Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité n°562

Institut Cochin

Équipe Développement neuromusculaire, Génétique et Physiopathologie

Rôle de Srf dans le contrôle de la fusion des myoblastes

Par Kassandra KOBON

Thèse de doctorat de Biologie cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Dr. Athanassia Sotiropoulos

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2022

Devant un jury composé de :

Delphine Duprez : DR1 - Institut de Biologie Paris Seine / Sorbonne Université	Rapporteur
Bruno Cadot : CR-HDR - Centre de Recherche en Myologie/ Sorbonne Université	Rapporteur
Onnik Agbulut : PU - Institut de Biologie Paris Seine / Sorbonne Université	Président du jury
Sabrina Batonnet-Pichon : MCU-HDR - Unité de BFA / Université Paris Cité	Examinateur
Athanassia Sotiropoulos : DR1 - Institut Cochin / Université Paris Cité	Directeur de Thèse

“I’m a survivor, I'm not gon' give up
I'm not gon' stop, I'm gon' work harder
I'm a survivor, I'm gonna make it
I will survive, keep on survivin' “

Destiny’s Child

Remerciements

Pour commencer, je voudrais remercier les membres de mon jury pour avoir pris le temps d'assister à ma soutenance. J'adresse mes remerciements à mes rapporteurs, le Dr. Delphine Duprez et le Dr. Bruno Cadot, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également le Pr Onnik Agbulut et le Dr Sabrina Batonnet-Pichon pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Celles à qui je dois les plus gros remerciements sont bien évidemment Nassia et Voahangy. Elles m'ont énormément aidée et guidée tout au long de ma thèse, me procurant de précieux conseils et un soutien à toute épreuve au cours de cette expérience qu'est la thèse. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans elles, m'ayant aidées dans toutes les difficultés que j'ai traversées (et il y en avait un sacré paquet !). Malgré leur emploi du temps plus que chargé, elles ont toujours été là, prêtes à me venir en aide en cas de besoin. Encore un grand merci à toutes les deux !

Je souhaite aussi remercier Pascal qui m'a aussi apporté de très bons conseils et a toujours été à l'écoute en cas de problèmes. Ce fut une grande joie d'avoir eu l'opportunité de réaliser ma thèse dans son équipe.

Je remercie aussi profondément Laura qui m'a énormément aidée durant mes quatre ans de thèse et a toujours donné de son temps, malgré son emploi du temps de ministre (c'est à se demander si tu n'étais vraiment qu'une simple doctorante) pour voler à mon secours, apporter des réponses à mes questions (même les plus bêtes) quand cela était à sa portée et du réconfort dans les moments les plus bas.

Léa, ma petite Léa (au sens propre comme au sens figuré XD) ! Ta compagnie a été une des plus merveilleuses au labo ! On a bien rigolé toutes les deux et j'ai adoré (c'est toujours le cas) tous les potins que tu as partagés avec moi. Ta douuuce voix (sur un ton sarcastique) m'a bercée pendant tout le temps que tu as passé avec moi dans le bureau. Elle me manquera beaucoup (lol). Je vais beaucoup regretter nos discussions sur LOL (enfin, les histoires que tu me racontes parce que personnellement je n'ai rien à raconter ^^') et t'entendre me raconter comment tes partenaires de jeu sont toujours aussi nuls et rageux ! T'entendre parler de LOL me donne presque l'envie de m'y mettre… Presque. Tu

m'as apportée beaucoup de bonne humeur et une vraie bouffée d'air frais pendant ces heures noires d'écriture. Je ne t'en remercierai jamais assez !

Que dire de Rouba. Un vrai rayon de soleil ! Rien que de te parler 5 minutes donne le sourire ! Tu m'as aussi beaucoup aidée pendant ces quatre ans. Tu m'as aidée à toujours voir le côté positif des choses et à ne rien lâcher. Te côtoyer a été un vrai plaisir !

Je tiens aussi à te remercier Steph. Tu m'as appris beaucoup de chose concernant cette technique étrange et extrêmement pénible qu'est le Western Blot (en vrai, il y a pire, il y a le cryostat…). Malheureusement pour moi, je n'ai pas réussi à en saisir toutes les subtilités et je continue à produire des blots assez... créatifs… Bien sûr, tu m'as aussi apportée tout un tas de bons conseils qui m'ont beaucoup aidée.

Je tiens aussi à remercier Nathalie qui m'a donnée de nombreux conseils, le couple Florian et Thierry avec leur humour plus que délirant et leurs questions pertinentes qui m'ont fait beaucoup réfléchir en réunion, notre duo d'ex-stagiaires passés thésards (bienvenue en enfer !) qui, j'espère, ne vont pas trop souffrir en mon absence, Benoit, Evelyne, Iryna.

Je tiens aussi à te remercier Chiara ! Après tout, c'est toi qui m'as formée et qui m'a tout appris. Tu m'as beaucoup aidée au début de ma thèse et c'était avec beaucoup de tristesse que je t'ai vue partir pour un autre institut. Heureusement, on est toujours en contact et même loin de Cochin, tu m'aides encore ! Merci pour cela.

Je tiens aussi à remercier Maryse, Yannig, Nathalie (bis), Chantal et Michelle pour toujours être là pour apporter de la bonne humeur à notre étage (et celui d'au-dessus). Je remercie également nos chers voisins les Romagnolo et les Peysonnaux.

Je tiens aussi à remercier la plateforme d'imagerie de Cochin (IMAG'IC) pour l'aide qu'ils ont apportée à mon projet ainsi qu'à celle de l'animalerie.

En dehors de l'institut, Je tiens à remercier mes amis, Sarah (ranger rose), Nico (ranger vert), Manu (ranger noir), Haytham (ranger rouge) et Diego (ranger bleu) pour me faire

rire et m'aider à me faire penser à autre chose que la thèse. Vous êtes des bons, les gars ! Je veux aussi te remercier Gwenola. Tu me mets toujours de bonne humeur.

Bien sûr, je remercie bien évidemment toute ma famille avec qui je vis de merveilleux moments et des histoires plus qu'improbable ! Mes parents, mon frère Willliam, ma sœur Kimberly, mon cousin Geoffroy et mes tantes. On rigole tout le temps et il se passe tous les jours des choses que l'on n'oubliera jamais (pas vrai Geoffroy ? Un pingouin n'est pas un oiseau, un poulet n'est pas une volaille ? Je le mets ici comme ça cela sera gravé à jamais ! AHAHAH !)

Pour finir, celui ou plutôt la compagnie que je ne remercierai **JAMAIS** est la SNCF. Ils m'ont fait perdre beaucoup de temps et surtout mon calme avec leur RER B de l'enfer !

Sommaire

Remerciements 3

Abréviations 9

Résumé 12

Abstract 14

Introduction

Chapitre 1 : Le muscle squelettique et les cellules souches musculaires

1. **Caractéristiques générales** 17
   a) Le tissu musculaire squelettique 17
   b) Les différents types de fibre 18
   c) La contraction musculaire 20
2. **Mise en place du muscle squelettique** 21
   a) La myogenèse 21
   b) La régulation génique de la myogenèse embryonnaire 23
3. **Les cellules satellites** 24
   a) Comportements des cellules satellites 25
   b) Implication des cellules satellites après la naissance 27

Chapitre 2 : La fusion cellulaire

1. **Généralités sur la fusion** 28
   a) Les étapes de la fusion au niveau cellulaire 29
   b) Les cellules aux capacités de fusion 30
      i. Les gamètes 30
      ii. Les cellules somatiques 31
2. **La régulation de la fusion dans le muscle squelettique** 36
   a) Reconnaissance et adhésion 36
   b) La dynamique du cytosquelette d'actine 37
   c) Le remodelage membranaire 42
   d) Autres mécanismes régulant la fusion 45
      i. Les régulateurs positifs de la fusion 45
      ii. Les régulateurs négatifs de la fusion 50

3. **La fusion dans un contexte physiologique et physiopathologique musculaire**
   a) La fusion au cours de la régénération……52
   b) La fusion au cours de l'hypertrophie……53
   c) La fusion dans les pathologies musculaires……57

Chapitre 3 : Le facteur de transcription Srf dans le muscle squelettique

1. **Les voies de signalisation et de régulation**……59
2. **Srf au cours du développement et de la myogenèse**……61
3. **Srf dans le muscle squelettique adulte**……62
   a) Invalidation de Srf dans les fibres musculaires adultes……62
   b) Invalidation de Srf dans les cellules satellites……64

Objectifs de la thèse……66

Résultats

Role of Srf in the mechanobiology of muscle cell fusion……71

Discussion et perspective……97

1. **Pourquoi la surexpression de MLC2 n'a pas d'effet sur la viscoélasticité globale des cellules dépourvues de Srf ?**……99
   a) Rôle de la F-actine corticale……99
   b) Méthodes alternatives pour évaluer la rigidité……100
   c) Effet localisé de MLC2 au niveau de la cellule……102
2. **Effet de la surexpression de MLC2 sur la fusion et la croissance musculaire *in vivo***……102
3. **Défaut de fusion dans les CS KO pour Srf : une potentielle implication des fusogènes Myomaker et Myomixer ?**……103
4. **La composition lipidique des CS dépourvues de Srf pourrait affecter leur fusion**……104
5. **La perméabilité de la membrane et fusion – implication de MLC2 ?**……105

Annexes……106

- Tableau des 144 gènes communs différentiellement exprimés
- Publication

Bibliographies……157

Listes des principales abréviations

AA: Acide Aminé
ACER3 : Alkaline Ceramidase 3
ADIPOR : adiponectin receptor
ADN: Acide désoxyribonucléique
AFF-1 : Anchor cell fusion failure-1
APC : adenomatous polyposis coli
Arp2/3: Actin Related Protein 2/3
ASCT 1/ 2 Alanine/serine/cysteine transporter 1/ 2
ATP11A: ATPase Phospholipid Transporting 11A
Bai : Brain-specific angiogenesis inhibitor 3

bHLH: basic Helix-loop-helix

βTRCP : transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
C1qL4 : Complément C1q Like 4

CalcR : Calcitonin Receptor

Cdh: cadhérine
CFZS: syndrome de Carey-Fineman-Ziter

Cre-ERT2 : Cre-Estrogen receptor 2

CS : Cellule Satellite
CSA : Cross section area
DC-STAMP : Dendritic cell-specific transmembrane protein
DMD: Duchenne muscular dystrophy
DOCK : dedicator of cytokenesis
Dsh : Disheveled

DTA : Diphtheria Toxin A

Duf: Dumbfounded
Dyn : Dynamine
EFF-1 : epithelial failure-1
Ehd2: EH Domain Containing 2

ELK1: ETS Transcription Factor 1

ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FAPS: Fibro/adipogenic progenitors
FC : Founder cell
FCM : Fusion competent myoblast
FKHR : Forkhead in human rhabdomyo-sarcoma
FOXO1 : Forkhead box-O1
GCPR : G protein-coupled receptor
GEF: Guanine nucleotide exchange
GRAF1 : GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase-1
GSK3 : glycogen synthase kinase-3β
H&E : hematoxyline and eosine
Hbs: Hibris
HIIT: high-intensity interval training:
HSA: Human skeletal α-actin
IEG: immediate early genes
IL-4 : Interleukin-4

Jam b/c/2a/3b: Junctional adhesion molecules b/c/2a/3b

Kirrel: Kirre Like Nephrin Family Adhesion Molecule

Klf: Kruppel-like fators

LRP : lipoprotein receptor-related protein

M-Cad : Muscle Cadherins

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

MADS: MCM1-Agamous-Deficiens-SRF

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MET : Microscopie électronique à Transmission

miRNA: micro Ribonucleic Acid

MLC2 : Myosin Light Chain 2

MND: Myonuclear Domain

MRF : Myogenic Regulatory Factor

Mrft: Myocardin-related transcription factor

MTJ: myotendinous junction

mTORC: Mammalian Target Of Rapamycin Complex

Mut : mutant

Mut/ Act+ : mutant surexprimant l'actine

Mut/ Act+/ MLC2+ : mutant surexprimant

Mut/ MLC2+ : mutant surexprimant MLC2 et l'actine

My11 : Myosin 11

Myf5: Myogenic factor 5

MYHC : Myosyn Heavy Chain

MyLC1 : myosin light chains 1

MyLC3 : myosin light chains 1

Mymk : Myomaker

Mymx : Myomerger/ Myomixer/ Minion

MyoD : Myoblast Determination Protein 1

MyoG : Myogenin

N-cad: Neural Cadherins

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

Nfix : Nuclear factor 1 X

NLS: Nuclear localization sequence

Nmj: Neuromuscular junction

Pax3/7 : Paired-box 3/7

PG : Prostaglandin

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinases

PKBα : protéine kinase B α

POWER: Progressive resistance voluntary wheel running

PS : Phosphatidylsérine

Rac1: Rac Family Small GTPase 1

RANKL: (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

Ras: Rat Sarcoma Virus

RhoA: Ras Homolog Family Member A

Rst: Roughest

SMAD2/3: Mothers against decapentaplegic homolog

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SnS : Sticks and stones

SRE: Serum Response Element

Srf : Serum response factor

Syn 1/2/A/B :

TA : Tibialis Anterior

TCF: Ternary Complex Factors

TCF/LEF : T cell factor/lymphoid enhancer factor family

TGF-ß1: Transforming growth factor beta 1

TNFα : Tumor necrosis factor

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1

VLA-4 : very late activation antigen 4

WASP: Wiskott–Aldrich syndrome protein

WAVE: WASP-family verprolin-homologous protein

Wnt : Wingless/Integrate

Résumé

Le muscle squelettique adulte possède une grande plasticité. Il peut adapter sa masse aux différentes contraintes qu'il reçoit de son environnement et se régénérer après une blessure. Cette plasticité repose en grande partie sur les cellules souches musculaires adultes (cellules satellites ou CS). Quiescentes à l'état basal, les CS s'activent après une blessure ou une surcharge mécanique, se divisent, se différencient et fusionnent pour former de nouvelles myofibres ou pour enrichir les fibres en croissance avec des nouveaux noyaux. Par conséquent, la régénération et la croissance des fibres musculaires dépendent toutes deux de la fusion des CS.

Srf est un facteur de transcription dont les gènes cibles régulent l'organisation du cytosquelette d'actine et nous avons montré qu'il est un régulateur majeur de la fusion des CS. En effet, Srf n'était pas essentiel pour la prolifération et la différenciation des CS mais il était requis pour leur fusion. Les CS dépourvues de Srf étaient incapables de fusionner et les protrusions en forme de doigts composées d'actine étaient absentes au site de fusion. Le maintien de l'architecture d'actine dans les CS mutantes pour Srf, restauré par la surexpression d'actine, peut rétablir la fusion altérée entre une cellule mutante et une cellule contrôle mais pas la fusion entre deux mutantes, ce qui suggère que d'autres gènes cibles de Srf sont impliqués.

Nous avons utilisé des modèles génétiques de défaut de fusion homotypique (des CS mutantes pour Srf (Mut), et des CS mutantes pour Srf surexprimant l'actine (Mut/ Act+)) pour découvrir de nouveaux gènes et voies de signalisation qui peuvent rétablir la fusion et fournir un aperçu sur les mécanismes de fusion des cellules musculaires des mammifères. Nous avons d'abord montré que Srf n'était pas nécessaire au mélange des membranes (hémifusion) et que Srf agissait après l'hémifusion dans le processus de fusion. De plus, nous avons démontré que les CS Mut et Mut/ Act+ étaient moins rigides que les cellules contrôles et nous avons réussi à restaurer partiellement la fusion des CS en augmentant la rigidité de la membrane par un choc osmotique hypotonique. Parmi les gènes cibles de Srf, un des gènes qui a retenu notre attention est *MLC2* qui régule la contractilité cellulaire et peut être impliqué dans le contrôle de la rigidité cellulaire. Nous avons montré que l'expression de MLC2 était diminuée dans les CS Mut et avons montré son rôle fonctionnel dans la fusion par des expériences d'inhibition de la contractilité en utilisant la Blebbistatine. De manière intéressante, la surexpression de *MLC2* dans les CS

Mut et Mut/ Act+ a partiellement restauré leur fusion dans des proportions similaires à celles observées après un choc osmotique hypotonique, suggérant ainsi que la tension membranaire est nécessaire à la fusion des CS. Enfin, la surexpression de *MLC2 in vivo* dans les muscles *Tibialis Anterior* (*TA*) Mut et Mut/ Act+ après régénération a également eu un effet bénéfique sur la croissance des fibres et sur l'accrétion des noyaux. Dans l'ensemble, ces résultats nous ont permis d'identifier *MLC2*, la contractilité cellulaire et la rigidité de la membrane comme de nouveaux acteurs potentiels de la fusion des myoblastes agissant en aval de Srf.

Titre : Rôle de Srf dans le contrôle de la fusion des myoblastes

Mots-clés : Srf, MLC2, pMLC2, cellule satellite, rigidité, contractilité, actine

Abstract

Adult skeletal muscle has great plasticity. It can adapt its mass to the different stresses it receives from its environment and regenerate following an injury. This plasticity is largely based on adult muscle stem cells (satellite cells or SC). Normally quiescent in the basal state, muscle stem cells activate after injury or mechanical overload, divide, differentiate and fuse to form new myofibers or to supplement growing fibers with nuclei. Therefore, repair and growth of multinucleated skeletal muscle cells both depend on the fusion of SC.

Srf is a transcription factors whose target genes regulate actin cytoskeleton organization and we have shown that it is a major regulator of satellite cell fusion. Indeed, Srf was not essential for SC proliferation and differentiation but was required in SC fusion propensity. SC lacking Srf were unable to fuse and actin-based finger-like protrusions were absent at their site of fusion. Maintenance of the actin architecture in Srf mutant SC, restored by actin overexpression, can reestablish the deficient fusion between a mutant and a control cell but not the fusion between two mutants, suggesting that additional Srf target genes are involved.

