal**). Les sialyltransférases ST8Sia, bien que modifiées lors de la différenciation myogénique et ayant comme action potentielle de masquer les acides sialiques  $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,6 liés n'ont pas été analysées pour un souci de clarté des résultats.

Partant de ces postulats, nous avons décidé de nous concentrer sur l' $\alpha$ 2,6 sialylation effectuée par l'enzyme ST6Gal I, seule  $\alpha$ 2,6 sialyltransférase présente dans le muscle squelettique (**Takashima et al., 2002**) et dans la lignée cellulaire C2C12. C'est pourquoi des cellules clonales sous-exprimant le gène codant ST6Gal I ont été créées.



Ces clones présentent un retard de prolifération et un doublement du temps de génération. Durant les 72 premières heures de la cinétique de différenciation, les cellules des clones ne montrent pas un indice de différenciation plus important que les cellules non transfectées. C'est à partir de 96 heures de différenciation que cet indice devient plus important. Cette caractéristique des clones *st6gal1* rejoint celle des progéniteurs hépatiques. Ainsi, la différenciation *in vitro* des progéniteurs hépatiques en hépatocytes est possible grâce à une régulation négative des sialyltransférases ST8Sia. Les ST8Sia II et ST8Sia IV réalisent une polysialylation en  $\alpha 2,8$  sur les NCAM, ce qui diminue leurs interactions avec les cellules voisines ou la matrice et favorise leur migration. En revanche, la différenciation des progéniteurs hépatiques est favorisée grâce aux clivages des acides sialiques liés en  $\alpha 2,8$  sur les NCAM par l'endosialidase (EndoN) (Tsuchiya *et al.*, 2014). Cette diminution de sialylation est également observée après la différenciation des monocytes en macrophages. La quantité d'acides sialiques liés en  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  diminue après cette différenciation. Parallèlement, le taux d'acides sialiques libres dans le milieu de culture et l'activité de la sialidase NEU1 sont augmentés (Wang *et al.*, 2016). Notre équipe a récemment montré que durant la différenciation des cellules satellites musculaires en préadipocytes, les gènes codant les sialylstransférases ST3Gal IV, ST3Gal V et ST6GalNAc III sont régulés de manière négative (Grassot *et al.*, 2017). Cette diminution globale de la sialylation observée lors de la différenciation myogénique est en accord avec celle relatée dans d'autres processus de différenciation.

Les acides sialiques  $\alpha 2,6$  liés identifiés par ces analyses MALDI-TOF-MS et fixés sur le motif « Gal $\beta$ 1,4GlcNAc » respectent la spécificité structurale du substrat de la ST6Gal I. La quantité de glycanes sialylés diminue de manière globale dans les cellules sous exprimant *st6gal1* en prolifération et en différenciation (comparée au contrôle). Ceci est en partie dû au knockdown du gène *st6gal1*. En prolifération, quel que soit le type cellulaire, les *N*-glycanes sialylés les plus nombreux sont les bi, tri et tétrasialylés. En différenciation, les glycanes les plus impactés par la baisse de l' $\alpha 2,6$  sialylation sont sialylés et bi-fucosylés. Concernant les cellules de réserve, certains *N*-glycanes fucosylés sont nécessaires au maintien de ces cellules. En effet, la quantité de ces *N*-glycanes s'effondre dans les cellules de réserve du clone, ce qui pourrait expliquer leur entrée en différenciation plus précoce. Notre équipe a récemment prouvé qu'un knockdown du gène codant la *O*-fucosyltransférase 1 dans les cellules C2C12 engendre une diminution du nombre de cellules de réserve et une différenciation myogénique plus précoce (Der Vartanian *et al.*, 2015). Ces analyses de spectrométrie de masse ont



finaleme nt permis d'identifier des *N*-glycanes susceptibles de promouvoir la fusion des myocytes (*N*-glycanes bi-antennés bi-sialylés, tri-antennés bi-sialylés et bi-antennés bi-fucosylés mono-sialylés) et d'autres, au contraire, qui l'inhiberaient (*N*-glycanes fucosylés et non-sialylés).

La diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation des cellules sous exprimant *st6gal1* s'accompagne d'une baisse de leur capacité proliférative. Celle-ci serait due à une très faible expression de *Pax7*, marqueur des cellules progénitrices adultes et impliqué dans la détermination myogénique précoce et la prolifération. Le processus de différenciation est régulé par une balance entre *Pax7* et *MyoD* : une diminution de l'expression de *Pax7* associée à l'augmentation de celle de *MyoD* induit l'entrée en différenciation (Olguin et Pisconti, 2012). Nous pouvons donc supposer que la diminution d'expression de *Pax7* constatée dans les cellules *st6gal1* entraînerait une plus forte expression de *MyoD* expliquant ainsi l'indice de fusion plus important pour ces dernières cellules. En effet, notre équipe a montré que l'expression de *MyoD* augmente à deux reprises au cours de la différenciation, à 48 et 164 heures, correspondant aux deux phases d'initiation des fusions primaires et secondaires (Doct oralat A. Bouchatal).

*Pax7* est régulé par un certain nombre de voies de signalisation. Parmi celles-ci, la voie de Notch est la plus essentielle puisque le récepteur Notch activé induit la transcription de *Pax7* et permet le renouvellement des cellules satellites lors de la myogénèse post-natale. De la même façon, Notch induit l'expression de gènes cibles *Hes* et *Hey* qui à leur tour inhiberont l'expression des MRF et empêcheront la différenciation terminale (Kuroda et al., 1999). Nous avons d'abord évalué le clivage du récepteur Notch en étudiant sa partie active, le NICD, dans les clones en prolifération. La quantité de NICD, liée à l'activation de Notch, diminue de 30% dans les cellules du clone comparée aux cellules du contrôle. Pour confirmer la diminution de l'activation de la voie de Notch, les quantités relatives de transcrits de ses gènes cibles *Hey1* et *Hes1* ont été déterminées. L'expression de ces deux gènes diminue également lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation est inhibée. Cette baisse de l'activation de la voie de Notch explique en partie la baisse de la capacité proliférative des clones. Il a été démontré que la protéine Lkb1 (Liver kinase b ou kinase hépatique b) ou STK11 (Sérine/Thréonine Kinase 11) active la voie de Notch, qui elle-même permet d'augmenter l'expression de *Pax7* et ainsi favoriser l'auto-renouvellement des cellules satellites et la prolifération des myoblastes tout en inhibant la différenciation (Shan et al., 2016). Il serait donc intéressant d'analyser le niveau d'expression et l'activation de cette kinase dans les cellules sous-exprimant *st6gal1*.

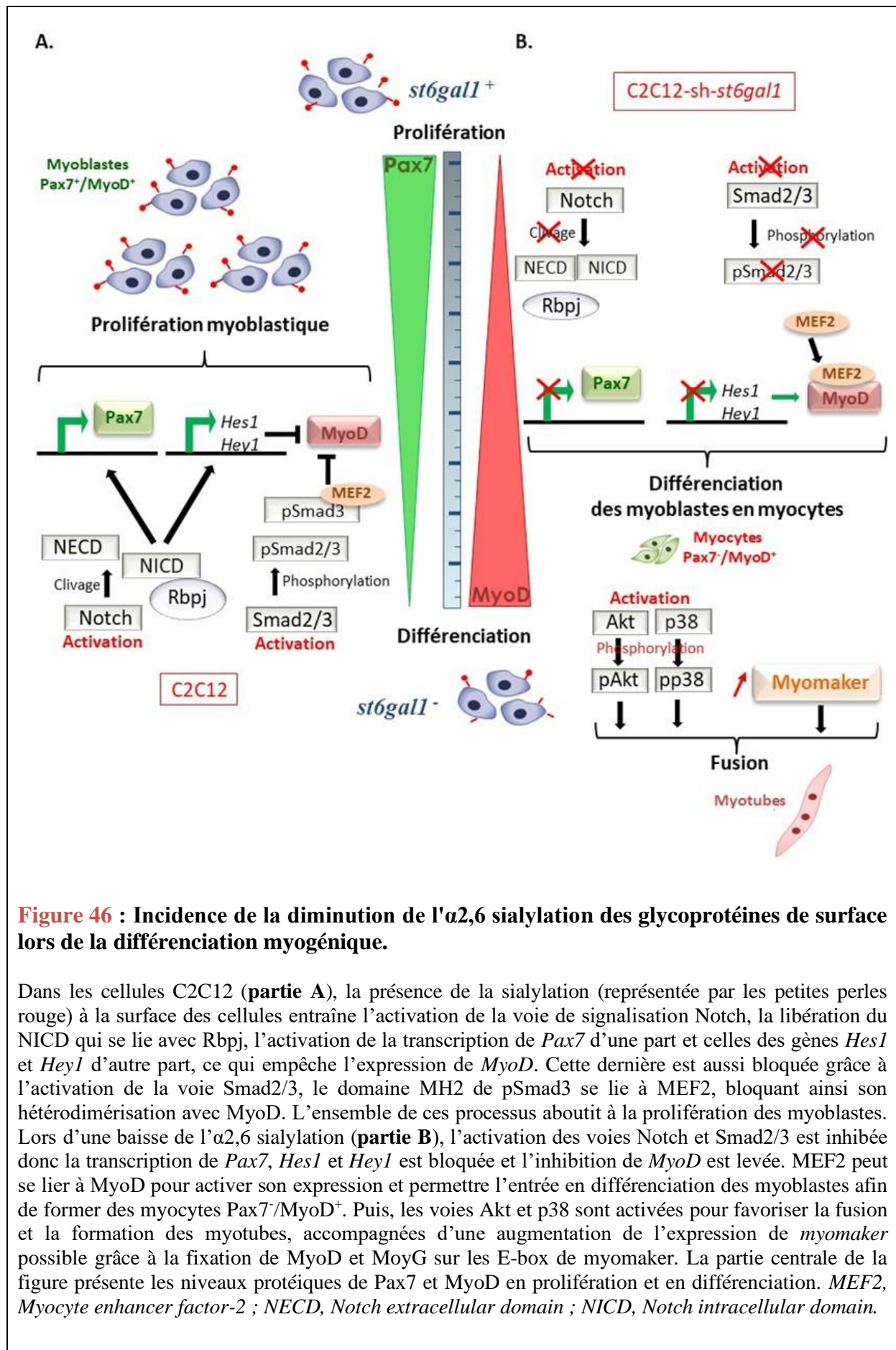


Une autre voie de signalisation a été identifiée comme étant impliquée dans la stimulation de la prolifération cellulaire, il s'agit de la voie TGF $\beta$ /Smad2/3. La diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation entraîne une diminution de l'activation de la voie des Smads, pouvant ainsi expliquer la prolifération moins intense des clones.

A l'inverse, la voie PI3K/Akt/mTOR joue un rôle pendant la différenciation myogénique, sans pour autant réguler directement l'expression de *Pax7*. Nous nous sommes concentrés sur Akt et son activation à 48 et 96 heures de différenciation. Akt est plus fortement activée lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation diminue. Cette activation peut être mise en relation avec la fusion plus importante des clones. Des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K ont été utilisés afin d'évaluer les rôles d'Akt et de mTOR dans la différenciation myoblastique. La PI3K permet l'activation de la transcription de *MyoG* via mTOR et Akt2. (**Sumitani et al., 2002**).

Cette perte de sialylation a aussi une conséquence majeure sur les cellules de réserve. Nous assistons en effet à une diminution du nombre de cellules Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>, cellules satellites en quiescence, et au contraire à une augmentation du nombre de cellules Pax7<sup>-</sup>/MyoD<sup>+</sup>, cellules différenciées, ce qui explique l'indice de fusion plus important des cellules *st6gal1*. Autrement dit, la proportion de cellules qui s'engagent en différenciation est supérieure à celle des cellules de réserve. C'est pourquoi, la quantité de transcrits de *myomaker* associé à la fusion est nettement plus importante lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation diminue. Son maximum d'expression a lieu au troisième jour de la différenciation des cellules C2C12 (**Millay et al., 2013**). Nous constatons dès 48 heures de différenciation sa très forte expression dans les cellules sous exprimant *st6gal1*.

La régulation de *Pax7* est extrêmement complexe puisque ce facteur de transcription intervient dans l'activation des progéniteurs musculaires vers un lignage musculaire tout en empêchant la différenciation (**Olguin et Pisconti, 2012**). Le mécanisme reliant les variations de l' $\alpha$ 2,6 sialylation et l'expression de *Pax7* demeure inconnu à ce jour. Néanmoins, l'implication de la sialylation dans la régulation de l'expression de *Pax7* et donc dans le développement musculaire a déjà été démontrée par une équipe israélienne. Cette dernière a réalisé un KO du gène codant l'enzyme GNE, responsable de la réalisation de deux étapes clés de biosynthèse des acides sialiques. Les souris déficientes pour le gène *Gne* meurent durant le développement embryonnaire à 8,5 jours. L'équipe a comparé *in vitro* des cellules souches embryonnaires de souris sauvages et de souris KO pour le gène *Gne*. De très rares cellules musculaires squelettiques sont identifiées dans les cultures sous-exprimant *Gne*.



**Figure 46 : Incidence de la diminution de l'α2,6 sialylation des glycoprotéines de surface lors de la différenciation myogénique.**

Dans les cellules C2C12 (**partie A**), la présence de la sialylation (représentée par les petites perles rouges) à la surface des cellules entraîne l'activation de la voie de signalisation Notch, la libération du NICD qui se lie avec Rbpj, l'activation de la transcription de *Pax7* d'une part et celles des gènes *Hes1* et *Hey1* d'autre part, ce qui empêche l'expression de *MyoD*. Cette dernière est aussi bloquée grâce à l'activation de la voie Smad2/3, le domaine MH2 de pSmad3 se lie à MEF2, bloquant ainsi son hétérodimérisation avec *MyoD*. L'ensemble de ces processus aboutit à la prolifération des myoblastes. Lors d'une baisse de l'α2,6 sialylation (**partie B**), l'activation des voies Notch et Smad2/3 est inhibée donc la transcription de *Pax7*, *Hes1* et *Hey1* est bloquée et l'inhibition de *MyoD* est levée. MEF2 peut se lier à *MyoD* pour activer son expression et permettre l'entrée en différenciation des myoblastes afin de former des myocytes Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>+</sup>. Puis, les voies Akt et p38 sont activées pour favoriser la fusion et la formation des myotubes, accompagnées d'une augmentation de l'expression de *myomaker* possible grâce à la fixation de *MyoD* et *MoyG* sur les E-box de *myomaker*. La partie centrale de la figure présente les niveaux protéiques de *Pax7* et *MyoD* en prolifération et en différenciation. MEF2, *Myocyte enhancer factor-2* ; NECD, *Notch extracellular domain* ; NICD, *Notch intracellular domain*.



Cette observation a été confortée par l'analyse de l'expression des transcrits de *Pax7* qui sont absents des cellules *Gne*<sup>-</sup>. L'enzyme GNE et d'une manière plus large la sialylation des glycoprotéines membranaires semble être impliquée dans la régulation de l'expression de *Pax7* et par conséquent dans la différenciation myogénique (Milman Krentsis *et al.*, 2011).

Mon travail de doctorat apporte un complément d'information à cette étude, à savoir l'implication de l' $\alpha$ 2,6 sialylation dans le développement musculaire.

En résumé, l' $\alpha$ 2,6 sialylation : (i) serait impliquée dans l'activation de l'expression de *Pax7* et la prolifération ; (ii) contribuerait au maintien des cellules de réserve via l'activation de la voie Notch ; (iii) sa diminution induit une fusion myoblastique plus importante (**Figure 46**). Ce travail a donc permis de compléter les connaissances acquises sur le rôle assuré par l' $\alpha$ 2,6 sialylation lors de la différenciation myogénique, mais surtout d'initier l'étude des glycoprotéines membranaires sialylées impliquées durant les différentes phases du processus myogénique.



## Perspectives

---

Pour achever cette étude, il faut encore identifier avec précision les récepteurs sialylés impliqués dans la fusion myoblastique. Pour ce faire, des électrophorèses en deux dimensions des protéines de cellules contrôle et de cellules sous exprimant *st6gal1* en prolifération et en différenciation permettraient de séparer les protéines selon leur charge électrique et leur poids moléculaire puis de comparer les gels pour déterminer les protéines d'intérêt. Ces dernières sont sélectionnées par leur différence de charge électrique. Ces protéines sont récupérées pour être analysées en spectrométrie de masse. L'immunoprécipitation peut aussi être utilisée pour reconnaître les protéines  $\alpha$ 2,6 sialylées, cependant, le fait qu'il s'agisse de protéines membranaires implique des difficultés de mise au point du protocole telles qu'une quantité suffisante de protéines.

Nous pourrions également quantifier les niveaux d'expression de toutes les sialyltransférases dans les cellules C2C12 afin de déterminer quelle(s) enzyme(s) est (sont) susceptible(s) d'impacter sur les étapes de prolifération et de différenciation myogénique.

Dans la perspective d'une poursuite de cette étude, il serait intéressant de restaurer l'expression de *Pax7* dans les cellules clonales *st6gal1*<sup>-</sup> au moyen d'un vecteur d'expression ayant intégré la séquence codante de *Pax7*. L'expression de ST6Gal I pourrait être complètement déléetée grâce à l'utilisation de miRNA ciblant spécifiquement le gène *st6gal1* tels que les miR 492, 335-5p ou 21-5p. Le niveau d' $\alpha$ 2,3 sialylation pourrait être alors exacerbé dans le but de « compenser » la perte d' $\alpha$ 2,6 sialylation. Nous pourrions aussi créer des clones qui cette fois sur-expriment la ST6Gal I, en faire l'étude phénotypique. Ces clones présenteraient certainement un indice de fusion ralenti et une prolifération accélérée. Les structures glycaniques impactées par cette hausse d' $\alpha$ 2,6 sialylation devraient être analysées pour confirmer les glycanes touchés lorsque *st6gal1* est sous-exprimé. Enfin, l'étude des voies de signalisation permettraient d'observer une augmentation de l'activation de la voie de Notch et de celle de Pax7.

Nous pourrions envisager d'étudier la sous-expression de la ST6Gal I dans un modèle murin. La taille des fibres musculaires et la proportion de cellules de réserve, probablement peu nombreuses, pourraient alors être analysées dans les principaux muscles squelettiques des souris *st6gal1*<sup>-/-</sup>. La cicatrisation du muscle à la suite d'une blessure est aussi une piste



d'étude puisque ces souris sont susceptibles de présenter une cicatrisation moins importante ou moins rapide due à une quasi-absence des cellules de réserve.

Enfin d'autres pistes impliquant des acteurs dont les rôles ont en partie été démontrés dans cette étude, peuvent être envisagées. D'après les bases de données protéiques, le récepteur Notch 1 possède six sites potentiels de *N*-glycosylation répartis sur cinq répétitions EGF-like. Une équipe japonaise a étudié le possible rôle des glycanes dans la régulation de voies de signalisation lors de la différenciation de cellules souches neurales en comparant le profil de *N*-glycosylation de ces cellules avant et après différenciation. Il s'est avéré que les *N*-glycanes porteurs de motifs sialyl-Lewis x, donc sialylés en  $\alpha 2,3$ , sont spécifiquement présents sur les cellules neurales non différenciées. Ces *N*-glycanes  $\alpha 2,3$  sialylés sont impliqués dans la prolifération des cellules souches neurales en régulant l'expression de Musashi-1, activateur de la voie de Notch. Les motifs sialyl-Lewis x, marqueurs de cellules neurales non différenciées, sont donc des activateurs de la voie de Notch impliquée dans le maintien de ces cellules durant le développement du cerveau (Yagi *et al.*, 2012). En se fondant sur cette publication, nous pourrions supposer que lors de la myogenèse, la sialylation du récepteur Notch participe à son activation, et par conséquent à celle de Pax7, et à son rôle dans le maintien des cellules de réserve et dans la prolifération myoblastique. Il restera encore à déterminer le type de liaison des acides sialiques, en  $\alpha 2,3$  ou en  $\alpha 2,6$ .