We used genetic models of defective homotypic fusion (Srf mutant SC (Mut), and Srf mutant SC overexpressing actin (Mut/ Act+)) to decipher new genes and pathways that can restore fusion and provide insight into the mechanisms of mammalian muscle cell fusion. We first showed that Srf was not necessary for membrane mixing and that Srf acted after hemifusion in the fusion process. Moreover, we demonstrated that Mut and Mut/ Act+ SC were less rigid than control cells and we succeeded to partially restore SC fusion by increasing membrane rigidity through a hypotonic osmotic shock. Among Srf target genes, one of the genes that caught our interest was *MLC2* that regulates cellular contractility and may be involved in the control of cell rigidity. We showed that MLC2 expression was decreased in Mut SCs and showed its functional role in fusion by contractility inhibition experiments using Blebbistatin. Interestingly, the overexpression of *MLC2* in Mut and Mut/ Act+ SC partially restored their fusion to similar extend to that observed following hypotonic osmotic shock, further suggesting that membrane tension in necessary for SC fusion. Finally, the overexpression of *MLC2 in vivo* in Mut and Mut/ Act+ *Tibialis Anterior* (*TA*) muscles after regeneration had also a beneficial effect on fiber growth and on nuclei accretion. Altogether, these finding allowed us to identify *MLC2*,

cellular contractility and membrane rigidity as potential new players of myoblast fusion acting downstream Srf.

Title: Role of Srf in the control of myoblasts fusion

Key words: Srf, MLC2, pMLC2, satellite cell, rigidity, contractility, actin

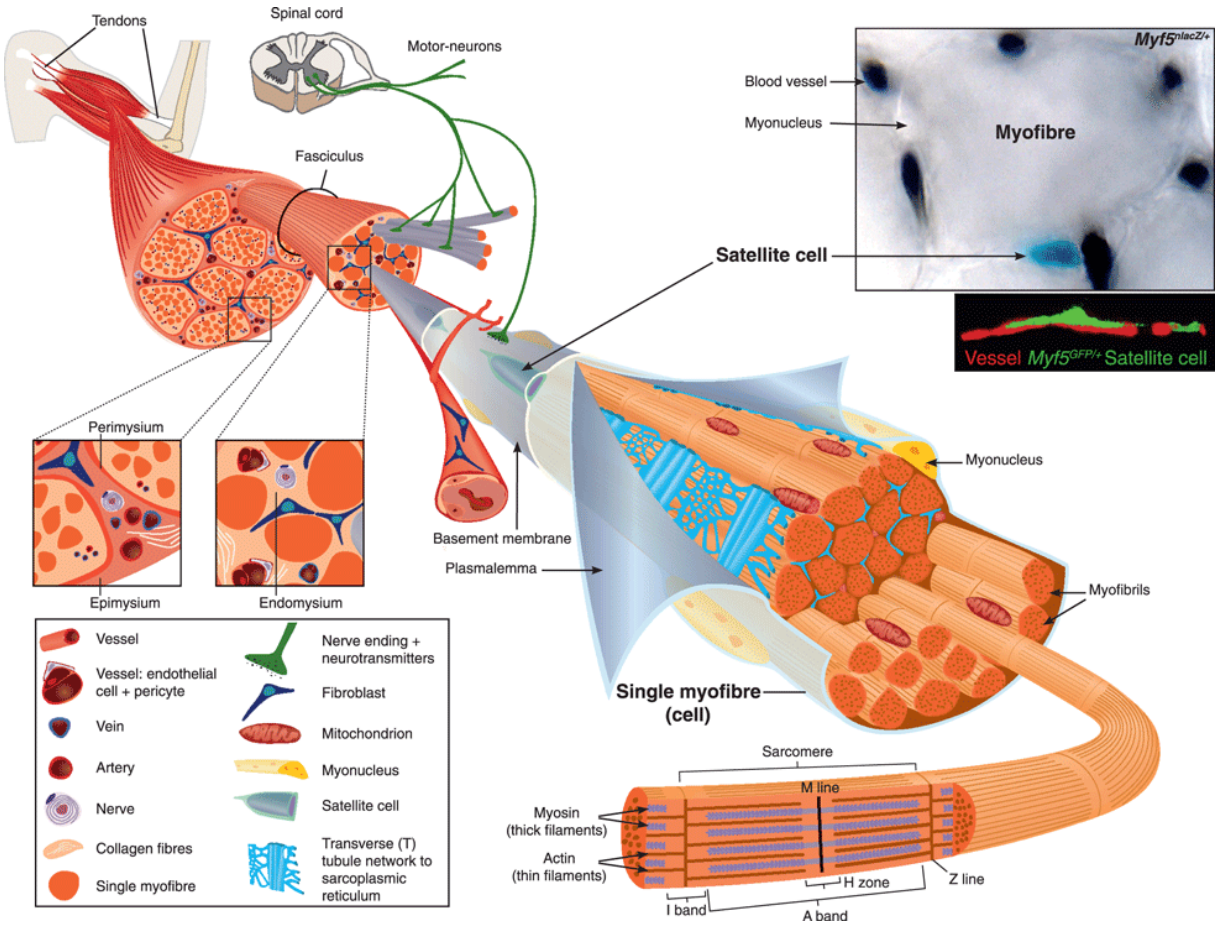
Introduction

Chapitre 1 : Le muscle squelettique et les cellules souches embryonnaires

1. Caractéristiques générales

a) Le tissu musculaire squelettique

Chez l'homme, le muscle squelettique représente environ 40% du poids corporel total, il contient 50 à 75% des protéines corporelles et possède 30 à 50% du turn-over protéique corporel (Frontera and Ochala, 2015). Ce tissu est hautement organisé (Figure 1), composé de faisceaux musculaires, eux-mêmes composés d'un ensemble de fibres musculaires appelés myofibres. Chaque muscle est relié à l'os via des tendons constitués en majorité par du tissu fibreux, élastique et solide. Chaque niveau d'organisation du muscle - muscle-faisceaux-myofibre - est successivement encapsulé par du tissu conjonctif appelé respectivement endomysium, épimysium et périmysium. Ce dernier est parcouru de structures nerveuses et vasculaires apportant au tissu musculaire l'innervation, les nutriments et l'oxygène nécessaires à son bon fonctionnement. Le muscle squelettique contribue également au maintien d'un métabolisme énergétique basal, sert de lieu de stockage pour d'importants substrats tels que les amino-acides et les carbohydrates, contribue à la production de chaleur corporelle et consomme la majorité de l'oxygène durant les activités physiques. L'unité fonctionnelle du muscle est la myofibre, une cellule post-mitotique et multinucléée. Elle contient des myofibrilles (dont les plus abondants sont l'actine et la myosine) qui, assemblées de manière très ordonnée, forment des sarcomères, unité de base contractile du muscle squelettique. C'est sur ce système contractile que repose la contraction du muscle squelettique permettant la production de mouvement volontaire. Ce tissu est aussi le lieu de résidence de populations cellulaires très diversifiées telles que les macrophages résidents, les progéniteurs fibro-adipogéniques, les cellules endothéliales et les cellules souches musculaires nommées cellules satellites (CS) qui sont au cœur de la plasticité musculaire.



Figue 1 : Schéma du muscle squelettique et de ses structures associées (Tajbakhsh, 2009).

b) Les différents types de myofibre

Le corps humain contient des muscles squelettiques très hétérogènes dus à la diversité du contenu biochimique, mécanique et métabolique des myofibres. Cette diversité de myofibres au sein d'un même muscle reflète sa capacité d'adaptation à différents types d'activités imposées par le motoneurone ainsi que sa capacité à participer à des activités ayant diverses demandes métaboliques et mécaniques. Les myofibres sont classées en utilisant différents critères :1) la couleur des myofibres corrélant avec le contenu en myoglobine, 2) les propriétés contractiles des unités motrices en réponse à une stimulation électrique, 3) la vitesse de raccourcissement lors d'une seule contraction (rapide vs lent), 4) le degré de fatigabilité lors d'une activité prolongée (fatigable vs résistant à la fatigue), 5) la prédominance de certains métabolites ou de voies métaboliques (oxydative vs glycolytique), 6) la réaction des marquages histo-enzymatique basée principalement sur les technique de marquage de l'ATPase mais aussi des enzymes oxydatives telles que la succinate déshydrogénase ou SDH, 7) l'utilisation du

calcium par le réticulum sarcoplasmique (lente ou rapide), 8) l'expression de différentes isoformes de protéines (Schiaffino and Reggiani, 2011). Les fibres musculaires sont plus communément classées selon l'isoforme de myosine qu'elles expriment. La myosine MYH7 des fibres de type I, aussi appelées fibres lentes, est caractérisées par une vitesse de contraction lente, une haute densité en capillaire, une grande quantité de mitochondries et d'enzymes oxydatives (métabolisme anaérobique) permettant une grande résistance à la fatigue. La myosine MYH2 pour les fibres de type IIA, la myosine MYH4 pour les fibres de type IIB et la myosine MYH1 pour les fibres de type IIX sont regroupées sous le terme fibres de type II ou fibres rapides. Elles sont caractérisées par une vitesse de contraction plus ou moins rapide (en fonction de l'isoforme exprimée), un haut potentiel glycolytique, un métabolisme anaérobique, une grande rapidité à générer de l'ATP et une plus grande fatigabilité (Figure 2).

	Fibres de type I	Fibres de type IIa	Fibres de type IIx	Fibres de type IIb
Myosine exprimée	MYH7	MYH2	MYH1	MHY4
Temps de contraction	Lente	Modérément rapide	Rapide	Très rapide
Résistance à la fatigue	Haute	Assez haute	Modérée	Faible
Métabolisme utilisé	Aérobique	Anaérobique	Anaérobique	Anaérobique
Densité mitochondriale	Très haute	Haute	Moyenne	Basse
Densité capillaire	Haute	Intermédiaire	Basse	Basse
Capacité oxydative	Haute	Haute	Modérée	Basse
Propriétés	Consume de l'acide lactique	Produit de l'acide lactique et de la créatinine phosphate	Consume de la créatinine phosphate	Consume de la créatinine phosphate

Figure 2 : Caractéristiques des différents types de fibres.

c) La contraction musculaire

La myosine est le principal moteur moléculaire de la myofibre et un total de 11 gènes codant pour différentes isoformes de myosine sarcomérique ont été décrits chez le mammifère. Deux de ces gènes sont aussi exprimés dans le muscle cardiaque.

Le sarcomère et le sarcoplasme contiennent de nombreuses autres protéines qui contribuent au cytosquelette, au couplage du processus excitation et contraction, à la libération d'énergie, et à la génération de force et de la puissance. De manière non négligeable, les protéines régulatrices, telles que le complexe troponine calcium-dépendant (comprenant les troponines C, I et T) et la tropomyosine, associées au filament d'actine, jouent un rôle très important dans le processus d'activation qui conduit au glissement des myofilaments et à la génération de force (Figure 3). D'autres protéines contribuent aux propriétés mécaniques et physiologiques musculaires tels que la titine et la nébuline (Monroy et al., 2012)(Ottenheijm and Granzier, 2010). La titine est une grande protéine élastique qui s'attache à la bande Z du sarcomère et à la myosine aidant à la stabilisation et l'alignement des filaments épais. La nébuline, d'un autre côté, est intégrée avec d'autres protéines aux filaments fins contenant l'actine. Ces protéines contribuent à l'intégrité du sarcomère, influencent les caractéristiques de tension passive et de rigidité des cellules individuelles, et peuvent être pertinentes pour l'assemblage des myofibrilles et la signalisation cellulaire. Le disque Z du sarcomère contient plusieurs protéines dont l'α-actinine et sert de point d'attache pour le myofilament d'actine. D'autres protéines relient le disque Z (par exemple la desmine) au sarcolemme et à la matrice extracellulaire et peuvent être dysfonctionnelles dans certaines myopathies.

La myofibre génère de la force grâce au mécanisme de glissement des filaments constituant le sarcomère (Figure 3). La force générée par les ponts actine-myosine est transmise longitudinalement et latéralement dans la fibre. Le mouvement est produit lorsque la force atteint la jonction myotendineuse, les tendons et les articulations et chaque mouvement nécessite la consommation d'ATP.

L'ATP se lie à son site de liaison sur la tête de la myosine. L'ATPase, également située au niveau de la tête de la myosine, hydrolyse l'ATP, ce qui produit de l'ADP et du Pi ce qui entraîne le détachement du pont actine-myosine existant. La tête de myosine bascule et se lie à une nouvelle molécule d'actine. La libération de Pi déclenche un coup de force et la myosine pousse le filament d'actine à la dépasser. La force est générée pendant ce coup

de force. À la fin du coup de force, l'ADP est libéré et la myosine reste liée à l'actine en position statique.

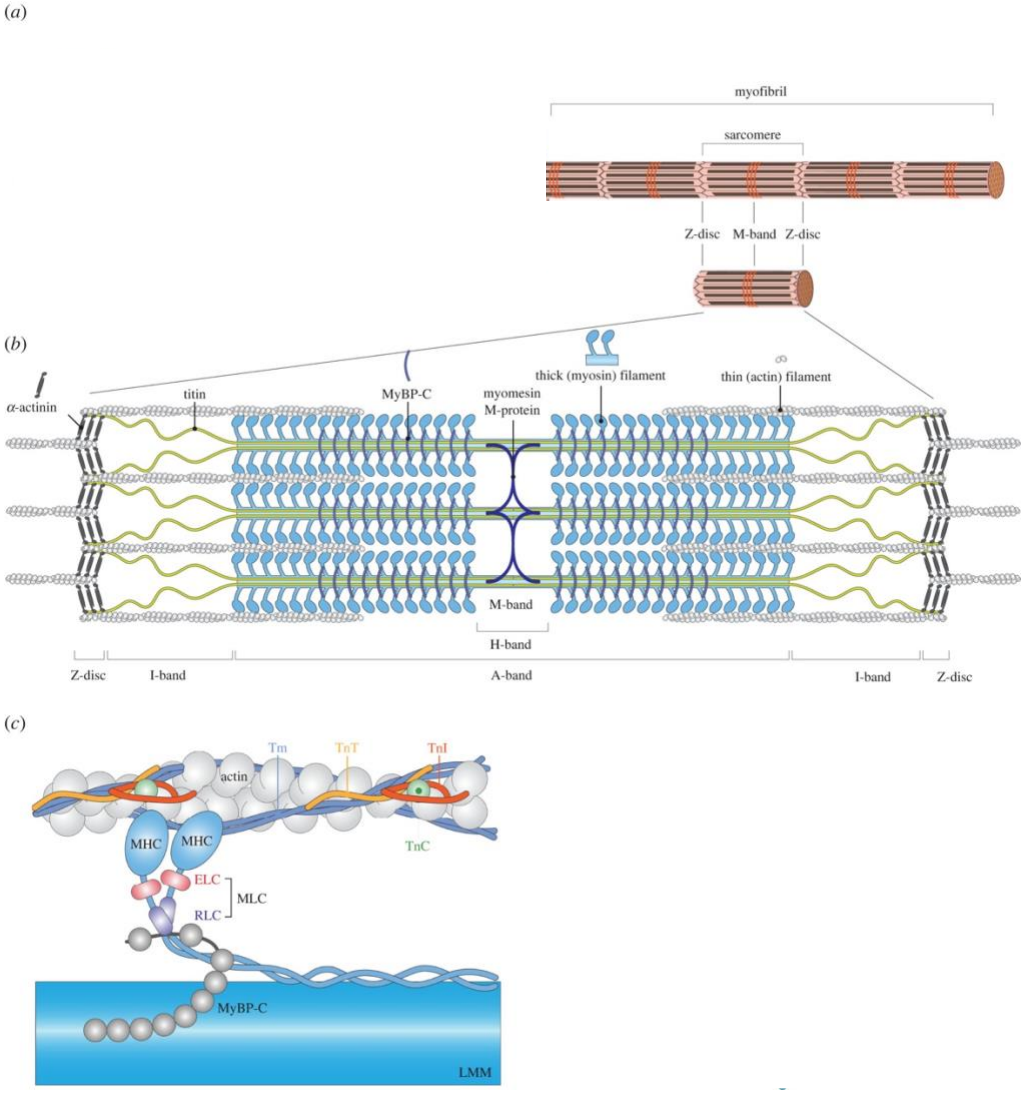


Figure 3 : Structure supportant la force musculaire contractile. (a) Schéma d'une myofibrille, (b) structure d'un sarcomère et (c) structure détaillée d'un filament fin et épais (Ahmed et al., 2022).

2. Mise en place du muscle squelettique

a) La myogenèse

Le muscle squelettique tient son origine des somites, groupes cellulaires résultant de la compaction du mésoderme paraxial se formant au cours de la somitogenèse à E8. Suite à l'action de gènes impliqués dans la voie Notch/Wnt, les somites vont se diviser en deux parties : une partie dorsale qui va subir une transition épithélio-mésenchymateuse aboutissant à la formation du sclérotome mésenchymal contenant les précurseurs des os et du cartilage et une partie ventrale devenant le dermomyotome (lui-même divisé en

deux parties : épaxial et hypaxial) qui donnera naissance aux muscles profonds du dos et intercostaux, abdominaux et aux muscles des membres (Revue de Grefte et al., 2007). Durant la myogenèse embryonnaire, le myotome primaire va se former en tant que masse cellulaire situé entre le dermomyotome dorsalement et le sclérotome ventralement. De cette structure va émerger des cellules progénitrices exprimant Pax3 qui vont s'allonger le long de l'axe antéro-postérieur. De plus en plus de cellules vont s'ajouter au myotome pour fusionner à ces cellules progénitrices conduisant à la formation de myofibres, appelées myofibres primaires, qui vont s'étendre jusqu'à atteindre le tendon. La myogenèse va progresser par vagues : la première de E10,5 à E12,5 et la seconde vague 14,5 à E17,5 chez la souris (Biressi et al., 2007)(Revue de Stockdale, 1992). La première vague, va permettre la formation de myofibres primaires exprimant les chaines lourdes (MyHC) lentes et légères (MyLC1, My11) de myosine (Kelly et al., 1997) ainsi que les bourgeons de membres. Ces myofibres primaires vont servir de charpentes pour les futurs muscles adultes (Murphy and Kardon, 2011). Pendant la seconde vague de myogenèse, une sous-population de progéniteurs exprimant Pax3 vont commencer à exprimer Pax7 et baisser l'expression de Pax3. Ces progéniteurs exprimant Pax7 vont fusionner entre eux ou avec les myofibres primaires et donner naissance à des myofibres secondaires ou fœtales exprimant la B-énolase, Nfix ou MyLC3. A ce moment, les fibres commencent aussi à exprimer les formes rapides de MyHC. Pendant la myogenèse secondaire, la croissance musculaire se fait essentiellement par fusion cellulaire et par l'addition de noyaux (White et al., 2010). Une sous-population de progéniteurs Pax7$^+$ vont constituer le pool de cellules souches musculaires adultes, les cellules satellites (Figure 4).

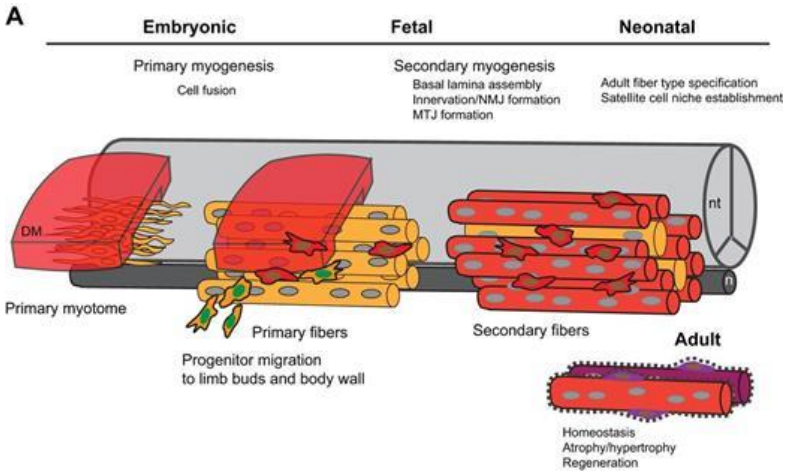


Figure 4 : Les différents stages de la myogenèse squelettique de l'embryon à l'adulte (Chal and Pourquié, 2017).

b) La régulation génique de la myogenèse embryonnaire

Pendant le développement embryonnaire, des molécules spécifiques sont nécessaires pour débuter le programme myogénique. Les MRFs pour Myogenic Regulatory Factor, composés notamment par MyoD, Myf5, Myogénine (MyoG) et MRF4 (aussi connu comme Myf6) ont été découverts et montrés comme étant capable de contourner le programme naturel de régulation génique d'une cellule non-musculaire vers une cellule de type myogénique (Braun et al., 1989), (Wright et al., 1989). Ces MRFs sont des facteurs de transcription de la famille des protéines à hélice-boucle-hélice (bHLH), se fixant sur des séquences spécifiques d'ADN, les boites E (CANNTG), pour induire l'expression de leur gène cible.

Les MRFs sont exprimés uniquement dans la lignée musculaire squelettique et ont été définis comme des éléments clés dans la régulation du développement du tissu musculaire squelettique. Au cours de la myogenèse, chaque facteur possède un pattern d'expression distinct s'étendant de la formation du muscle pour certains à la différenciation pour d'autres (Figure 5).

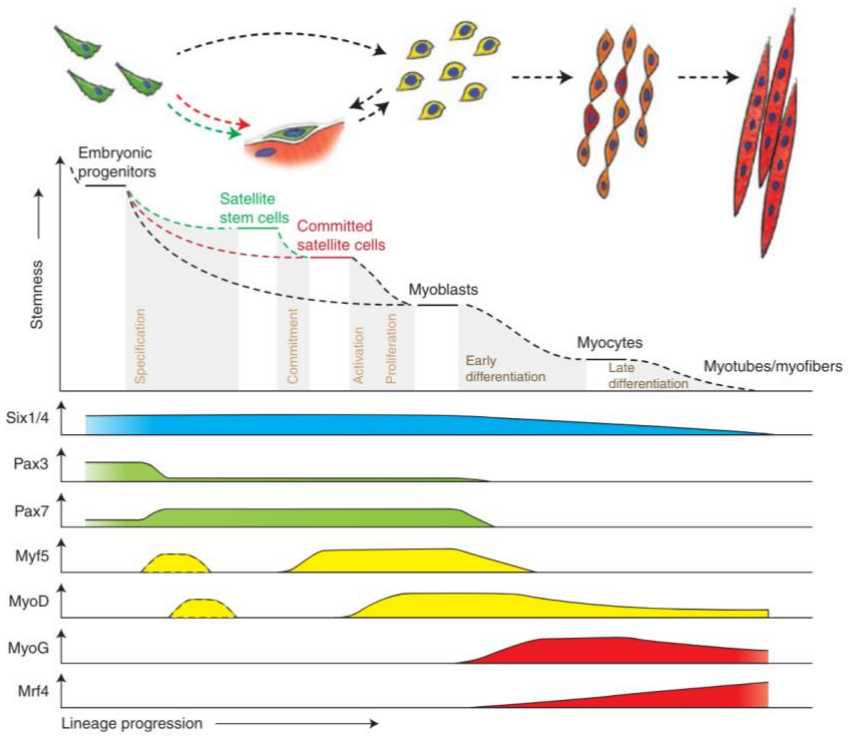


Figure 5 : Hiérarchie des facteurs de transcription régulant l'avancée du programme myogénique (Bentzinger et al., 2012).

Des molécules ont été découvertes en amont de la voie de régulation des MRFs, les facteurs de transcription à homéodomaine, Pax3 et Pax7, définissant la population des progéniteurs durant tous les stages de formation musculaire squelettique (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Ces facteurs de transcription sont d'une importance majeure étant donné que leurs absences entrainent de sévères problèmes développementaux (Revue de Buckingham, 2007).

D'autres facteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la myogenèse via leur lien au MRFs: la famille des Six (Sine oculis), codant pour des facteurs de transcription induisant l'expression de gènes tels que la Myogénine et MyoD (Grifone et al., 2005). Le Serum response factor (Srf), un autre facteur de transcription, joue un rôle important dans la myogenèse, rôle qui sera développé dans un chapitre lui étant consacré (chapitre 3).

3. Les cellules satellites

Les CS sont les cellules souches spécifiques du muscle squelettique adulte qui après activation, vont participer activement à la plasticité musculaire adulte. Elles ont été découvertes et identifiées pour la première fois par Mauro. A en 1961 (Mauro, 1961) et sont localisées entre la lame basale et la fibre musculaire. Elles résident dans un état quiescent G_0 dans le muscle en repos. Depuis la découverte des CS, de nombreux marqueurs ont été découverts pour les identifier comme Myf5, α7-integrine, CD34, VCAM1, le récepteur à la calcitonine (CALCR) et le plus communément utilisé, Pax7 (Zhou et al., 2022).

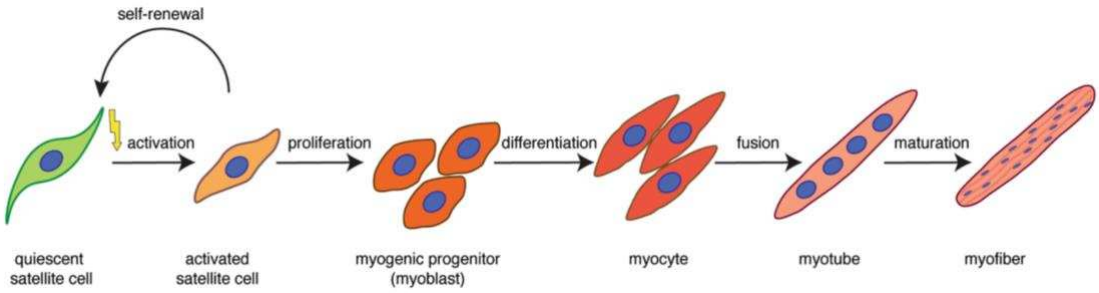


Figure 6 : Progression du lignage myogénique (Schmidt et al., 2019).

Après activation par un stimulus, elles vont quitter leur état de quiescence pour entrer dans le programme myogénique où elles vont proliférer, se différencier et fusionner entre elles pour former un myotube qui maturera en myofibre (Figure 6).

À la naissance, les CS se divisent activement et représentent jusqu'à 30 % des cellules mononucléées dans le tissu musculaire de la souris (Allbrook et al., 1971). Cependant, dans les deux mois suivant la naissance, le nombre de CS est réduit à un petit groupe qui ne représentent qu'un faible pourcentage (5%) des cellules mononucléées dans le muscle adulte (Allbrook et al., 1971)(Cardasis and Cooper, 1975)(Schmalbruch and Hellhammer, 1976).

a) Comportement des cellules satellites

Comme mentionné précédemment, en absence de stimulation, les CS sont en quiescence, c'est-à-dire dans un état de dormance, hors du cycle cellulaire. Ces cellules quiescentes expriment Pax7 et reposent dans un environnement favorisant cet état de dormance nommé niche. Dans cette niche, les CS vont exprimer Pax7 ainsi que d'autres gènes tels que ceux de la voie Notch, WNT, CALCR qui vont maintenir les CS en quiescence en inhibant MyoD1 et préservant Pax7 (Bjornson et al., 2012)(Olguin and Olwin, 2004), (Fukada et al., 2007)(Yamaguchi et al., 2015), (Sousa-Victor et al., 2022) (Figure 7). Les CS vont aussi établir avec leur niche des jonctions adhérentes composées de M-Cad et N-Cad (Muscle et Neural Cadherins) qui vont contribuer à la quiescence. La double délétion de ces protéines mène à une perte de quiescence provoquant une entrée anormale des cellules dans le cycle cellulaire et leur fusion à la myofibre (Goel et al., 2017).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la quiescence des CS comme les gènes de la famille *FoxO*. Leurs délétions induisent la perte de quiescence ainsi que l'activation spontanée des CS (Gopinath et al., 2014), (García-Prat et al., 2020).

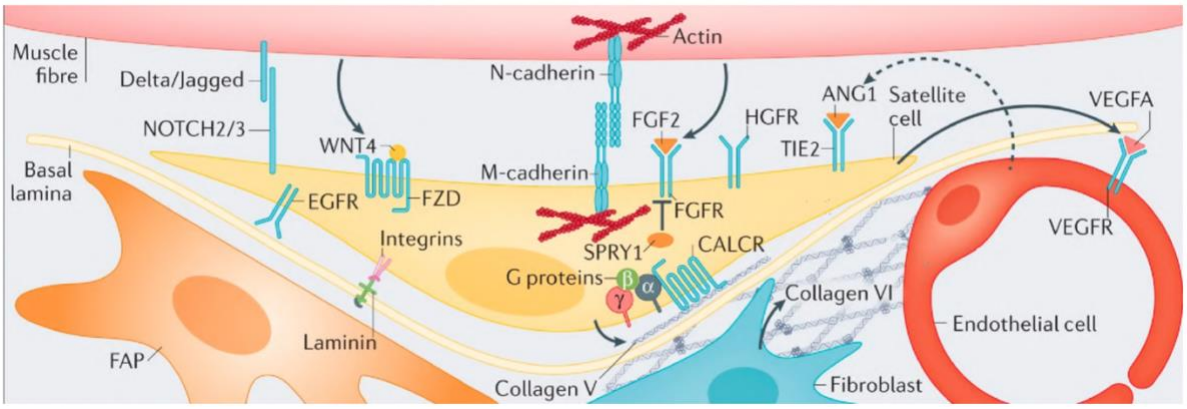


Figure 7 : Les cellules satellites dans leur niche de quiescence (Sousa-Victor et al., 2022).

En réponse à divers signaux environnementaux et signaux chimiques, les CS vont sortir de leur état de quiescence et s'activer pour s'engager par la suite dans le programme myogénique. Un état de pré-activation, appelé « G-alert » a été identifié et défini comme un état de pré-activation permettant aux CS d'entrer plus rapidement dans le cycle cellulaire, état dépendant de la signalisation de mTORC1 (voir plus bas) (Rodgers et al., 2014), (Machado et al., 2017). La sortie de quiescence des CS va induire la répression des voies de quiescence et l'activation de la voie PI3K-AKT-mTORC1 (Wang et al., 2018), (Rodgers et al., 2014). PI3K est nécessaire et suffisant pour déclencher l'activation des CS quiescentes tandis que mTORC1, un effecteur en aval de PI3K, médie les effets de celui-ci dans la CS. En effet, la délétion de *Rptor* dans les CS, un composant indispensable du complexe mTORC1, perturbe l'activation des CS *in vivo* et *in vitro* (Rion et al., 2019).

Suite à cette activation, les CS vont effectuer des divisions symétriques et asymétriques pour accroitre le pool de CS pour de futures activations et pour produire des progéniteurs myogéniques (myoblastes) participant au remodelage musculaire tout en repeuplant le pool de CS (auto-renouvellement) (Figure 8) (Le Grand et al., 2009), (Kuang et al., 2007), (Cossu and Tajbakhsh, 2007). Il a été montré que la division symétrique est médiée par la voie non canonique WNT7a qui, en collaboration avec la fibronectine, va se lier avec à FZD7 et le corécepteur de syndecan4 pour activer RAC1 et les RhoGTPases en aval (Le Grand et al., 2009), (Bentzinger et al., 2013).

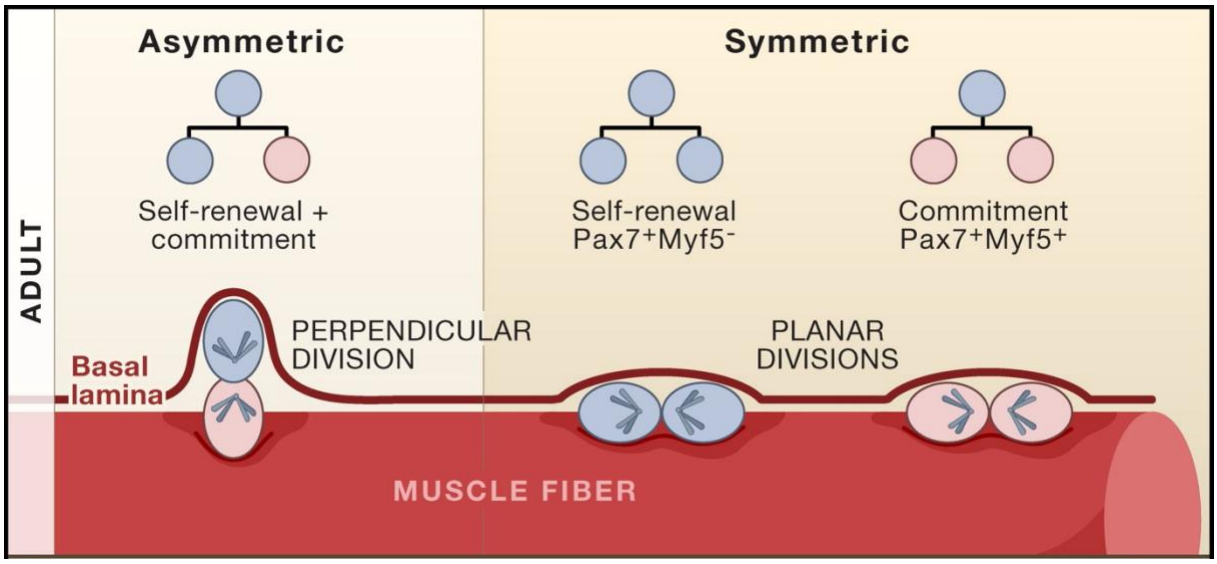


Figure 8 : Fusion symétrique et asymétrique des cellules satellites musculaires (Cossu and Tajbakhsh, 2007).

Les CS progressant dans le destin myogénique vont activer p38α/β de la voie des MAPK qui va agir à plusieurs niveaux en réprimant l'expression de Pax7 et en activant l'expression de MyoD et MEF2 pour induire la différenciation (Zetser et al., 1999) (Wu et al., 2000). De plus, MyoD va renforcer la sortie de cycle en induisant l'expression de la Myogénine, facteur clé de la différenciation (Peng et al., 2017), (Sousa-Victor et al., 2022). Par la suite, MyoD et MyoG vont agir de manière coordonnée pour activer MRF4 et terminer la différentiation (Singh and Dilworth, 2013). Ces cellules différenciées (myocytes) vont définitivement sortir du cycle cellulaire puis fusionner et former des myotubes qui vont ensuite exprimer les chaînes lourdes de myosine (MYHC) (Schiaffino et al., 2015). Le processus de fusion sera abordé plus en détail dans un chapitre qui lui est consacré (chapitre 2).

b) Implication des cellules souches après la naissance

Au cours du développement postnatal, la masse corporelle augmente rapidement ainsi que la taille des muscles squelettiques. L'augmentation de la taille des muscles est principalement due à l'augmentation de la surface de section transversale (CSA) et de la longueur des myofibres individuelles. Afin de faciliter la croissance rapide des myofibres, les CS se divisent activement et fusionnent avec les myofibres en croissance. Il a été formellement démontré depuis longtemps que les CS sont la principale source de myonuclei au cours du développement (Moss and Leblond, 1971). Jusqu'à ce que des études récentes prouvent le contraire, il était admis que l'accrétion nucléaire cessait à P21 chez la souris (White et al., 2010)(Lepper et al., 2009)(Stantzou et al., 2017), de nombreux arguments pointant dans cette direction (White et al., 2010)(Lepper et al., 2009)(Revue de Relaix and Zammit, 2012). Cependant, contrairement à White et collègues, d'autres groupes ont observé une augmentation du nombre de myonuclei après P21. Une étude a décrit de manière approfondie le comportement des CS pendant la croissance postnatale en utilisant des marqueurs myogénique (MyoG et MyoD) et de la prolifération à différents points temporels (Gattazzo et al., 2020). Ainsi, ils ont démontré que le pool de CS quiescentes était établi entre 7 et 8 semaines après la naissance, bien au-delà du moment précédemment décrit de P21.