Pour terminer, une des futures pistes d'étude est l'analyse des ST6GalNAc au cours de la myogenèse. En effet, *ST6GalNAc II* est exprimé de manière abondante dans le muscle squelettique adulte et son produit possède une activité  $\alpha 2,6$  sialyltransférase (Samyn-Petit *et al.*, 2000), *ST6GalNAc IV* est aussi exprimé dans le muscle (Harduin-Lepers *et al.*, 2000). Il serait alors intéressant de déterminer les variations d'expression de ces sialyltransférases au cours de la différenciation myogénique et si ces variations sont suffisantes, de réaliser des clones de cellules C2C12 sous exprimant ou sur exprimant ces enzymes. Ces pistes de recherche concernent les glycoprotéines, nous pourrions analyser le rôle des glycolipides durant la différenciation des cellules musculaires en ciblant les sialyltransférases impliquées dans leur synthèse, et notamment la ST6GalNAc V responsable de l'étape finale d'élongation des gangliosides des séries O, a et b.



## Conclusion

---

Le but de ma thèse de doctorat a été d'identifier les voies de signalisation activées ou réprimées en raison de la modification d' $\alpha$ 2,6 sialylation des glycanes de surface lors de la myogenèse adulte. Ainsi, j'ai montré que l' $\alpha$ 2,6 sialylation est impliquée dans ce processus grâce à la création de clones sous-exprimant le gène *st6gal1* à partir de la lignée murine C2C12. L'étude phénotypique a révélé que ces clones possèdent une capacité proliférative amoindrie en raison de la faible expression de *Pax7*. Ils présentent une fusion plus importante et une diminution du nombre de cellules de réserve. Les structures glycaniques les plus touchées par cette baisse de sialylation sont les *N*-glycanes sialylés et bi-fucosylés. Les *N*-glycanes sialylés ne semblent pas intervenir dans le maintien des cellules de réserve, contrairement aux *N*-glycanes fucosylés.

Ces modifications de sialylation impactent des glycoprotéines de surface ayant des fonctions de récepteurs impliqués dans la signalisation intracellulaire myogénique. Ces glycoprotéines régulent en particulier l'expression de *Pax7*, le nombre de cellules de réserve ainsi que la prolifération et leur entrée en différenciation. *Pax7* est notamment dépendant de la voie de Notch, associée au maintien des cellules de réserve et à la prolifération. La voie des Smads a elle aussi été sélectionnée puisqu'elle est liée à la prolifération. Ces deux voies sont plus faiblement activées lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation diminue, ce qui provoque une diminution de l'expression de *Pax7* et donc le ralentissement de la prolifération constaté pour les clones. Les voies PI3K/Akt/mTOR et MAPK/p38 sont impliquées dans les divers mécanismes de différenciation cellulaire. Ainsi, la voie PI3K/Akt/mTOR, et probablement celle de p38, présentent une plus forte activation entraînant ainsi un plus fort indice de fusion lorsque l' $\alpha$ 2,6 sialylation diminue. Par conséquent, cette baisse de sialylation touche des récepteurs membranaires dont le récepteur Notch et certainement d'autres engagés dans les voies étudiées au cours de ce travail tels que les récepteurs aux TGF $\beta$  ou les récepteurs à activité tyrosine kinase.





## Références bibliographiques

---

- 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.
- Aguiari, P., Leo, S., Zavan, B., Vindigni, V., Rimessi, A., Bianchi, K., Franzin, C., Cortivo, R., Rossato, M., Vettor, R., et al.** (2008). High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1226–1231.
- 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 Pofut1cax/cax mice. *Open Biol* 6.
- Alwan, R., Bruel, A.-L., Da Silva, A., Blanquet, V., and Bouhouche, K.** (2017). An siRNA-based screen in C2C12 myoblasts identifies novel genes involved in myogenic differentiation. *Exp. Cell Res.* 359, 145–153.
- Amith, S.R., Jayanth, P., Franchuk, S., Finlay, T., Seyrantepe, V., Beyaert, R., Pshezhetsky, A.V., and Szewczuk, M.R.** (2010). Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cell. Signal.* 22, 314–324.
- Anastasia, L., Papini, N., Colazzo, F., Palazzolo, G., Tringali, C., Dileo, L., Piccoli, M., Conforti, E., Sitzia, C., Monti, E., et al.** (2008). NEU3 sialidase strictly modulates GM3 levels in skeletal myoblasts C2C12 thus favoring their differentiation and protecting them from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 36265–36271.
- Anderson, J.E.** (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 1859–1874.
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A.** (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–31524.
- Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., and Fukuda, M.** (1997). Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J. Biol. Chem.* 272, 7182–7190.
- Angata, K., Suzuki, M., McAuliffe, J., Ding, Y., Hindsgaul, O., and Fukuda, M.** (2000). Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J. Biol. Chem.* 275, 18594–18601.
- Angata, K., Yen, T.Y., El-Battari, A., Macher, B.A., and Fukuda, M.** (2001). Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity. *J. Biol. Chem.* 276, 15369–15377.
- Angata, K., Suzuki, M., and Fukuda, M.** (2002). ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J. Biol. Chem.* 277, 36808–36817.
- Angata, T., and Varki, A.** (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102, 439–469.

- Appenheimer, M.M., Huang, R.-Y., Chandrasekaran, E.V., Dalziel, M., Hu, Y.P., Soloway, P.D., Wuensch, S.A., Matta, K.L., and Lau, J.T.Y.** (2003). Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. *Glycobiology* *13*, 591–600.
- Apuzzo, S., and Gros, P.** (2007). Cooperative interactions between the two DNA binding domains of Pax3: helix 2 of the paired domain is in the proximity of the amino terminus of the homeodomain. *Biochemistry* *46*, 2984–2993.
- Argov, Z., and Yarom, R.** (1984). “Rimmed vacuole myopathy” sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J. Neurol. Sci.* *64*, 33–43.
- Bakker, H., Schoenmakers, P.S., Koeleman, C.A., Joziase, D.H., van Die, I., and van den Eijnden, D.H.** (1997). The substrate specificity of the snail *Lymnaea stagnalis* UDP-GlcNAc:GlcNAc beta-R beta 4-N-acetylglucosaminyltransferase reveals a novel variant pathway of complex-type oligosaccharide synthesis. *Glycobiology* *7*, 539–548.
- Basu, S., Basu, M., Kyle, J.W., and Chon, H.C.** (1984). Biosynthesis in vitro of gangliosides containing Gg- and Lc-cores. *Adv. Exp. Med. Biol.* *174*, 249–261.
- Becam, I., Fiuza, U.-M., Arias, A.M., and Milán, M.** (2010). A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *20*, 554–560.
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., van Beusekom, E., van der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W.B., et al.** (2002). Mutations in the O-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 1033–1043.
- Bennett, E., Urcan, M.S., Tinkle, S.S., Koszowski, A.G., and Levinson, S.R.** (1997). Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J. Gen. Physiol.* *109*, 327–343.
- Bennett, E.S.** (2002). Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I. *J. Physiol. (Lond.)* *538*, 675–690.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Dumont, N.A., and Rudnicki, M.A.** (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* *14*, 1062–1072.
- Bergeron, J.J., Paiement, J., Khan, M.N., and Smith, C.E.** (1985). Terminal glycosylation in rat hepatic Golgi fractions: heterogeneous locations for sialic acid and galactose acceptors and their transferases. *Biochim. Biophys. Acta* *821*, 393–403.
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R.** (2001). Dynamic expression and essential functions of *Hes7* in somite segmentation. *Genes Dev.* *15*, 2642–2647.
- Bi, P., Yue, F., Sato, Y., Wirbisky, S., Liu, W., Shan, T., Wen, Y., Zhou, D., Freeman, J., and Kuang, S.** (2016). Stage-specific effects of Notch activation during skeletal myogenesis. *Elife* *5*: e17355.
- Bhide, G.P., and Colley, K.J.** (2017). Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem. Cell Biol.* *147*, 149–174.
- Bilanges, B., Argonza-Barrett, R., Kolesnichenko, M., Skinner, C., Nair, M., Chen, M., and Stokoe, D.** (2007). Tuberous sclerosis complex proteins 1 and 2 control serum-dependent translation in a TOP-dependent and -independent manner. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 5746–5764.
- Bischoff, R.** (1997). Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev. Dyn.* *208*, 505–515.
- 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.
- Blackwell, T.K., and Weintraub, H.** (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* *250*, 1104–1110.

- Blasius, A.L., and Colonna, M.** (2006). Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol.* *27*, 255–260.
- Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L.** (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 225–227.
- Bouchatal, A.** Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique : rôle particulier de l'( $\alpha$ 2,6) sialylation. (2015). Thèse de doctorat, Université de Limoges.
- Bourdon, M.A., Oldberg, A., Pierschbacher, M., and Ruoslahti, E.** (1985). Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *82*, 1321–1325.
- Brand-Saberi, B., Gamel, A.J., Krenn, V., Müller, T.S., Wilting, J., and Christ, B.** (1996a). N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud. *Dev. Biol.* *178*, 160–173.
- Brand-Saberi, B., Wilting, J., Ebersperger, C., and Christ, B.** (1996b). The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* *40*, 411–420.
- 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.
- Brennan, T.J., Edmondson, D.G., Li, L., and Olson, E.N.** (1991). Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 3822–3826.
- Brooke, M.H., and Kaiser, K.K.** (1969). Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* *17*, 431–432.
- 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.
- Brown, J.R., and Auger, K.R.** (2011). Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evol. Biol.* *11*, 4.
- Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* *406*, 411–415.
- Brun, C., Périé, L., Baraige, F., Vernus, B., Bonnieu, A., and Blanquet, V.** (2014). Absence of hyperplasia in Gasp-1 overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation. *Cell. Physiol. Biochem.* *34*, 1241–1259.
- Brunetti, A., and Goldfine, I.D.** (1990). Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* *265*, 5960–5963.
- Buas, M.F., Kabak, S., and Kadesch, T.** (2009). Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J. Cell. Physiol.* *218*, 84–93.
- Buckingham, M.** (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 440–448.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F.** (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* *202*, 59–68.
- Burda, P., and Aebi, M.** (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1426*, 239–257.
- Calleja, V., Laguerre, M., and Larijani, B.** (2012). Role of the C-terminal regulatory domain in the allosteric inhibition of PKB/Akt. *Adv Biol Regul* *52*, 46–57.