Le début de la puberté est caractérisé par l'induction d'hormones sexuelles, la testostérone chez les mâles et l'estradiol chez les femelles (Ober et al., 2008). Il a été révélé que ces hormones sexuelles jouent un rôle dans l'établissement du pool des CS quiescentes (Kim et al., 2016). Dans cette étude, Kim et collègues ont démontré que les hormones sexuelles (à la fois les œstrogènes et les androgènes) peuvent induire la signalisation Notch dans les CS du cycle juvénile, les conduisant à un état quiescent. Enfin, ces auteurs ont établi que la perte d'hormones sexuelles (soit par une orchidectomie chirurgicale, soit par un antagoniste pharmacologique) entraîne une entrée en quiescence retardée jusqu'à l'âge de 8 semaines chez la souris. De plus, l'estradiol est important pour la survie des CS féminins, une ovariectomie entraînant une diminution du nombre de CS et des déficiences d'auto-renouvellement et de différenciation (Collins et al., 2019). Toutes ces études démontrent l'importance des hormones sexuelles et de la signalisation Notch non seulement pour établir la quiescence des CS, mais aussi pour la maintenir.

Chapitre 2 La fusion cellulaire

1. Généralités sur la fusion

La fusion est un processus biologique qui se traduit par le mélange de deux membranes en une seule couche lipidique permettant l'échange entre deux contenus cytoplasmiques. On distingue deux catégories de fusion : la fusion intracellulaire et la fusion cellule-cellule. La fusion intracellulaire permet le trafic de matériaux entre des compartiments cellulaires (transport vésiculaire) et l'élargissement de réseaux (réseau mitochondrial, le réticulum endoplasmique) (Figure 9). Il y a aussi le cas viral, où l'enveloppe des virus (virus enveloppés uniquement) fusionne avec les cellules entraînant l'infection de celles-ci. La fusion cellule-cellule, utilisant un mécanisme cellulaire plus complexe dû à la complexité des entités fusionnant, permet le mélange d'informations génétiques et le modelage des tissus pendant le développement (Figure 9). Dans les deux cas, la présence de protéines spécialisées dans le remodelage membranaire appelées fusogènes est essentielle pour induire la fusion (les SNAREs pour la fusion intracellulaire, Myomaker et Myomerger pour la fusion des myoblastes par exemple).

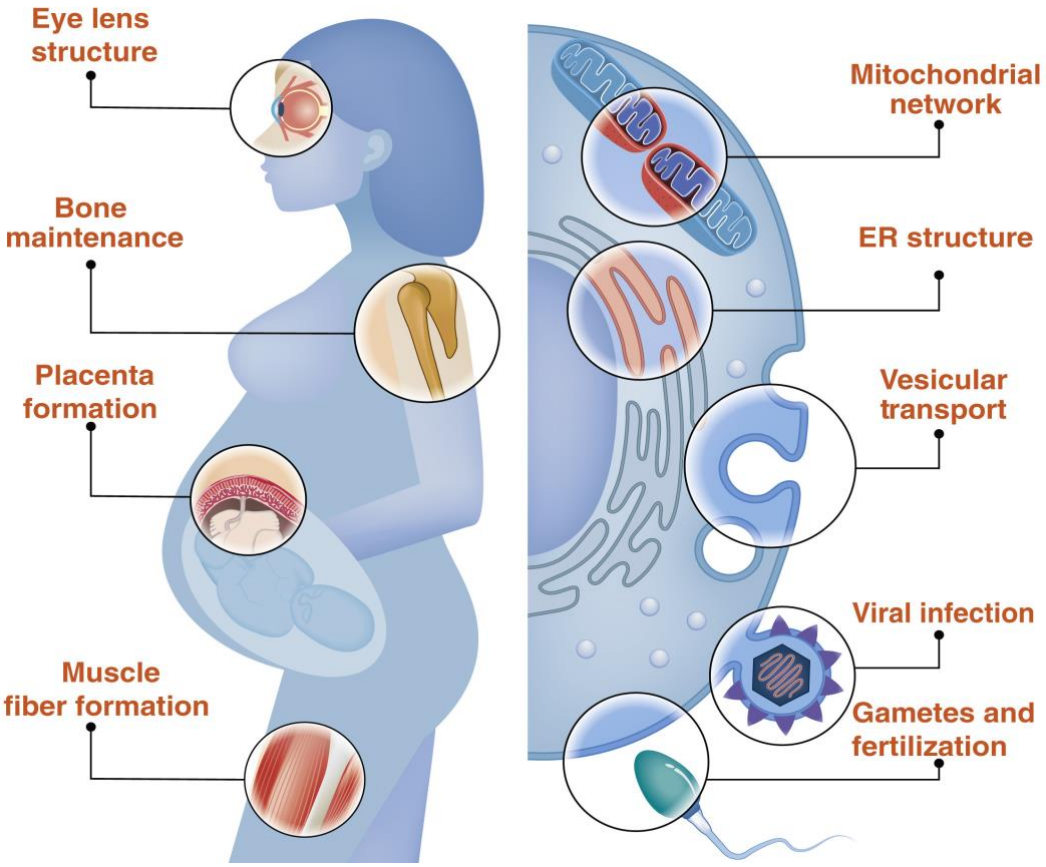


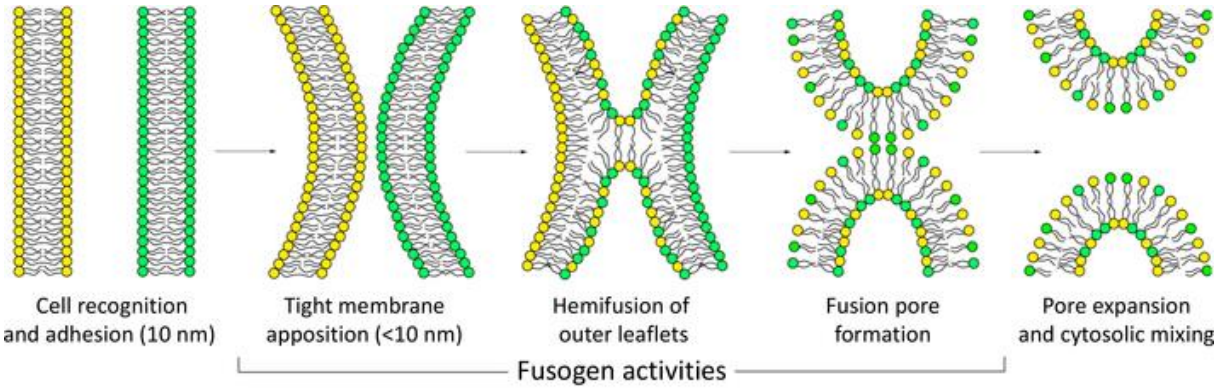
Figure 9 : Les fusogènes médient divers phénomènes physiologiques. (Segev et al., 2018)

a) Les étapes de la fusion cellule-cellule

La fusion est un processus séquentiel comprenant différents évènements : 1) la reconnaissance et l'adhésion des cellules qui sont nécessaires pour permettre la fusion entre des cellules du même type, le rapprochement des membranes à des distances de 10-30 nm et la formation des sites de fusion appelés synapses fusogéniques ; 2) l'hémifusion, produit transitoire de fusion, représentant le mélange des feuillets externes des bicouches lipidiques ; 3) la formation du pore de fusion, rupture de la membrane au lieu d'hémifusion créant un point d'entrée pour le cytoplasme des cellules ; 4) l'extension du pore et le mélange des cytoplasmes (Figure 10). On observe aussi entre la reconnaissance/adhésion et l'hémifusion un remodelage de l'actine renforçant le rapprochement des membranes avec la formation de structures à base d'actine au niveau de la synapse fusogénique ((Short, 2012), (Wang et al., 2014), (Oikawa and Matsuo, 2012), (revue de Chen, 2011), (Randrianarison-Huetz et al., 2018)). La fusion est un processus très contrôlé qui n'arrive que sous certaines conditions encore inconnues de nos jours. C'est un processus coûteux en énergie, possédant des barrières énergétiques élevées associées à la déformation des membranes, la formation du pore de fusion et à son

expansion (Chernomordik and Kozlov, 2003). Pour que la fusion devienne énergétiquement favorable, les membranes doivent surmonter les forces de répulsion générées par les phospholipides hydratés chargés et se mélanger avec une exposition minimale de leurs noyaux hydrophobes (Chernomordik and Kozlov, 2003). Seules des protéines spécifiques nommées fusogènes sont suffisamment complexes pour coordonner, exécuter et contrôler un tel événement. Les fusogènes sont les protéines qui agissent sur les membranes et font en sorte que la fusion se produise de manière contrôlée et régulée. Un fusogène doit : 1) être nécessaire pour la fusion, 2) être présent sur les membranes en fusion, au bon endroit, au bon moment, 3) être suffisant pour induire la fusion de membranes qui normalement ne devraient pas fusionner (Podbilewicz et al., 2006), (Oren-Suissa and Podbilewicz, 2007).

Le phénomène de fusion, primordial notamment dans le développement et la reproduction sexuelle, est à l'origine de la morphogenèse de nombreux tissus.



Figue 10 : Les étapes de la fusion des membranes cellulaires (Petrany and Millay, 2019).

b) Les cellules aux capacités de fusion

i. Les gamètes

Au cours de la reproduction, la fusion des gamètes est une étape nécessaire pour aboutir à la naissance d'une nouvelle forme de vie. HAP2, aussi connu comme GSC1, a été identifié comme étant la protéine responsable de la fusion des gamètes chez les protistes (microorganismes eucaryotes unicellulaires) (Liu et al., 2008), les plantes à fleurs (Mori et al., 2006) et les invertébrés (revue de(Hernández and Podbilewicz, 2017). C'est une protéine transmembranaire de type 1 fonctionnant dans les stades tardifs de la fusion des gamètes (Mori et al., 2006) et qui possède des similarités avec le fusogène EFF-1 (epithelial failure-1) ainsi que les fusogènes viraux de classe 2. L'expression de HAP2 dans

des cellules de mammifères hétérologues résulte en leur fusion. De plus, le remplacement chez le virus de la stomatite vésiculaire de sa glycoprotéine G virale (VSV-G) par HAP2 permet également son entrée dans les cellules. Ces données montrent par conséquent que HAP2 est par définition un fusogène (Valansi et al., 2017). Cependant, HAP2 est absent dans de nombreuses lignées eucaryotes tels que les nématodes, les fungi et les vertébrés. Pourtant, les gamètes de ces espèces réussissent à fusionner. Malgré le fait que les fusogènes impliqués soient encore inconnus, de nombreuses protéines se sont montrées importantes pour la fusion des gamètes comme Izumo1 et Juno chez les mammifères et Bouncer chez le poisson-zèbre où leur absence provoque une infertilité chez ces organismes ((Inoue et al., 2005), (Bianchi et al., 2014), (Herberg et al., 2018)).

ii. Les cellules somatiques

Les fusogènes sont aussi retrouvés dans plusieurs cellules somatiques qui vont aboutir à la formation de nouvelles lignées cellulaires ou de tissus. Chez *Caenorhabditis elegans*, la fusion cellulaire joue un rôle très important étant donné qu'un tiers des cellules somatiques générées pendant le développement passe par un programme de fusion cellulaire durant le développement embryonnaire et post-embryonnaire (Podbilewicz, 2000). Les fusogènes responsables de cela sont EFF-1 (epithelial fusion failure-1) (Mohler et al., 2002), une glycoprotéine de type 1 dont la structure atomique possède une homologie avec les protéines de fusions virales de classe 2 et son paralogue AFF-1 (Anchor cell fusion failure-1) (Sapir et al., 2007). EFF-1 permet la fusion de cellules dans l'épiderme, le pharynx, la vulve et l'utérus et une mutation de EFF-1 résulte en des anormalités dans le destin cellulaire des cellules non-fusionnées ainsi qu'une baisse de la fertilité (Mohler et al., 2002). AFF-1, quant à lui, médie la fusion de cellules épidermiques embryonnaires, de quelques myoblastes dans le pharynx et des cellules gliales entre autres (Sapir et al., 2007).

Chez les mammifères, au cours de la grossesse, va se développer le syncytiotrophoblaste, une cellule géante de plus de 10 milliards de noyaux et d'une surface d'environ $10m^2$ servant de barrière fœto-maternelle, résultante de la fusion des cytotrophoblastes. Cette fusion dépend de protéines endogènes d'origine rétrovirale, appelées Syncytine 1 (Syn1) et Syncytine 2 (Syn2) chez les primates et Syncytine A (SynA) et Syncytine B (SynB) chez les rongeurs (Revue de Pötgens et al., 2004). L'interaction de Syn1 et Syn2 avec leurs récepteurs, les transporteurs ubiquitaires d'acides aminés

neutres ASCT1 et ASCT2, déclenche la restructuration fusogénique. Cette fusion est accompagnée de la formation de protrusions (Wang et al., 2014) et de l'exposition de phosphatidylsérines (PS) à la surface cellulaire (Pötgens et al., 2004) et de AnXA5 (Degrelle et al., 2017), une protéine se liant au PS.

Les syncytines jouent également un rôle important dans l'homéostasie et le développement osseux, qui dépendent de la balance entre la formation osseuse par les ostéoblastes et la résorption osseuse par les ostéoclastes. Ces derniers sont générés par la fusion de précurseurs ostéoclastiques ou pré-ostéoclastes dérivant de la lignée des monocytes après une stimulation par le facteur de stimulation des colonies (M-CSF) et RANKL1 (Levaot et al., 2015). Il a été montré que Syn1 ainsi qu'une protéine transmembranaire spécifique des cellules dendritiques, DC-STAMP (Verma et al., 2018) étaient impliquées dans l'hémifusion des pré-ostéoclastes humains. De plus, l'étape de fusion dépend aussi de l'exposition de PS et de ses protéines associées ainsi que de la Dynamine 2 (Verma et al., 2014).

La fusion cellulaire intervient aussi dans la formation d'un des plus grands tissus de l'organisme : le muscle squelettique. Les divers travaux génétiques chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ont apporté des informations majeures permettant de mettre en évidence un modèle décrivant la fusion des myoblastes. Dans le cas de *Drosophila melanogaster*, on distingue deux populations distinctes : les cellules fondatrices (FC) et les myoblastes compétents pour la fusion (FCM), qui vont fusionner pour former les fibres musculaires. La particularité de la fusion des myoblastes chez la drosophile est que celle-ci se passe de manière asymétrique entre deux sous-populations de cellules différentes (FC et FCM), au comportement différent. Diverses protéines exprimées dans les FC vont induire la migration de ces cellules et leur interaction avec les protéines exprimées par les FCM va permettre leur association avec celles-ci. De plus, il a été souligné le rôle du réarrangement d'actine permettant de médier la fusion asymétrique entre les FC et les FCM. En effet, il a été découvert sur le site de fusion des structures riches en actine (Sens et al., 2010). Il a été proposé un modèle où la FCM forme des protrusions envahissant la FC opposée qui, en réponse, va former sous sa membrane un réseau d'actomyosine compacte créant une force de résistance facilitant l'invasion (Kim et al., 2015) (Figure 11).

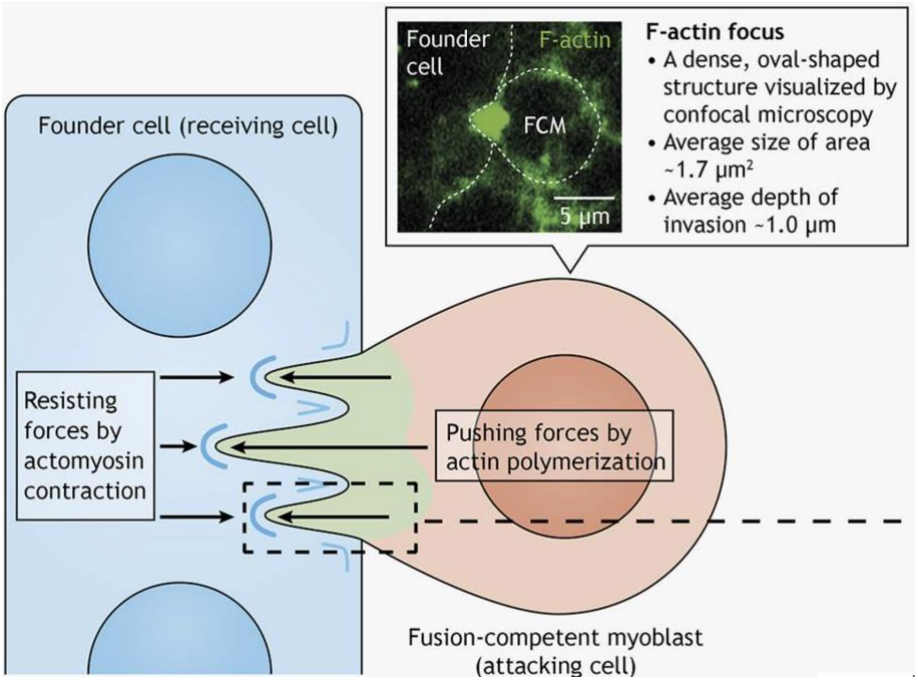


Figure 11 : La tension mécanique induit la fusion des myoblastes (Kim and Chen, 2019).

Cette hypothèse est partiellement soutenue par les évidences recueillies sur le système hétérologue chez les cellules de drosophile en utilisant EFF-1 comme fusogène (Shilagardi et al., 2013). Dans ce cas, EFF-1 (le fusogène de *C.elegans*) et Sns (Sticks and stones, une protéine d'adhésion) sont retrouvés accumulés au niveau des protrusions. Ces protrusions ont été visualisées par microscopie électronique (Shilagardi et al., 2013) et le cytosquelette d'actine est requis pour la localisation de EFF-1 (Yang et al., 2017).
Cependant, la présence des protrusions n'est pas tout le temps observé au cours de la fusion y compris chez la drosophile indiquant la nature transitoire de ses structures (Dhanyasi et al., 2015). De plus, malgré le fait que les différentes étapes de la fusion soient bien détaillées, il reste à identifier une protéine spécifique impliquée directement au site de fusion et catalysant les évènements biochimiques requis pour la fusion membranaire.

Chez les mammifères, la machinerie impliquée dans la fusion reste encore peu connue, mais deux protéines ont été démontrées comme étant des fusogènes directement impliqués au niveau de la membrane : Myomaker (Mymk) (Millay et al., 2013) et Myomerger/Myomixer/Minion (Mymx) (Quinn et al., 2017)(Bi et al., 2017)(Zhang et al., 2017). Myomaker est une protéine à sept domaines transmembranaires, composée de 221 acides aminés, avec un N-terminal extracellulaire et un C-terminal intracellulaire. Myomerger contient seulement 84 acides aminés, possède un seul domaine transmembranaire et un ectodomaine qui abrite deux régions

hélicoïdales putatives. La régulation transcriptionnelle de ces fusogènes passe par les facteurs myogéniques, MyoD et la Myogénine (Millay et al., 2014)(Luo et al., 2015)(Ganassi et al., 2018). La délétion de Myomaker entraine l'absence de formation de myotubes *in vitro*. *In vivo*, malgré un ratio mendélien respecté à E15 et E17.5 (Millay et al., 2013), les souris *Myomaker* $^{-/-}$ meurent toutes après la naissance et présentaient une forte réduction de fibres musculaires plurinucléées (Millay et al., 2013) (Figure 12).

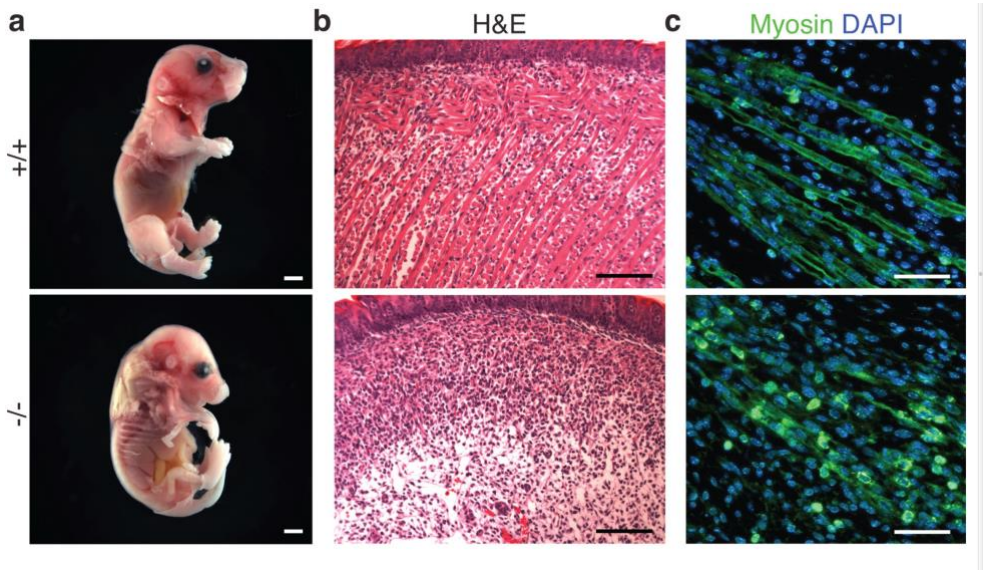


Figure 12 : Myomaker est essentiel pour le développement musculaire squelettique. (a) Embryon WT et *Myomaker -/-* à terme illustrant le manque de muscles autour des membres Myomaker KO. (b) Marquage H&E de coupes de langue WT et Myomaker KO. (c) Immunomarquages de sections longitudinales de muscles de pattes arrières à E14 (Millay et al., 2013).

La délétion de Myomerger entraîne aussi l'absence de formation de myotubes *in vitro* et une réduction drastique de fibres plurinucléées *in vivo*, les embryons présentant ainsi une réduction de la masse musculaire (Quinn et al., 2017) (Figure 13).

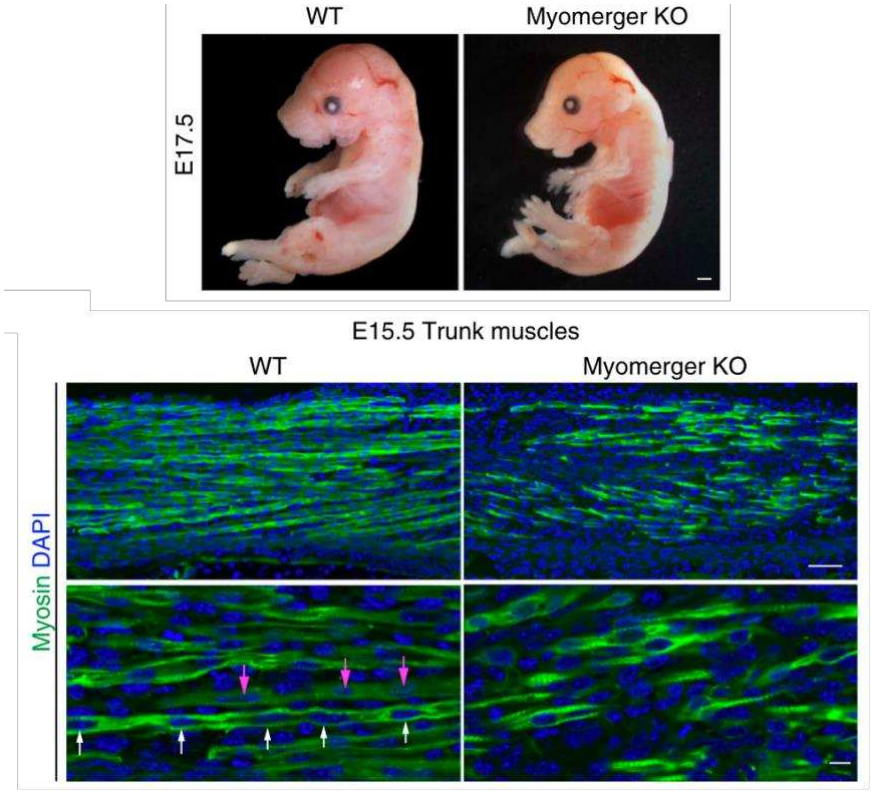


Figure 13 : Myomerger est essentiel pour la formation des muscles pendant le développement embryonnaire. En haut : embryon WT et Myomerger KO à E17,5 montrant un manque de muscles dans l'embryon Myomerger KO. En bas : Immunomarquages de coupes de tronc à E15,5. (Quinn et al., 2017)

De plus, l'expression ectopique de Myomaker dans les fibroblastes les rend compétents pour fusionner avec des myoblastes, mais pas entre eux (Millay et al., 2013). Cependant, la co-expression de Myomaker et Myomerger dans les fibroblastes les rend capables de fusionner entre eux (Quinn et al., 2017). Des études plus poussées ont montré que ces deux protéines étaient conservées chez les vertébrés et étaient indispensables pour la formation des muscles chez le poulet et le poisson-zèbre (Landemaine et al., 2014)(Shi et al., 2017)(Luo et al., 2015).

De nombreuses molécules, qui seront détaillées dans le paragraphe suivant, ont été montrées comme étant impliquées dans le contrôle de plusieurs étapes de la fusion cependant, leur interaction avec les fusogènes Myomaker et Myomerger reste encore inconnue.

2. La régulation de la fusion dans le muscle squelettique

a) Reconnaissance et adhésion

Pour que la fusion débute, les myoblastes ont besoin de se rencontrer, se reconnaître et adhérer l'une à l'autre. L'adhésion, elle, va en théorie permettre le rapprochement des membranes à des distances de 10-30 nm et ainsi former des sites de fusion. Ces étapes ont été le mieux décrit dans des travaux chez la Drosophile et le poisson-zèbre. Chez la drosophile, les protéines d'adhésion Dumbfounded (Duf ou Kirre) ou Roughest (Rst) sur les FC interagissent en *trans* avec les protéines Sticks and stones (Sns) ou Hibris (Hbs) sur la surface des FCM (Millay, 2022). Leur interaction initie une cascade de signalisation passant par la protéine dedicator of cytokenesis (DOCK) provoquant l'activation des régulateurs de nucléation de l'actine (Rac1, WASP, Arp1/2) pour induire le réarrangement du cytosquelette nécessaire pour la fusion (Lee and Chen, 2019). Des molécules d'adhésion et de signalisation ont également été identifiées chez le poisson zèbre. La perte de Kirrel, un homologue de Duf chez la drosophile, réduit la fusion des myoblastes (Srinivas et al., 2007). En plus de Kirrel, Jamb et Jamc sont des molécules d'adhésion qui interagissent en trans et sont nécessaires à la fusion des muscles rapides chez le poisson zèbre (Powell and Wright, 2011). De plus, récemment, il a été montré chez le poisson-zèbre que deux protéines d'adhésion, Jam2a et Jam3b, étaient impliquées dans la formation de foci de F-actine à l'aide des facteurs de nucléation de l'actine WAVE et WASP et qu'ensemble, elles promouvaient la fusion à la synapse fusogénique. Cette étude montre le lien entre les protéines d'adhésion et les voies de nucléation de l'actine au cours de la fusion (Luo et al., 2022a).

L'accumulation de données génétiques recueillies sur les protéines de reconnaissance et d'adhésion démontre l'aspect essentiel de ces molécules dans la fusion des myoblastes de Drosophile et de poisson. Cependant, ces données restent encore manquantes lorsqu'il s'agit de la fusion des myoblastes de mammifères (Figure 14). La fonction de la Néphrine, un homologue de la Sns de la Drosophile, met en évidence une divergence évolutive potentielle entre les systèmes de la Drosophile, du poisson zèbre et des mammifères. Les souris knock-out Nephrin ne présentent pas de phénotype de développement évident dans le muscle, mais les myoblastes primaires présentent une réduction de la fusion *in vivo* (Sohn et al., 2009). De même, il n'est pas certain que la perte de Jamb et Jamc dans le muscle squelettique de la souris ait un impact sur les événements de fusion (Powell and Wright, 2011). La cadhérine a également été proposée comme

facteur d'adhésion essentiel pour la fusion des myoblastes de souris, mais les études génétiques de perte de fonction ne soutiennent pas un rôle critique de celle-ci (Krauss et al., 2017). Les intégrines ß1 sont nécessaires à la fusion des myoblastes chez la souris, mais on ne sait pas si la perturbation observée est due à l'adhésion ou à une autre voie (Schwander et al., 2003). Enfin, des facteurs sécrétés, tels que l'Interleukine-4 (IL-4) provenant des myotubes/myofibres, peuvent constituer un signal de reconnaissance pour la fusion myoblaste-myotube (Horsley et al., 2003).

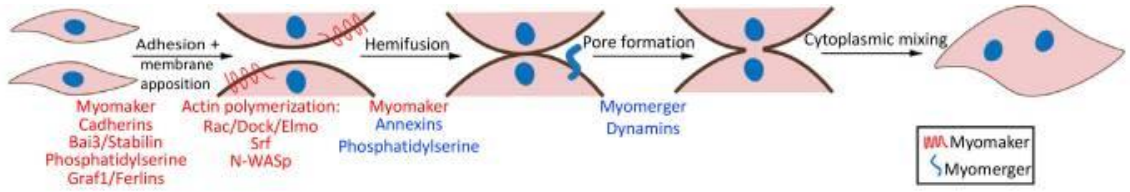


Figure 14 : Les mécanismes de la fusion des myoblastes chez les vertébrés (Petrany and Millay, 2019).

b) La dynamique du cytosquelette d'actine

Le réarrangement du cytosquelette d'actine lors de la fusion des cellules musculaires est très conservé entre la Drosophile et les vertébrés. Chez la drosophile, un point d'accumulation de l'actine filamenteux (F-actine) se forme dans les FCM et prend l'apparence d'une protrusion invasive suggérant que cette population possède une capacité « attaquante » (Figure 11 et 15) (Sens et al., 2010)(Revue de Chen, 2011)(Shilagardi et al., 2013). Dans la FC, une grande tension mécanique, mettant en jeu la contractilité du complexe actomyosine par le biais de la phosphorylation de la Myosine Light Chain 2 (MLC2), se crée au niveau cortical pour résister aux forces d'invasion et cette interaction est suggérée comme provoquant la formation du pore de fusion (Kim et al., 2015). MLC2 (aussi appelé RLC) est une protéine sarcomérique majeure du muscle strié des mammifères, d'environ 19 kDa et 166 acides aminés. Elle s'active par phosphorylation sur sa Ser19 et Thr18, et cette phosphorylation joue un rôle central dans l'activation du moteur actine/myosine afin de fournir des forces contractiles essentielles à plusieurs processus cellulaires, tels que la contraction cellulaire, la cytokinèse, la migration cellulaire et la purge de la membrane (Kawano et al., 1999), (Kureishi et al., 1997), (Sebbagh et al., 2001).

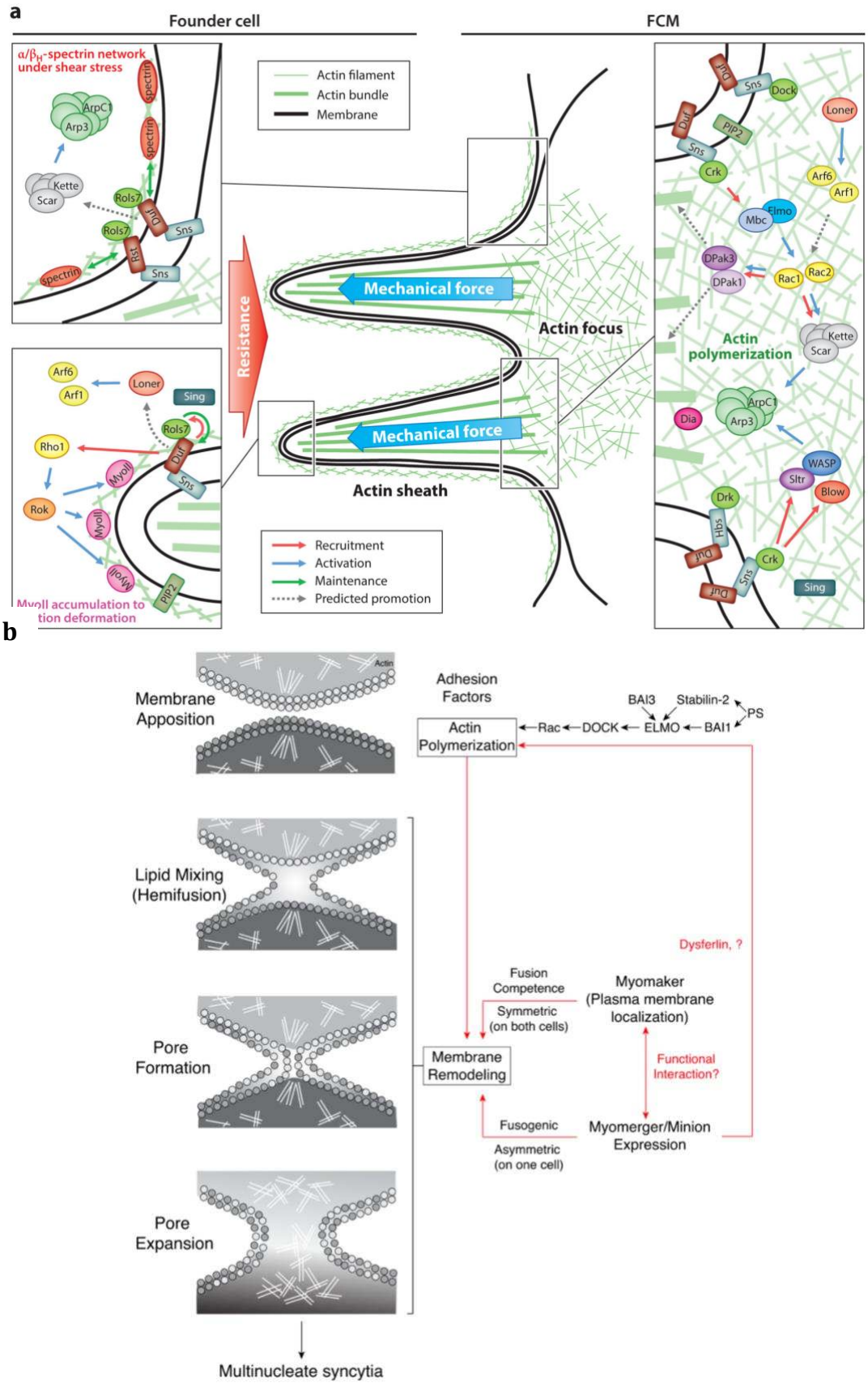


Figure 15: Évènements moléculaires à la synapse fusogénique a) chez la drosophile et b) les vertébrés (Revue de Lee and Chen, 2019) (Sampath et al., 2018).