- Cantini, M., Massimino, M.L., Rapizzi, E., Rossini, K., Catani, C., Dalla Libera, L., and Carraro, U.** (1995). Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *216*, 49–53.
- Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alemà, S., Martelli, F., and Falcone, G.** (2009). MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PLoS ONE* *4*, e7607.
- Chabanais, J., Labrousse, F., Chaunavel, A., Germot, A., and Maftah, A.** (2018). POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* *10*, 411.
- Chakravarthy, M.V., Davis, B.S., and Booth, F.W.** (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* *89*, 1365–1379.
- Chan, T.O., and Tschlis, P.N.** (2001). PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci. STKE* *2001*, pe1.
- Chang, I.J., He, M., and Lam, C.T.** (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Ann Transl Med* *6*.
- Chang, N.C., Chevalier, F.P., and Rudnicki, M.A.** (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol Med* *22*, 479–496.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z.** (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* *38*, 228–233.
- Chen, Y.-G., Wang, Z., Ma, J., Zhang, L., and Lu, Z.** (2007). Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* *282*, 9688–9695.
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z.** (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* *190*, 867–879.
- Cheung, T.H., Quach, N.L., Charville, G.W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., Yoo, B., Hoang, P., and Rando, T.A.** (2012). Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* *482*, 524–528.
- Chou, H.H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K.L., Muchmore, E.A., Nelson, D.L., Warren, S.T., and Varki, A.** (1998). A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 11751–11756.
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al.** (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1397–1409.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicolet, M., Alameddine, H., Goudou, D., Dehaupas, M., Rieger, F., and Mège, R.M.** (1995). M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis. *Mech. Dev.* *50*, 85–97.
- Ciucanu, I., Kerek, F.** (1984). Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxyfatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A.* *284*, 179.
- Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., and Morgan, J.E.** (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* *122*, 289–301.
- Conboy, I.M., and Rando, T.A.** (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell* *3*, 397–409.
- Cooke, J., and Zeeman, E.C.** (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* *58*, 455–476.

- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z.Y., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., et al.** (2008). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 849–857.
- Cornelison, D.D., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., and Wold, B.J.** (2000). MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev. Biol.* *224*, 122–137.
- Crist, C.G., Montarras, D., Pallafacchina, G., Rocancourt, D., Cumano, A., Conway, S.J., and Buckingham, M.** (2009). Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 13383–13387.
- Crist, C.G., Montarras, D., and Buckingham, M.** (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* *11*, 118–126.
- Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T.G., and Kunkel, L.M.** (2006). Loss of FilaminC (FLNc) results in severe defects in myogenesis and myotube structure. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6522–6534.
- Darvish, D., Vahedifar, P., and Huo, Y.** (2002). Four novel mutations associated with autosomal recessive inclusion body myopathy (MIM: 600737). *Mol. Genet. Metab.* *77*, 252–256.
- Datta, A.K., Chammas, R., and Paulson, J.C.** (2001). Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J. Biol. Chem.* *276*, 15200–15207.
- Datta, A.K.** (2009). Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs. *Curr Drug Targets* *10*, 483–498.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* *51*, 987–1000.
- Dawson, S.R., Turner, D.L., Weintraub, H., and Parkhurst, S.M.** (1995). Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6923–6931.
- Deblandre, G.A., Lai, E.C., and Kintner, C.** (2001). Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev. Cell* *1*, 795–806.
- Der Vartanian, A., Audfray, A., Al Jaam, B., Janot, M., Legardinier, S., Maftah, A., and Germot, A.** (2015). Protein O-fucosyltransferase 1 expression impacts myogenic C2C12 cell commitment via the Notch signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 391–405.
- De Strooper, B., and Annaert, W.** (2001). Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *J. Cell Biol.* *152*, F17–20.
- DeVol, D.L., Rotwein, P., Sadow, J.L., Novakofski, J., and Bechtel, P.J.** (1990). Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am. J. Physiol.* *259*, E89–95.
- Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A.** (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 203–214.
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G.** (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 73–129.
- Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R.** (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* *270*, 10618–10624.
- Dünker, N., and Kriegstein, K.** (2000). Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6982–6988.
- Egan, S.E., St-Pierre, B., and Leow, C.C.** (1998). Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *228*, 273–324.

- El Maarouf, A., Petridis, A.K., and Rutishauser, U.** (2006). Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 16989–16994.
- Esteves de Lima, J., Bonnin, M.-A., Birchmeier, C., and Duprez, D.** (2016). Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. *Elife* *5*: e155593.
- Erbay, E., Park, I.-H., Nuzzi, P.D., Schoenherr, C.J., and Chen, J.** (2003). IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *J. Cell Biol.* *163*, 931–936.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P.** (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* *122*, 809–823.
- Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Zizioli, D., Presta, M., Preti, A., and Marchesini, S.** (2003). Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells. *FEBS Lett.* *547*, 183–188.
- Fanzani, A., Colombo, F., Giuliani, R., Preti, A., and Marchesini, S.** (2006). Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy. *FEBS J.* *273*, 3709–3721.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., and Goridis, C.** (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *112*, 482–487.
- Fisher, A.L., Ohsako, S., and Caudy, M.** (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2670–2677.
- Fleming, R.J.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.* *9*, 599–607.
- Floss, T., Arnold, H.H., and Braun, T.** (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* *11*, 2040–2051.
- Fong, A.P., Yao, Z., Zhong, J.W., Cao, Y., Ruzzo, W.L., Gentleman, R.C., and Tapscott, S.J.** (2012). Genetic and epigenetic determinants of neurogenesis and myogenesis. *Dev. Cell* *22*, 721–735.
- Francisco, R., Pascoal, C., Marques-da-Silva, D., Morava, E., Gole, G.A., Coman, D., Jaeken, J., and Ferreira, V. dos R.** (2019). Keeping an eye on congenital disorders of O-glycosylation: A systematic literature review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* *42*, 29–48.
- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.H., and Miyazono, K.** (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* *75*, 681–692.
- Freeze, H.H., and Aebi, M.** (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 490–498.
- Freeze, H.H., Chong, J.X., Bamshad, M.J., and Ng, B.G.** (2014). Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 161–175.
- Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A.** (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol. Cell* *16*, 509–520.
- Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J.E., Dell, A., and Klock, J.C.** (1984). Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J. Biol. Chem.* *259*, 10925–10935.
- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S.** (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* *25*, 2448–2459.
- Funderburgh, J.L.** (2000). Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* *10*, 951–958.

- Gan, M., Du, J., Shen, L., Yang, D., Jiang, A., Li, Q., Jiang, Y., Tang, G., Li, M., Wang, J., et al.** (2018). miR-152 regulates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by targeting E2F3. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *54*, 304–310.
- Gandhi, N.S., and Mancera, R.L.** (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* *72*, 455–482.
- Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Jory, A., Sambasivan, R., Negroni, E., Flamant, P., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Di Santo, J., Cumano, A., et al.** (2012). Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. *J. Cell. Sci.* *125*, 1738–1749.
- Ge, G., and Greenspan, D.S.** (2006). BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J. Cell Biol.* *175*, 111–120.
- Geremia, R.A., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P.** (1997). Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology* *7*, v–vii.
- Gilormini, P.A., Lion, C., Vicogne, D., Guérardel, Y., Foulquier, F., and Biot, C.** (2018). Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells. *J. Inherit. Metab. Dis.* *41*, 515–523.
- Giordanengo, V., Bannwarth, S., Laffont, C., Van Miegem, V., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Lefebvre, J.C.** (1997). Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem.* *247*, 558–566.
- Glebov, O.O., and Nichols, B.J.** (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat. Cell Biol.* *6*, 238–243.
- Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C., and Bray, S.** (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *EMBO J.* *25*, 4697–4706.
- Gnocchi, V.F., White, R.B., Ono, Y., Ellis, J.A., and Zammit, P.S.** (2009). Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS ONE* *4*, e5205.
- Gonzalez-Gil, A., Porell, R.N., Fernandes, S.M., Wei, Y., Yu, H., Carroll, D.J., McBride, R., Paulson, J.C., Tiemeyer, M., Aoki, K., et al.** (2018). Sialylated keratan sulfate proteoglycans are Siglec-8 ligands in human airways. *Glycobiology* *28*, 786–801.
- Gooley, A.A., and Williams, K.L.** (1994). Towards characterizing O-glycans: the relative merits of in vivo and in vitro approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites. *Glycobiology* *4*, 413–417.
- Gopinath, S.D., Webb, A.E., Brunet, A., and Rando, T.A.** (2014). FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. *Stem Cell Reports* *2*, 414–426.
- 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.
- Gordon, W.R., Zimmerman, B., He, L., Miles, L.J., Huang, J., Tiyanont, K., McArthur, D.G., Aster, J.C., Perrimon, N., Loparo, J.J., et al.** (2015). Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev. Cell* *33*, 729–736.
- Grahn, A., Barkhordar, G.S., and Larson, G.** (2002). Cloning and sequencing of nineteen transcript isoforms of the human alpha2,3-sialyltransferase gene, ST3Gal III; its genomic organisation and expression in human tissues. *Glycoconj. J.* *19*, 197–210.
- Grassot, V., Da Silva, A., Saliba, J., Maftah, A., Dupuy, F., and Petit, J.-M.** (2014). Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis. *BMC Genomics* *15*, 621.
- Grassot, V., Bouchatal, A., Da Silva, A., Chantepie, S., Papy-Garcia, D., Maftah, A., Gallet, P.-F., and Petit, J.-M.** (2017). Heparan sulfates and the decrease of N-glycans promote early adipogenic differentiation rather than myogenesis of murine myogenic progenitor cells. *Differentiation* *93*, 15–26.