Les principaux acteurs du remodelage de l'actine sont les Rho de la famille des petites GTPases telles que RhoA, Rac1, CdC42, N-Wasp qui sont responsables de différents assemblages subcellulaires. On compte parmi leur cible Arp2/3, responsable de la ramification des filaments d'actine, et la formine, impliquée dans le regroupement des filaments d'actine (Revue de Blanchoin et al., 2014). De plus, des protéines régulant l'activité de ces petites GTPases telles que les DOCK, des facteurs d'échange de nucléotides de guanine (GEF) pour Rac1 et Cdc42 ont été montrées comme étant importantes pour la fusion des myoblastes chez la souris (Moore et al., 2007)(Laurin et al., 2008)(Vasyutina et al., 2009)(Gruenbaum-Cohen et al., 2012). Chez les vertébrés, le signal de nucléation de l'actine n'est pas aussi clair que chez la Drosophile cependant on observe aussi une accumulation de F-actine et la présence de protrusions au site de fusion (figure 16) (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

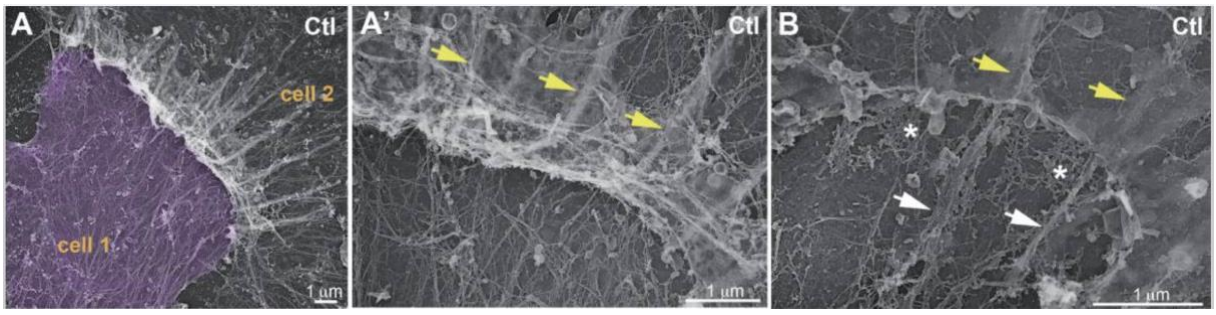


Figure 16 : Formation de protrusions à base d'actine à la synapse fusogénique. Images de cellules au niveau ventral obtenues grâce à la technique d'imagerie électronique Metal-replica : les cellules adhérées à leur substrat sont soniquées pour retirer la partie supérieure de la cellule, laissant que la partie ventrale adhérée. Ensuite, la partie ventrale est recouverte d'une couche de platine et de carbone pour créer une réplique métallique qui sera observée sous un microscope électronique à transmission (MET) (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

Un des mécanismes qui a été proposé comme signal déclencheur est l'activation des protéines de la famille des inhibiteurs cerveaux-spécifiques de l'angiogenèse (Bai) par la phosphatidylsérine (PS). En temps normal, la PS est dans le feuillet interne de la membrane plasmique cellulaire et son basculement à la surface est proposé comme initiateur de la fusion des myoblastes et des autres cellules capables de fusionner (Jeong and Conboy, 2011)(Whitlock and Chernomordik, 2021). Bai3 est un Récepteur Couplé aux Protéines G (GPCR) favorisant la fusion des myocytes dans le poulet et la souris (Hamoud et al., 2014). Il fonctionne en tant que lien entre les signaux de surface cellulaire et les

voies de signalisation de nucléation de l'actine en recrutant ELMO/DOCK à la membrane, ce qui active Rac1 résultant au réarrangement du cytosquelette. Bai3 est nécessaire dans les deux cellules en fusion, mais il n'est pas clair si ces protéines interagissent en trans (entre deux membranes cellulaires). Bai3 est régulée positivement par la Stabiline-2, et négativement par le Complément C1q Like 4 (C1qL4) (Hamoud et al., 2018). Cette régulation suggère que la voie est un point vital pour l'initiation de la fusion. La stabiline-2 est un récepteur de la phosphatidylsérine (PS). C1qL4 est une molécule sécrétée qui se lie au domaine extracellulaire de Bai3 et inhibe son activité. Bai1 est également impliquée dans la fusion des myoblastes par son activité de récepteur PS. Il est à noter que la perte de fonction génétique de Bai1, Bai3 ou Stabilin-2 entraîne un léger phénotype de défaut de fusion des myoblastes, ce qui suggère que d'autres protéines importantes peuvent être impliquées (Hamoud et al., 2014)(Park et al., 2016). Dans ces modèles, le muscle se forme toujours mais avec une réduction de la taille des myofibres et du nombre de noyaux.

En plus des voies de nucléation de l'actine contrôlées par Rac et N-Wasp, il y a aussi d'autres régulateurs de l'actine comme la dynamine, la PI(4,5)P2 et le Serum Response Factor (SRF). PI(4,5)P2 aide à la localisation membranaire de Arp2/3 induisant la nucléation locale de l'actine (Bothe et al., 2014). La Dynamine (Dyn), principalement associée à l'endocytose, provoque aussi directement la mise en faisceaux de l'actine rendant le réseau d'actine plus fort. De plus, Dyn est importante pour la fusion des myoblastes chez la drosophile et la souris (Zhang et al., 2020)(Chuang et al., 2019). Srf est un facteur de transcription contrôlant les expressions de l'actine et de régulateurs de l'actine. Sa délétion dans les CS impacte le pool d'actine, son organisation, entraîne la disparition des protrusions d'actine observées au site de fusion, un défaut de la régénération ainsi que l'hypertrophie musculaire (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Tous ces résultats indiquent que la nucléation de l'actine est un aspect critique de la fusion des myoblastes conservée à travers de nombreux organismes.

Le principal rôle du remodelage du cytosquelette est de mettre en contact étroit les membranes opposées (>10 nm) et aide ainsi à apposer les membranes pour que les fusogènes puissent agir. Cependant, il a été noté que les membranes entourant les protrusions invasives ne sont pas plus proches que les membranes situées à l'extérieur des protrusions (Hernández and Podbilewicz, 2017). Ce modèle suggère également la formation d'un pore de fusion à l'extrémité d'une de ces projections. Un modèle distinct a été proposé pour les muscles de vol indirect chez la mouche, qui nécessitent toutes les

voies canoniques qui initient la nucléation de l'actine. Cependant, les protubérances ont été détectées à une faible fréquence, ce qui exclut toute interprétation fonctionnelle, et les protubérances étaient plus prononcées chez les mutants où la fusion était perturbée. De plus, en microscopie électronique, une membrane de myoblaste relativement plate est juxtaposée à la membrane de la myofibre après l'adhésion, et la fusion se produit à travers des pores multiples (Figure 17) (Dhanyasi et al., 2015). Il est possible que les deux modèles soient tous deux corrects en fonction du contexte physiologique. Pendant la fusion primaire, où deux myoblastes fusionnent pour former une myofibre naissante, des protubérances invasives pourraient être nécessaires pour former une synapse fusogénique. Cependant, lors de la fusion secondaire, où un myoblaste fusionne avec une myofibre existante, de multiples pores de fusion pourraient être nécessaires en raison du manque de courbure de la membrane de la myofibre. Cela met en avant le concept selon lequel la fusion pour former de nouvelles myofibres pourrait être différente de la fusion d'une CS avec des myofibres établies.

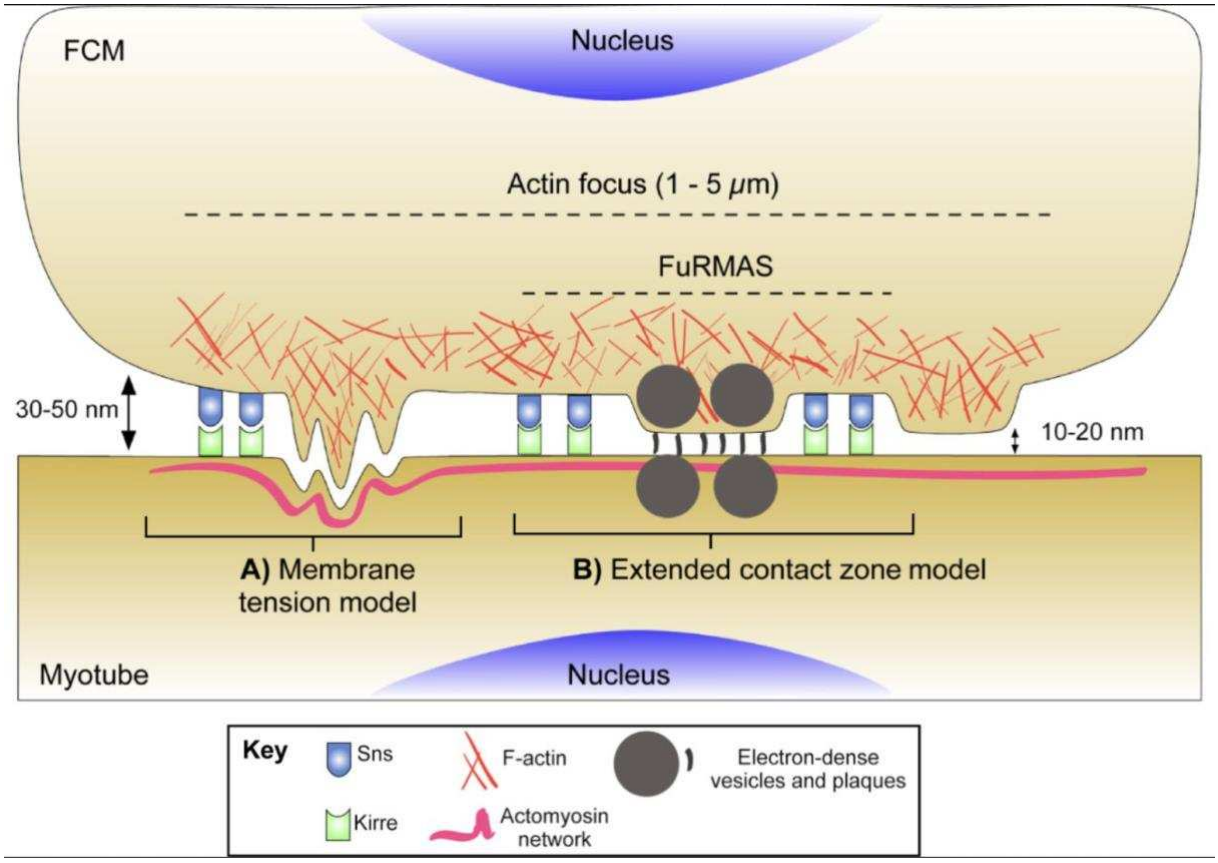


Figure 17 : Modèles pour les étapes de préfusion de l'adhésion myoblaste-myotube chez la drosophile (Revue de Hernández and Podbilewicz, 2017).

c) Le remodelage membranaire

Les fusogènes agissent pour permettre aux membranes de se rapprocher au-delà des distances qui peuvent être atteintes par une forte adhésion et des protrusions d'actine. Il a été proposé qu'en début de chaque fusion, un remodelage de la membrane se faisait en passant par une étape d'hémifusion (intermédiaire de fusion), où les feuillets de la membrane externe fusionnent, suivis par la rupture de cet intermédiaire conduisant à la formation du pore et au mélange cytoplasmique. Étant donné que les bicouches membranaires sont thermodynamiquement stables, les fusogènes doivent agir sur les lipides de manière à générer de l'énergie dans un système qui favoriserait les réarrangements nécessaires pour la fusion. Comme mentionné dans le chapitre 2 partie 1. a) *ii*, les fusogènes spécifiques du muscle conduisant au remodelage de la membrane chez les vertébrés sont Myomaker (Mymk) et Myomerger/Myomixer/Minion (Mymx). Ce sont des protéines conservées et fonctionnelles dans de nombreuses espèces telles les mammifères, le poulet, le poisson-zèbre, la truite (vertébrés) ou les chordés non-vertébrés comme la lamproie (revue de (Millay, 2022). De nombreuses études ont permis d'établir les capacités fusogéniques et de remodelage membranaire de Myomaker et Myomerger.

Actuellement, deux modèles sont proposés pour expliquer les activités de Myomaker et Myomerger qui conduisent à la fusion des myoblastes. Dans le premier modèle, les deux protéines interagissent, Mymx induisant l'activité fusogénique de Mymk pour établir un pore de fusion (Zhang et al., 2020). L'interaction entre Myomaker et Myomerger a été détectée par des études de co-immunoprécipitation, à partir de cellules surexprimant des versions taguées (Bi et al., 2017)(Leikina et al., 2018). Cependant, il n'a pas été explicitement montré que ces deux protéines interagissaient directement. Un deuxième modèle a été proposé pour expliquer les fusions induites par Mymk et Mymx : ces deux protéines ont pour fonction de perturber les lipides par des mécanismes différents et de contrôler des étapes distinctes de la fusion (Leikina et al., 2018) (Figure 18).

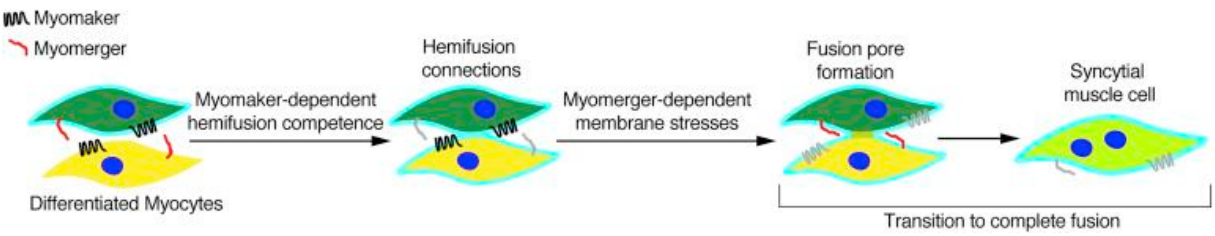


Figure 18 : Myomaker et Myomerger agissent à des étapes distincts de la fusion des myoblastes (Leikina et al., 2018).

En effet, Leikina et collègues ont montré (Leikina et al., 2018), que les myoblastes KO pour Mymk ne présentent pas d'hémifusion, ce qui indique que Mymx fonctionne en même temps ou avant cette étape critique de la fusion. De plus, l'hémifusion est détectée dans les myoblastes dépourvus de Mymx mais le mélange cytoplasmique est bloqué, ce qui indique que Mymx fonctionne à l'étape de la formation des pores. La meilleure preuve que l'activité de Mymk et Mymx ne nécessite pas d'interaction est peut-être le fait que leurs activités individuelles sont détectées en l'absence de l'autre protéine. Dans les cellules humaines, Mymk est suffisant pour induire des fusions de faible niveau même sans la présence de Mymx (Zhang et al., 2020). De plus, la fusion de myoblastes de souris dépourvues que Mymk (*Mymx-/-*) peut être induite avec des agents qui favorisent la transition hémifusion-fusion (Leikina et al., 2018). Ces données suggèrent que Mymk est fonctionnel en l'absence de Mymx. De même, Mymx peut induire l'achèvement de la fusion dans un système fibroblaste-hémagglutinine et les ectodomaines de Mymx purifiés sont actifs sur des liposomes synthétiques, même si les deux systèmes sont dépourvus de Mymk (Leikina et al., 2018).

Une des questions qui s'est posée suite à ces travaux est de savoir comment Mymk et Mymx performaient leur rôle d'inducteur d'hémifusion et de formateur de pore respectivement alors que leurs activités se chevauchent lors de la fusion et qu'ils agissent à deux étapes distinctes. Des travaux pointent des similitudes entre Mymk et les céramidases, telles que la céramidase alcaline 3 (ACER3) et le récepteur de l'adiponectine (ADIPOR) (Pei et al., 2011). Cependant, il présente aussi des différences laissant penser que Mymk possède un mécanisme d'action unique. De plus, si Mymk est une céramidase, la dégradation de la céramide pourrait entraîner des changements dans la fluidité de la membrane, une caractéristique connue pour augmenter la fusion membranaire (Saez et al., 1985)(Wilschut et al., 1985). La fluidité membranaire est augmentée avant la fusion dans les cellules musculaires (Prives and Shinitzky, 1977) et celle-ci a été proposée pour réguler la fusion des myoblastes par les acides gras à très longue chaîne (VLCA) (Srinivas et al., 2007). Cependant, la caractéristique clé de la fluidité membranaire est qu'elle n'est pas modifiée globalement mais plutôt dans des domaines locaux de la membrane.