- Grifone, R., Demignon, J., Houbron, C., Souil, E., Niro, C., Seller, M.J., Hamard, G., and Maire, P.** (2005). Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* *132*, 2235–2249.
- Groux-Degroote, S., Guérardel, Y., and Delannoy, P.** (2017). Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *ChemBiochem* *18*, 1146–1154.
- Gruss, P., and Walther, C.** (1992). Pax in development. *Cell* *69*, 719–722.83.
- Hakomori, S.** (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv. Cancer Res.* *52*, 257–331.
- Harris, R.J., and Spellman, M.W.** (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* *3*, 219–224.
- Haines, N., and Irvine, K.D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 786–797.
- Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., and Lassar, A.B.** (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* *267*, 1018–1021.
- Hanisch, F.G.** (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* *382*, 143–149.
- Hansson, E.M., Lanner, F., Das, D., Mutvei, A., Marklund, U., Ericson, J., Farnebo, F., Stumm, G., Stenmark, H., Andersson, E.R., et al.** (2010). Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. *J. Cell. Sci.* *123*, 2931–2942.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K.** (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* *110*, 177–189.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K.** (1994). Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 10455–10459.
- Harduin-Lepers, A., Recchi, M.A., and Delannoy, P.** (1995). 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* *5*, 741–758.
- Harduin-Lepers, A., Stokes, D.C., Steelant, W.F., Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Vallejo-Ruiz, V., Zanetta, J.P., Augé, C., and Delannoy, P.** (2000). Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J.* *352 Pt 1*, 37–48.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S., and Delannoy, P.** (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie* *83*, 727–737.
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J.-M., and Oriol, R.** (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol. Biol.* *8*, 258.
- Harduin-Lepers, A.** (2010). Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiology Insights.* *2*, 29-61.
- Harris, R.J., and Spellman, M.W.** (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* *3*, 219–224.
- Harrison, C.A., Al-Musawi, S.L., and Walton, K.L.** (2011). Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- $\beta$  superfamily ligands. *Growth Factors* *29*, 174–186.



- Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C.** (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* *446*, 1017–1022.
- Hauerslev, S., Vissing, J., and Krag, T.O.** (2014). Muscle atrophy reversed by growth factor activation of satellite cells in a mouse muscle atrophy model. *PLoS ONE* *9*, e100594.
- He, J., Wang, F., Zhang, P., Li, W., Wang, J., Li, J., Liu, H., and Chen, X.** (2017). miR-491 inhibits skeletal muscle differentiation through targeting myomaker. *Arch. Biochem. Biophys.* *625–626*, 30–38.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* *390*, 465–471.
- Helenius, A., and Aebi, M.** (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 1019–1049.
- 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, S.T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J.** (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1751–1762.
- Hildebrandt, H., Becker, C., Müräu, M., Gerardy-Schahn, R., and Rahmann, H.** (1998). Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J. Neurochem.* *71*, 2339–2348.
- Hinderlich, S., Salama, I., Eisenberg, I., Potikha, T., Mantey, L.R., Yarema, K.J., Horstkorte, R., Argov, Z., Sadeh, M., Reutter, W., et al.** (2004). The homozygous M712T mutation of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase results in reduced enzyme activities but not in altered overall cellular sialylation in hereditary inclusion body myopathy. *FEBS Lett.* *566*, 105–109.
- Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquié, O.** (2001). Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* *128*, 107–116.
- Hollenberg, S.M., Cheng, P.F., and Weintraub, H.** (1993). Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 8028–8032.
- 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.
- Hosokawa, N., Tremblay, L.O., You, Z., Herscovics, A., Wada, I., and Nagata, K.** (2003). Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* *278*, 26287–26294.
- Hu, P., Geles, K.G., Paik, J.-H., DePinho, R.A., and Tjian, R.** (2008). Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev. Cell* *15*, 534–546.
- Hughes, R.C., and Mills, G.** (1986). Functional differences in the interactions of glycosylation-deficient cell lines with fibronectin, laminin, and type IV collagen. *J. Cell. Physiol.* *128*, 402–412.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K.** (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* *389*, 622–626.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L.** (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648–657.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A.** (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn.* *199*, 326–337.

- Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., and Saito, M.** (1998). Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem.* *273*, 31652–31655.
- Issad, T., Masson, E., and Pagesy, P.** (2010). O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab.* *36*, 423–435.
- Janot, M., Audfray, A., Loriol, C., Germot, A., Maftah, A., and Dupuy, F.** (2009). Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics* *10*, 483.
- Jean, S., and Kiger, A.A.** (2014). Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell. Sci.* *127*, 923–928.
- Jeanneau, C., Chazalet, V., Augé, C., Soumpasis, D.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imberly, A., and Breton, C.** (2004). Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif. *J. Biol. Chem.* *279*, 13461–13468.
- Jennings, B.H., Tyler, D.M., and Bray, S.J.** (1999). Target specificities of Drosophila enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4600–4610.
- Jensen, P.H., Kolarich, D., and Packer, N.H.** (2010). Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together. *FEBS J.* *277*, 81–94.
- Jones, M.B., Oswald, D.M., Joshi, S., Whiteheart, S.W., Orlando, R., and Cobb, B.A.** (2016). B-cell-independent sialylation of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *113*, 7207–7212.
- Jostes, B., Walther, C., and Gruss, P.** (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* *33*, 27–37.
- Kaar, J.L., Li, Y., Blair, H.C., Asche, G., Koepsel, R.R., Huard, J., and Russell, A.J.** (2008). Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis. *Acta Biomater* *4*, 1411–1420.
- Kageshita, T., Hirai, S., Kimura, T., Hanai, N., Ohta, S., and Ono, T.** (1995). Association between sialyl Lewis(a) expression and tumor progression in melanoma. *Cancer Res.* *55*, 1748–1751.
- 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.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S.** (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* *19*, 1426–1431.
- Kästner, S., Elias, M.C., Rivera, A.J., and Yablonka-Reuveni, Z.** (2000). Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J. Histochem. Cytochem.* *48*, 1079–1096.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L.** (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* *6*, 1365–1375.
- Kelleher, D.J., and Gilmore, R.** (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J. Biol. Chem.* *269*, 12908–12917.
- Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdière-Sahuqué, M., Fardeau, M., and Alameddine, H.S.** (1999). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* *205*, 158–170.
- Kidd, S., Lockett, T.J., and Young, M.W.** (1983). The Notch locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell* *34*, 421–433.

- Kitagawa, H., and Paulson, J.C.** (1994). Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J. Biol. Chem.* *269*, 17872–17878.
- Kitazume-Kawaguchi, S., Dohmae, N., Takio, K., Tsuji, S., and Colley, K.J.** (1999). The relationship between ST6Gal I Golgi retention and its cleavage-secretion. *Glycobiology* *9*, 1397–1406.
- Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N.J., and Fernandez, A.** (1998). The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol.* *142*, 1447–1459.
- Koch, U., Lehal, R., and Radtke, F.** (2013). Stem cells living with a Notch. *Development* *140*, 689–704.
- Kochlamazashvili, G., Senkov, O., Grebenyuk, S., Robinson, C., Xiao, M.-F., Stummeyer, K., Gerardy-Schahn, R., Engel, A.K., Feig, L., Semyanov, A., et al.** (2010). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid regulates synaptic plasticity and learning by restraining the signaling through GluN2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* *30*, 4171–4183.
- 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*, e196.
- Koning, M., Werker, P.M.N., van Luyn, M.J.A., Krenning, G., and Harmsen, M.C.** (2012). A global downregulation of microRNAs occurs in human quiescent satellite cells during myogenesis. *Differentiation* *84*, 314–321.
- Kono, M., Yoshida, Y., Kojima, N., and Tsuji, S.** (1996). Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesizes GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. *J. Biol. Chem.* *271*, 29366–29371.
- Koopman, R., Gehrig, S.M., Léger, B., Trieu, J., Walrand, S., Murphy, K.T., and Lynch, G.S.** (2010). Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *J. Physiol. (Lond.)* *588*, 4811–4823.
- Kopan, R., Nye, J.S., and Weintraub, H.** (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* *120*, 2385–2396.
- Koyano-Nakagawa, N., Kim, J., Anderson, D., and Kintner, C.** (2000). Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development* *127*, 4203–4216.
- Krol, A.J., Roellig, D., Dequéant, M.-L., Tassy, O., Glynn, E., Hattem, G., Mushegian, A., Oates, A.C., and Pourquié, O.** (2011). Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. *Development* *138*, 2783–2792.
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R.K., and Margolis, R.U.** (1986). Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* *261*, 8237–8242.
- Krzewinski-Recchi, M.-A., Julien, S., Juliant, S., Teinturier-Lelièvre, M., Samyn-Petit, B., Montiel, M.-D., Mir, A.-M., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P.** (2003). Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *Eur. J. Biochem.* *270*, 950–961.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A.** (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* *129*, 999–1010.
- Kumar, D., Shadrach, J.L., Wagers, A.J., and Lassar, A.B.** (2009). Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3170–3177.
- 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.

- Lai, K.-M.V., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J.** (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9295–9304.
- Lal, A., Schutzbach, J.S., Forsee, W.T., Neame, P.J., and Moremen, K.W.** (1994). Isolation and expression of murine and rabbit cDNAs encoding an alpha 1,2-mannosidase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* *269*, 9872–9881.
- Laporte, B., Gonzalez-Hilarion, S., Maftah, A., and Petit, J.-M.** (2009). The second bovine beta-galactoside-alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal II): genomic organization and stimulation of its in vitro expression by IL-6 in bovine mammary epithelial cells. *Glycobiology* *19*, 1082–1093.
- Lawler, S., Feng, X.H., Chen, R.H., Maruoka, E.M., Turck, C.W., Griswold-Prenner, I., and Derynck, R.** (1997). The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* *272*, 14850–14859.
- Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., et al.** (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* *127*, 775–788.
- Ledeer, R., and Wu, G.** (2011). New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *J. Neurochem.* *116*, 714–720.
- Lee, H., Lee, S.-J., Bae, G.-U., Baek, N.-I., and Ryu, J.-H.** (2017). Canadine from *Corydalis turtschaninovii* Stimulates Myoblast Differentiation and Protects against Myotube Atrophy. *Int J Mol Sci* *18*, 2748.
- Lee, H.-W., Kim, S.-J., Choi, I.J., Song, J., and Chun, K.-H.** (2015). Targeting Notch signaling by  $\gamma$ -secretase inhibitor I enhances the cytotoxic effect of 5-FU in gastric cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *32*, 593–603.
- Lee, M.M., Nasirikenari, M., Manhardt, C.T., Ashline, D.J., Hanneman, A.J., Reinhold, V.N., and Lau, J.T.Y.** (2014). Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *J. Biol. Chem.* *289*, 8742–8748.
- Legerlotz, K., and Smith, H.K.** (2008). Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve* *38*, 1087–1100.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B., and Gessler, M.** (1999). Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* *85*, 173–177.
- Lepper, C., Conway, S.J., and Fan, C.-M.** (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* *460*, 627–631.
- Li, H.-H., Willis, M.S., Lockyer, P., Miller, N., McDonough, H., Glass, D.J., and Patterson, C.** (2007). Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *J. Clin. Invest.* *117*, 3211–3223.
- Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A.** (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* *25*, 455–471.
- Li, Y.-P.** (2003). TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *285*, C370-376.
- Litvinov, S.V., and Hilkens, J.** (1993). The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J. Biol. Chem.* *268*, 21364–21371.
- Liu, D., Black, B.L., and Derynck, R.** (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* *15*, 2950–2966.
- Liu, D., Kang, J.S., and Derynck, R.** (2004). TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J.* *23*, 1557–1566.