Des études cellulaires et biochimiques ont montré que Mymx possède une capacité permettant d'appliquer un stress au niveau de la membrane. La présence de Myomerger sensibilise les cellules à un choc hypotonique osmotique, un stimulus qui induit une tension membranaire et la formation de pores (Leikina et al., 2018). En effet, la protéine Mymx recombinante cause la déstabilisation de membranes synthétiques (Leikina et al., 2018). Mymx contient un domaine transmembranaire suivi de deux régions dans son ectodomaine qui sont prédites comme étant hélicoïdales. Il est probable que ces régions hélicoïdales s'insèrent dans les membranes et médient l'activité de stress membranaire de Myomerger. Une caractéristique unique de Mymx est que son ectodomaine fonctionne depuis l'extérieur de la cellule mais que les lipides du diaphragme d'hémifusion qui doivent être remodelés se trouvent à l'intérieur de la cellule. La modélisation théorique et les preuves expérimentales démontrent que la courbure positive générée par Mymx dans le feuillet externe se propage aux lipides du diaphragme interne, entraînant la formation de pores (Golani et al., 2021). Outre une activation transcriptionnelle, une régulation de Mymk et Mymx dans le temps et l'espace est sûrement nécessaire pour contrôler leur activité déstabilisante membranaire afin de maintenir une intégrité membranaire et réguler la fusion. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour réguler Mymk et Mymx. Il a été proposé que, au vu de sa localisation golgienne et membranaire, Mymk subissait une série de modifications post traductionnelles dans le Golgi (la palmitylation des cystéines en C-terminal pour sa localisation dans le golgi et sa lipidation ainsi que l'addition d'autres amino-acides hydrophobique pour son fonctionnement), puis était adressé à la membrane pour induire la fusion. Il a aussi été proposé que Mymk soit contenu dans le Golgi pour fournir un réservoir de vésicules de Mymk lorsque les voies de fusion sont activées (Gamage et al., 2017). Un des mécanismes proposé est le déplacement des protéines vers des zones riches en actine, où la fusion peut se produire (accumulation de Mymk et Mymx au niveau des filopodes) (Hammers et al., 2021), (Luo et al., 2022a).

Enfin, les lipides ont également été proposés, notamment la PS comme déclencheur de la fusion des myoblastes (Whitlock and Chernomordik, 2021) en plus de sa fonction d'activation des molécules de surface cellulaire qui conduisent à la nucléation de l'actine. La PS fonctionnerait également pendant l'étape de remodelage de la membrane lors de la fusion (Leikina et al., 2013). Mymx contient des résidus d'arginine chargés positivement dans la première hélice (amphipathique) de son ectodomaine, ce qui devrait

théoriquement favoriser l'association avec la PS chargée négativement dans les bicouches membranaires (Gamage et al., 2022). Il a aussi été proposé une interaction entre les fusogènes et l'actine pour induire la fusion notamment dans la formation du pore (Zhang et al., 2017). Cependant, d'autres travaux indiquent plutôt qu'il n'y aurait pas vraiment d'interaction entre les deux protéines pendant la formation du pore (Leikina et al., 2018)(Luo et al., 2022a) mais des études plus poussées sont nécessaires pour permettre de valider cette hypothèse.

D'autres molécules, autres que Mymk et Mymx, sont indiquées comme intervenant dans le remodelage membranaire aboutissant à la fusion. GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase-1 (GRAF1) et la Myoferlin ont été décrites comme agissant lors de la fusion, même si leur interaction reste à être démontrée (Lenhart et al., 2014)(Posey et al., 2011). GRAF1 est une protéine produisant une courbature de la membrane et augmentant la formation de pores par les fusogènes viraux (Richard et al., 2011) tandis que la Myoferlin régule le trafic endocytaire, affectant potentiellement la fusion par les mouvements de protéines et de lipides.

On observe aussi les syncytines, protéines structurellement similaires aux fusogènes viraux, permettant la fusion des trophoblastes (Dupressoir et al., 2011). La délétion constitutive de la SynB chez la souris montre une réduction de la taille des muscles avec une diminution du nombre de noyaux (Redelsperger et al., 2016).

d) Autres mécanismes régulant la fusion

i. Les régulateurs positifs de la fusion

D'autres mécanismes présentent une importance majeure dans la régulation de la fusion des myoblastes.

On peut notamment souligner l'implication du calcium Ca^{2+} dans cette régulation. Il a été montré qu'une diminution des concentrations de l'ion Ca^{2+} (de 1,4 à 0,27) empêchait de la fusion des myoblastes de rat (Constantin et al., 1996)(Wakelam, 1985). Cela peut être associé à une inhibition de la contractilité de l'actomyosine et donc de leur capacité migratoire qui est grandement dépendante de la régulation Ca^{2+}-calmoduline (Blanchoin et al., 2014). Le calcium est aussi impliqué dans la formation de contacts cellule-cellule via la cadhérine. De plus, l'augmentation de calcium active la calcineurine, une sérine-thréonine phosphatase dépendante de la calmoduline. Les voies dépendantes de la calcineurine sont impliquées dans l'expression de nombreux gènes spécifiques du

muscle (Horsley et al., 2001)(Witwicka et al., 2019). Cela est dû au fait qu'une de ses cibles est le Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) (Friday and Pavlath, 2001).

Les membres de la famille NFAT (NFATC1 à C4) sont des facteurs de transcription sensibles au calcium essentiels dans la transcription des gènes au cours de la réponse immunitaire en régulant l'expression de nombreuses interleukines (IL) telles que l'IL-2, 3, 4, 5 ainsi que le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) (Horsley and Pavlath, 2004)(Rao et al., 1997). Les NFAT ne sont pas seulement exprimés dans les lymphocytes T mais aussi dans différents processus physiologiques et voies moléculaires de différents tissus, y compris le muscle squelettique (de la Pompa et al., 1998)(Ho et al., 1998)(Ranger et al., 1998)(Kegley et al., 2001). En absence de stimulation, ces protéines sont situées dans le cytoplasme sous forme phosphorylée. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'ions Ca2+ entraîne l'activation de la calcineurine qui va déphosphoryler NFAT et permettre sa translocation dans le noyau. Cette action va ainsi provoquer la transcription des gènes contrôlés par ce facteur de transcription (López-Rodríguez et al., 1999).

Il a été démontré que trois isoformes de NFAT (NFATC1, NFATC2, NFATC3) étaient fortement exprimées et transloquées dans le noyau à différents stades de la myogenèse. NFATC3 est exprimé dans les myoblastes et les myotubes, NFATC1 et NFATC2 dans les myotubes naissants, et NFATC2 dans les myotubes (Abbott et al., 1998)(Perroud et al., 2017). Le fait que des isoformes spécifiques de NFAT soient capables d'activer la transcription des gènes à certains stades de la myogenèse indique que chaque isoforme de NFAT régule des sous-ensembles distincts de gènes pendant le développement musculaire. Une étude a démontré que le muscle soléaire isolé de souris NFATC2 KO était significativement plus petit, illustré par la diminution de la CSA des myofibres (Horsley and Pavlath, 2004). Un défaut de croissance des myotubes a également été observée *in vitro* dans les myotubes dépourvus de NFATC2, plus petits en taille avec une quantité réduite de noyaux par rapport au contrôle. Une réduction du nombre de noyaux a aussi été observée dans les myofibres des souris NFATC2-/- *in vivo*. Ces observations semblent indiquer que les premières étapes de fusion des myoblastes (myogenèse primaire) se déroulent normalement, mais qu'il existe des aberrations dans la fusion des myoblastes avec les myotubes naissants (myogenèse secondaire). Ainsi, l'addition de myoblastes (noyaux) et la poursuite de la croissance des myotubes semblent être contrôlées par une voie moléculaire régulée par NFATC2 (Wang et al., 2011)(Horsley et al., 2003).

Il a été montré qu'IL-4, une cible de NFATC2, avait une importance au cours de la fusion musculaire (Horsley et al., 2003). Pour contrôler la fusion cellulaire, l'IL-4 agit par l'intermédiaire du récepteur IL-4Rα présent sur les myoblastes mais pas sur les myotubes. Les cellules musculaires dépourvues d'IL-4 ou de son récepteur sont caractérisées par la réduction de leur taille et de leur quantité en noyaux. Les myoblastes n'exprimant pas IL-4Rα ne peuvent pas être recrutés par les myotubes naissants sécrétant de l'IL-4. Cependant, les myotubes naissants IL-4Rα -/- réussissent à fusionner avec des myoblastes sauvages. Pendant la myogenèse secondaire qui est sous le contrôle de NFATC2, le niveau d'expression de l'IL-4 dans les myotubes naissants augmente. Cela conduit à leur fusion avec les myoblastes par l'intermédiaire de la sous-unité IL- 4Rα (Ho et al., 1998). Les mécanismes par lesquels l'IL-4 contrôle le processus de fusion des cellules myogéniques ne sont pas encore totalement compris. Mais certains travaux laissent penser que l'IL-4 pourrait réguler la fusion en augmentant l'expression d'intégrines telles que VCAM-1 ou VLA-4 (very late activation antigen 4) (Kitazawa et al., 1995)(McNally and Anderson, 2002)(Lind et al., 1995).

Un des activateurs de NFATC2 tel que la prostaglandine (PG) peut aussi être impliqué dans la myogenèse. Les PG sont des lipides acides issus de l'acide arachidonique. Elles sont produites par voie enzymatique par les cellules de mammifères en réponse à des stimuli mécaniques, chimiques et immunologiques. Il y a quatre classes de PG en fonction de leur structure : PGE, PGA, PGB et PGF. Toutes les PG participent à la signalisation paracrine. Il a été montré que les PG induisent une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca2+ dans les cellules musculaires (Fong Yew, 1998). Suite à la découverte des PG, il a été montré que la prostaglandine F2α (PGF2α) activait le facteur de transcription NFATC2 dépendant du calcium au cours de la myogenèse (Horsley et al., 2003). D'autres études consacrées à la voie PGF2α-NFATC2, ont démontré que la PGF2α régule la myogenèse secondaire. L'activation de NFATC2 est médiée par le récepteur PGF2α, dont le niveau est significativement augmenté pendant la fusion. Le récepteur PGF2α est exprimé dans les myotubes naissants et favorise la fusion des myoblastes avec les myotubes naissants. Les signaux déclenchant la production de l'isoforme PGF2α ne sont pas encore connus mais l'activité physique pourrait être un bon candidat conduisant à la libération de PGF2α (Vandenburgh et al., 1995)(Trappe, 2001).

Dans les myofibres, il a été montré que suite à une surcharge de travail, la production de PG et l'expression de IL-4 permettait le recrutement et la fusion des CS au

fibres en croissance et que ceci était sous le contrôle du facteur de transcription Srf (Serum Response Factor), un relais transcriptionnel des voies de mécanotransduction (Guerci et al., 2012) (voir chapitre 3 partie 3).

Une des familles de protéines impliquées dans la fusion des myoblastes et associées à la signalisation NFAT sont les ferlines, des protéines impliquées dans la réparation et le trafic membranaire mais aussi exprimées dans les cellules musculaires sous l'isoforme spécifique au muscle, la Myoferline (Posey et al., 2011). La Myoferline est associée à la membrane cellulaire et se lie aux phospholipides d'une manière dépendante du Ca^{2+} (Peulen et al., 2019). Il a été démontré que NFATC1 et NFATC3 régulent étroitement le promoteur de la Myoferline. En outre, les souris dépourvues de Myoferline présentent un phénotype similaire à celui des mutants KO pour NFATC2. Les myofibres isolées de ces animaux sont de tailles réduites et possèdent une CSA diminuée, résultant de défauts de fusion (Demonbreun et al., 2011). L'expression de la Myoferline est élevée dans les myoblastes avant l'initiation du processus de fusion et elle pourrait jouer un rôle dans le remodelage membranaire mentionné plus haut.
Le rôle de NFATC1 dans la myogenèse *in vivo* n'est pas bien établi car les souris knockout NFATC1 meurent *in utero* de pathologie cardiaque (Ranger et al., 1998).

Un autre facteur de transcription majeur régulant la formation des cellules musculaires est le facteur de transcription Forkhead in human rhabdomyosarcoma (FKHR), également connu sous le nom de Forkhead box-O1 (FoxO1) (Xu et al., 2017). La principale fonction de FKHR dans les différentes lignées cellulaires étudiées est la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire en augmentant l'expression de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p27Kip1. L'activité de FKHR est directement régulée par phosphorylation sur les résidus Thr24/Ser256/Ser319 par la protéine kinase B α (PKB α) médiée par AKT (Rena et al., 2001). Il a été montré que le niveau de FKHR actif était augmenté dans le noyau des myoblastes se préparant à entrer en fusion, et que l'inhibition de son activité transcriptionnelle entraînait une réduction de la fusion des myoblastes. Les gènes, dont les produits protéiques se sont avérés être significativement régulés par le facteur de transcription FKHR, participent à la fusion cellulaire (par exemple Frizzled-4 et Prosaposine) et au remodelage de la matrice extracellulaire (par exemple Fibuline-2, Ankyrine-3 et Tenascin-C) (Bois and Grosveld, 2003). De plus, ces gènes possèdent un site de liaison à FKHR, indiquant une régulation directe de ses gènes par celui-ci (Furuyama et al., 2000).

La voie canonique Wnt/β-caténine est essentielle pour contrôler le développement embryonnaire et l'homéostasie adulte. Les protéines Wnt interagissent avec les récepteurs Frizzled et les co-récepteurs de la low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) et stimulent la phosphorylation de Disheveled (Dsh) tout en inactivant la phosphorylation de la β-caténine par la glycogen synthase kinase-3β (GS3Kβ). Cela conduit à sa stabilisation et à sa translocation nucléaire. Dans le noyau du myoblaste, la β-caténine se lie aux facteurs de transcription T cell factor/lymphoid enhancer factor family (TCF/LEF1) qui sont impliqués dans l'activation de facteurs myogéniques tels que Myf5 et MyoD (Tsivitse, 2010).

En l'absence de Wnt, la β-caténine est constamment dégradée par le complexe axin, composé de l'axin, de l'adenomatous polyposis coli protein (APC), de la casein kinase 1 (CK1) et de GSK3. CK1 et GSK3 phosphorylent séquentiellement la région amino-terminale de la β-caténine, ce qui entraîne la reconnaissance de la β-caténine par la β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase (βTRCP) et son ubiquitination ultérieure conduisant à sa dégradation par le protéasome (MacDonald et al., 2009). Ce processus empêche la β-caténine d'atteindre le noyau et réprime les gènes cibles de Wnt (He et al., 2005). Il a été montré récemment que la voie Wnt/β-caténine avait un rôle important pour le développement musculaire embryonnaire et la myogenèse postnatale via la régulation de l'expression de la néphrine, une protéine de surface associée au maintien de la barrière de filtration dans le rein (Patrakka and Tryggvason, 2007). L'expression de cette protéine est significativement augmentée au cours de la fusion des myoblastes et au cours du développement musculaire murin. Une absence de néphrine entraine une réduction drastique du développement musculaire *in vivo* et une fusion incomplète des myotubes *in vitro* (Sohn et al., 2009).

La voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) joue un rôle non négligeable dans la régulation du processus de fusion. En effet, il a été rapporté que la quantité de extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) augmentait énormément pendant la différenciation et qu'elle perdurait jusqu'à la différenciation terminale (Dinev et al., 2001). De plus, ERK5 régule l'activation du facteur de transcription SP1 (Specificity protein 1), pouvant se lier au promoteur de Klf2 et Klf4 (Kruppel-like fators), dont la surexpression augmente la fusion et dont l'absence l'inhibe. Cette voie de signalisation régule de nombreux gènes impliqués dans la fusion, mais l'augmentation de ces molécules seules

(Klf2 et Klf4) est incapable de provoquer la fusion. Elles induisent la fusion seulement en coopérant avec des facteurs myogéniques tels que MyoD et MEF2 ainsi que d'autres protéines importantes comme les cadhérines Cdh15, VCAM-1, les glycoprotéines CD164 et les régulateurs de cavéoles EH Domain Containing 2 (Ehd2) (Hindi et al., 2013). Dans ces contextes, la voie des MAPK agit comme un régulateur positif de la fusion. Mais il existe des cas où elle la freine, comme nous allons le voir plus bas.

ii. Les régulateurs négatifs de la fusion

Il a aussi été montré que l'inhibition de ERK1/2 dans les myoblastes pendant leur phase de prolifération en culture provoquait un arrêt du cycle des myoblastes et les engageait dans un programme myogénique induisant leur différentiation. Cela passe par la levée d'inhibition de p21 et p27 et de MyoG résultant à une hyperfusion par le recrutement de myoblastes au site de fusion conduisant à la formation de robustes myotubes. Lors de la différenciation, l'inhibition de ERK1/2 va réduire la phospho-inhibition de RXR entraînant l'activation des récepteurs à ryanodine 1 et 3 (RYR1 et RYR3), des canaux à Ca^{2+}. L'activité de RYR va induire l'activation de la voie CaMKII-Ca^{2+} menant à la formation myotubes, résultant de la fusion de myoblastes avec des myotubes naissants, via Mymk et Rac1 (Eigler et al., 2021).

Il a aussi été montré que le complexe phospholipide flippase de l'ATP11A, membre de la sous-famille de type IV des adénosine triphosphatases de type P (P4-ATPases) et CDC50A fonctionne en déplaçant les PS du feuillet externe au feuillet interne des cellules musculaires in vitro (Tsuchiya et al., 2018). La réduction de l'un ou l'autre de ces facteurs entraîne une fusion excessive, ce qui suggère que l'élimination de la PS du feuillet externe est nécessaire pour contrôler la fusion des myoblastes. Les cellules déplétées en ATP11A et CDC50A présentent une réduction de F-actine et de la myosine IIA non-musculaire (NMIIA) dans les myotubes, ce qui est proposé pour empêcher les fusions incontrôlées. PIEZO1 est un canal Ca2+ mécanosensible dont la fonction est régulée par l'ATP11A et CDC50A. La déplétion de cette protéine entraîne également une fusion cellulaire excessive et aucune accumulation de F-actine corticale ou de NMIIA dans les cellules multinucléées. Dans leur ensemble, ces données indiquent que le déplacement de la PS vers le feuillet interne de la membrane des myotubes active l'activité du canal Ca2+ de PIEZO1, ce qui

entraîne la formation d'un assemblage d'actomyosine corticale limitant une fusion cellulaire incontrôlée (Tsuchiya et al., 2018).