- Liu, R., Ginn, S.L., Lek, M., North, K.N., Alexander, I.E., Little, D.G., and Schindeler, A.** (2009). Myoblast sensitivity and fibroblast insensitivity to osteogenic conversion by BMP-2 correlates with the expression of Bmpr-1a. *BMC Musculoskelet Disord* 10, 51.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- 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.
- Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., and Marks, R.M.** (1990). ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 63, 475–484.
- 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.
- 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, G., Hershko, D.D., Robb, B.W., Wray, C.J., and Hasselgren, P.-O.** (2003). IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1249–1254.
- Luo, W., Li, E., Nie, Q., and Zhang, X.** (2015). Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. *Int J Mol Sci* 16, 26186–26201.
- Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R.S., and Panin, V.M.** (2006). Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats. *J. Biol. Chem.* 281, 9393–9399.
- Macauley, M.S., Crocker, P.R., and Paulson, J.C.** (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 653–666.
- Machado, E., White-Gilbertson, S., van de Vlekkert, D., Janke, L., Moshiach, S., Campos, Y., Finkelstein, D., Gomerio, E., Mosca, R., Qiu, X., et al.** (2015). Regulated lysosomal exocytosis mediates cancer progression. *Sci Adv* 1, e1500603.
- Macharia, R., Otto, A., Valasek, P., and Patel, K.** (2010). Neuromuscular junction morphology, fiber-type proportions, and satellite-cell proliferation rates are altered in MyoD(-/-) mice. *Muscle Nerve* 42, 38–52.
- Magli, A., Incitti, T., Kiley, J., Swanson, S.A., Darabi, R., Rinaldi, F., Selvaraj, S., Yamamoto, A., Tolar, J., Yuan, C., et al.** (2017). PAX7 Targets, CD54, Integrin  $\alpha 9\beta 1$ , and SDC2, Allow Isolation of Human ESC/iPSC-Derived Myogenic Progenitors. *Cell Rep* 19, 2867–2877.
- Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K.F., Steplewski, Z., and Koprowski, H.** (1981). A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science* 212, 55–56.
- Maine, E.M., Lissemore, J.L., and Starmer, W.T.** (1995). A phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Notch-related genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 139–149.
- Malik, A., Lee, E.J., Jan, A.T., Ahmad, S., Cho, K.-H., Kim, J., and Choi, I.** (2015). Network Analysis for the Identification of Differentially Expressed Hub Genes Using Myogenin Knock-down Muscle Satellite Cells. *PLoS ONE* 10, e0133597.

- Mare, L., and Trinchera, M.** (2004). Suppression of beta 1,3galactosyltransferase beta 3Gal-T5 in cancer cells reduces sialyl-Lewis a and enhances poly N-acetyllactosamines and sialyl-Lewis x on O-glycans. *Eur. J. Biochem.* *271*, 186–194.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., and Ando, S.** (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.* *56*, 5165–5171.
- Martelli, A.M., Buontempo, F., and McCubrey, J.A.** (2018). Drug discovery targeting the mTOR pathway. *Clin. Sci.* *132*, 543–568.
- Marth, J.D., and Grewal, P.K.** (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 874–887.
- Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* *9*, 493–495.
- Mayeuf, A., and Relaix, F.** (2011). [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Med Sci (Paris)* *27*, 521–526.
- Mayeuf-Louchart, A., Lagha, M., Danckaert, A., Rocancourt, D., Relaix, F., Vincent, S.D., and Buckingham, M.** (2014). Notch regulation of myogenic versus endothelial fates of cells that migrate from the somite to the limb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 8844–8849.
- Mennerich, D., Schäfer, K., and Braun, T.** (1998). Pax-3 is necessary but not sufficient for Ibx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech. Dev.* *73*, 147–158.
- Mercier, D., Wierinckx, A., Oulmouden, A., Gallet, P.F., Palcic, M.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Petit, J.M., Levéziel, H., and Julien, R.** (1999). Molecular cloning, expression and exon/intron organization of the bovine beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase gene. *Glycobiology* *9*, 851–863.
- 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
- Millay, D.P., Sutherland, L.B., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N.** (2014). Myomaker is essential for muscle regeneration. *Genes Dev.* *28*, 1641–1646.
- Milman Krentsis, I., Sela, I., Eiges, R., Blanchard, V., Berger, M., Becker Cohen, M., and Mitrani-Rosenbaum, S.** (2011). GNE is involved in the early development of skeletal and cardiac muscle. *PLoS ONE* *6*, e21389.
- Miyagi, T., and Tsuiki, S.** (1984). Rat-liver lysosomal sialidase. Solubilization, substrate specificity and comparison with the cytosolic sialidase. *Eur. J. Biochem.* *141*, 75–81.
- Miyagi, T., and Tsuiki, S.** (1985). Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver. *J. Biol. Chem.* *260*, 6710–6716.
- Miyazawa, K., and Miyazono, K.** (2017). Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*: a022095.
- Mnatsakanyan, H., Serra, R.S.I., Rico, P., and Salmerón-Sánchez, M.** (2018). Zinc uptake promotes myoblast differentiation via Zip7 transporter and activation of Akt signalling transduction pathway. *Sci Rep* *8*, 13642.
- Mohorko, E., Glockshuber, R., and Aebi, M.** (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 869–878.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., et al.** (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* *406*, 369–375.

- 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. *New Biol.* *3*, 592–600.
- Moretti, I., Ciciliot, S., Dyar, K.A., Abraham, R., Murgia, M., Agatea, L., Akimoto, T., Bicciato, S., Forcato, M., Pierre, P., et al.** (2016). MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity. *Nat Commun* *7*, 12397.
- 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.
- Mühlenhoff, M., Rollenhagen, M., Werneburg, S., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H.** (2013). Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochem. Res.* *38*, 1134–1143.
- Mullen, A.C., Orlando, D.A., Newman, J.J., Lovén, J., Kumar, R.M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M.G., DeKoter, R.P., and Young, R.A.** (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- $\beta$  signaling. *Cell* *147*, 565–576.
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Rosenthal, N.** (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* *27*, 195–200.
- Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y.** (1986). A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J. Biol. Chem.* *261*, 11550–11557.
- Nakagoe, T., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., Arisawa, K., and Ishikawa, H.** (2002). Difference in prognostic value between sialyl Lewis(a) and sialyl Lewis(x) antigen levels in the preoperative serum of gastric cancer patients. *J. Clin. Gastroenterol.* *34*, 408–415.
- Nakata, D., Zhang, L., and Troy, F.A.** (2006). Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. *Glycoconj. J.* *23*, 423–436.
- Nandan, D., Cates, G.A., Ball, E.H., and Sanwal, B.D.** (1990). Partial characterization of a collagen-binding, differentiation-related glycoprotein from skeletal myoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* *278*, 291–296.
- Neuhaus, P., Oustanina, S., Loch, T., Krüger, M., Bober, E., Dono, R., Zeller, R., and Braun, T.** (2003). Reduced mobility of fibroblast growth factor (FGF)-deficient myoblasts might contribute to dystrophic changes in the musculature of FGF2/FGF6/mdx triple-mutant mice. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6037–6048.
- Nishimura, M., Isaka, F., Ishibashi, M., Tomita, K., Tsuda, H., Nakanishi, S., and Kageyama, R.** (1998). Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genomics* *49*, 69–75.
- Noll, M.** (1993). Evolution and role of Pax genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *3*, 595–605.
- Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M.** (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat. Cell Biol.* *7*, 286–294.
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., and Caudy, M.** (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation. *Genes Dev.* *8*, 2743–2755.
- Ohtsubo, K., and Marth, J.D.** (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* *126*, 855–867.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.** (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* *18*, 2196–2207.

- Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K.** (1999a). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J. Biol. Chem.* *274*, 11479–11486.
- Okajima, T., Fukumoto, S., Ito, H., Kiso, M., Hirabayashi, Y., Urano, T., and Furukawa, K.** (1999b). Molecular cloning of brain-specific GD1alpha synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats. *J. Biol. Chem.* *274*, 30557–30562.
- Olguín, H.C., and Pisconti, A.** (2012). Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 1013–1025.
- Ono, Y., Calhabeu, F., Morgan, J.E., Katagiri, T., Amthor, H., and Zammit, P.S.** (2011). BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ.* *18*, 222–234.
- Otis, J.S., Niccoli, S., Hawdon, N., Sarvas, J.L., Frye, M.A., Chicco, A.J., and Lees, S.J.** (2014). Pro-inflammatory mediation of myoblast proliferation. *PLoS ONE* *9*, e92363.
- Oswald, F., Täuber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S., and Schmid, R.M.** (2001). p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7761–7774.
- Oulmouden, A., Wierinckx, A., Petit, J.M., Costache, M., Palcic, M.M., Mollicone, R., Oriol, R., and Julien, R.** (1997). Molecular cloning and expression of a bovine alpha(1,3)-fucosyltransferase gene homologous to a putative ancestor gene of the human FUT3-FUT5-FUT6 cluster. *J. Biol. Chem.* *272*, 8764–8773.
- Pallafacchina, G., Calabria, E., Serrano, A.L., Kalhovde, J.M., and Schiaffino, S.** (2002). A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 9213–9218.
- Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M.** (2010). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res* *4*, 77–91.
- Pannérec, A., Marazzi, G., and Sassoon, D.** (2012). Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche. *Trends Mol Med* *18*, 599–606.
- Patel, R.Y., and Balaji, P.V.** (2006). Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. *Glycobiology* *16*, 108–116.
- Paulson, J.C., Beranek, W.E., and Hill, R.L.** (1977). Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose. *J. Biol. Chem.* *252*, 2356–2362.
- Paulson, J.C., and Colley, K.J.** (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* *264*, 17615–17618.
- Pelletier, M.F., Marcil, A., Seigny, G., Jakob, C.A., Tessier, D.C., Chevet, E., Menard, R., Bergeron, J.J.M., and Thomas, D.Y.** (2000). The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo. *Glycobiology* *10*, 815–827.
- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C.** (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* *250*, 1130–1132.
- 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.
- Plummer, T.H., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W., and Tarentino, A.L.** (1984). Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.* *259*, 10700–10704.



- Preuss, U., Gu, X., Gu, T., and Yu, R.K.** (1993). Purification and characterization of CMP-N-acetylneuraminic acid:lactosylceramide (alpha 2-3) sialyltransferase (GM3-synthase) from rat brain. *J. Biol. Chem.* *268*, 26273–26278.
- Qing, J., Zhang, Y., and Derynck, R.** (2000). Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta -induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. *J. Biol. Chem.* *275*, 38802–38812.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J.F., Nita-Lazar, A., Kosik, K.S., and Haltiwanger, R.S.** (2005). Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J. Biol. Chem.* *280*, 32133–32140.
- Rauvala, H.** (1976). Gangliosides of human kidney. *J. Biol. Chem.* *251*, 7517–7520.
- Rawls, A., Valdez, M.R., Zhang, W., Richardson, J., Klein, W.H., and Olson, E.N.** (1998). Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* *125*, 2349–2358.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M.** (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* *18*, 1088–1105.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M.** (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* *435*, 948–953.
- Relaix, F., and Zammit, P.S.** (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* *139*, 2845–2856.
- Reynaud, E.G., Leibovitch, M.P., Tintignac, L.A., Pospel, K., Guillier, M., and Leibovitch, S.A.** (2000). Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2). *J. Biol. Chem.* *275*, 18767–18776.
- 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.
- Ronchini, C., and Capobianco, A.J.** (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5925–5934.
- Rosenblatt, J.D., and Parry, D.J.** (1992). Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *J. Appl. Physiol.* *73*, 2538–2543.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K., Mann, D.M., and Sunshine, J.** (1988). The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* *240*, 53–57.
- Salazar, J.L., and Yamamoto, S.** (2018). Integration of Drosophila and Human Genetics to understand Notch signaling related diseases. *Adv Exp Med Biol* *1066*, 141–185.
- Salo, H., Sievi, E., Suntio, T., Mecklin, M., Mattila, P., Renkonen, R., and Makarow, M.** (2005). Co-expression of two mammalian glycosyltransferases in the yeast cell wall allows synthesis of sLex. *FEMS Yeast Res.* *5*, 341–350.
- Salzmann, G.S., Greve, J.M., Roller, R.J., and Wassarman, P.M.** (1983). Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse. *EMBO J.* *2*, 1451–1456.
- Samraj, A.N., Pearce, O.M.T., Läubli, H., Crittenden, A.N., Bergfeld, A.K., Banda, K., Gregg, C.J., Bingman, A.E., Secrest, P., Diaz, S.L., et al.** (2015). A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 542–547.
- Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Steelant, W.F., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A.** (2000). Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1474*, 201–211.
- Sartorelli, V., and Fulco, M.** (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci. STKE* *2004*, re11.

- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S.** (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* *6*, 2620–2634.
- Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T., and Hasegawa, M.** (1993). Expression cloning of a novel Gal beta (1-3/1-4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *J. Biol. Chem.* *268*, 22782–22787.
- Sawaguchi, S., Varshney, S., Ogawa, M., Sakaidani, Y., Yagi, H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Sundaram, S., Stanley, P., et al.** (2017). O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *Elife* *6*, e24419.
- Schabort, E.J., van der Merwe, M., Loos, B., Moore, F.P., and Niesler, C.U.** (2009). TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp. Cell Res.* *315*, 373–384.
- Schachter, H.** (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj. J.* *17*, 465–483.
- Schachter, H., and Freeze, H.H.** (2009). Glycosylation diseases: Quo vadis? *Biochim Biophys Acta* *1792*, 925–930.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C.** (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schultz, E., Jaryszak, D.L., and Valliere, C.R.** (1985). Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* *8*, 217–222.
- 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.
- Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O.M., Ruegg, U.T., Schittny, J., and Müller, U.** (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* *4*, 673–685.
- Schwientek, T., Bennett, E.P., Flores, C., Thacker, J., Hollmann, M., Reis, C.A., Behrens, J., Mandel, U., Keck, B., Schäfer, M.A., et al.** (2002). Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* *277*, 22623–38.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A.** (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* *102*, 777–786.
- Sellmeier, M., Weinhold, B., and Münster-Kühnel, A.** (2015). CMP-Sialic Acid Synthetase: The Point of Constriction in the Sialylation Pathway. *Top Curr Chem* *366*, 139–167.
- Senechal, H., Delain, D., Schapira, G., and Wahrmann, J.P.** (1983). Alterations in glycosylation of plasma membrane proteins during myogenesis. *Exp. Cell Res.* *147*, 341–350.
- Shan, T., Zhang, P., Xiong, Y., Wang, Y., and Kuang, S.** (2016). Lkb1 deletion upregulates Pax7 expression through activating Notch signaling pathway in myoblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *76*, 31–38.
- Shea, K.L., Xiang, W., LaPorta, V.S., Licht, J.D., Keller, C., Basson, M.A., and Brack, A.S.** (2010). Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell* *6*, 117–129.
- Shi, Y., and Massagué, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* *113*, 685–700.
- 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.

- Shimokawa, T., Kato, M., Ezaki, O., and Hashimoto, S.** (1998). Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 287–292.
- 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.
- Siegel, A.L., Atchison, K., Fisher, K.E., Davis, G.E., and Cornelison, D.D.W.** (2009). 3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells* *27*, 2527–2538.
- Sinclair, D.A.R., Syrzycka, M., Macauley, M.S., Rastgardani, T., Komljenovic, I., Vocadlo, D.J., Brock, H.W., and Honda, B.M.** (2009). Drosophila O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (sxc). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 13427–13432.
- Singh, P., Wig, J.D., and Srinivasan, R.** (2011). The Smad family and its role in pancreatic cancer. *Indian J Cancer* *48*, 351–360.
- Singh, K., and Dilworth, F.J.** (2013). Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J.* *280*, 3991–4003.
- Snow, M.H.** (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat. Rec.* *188*, 201–217.
- Sohn, R.L., Huang, P., Kawahara, G., Mitchell, M., Guyon, J., Kalluri, R., Kunkel, L.M., and Gussoni, E.** (2009). A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 9274–9279.
- Soleimani, V.D., Punch, V.G., Kawabe, Y., Jones, A.E., Palidwor, G.A., Porter, C.J., Cross, J.W., Carvajal, J.J., Kockx, C.E.M., van IJcken, W.F.J., et al.** (2012). Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev. Cell* *22*, 1208–1220.
- Song, E., and Mechref, Y.** (2013). LC-MS/MS identification of the O-glycosylation and hydroxylation of amino acid residues of collagen  $\alpha$ -1 (II) chain from bovine cartilage. *J. Proteome Res.* *12*, 3599–3609.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., and Prinetti, A.** (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* *17*, 1R-13R.
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M.B.** (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* *465*, 86–90.
- Stibler, H., Holzbach, U., Tengborn, L., and Kristiansson, B.** (1996). Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul. Fibrinolysis* *7*, 118–126.
- Stoppani, E., Rossi, S., Marchesini, S., Preti, A., and Fanzani, A.** (2009). Defective myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells is characterized by sialidase Neu2 loss of expression. *Cell Biol. Int.* *33*, 1020–1025.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., and Nürnberg, B.** (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* *269*, 690–693.
- Sumitani, S., Goya, K., Testa, J.R., Kouhara, H., and Kasayama, S.** (2002). Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology* *143*, 820–828.
- Suzuki, M., Angata, K., Nakayama, J., and Fukuda, M.** (2003). Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* *278*, 49459–49468.
- Svensson, E.C., Conley, P.B., and Paulson, J.C.** (1992). Regulated expression of alpha 2,6-sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP. *J. Biol. Chem.* *267*, 3466–3472.

- Tajbakhsh, S., and Buckingham, M.** (2000). The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr. Top. Dev. Biol.* *48*, 225–268.
- Takashima, S., Tsuji, S., and Tsujimoto, M.** (2002). Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. *Genomic analysis of human sialyltransferase genes.* *J. Biol. Chem.* *277*, 45719–45728.
- Takeuchi, H., and Haltiwanger, R.S.** (2014). Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *453*, 235–242.
- Taniguchi, Y., Furukawa, T., Tun, T., Han, H., and Honjo, T.** (1998). LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 644–654.
- Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., and Lassar, A.B.** (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* *242*, 405–411.
- Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., and Allen, R.E.** (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* *194*, 114–128.
- Tatsumi, R.** (2010). Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim. Sci. J.* *81*, 11–20.
- Tee, A.R., Anjum, R., and Blenis, J.** (2003). Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.* *278*, 37288–37296.
- Teinturier-Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cérutti, M., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A.** (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem. J.* *392*, 665–674.
- Tidball, J.G., and Villalta, S.A.** (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *298*, R1173–1187.
- Toker, A., and Marmiroli, S.** (2014). Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv Biol Regul* *55*, 28–38.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., and Furukawa, K.** (2003). Synthesis of disialyl Lewis a (Le(a)) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase, ST6GalNAc VI, responsible for the synthesis of alpha-series gangliosides. *J. Biol. Chem.* *278*, 22787–22794.
- Tsuchiya, A., Lu, W.-Y., Weinhold, B., Boulter, L., Stutchfield, B.M., Williams, M.J., Guest, R.V., Minnis-Lyons, S.E., MacKinnon, A.C., Schwarzer, D., et al.** (2014). Polysialic acid/neural cell adhesion molecule modulates the formation of ductular reactions in liver injury. *Hepatology* *60*, 1727–1740.
- Tsuji, S.** (1996). Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J. Biochem.* *120*, 1–13.
- Tureckova, J., Wilson, E.M., Cappalonga, 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.
- Umamoto, J., Matta, K.L., Barlow, J.J., and Bhavanandan, V.P.** (1978). Action of endo-alpha-N-acetyl-D-galactosaminidase on synthetic glycosides including chromogenic substrates. *Anal. Biochem.* *91*, 186–193.
- Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F.S., Blaauw, B., Cossu, G., et al.** (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun* *4*, 1964.

- Varki, A.** (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97–130.
- Varki, A., and Crocker, P.R.** (2009). I-type Lectins. 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., and Schauer, R.** (2009). Sialic Acids. 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).
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., and Klein, W.H.** (1995). Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* 128, 563–576.
- Villalta, F., and Kierszenbaum, F.** (1987). Role of membrane N-linked oligosaccharides in host cell interaction with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 109–114.
- Wagner, J., Schmidt, C., Nikowits, W., and Christ, B.** (2000). Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by wnt expression. *Dev. Biol.* 228, 86–94.
- Wang, D., Ozhegov, E., Wang, L., Zhou, A., Nie, H., Li, Y., and Sun, X.-L.** (2016). Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages. *Glycoconj. J.* 33, 725–733.
- Wang, J., Yang, L.Z., Zhang, J.S., Gong, J.X., Wang, Y.H., Zhang, C.L., Chen, H., and Fang, X.T.** (2018). Effects of microRNAs on skeletal muscle development. *Gene* 668, 107–113.
- Wang, T., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., and Donahoe, P.K.** (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435–444.
- Wang, W.-S., Lin, J.-K., Chiou, T.-J., Liu, J.-H., Fan, F.S., Yen, C.-C., Lin, T.-C., Jiang, J.-K., Yang, S.-H., Wang, H.-S., et al.** (2002). CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 49, 160–164.
- Wang, Y.-C., Stein, J.W., Lynch, C.L., Tran, H.T., Lee, C.-Y., Coleman, R., Hatch, A., Antontsev, V.G., Chy, H.S., O'Brien, C.M., et al.** (2015). Glycosyltransferase ST6GAL1 contributes to the regulation of pluripotency in human pluripotent stem cells. *Sci Rep* 5, 13317.
- Watanabe, S., Kondo, S., Hayasaka, M., and Hanaoka, K.** (2007). Functional analysis of homeodomain-containing transcription factor Lbx1 in satellite cells of mouse skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* 120, 4178–4187.
- Weber, K.S.C., Alon, R., and Klickstein, L.B.** (2004). Sialylation of ICAM-2 on platelets impairs adhesion of leukocytes via LFA-1 and DC-SIGN. *Inflammation* 28, 177–188.
- Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P.H., and Paulson, J.C.** (1987). Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor. *J. Biol. Chem.* 262, 17735–17743.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., and Hollenberg, S.** (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761–766.
- Wehr, R., and Gruss, P.** (1996). Pax and vertebrate development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 369–377.
- Wen, Y., Bi, P., Liu, W., Asakura, A., Keller, C., and Kuang, S.** (2012). Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2300–2311.
- 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.

- White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S.** (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev. Biol.* *10*, 21.
- Willett, C.G., Daly, W.J., and Warshaw, A.L.** (1996). CA 19-9 is an index of response to neoadjuvant chemoradiation therapy in pancreatic cancer. *Am. J. Surg.* *172*, 350–352.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., and Massagué, J.** (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* *71*, 1003–1014.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J.** (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* *370*, 341–347.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., et al.** (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* *8*, 1277–1289.
- Wuensch, S.A., Huang, R.Y., Ewing, J., Liang, X., and Lau, J.T.** (2000). Murine B cell differentiation is accompanied by programmed expression of multiple novel beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase mRNA forms. *Glycobiology* *10*, 67–75.
- Xu, A., Haines, N., Dlugosz, M., Rana, N.A., Takeuchi, H., Haltiwanger, R.S., and Irvine, K.D.** (2007). In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe. *J. Biol. Chem.* *282*, 35153–35162.
- Yablonka-Reuveni, Z., and Rivera, A.J.** (1997). Proliferative Dynamics and the Role of FGF2 During Myogenesis of Rat Satellite Cells on Isolated Fibers. *Basic Appl. Myol.* *7*, 189–202.
- Yadin, D., Knaus, P., and Mueller, T.D.** (2016). Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* *27*, 13–34.
- Yaffe, D., and Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* *270*, 725–727.
- Yagi, H., Saito, T., Yanagisawa, M., Yu, R.K., and Kato, K.** (2012). Lewis X-carrying N-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *287*, 24356–24364.
- Yanagisawa, M., Nakamura, K., and Taga, T.** (2004). Roles of lipid rafts in integrin-dependent adhesion and gp130 signalling pathway in mouse embryonic neural precursor cells. *Genes Cells* *9*, 801–809.
- Yang, W.H., Nussbaum, C., Grewal, P.K., Marth, J.D., and Sperandio, M.** (2012). Coordinated roles of ST3Gal-VI and ST3Gal-IV sialyltransferases in the synthesis of selectin ligands. *Blood* *120*, 1015–1026.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., and Nabeshima, Y.** (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates “reserve cells.” *J. Cell. Sci.* *111* ( Pt 6), 769–779.
- Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., and Tsuji, S.** (1995). Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain. *J. Biol. Chem.* *270*, 14628–14633.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., and Ariga, T.** (2012). Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. *Neurochem. Res.* *37*, 1230–1244.
- Yusuf, F., and Brand-Saberi, B.** (2006). The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat. Embryol.* *211 Suppl 1*, 21–30.
- de Zegher, F., and Jaeken, J.** (1995). Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 from birth through adolescence. *Pediatr. Res.* *37*, 395–401.
- 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.

**Zeng, G., and Yu, R.K.** (2008). Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets* 9, 317–324.

**Zhang, L., and Ten Hagen, K.G.** (2011). The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 378–382.





## RESUME

La myogenèse est un processus physiologique qui inclut la prolifération, la différenciation et la fusion des myoblastes dans le but de créer des myotubes et par conséquent des fibres musculaires. Ces processus sont régulés par les MRF (Myogenic Regulatory Factors) et par les protéines Pax3 et Pax7, membres de la famille des protéines « Paired box ». L'équilibre entre l'expression de Pax7 et de MyoD est le facteur déterminant du devenir des progéniteurs musculaires et de leur entrée en différenciation. La fusion myoblastique nécessite aussi la présence des glycanes sur les protéines de la surface cellulaire. Nous avons démontré qu'au cours de la différenciation myoblastique a lieu une diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation associée à une baisse de l'expression du gène *st6gal1*. Nous avons utilisé la lignée myoblastique murine C2C12 afin d'analyser les modifications de l' $\alpha$ 2,6 sialylation et son impact sur l'expression de Pax7 au cours de la différenciation cellulaire. C'est pourquoi, nous avons créé des clones de C2C12 qui sous-expriment *st6gal1* grâce à l'introduction d'un shRNA spécifique. Les clones obtenus montrent une prolifération ralentie et une faible expression de Pax7 ainsi qu'un indice de fusion plus important. Les structures glycaniques modifiées lors de la différenciation ont été identifiées par « lectinblots » et spectrométrie de masse : les N-glycanes sialylés bi-fucosylés sont les plus impactés par la diminution de l' $\alpha$ 2,6 sialylation en différenciation. L'indice de fusion observé dans les clones engendre une diminution de la proportion des cellules de réserve (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>). La quasi-extinction de l'expression de Pax7 pendant la différenciation est due à la baisse de l'activation de la voie de Notch. Le KD de *st6gal1* inactive la voie Smad2/3 associée à la prolifération et il active la voie Akt connue pour favoriser la différenciation. Ainsi, nous montrons que l' $\alpha$ 2,6 sialylation est nécessaire pour la prolifération myoblastique et elle contribue à l'activation de Pax7.

Mots clés : Myogenèse, sialyltransférases, Pax7, N-glycanes sialylés, cellules C2C12.

## ABSTRACT

Myogenesis is a physiological process which includes the proliferation, the differentiation and the fusion of myoblasts in order to form myotubes and then muscular fibers. These mechanisms are regulated by the MRF (Myogenic Regulatory Factors) and Pax3 and Pax7 proteins which are members of the Pax protein family. The balance between Pax7 and MyoD is the determining factor of the cell fate determination and their entry in differentiation. The myoblastic fusion requires the presence of glycans on cell surface proteins. We demonstrated that during C2C12 cell differentiation, takes place a decrease of  $\alpha$ 2,6 sialylation associated with a decrease of gene expression coding for ST6Gal 1. We have used the C2C12 myoblastic cell line to analyse the modifications of  $\alpha$ 2,6 sialylation and its impact on the expression of Pax7 during cell differentiation. For this purpose, we have created C2C12 clones which expressed shRNA against *st6gal1*. These cells show a slowdown proliferation, a severe decrease of Pax7 expression and an earlier entry in differentiation. The glycan structures modified during myoblast differentiation were identified by lectin blotting and mass spectrometry: the sialylated bi-fucosylated N-glycans are the most impacted by the decrease of  $\alpha$ 2,6 sialylation. The earlier fusion of the clones *st6gal1* leads to a decrease of the amount of reserve cells (Pax7<sup>+</sup>/MyoD<sup>-</sup>). The extinction of Pax7 expression during differentiation is due to the decrease of the activation of Notch pathway. The KD of *st6gal1* inactivates Smad2/3 pathway associated with the cell proliferation and it activates the Akt pathway which favors the cell fusion. We can conclude that  $\alpha$ 2,6 sialylation is required for C2C12 proliferation and it contributes to Pax7 activation.

Keywords: Myogenesis, sialyltransferases, Pax7, sialylated N-glycans, C2C12 cell line.