La signalisation TGF-β est également un régulateur négatif de la voie de fusion chez le poulet et la souris (Girardi et al., 2021)(Melendez et al., 2021). Deux études indépendantes ont montré que pour que la fusion des myoblastes ait lieu, la signalisation TGF-β devait être réduite. Dans la fusion de myoblastes de d'embryons de poulet, cette régulation se produit dans le compartiment des myofibres, mais il est moins clair si cela est également vrai lors de la fusion de myoblastes de souris. L'activation de la signalisation du TGF-β dans le système du poulet est obtenue par un mécanisme de complémentation des récepteurs, où la myofibre exprime le TGF-βR1 et le myoblaste apporte le TGF-βR2 par fusion, ce qui provoque l'hétérodimérisation des récepteurs TGF-β et l'initiation de la cascade de signalisation SMAD2/3 (Melendez et al., 2021). Dans les myoblastes de souris, la signalisation TGF-β empêche ou décompose l'architecture de l'actine. Cela suggère que cette voie réduirait la fusion des myoblastes puisque l'actine est nécessaire dans ce compartiment (Girardi et al., 2021). Il est difficile d'interpréter si une réduction de l'actine dans la myofibre après la fusion, induite par la signalisation TGF-β, limiterait également la fusion. L'étude sur PIEZO1 suggère que la formation d'actine corticale limiterait la fusion (Tsuchiya et al., 2018), bien que différentes structures d'actine puissent être régulées par ces différentes voies. Des études plus précises dans lesquelles les régulateurs de fusion sont manipulés spécifiquement dans les compartiments myoblastes ou myofibres *in vivo* pourraient permettre de définir plus précisément la voie de fusion des myofibres.

Pour finir, une étude a mis en avant l'implication des tétraspanines CD9 et CD81, protéines faisant partie de la superfamille de protéines associées à la membrane caractérisées par la présence de quatre domaines transmembranaire, dans le contrôle de la régulation de la fusion des cellules musculaires (Charrin et al., 2013). Dans cette étude, il a été montré que l'absence de ces deux trétraspanines provoquait une régénération anormale avec la formation de grosses fibres à l'allure dystrophique. Ils ont aussi démontré qu'en greffant des myoblastes déplétés en CD9P-1, partenaire moléculaire de ces trétraspanines, dans un muscle en régénération menait aussi à un défaut de régénération. De plus, *in vitro*, en leurs absences, les myotubes fusionnent les unes avec les autres à une fréquence élevée, engendrant la formation de large syncytiums comparée

aux myotubes contrôles. Ces données montrent que CD9, CD81 et CD9P-1 agissent comme des régulateurs négatifs de la fusion.

3. La fusion dans un contexte physiologique et physiopathologique musculaire

a) La fusion au cours de la régénération

La régénération musculaire est un modèle très communément utilisé de myogenèse adulte. En effet, suite à une lésion, les cellules satellites en quiescence entrent dans le cycle cellulaire et commencent à exprimer MyoD, prolifèrent et migrent sur le site de la lésion, se différencient et fusionnent entre elles pour reconstituer de nouvelles fibres musculaires.

Au cours de la régénération, la destruction du tissu déclenche une réponse inflammatoire entrainant le recrutement de cellules immunitaires qui vont dans un premier temps aider à au nettoyage des débris cellulaires puis aider à la régénération musculaire en apportant un soutien aux myoblastes. En effet, dans des cultures cellulaires *in vitro*, il a été montré que les macrophages pro-inflammatoires (M1) inhibaient la fusion des myoblastes tandis les macrophages anti-inflammatoires (M2) induisaient fortement la différenciation des myoblastes en augmentant leur transition en myocytes différenciés et en améliorant la formation de myotubes matures (Saclier et al., 2013). *In vivo*, il a été montré que la déplétion de macrophages affectait la régénération (Arnold et al., 2007). En effet, les macrophages vont agir en tant que cellules sécrétrices modulant le comportement des cellules satellites, promouvant la fusion des myoblastes (Varga et al., 2016). Les éosinophiles étant la principale source d'IL-4 (Yin et al., 2013)(Tidball, 1995) et le knockdown de l'IL-4 perturbe la régénération musculaire en affectant le destin des cellules progénitrices fibro-adipogéniques (FAPs), affectant indirectement la régénération (Heredia et al., 2013) mais aussi la fusion des CS (Horsley et al 2009).

Les premiers travaux montrant une implication des cellules satellites dans la régénération musculaire sont les travaux sur le modèle KO constitutif de Pax7 chez la souris. Chez les rares souris réussissant à atteindre l'âge adulte (5%), on observe un nombre très bas de SC, des muscles plus faibles et une perte de myofibres (Kuang et al., 2006) ou une taille musculaire réduite contenant des fibres de petits calibres (Oustanina et al., 2004). Lorsque l'on cultive les quelques CS restantes ex vivo, ces cellules montrent des défauts de prolifération et de différenciation (Kuang et al., 2006) (Oustanina et al., 2004). Plus tard, l'ablation totale des cellules $Pax7^{+}$ dans le modèle DTA démontre

l'importance cruciale de ces cellules pour la régénération (Lepper et al., 2011)(Sambasivan et al., 2011). Le modèle de régénération est un modèle très utilisé lorsqu'il faut démontrer si une molécule est nécessaire pendant la myogenèse adulte. De cette manière, des éléments tels que Mymk, TGF-β et Srf ont été démontrés comme importants car leur absence perturbe la fusion des CS et la régénération. Dans le KO inductible de Mymk dans les CS, (Millay et al., 2014), on voit que les premiers stades de la régénération (J+3) sont similaires entre les contrôles et les mutants, avec la présence de cellules mononuclées Myogenine et Desmine positives indiquant que l'activation, la prolifération et l'engagement dans la différenciation des CS n'étaient pas affectés. Cependant à J+9 de régénération, le processus de régénération est fortement perturbé avec une diminution drastique du nombre et de la taille des fibres régénérées. Ces données montrent que Mymk est nécessaire pour la fusion des CS et la régénération du muscle adulte. Les muscles des souris présentant une délétion de Mymx dans les CS présentent aussi une perturbation de la régénération avec une réduction de fibres régénérées (Bi et al., 2018). Dans ce modèle, l'expression de Mymk a été détectée indiquant que Mymk seul n'est pas suffisant pour induire la fusion et qu'un partenariat entre Mymk et Mymx est obligatoire pour la formation de fibres musculaires.
Les muscles issus des souris dépourvues de Srf dans les CS présentent aussi une perturbation de la régénération avec une réduction drastique de la taille des fibres et du nombre de noyaux par fibre (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

Pour finir, TGF-β a été montré comme étant impliqué dans la fusion en la régulant négativement (voir chapitre 2 partie d ii) et que l'ajout de la protéine dans les premiers jours de la régénération menait à la formation de petites myofibres contenant peu de noyaux altérant la fonction musculaire (force spécifique à la baisse) tandis que son inhibition pharmacologique entraînait la formation de myofibres géantes sans pour autant augmenter la force spécifique musculaire (Girardi et al., 2021).

b) Le cas de l'hypertrophie

Le muscle est un tissu extrêmement plastique qui est capable d'adapter sa masse en fonction des différents stimuli environnementaux qu'il perçoit. En particulier, le muscle squelettique adulte peut s'hypertrophier en cas d'augmentation de la charge de travail (surcharge fonctionnelle ou « overload ») et s'atrophier en cas d'inactivité. Cette augmentation de la masse musculaire passe principalement par une augmentation de la

taille de la myofibre et non par une augmentation du nombre de fibres. Cette hypertrophie se traduit par une augmentation du volume cytoplasmique : i) *via* une augmentation de la synthèse protéique conduisant à l'incorporation de nouvelles protéines contractiles et ii) *via* l'addition de nouveaux noyaux provenant de la fusion des CS aux fibres en croissance. La principale voie de signalisation régulant la masse musculaire est la voie IGF1-Akt/PKB-mTOR. Elle favorise la synthèse des protéines et la croissance cellulaire en augmentant la traduction et la synthèse des protéines (Schiaffino and Mammucari, 2011, p. 1).

La contribution des CS à l'hypertrophie a été pendant longtemps débattue. Les premières évidences de l'implication des cellules satellites dans l'hypertrophie ont été montrées lors des travaux de Schiaffino chez le rat. Dans ces études, lui et son équipe ont marqué à la thymidine radioactive (3H-thymidine) les cellules satellites au cours d'expériences de surcharge fonctionnelle et ont montré que ceux-ci étaient la source de noyaux observés pendant l'hypertrophie musculaire après surcharge mécanique (Schiaffino et al., 1972), (Schiaffino et al., 1976). Plus tard, d'autres études ont stipulé qu'un maintien d'un ratio constant du nombre de noyaux musculaires sur le volume cytoplasmique, était nécessaire pour une hypertrophie physiologique et fonctionnelle, d'où la nécessité de la fusion de cellules satellites à la myofibre (Figure 19).

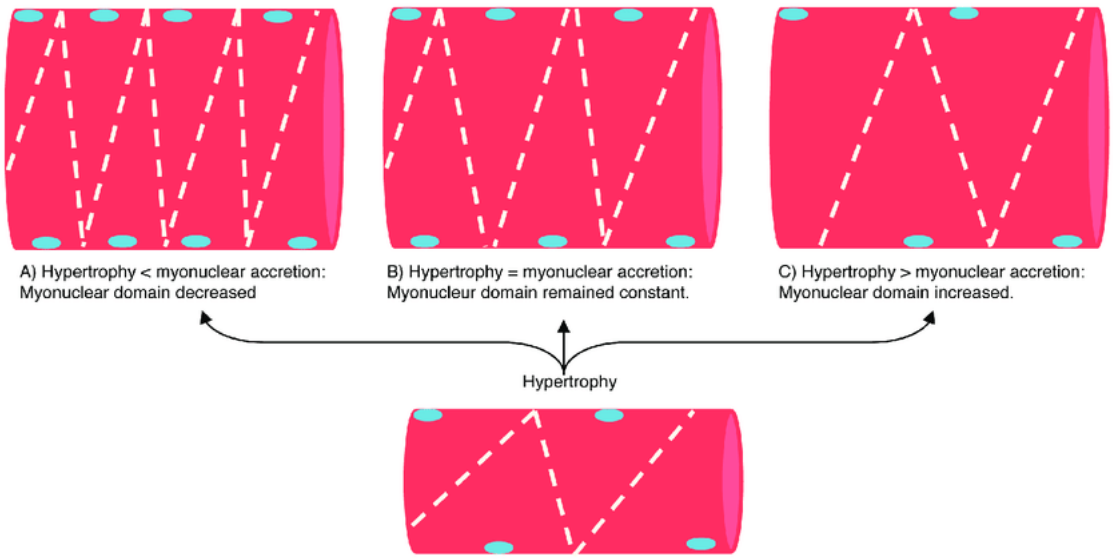


Figure 19 : Possible scénarios de modification du domaine myonucléaire au cours de l'hypertrophie.

Au sein des myofibres, les noyaux musculaires résidents partagent un cytoplasme commun et sont répartis uniformément sur toute la longueur des myofibres (Bruusgaard

et al., 2003), sauf au niveau des jonctions neuromusculaires (NMJ) et des jonctions myotendineuses (MTJ) où ils ont tendance à se regrouper. On pense que chaque myonucleus régule de manière transcriptionnelle un volume fini de cytoplasme dans son voisinage immédiat, appelé domaine myonucléaire (MND), ce qui constitue la base de la théorie du MND (Cheek et al., 1971), (Cheek, 1985), (Allen et al., 1999). Dérivé du concept de "sphère d'influence" de Strassburger, le concept de MND reflète, au niveau pratique, les limites du support biosynthétique qu'un seul myonuclei peut fournir, et sert donc de mesure de la taille des myofibres. En effet, les valeurs des MND, qui ont tendance à être plus petits dans les myofibres de type I (lentes, oxydatives) que dans celles de type II (rapides, glycolytiques) (Tseng et al., 1994), sont en corrélation avec la taille des myofibres dans les deux types de fibres (Cristea et al., 2010).

L'utilisation du modèle génétique Pax7-CreER; Rosa26 Diphteria Toxin A (Pax7-DTA), permettant l'ablation inductible des cellules satellites, a cependant montré qu'il y avait un certain degré d'hypertrophie après surcharge mécanique. Toutefois, cette hypertrophie n'atteint pas le niveau de croissance musculaire observé chez les contrôles, suggérant que la fusion des cellules satellite n'étaient pas absolument nécessaire et qu'il y avait une certaine plasticité dans le MND (McCarthy et al., 2011). Cependant, les résultats contradictoires obtenus avec ce modèle ont laissé la question en suspens (McCarthy et al., 2011), (Egner et al., 2017), (McCarthy et al., 2017), (Egner et al., 2016). Lorsque que l'on applique à de jeunes souris (<4 mois) déplétées en CS une surcharge mécanique pour induire une hypertrophie, les muscles ne réussissent pas à s'hypertrophier indiquant que les SC sont nécessaires pour s'adapter dans lors de la croissance post-natale (Murach et al., 2017). Cependant, imposer ce même stimulus chez des souris âgées de plus de 4 mois induit une hypertrophie, même en l'absence de CS (Murach et al., 2017). Il a été reporté que les myonuclei des souris adultes présentaient une capacité de réserve transcriptionnelle conséquent permettant de déclencher des signaux pro-hypertrophique en absence de fusion de cellules satellites (Kirby et al., 2016) ce qui pourrait manquer chez les jeunes souris pointant une certaine importance de l'âge de maturation. Cela expliquerait pourquoi certain observerait une hypertrophie et d'autres non.

D'autres modèles alternatifs de perturbation de la fusion des CS *in vivo* via des moyens génétiques ont conclu que l'accrétion nucléaire par la fusion de CS était nécessaire pour l'hypertrophie. En effet, la délétion de Mymk ou de Srf dans les CS, deux régulateurs majeurs de la fusion, bloque la fusion des CS et l'hypertrophie des myofibres,

montrant ainsi le rôle primordial de la fusion dans la croissance hypertrophique du muscle (Goh and Millay, 2017), (Randrianarison-Huetz et al., 2018). De plus, dans le modèle de délétion de Srf dans les CS, la restauration de la fusion par la restauration de l'expression de l'actine et de la croissance hypertrophique, montrent l'importance de la fusion dans le processus hypertrophique (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

Le développement de nouveaux modèles d'exercice murin ont permis de mieux cerner l'implication des CS durant l'hypertrophie dans un cadre plus physiologique. En utilisant une nouvelle méthode de course de roue progressive, pondérée et volontaire (PoWeR) sur des souris ayant subi une ablation des CS, il a été montré une réduction de l'hypertrophie et de la CSA (Englund et al., 2020). Il a aussi été montré que lorsque que l'on applique un protocole d'entraînement fractionné de haute intensité (HIIT) à des souris adultes (8 mois) pendant 8 semaines, on observe chez ces souris une augmentation progressive du nombre de noyaux par fibres et de l'hypertrophie (Goh et al., 2019). Cependant, si on induit le KO de Mymk, empêchant ainsi la fusion des CS à la myofibre, on observe une perturbation de l'hypertrophie quel que soit le moment de l'induction (au début de l'entrainement ou 4 semaines après) (Goh et al., 2019). Avec l'aide de ces nouvelles approches, les données récoltées penchent plus en faveur d'une contribution des cellules satellites à l'hypertrophie et au remodelage musculaire pour maintenir une fonction musculaire correcte permettant aux muscles de s'adapter aux stimuli environnementaux qu'il reçoit.

Une étude a voulu aller plus loin et comprendre le lien entre le MND et la capacité fonctionnelle du muscle squelettique. Pour cela, ils ont utilisé deux modèles génétiques : un modèle de délétion de la Myostatine et un modèle de surexpression de IGF1 dans le muscle squelettique qui dans les deux cas mène à une hypertrophie musculaire.

Dans le KO Myostatine, l'hypertrophie se fait par une augmentation de la taille de la myofibre sans ajout de noyaux, ce qui a pour conséquence d'augmenter le MND accompagné d'une force musculaire spécifique diminuée. Dans le modèle IGF1, on observe une hypertrophie par l'ajout de nouveaux noyaux rendant le MND constant avec une force musculaire spécifique préservée. Cette étude démontre qu'il y a une taille critique de MND au-delà de laquelle les fibres musculaires ne peuvent plus soutenir de manière adéquate les protéines contractiles pour maintenir la production de force (Qaisar et al., 2012).

c) La fusion dans les pathologies musculaires

La fusion est un processus important impliquée dans plusieurs étapes du développement du muscle squelettique ainsi que dans le maintien d'une bonne homéostasie musculaire. Une perturbation de ce processus via une dérégulation de ses facteurs critiques entraîne l'apparition de maladie musculaire portant atteinte au fonctionnement de ce tissu. Le syndrome de Carey-Fineman-Ziter (CFZS) est une myopathie congénitale associée à des mutations de Mymk. Les patients atteints par cette myopathie présentent une hypotonie, des anomalies faciales et des retards moteurs. Ces patients sont l'exemple direct de l'implication de la fusion des myoblastes en tant que cause d'une maladie (Camacho et al., 2020).

Il existe aussi une myopathie liée la mutation du partenaire de fusion de Mymk, Mymx. Cette myopathie est due à un variant récessif tronqué éliminant le domaine hydrophobique extracellulaire, conservé au cours de l'évolution. Les patients atteints présentent des anomalies similaires à la CFZS et les myoblastes issus de ces patients présentent des défauts de fusion (Ramirez-Martinez et al., 2022). De manière intéressante, la délétion de Mymx dans le poisson-zèbre entraine aussi, outre le défaut de fusion, une sévère myopathie (Wu et al., 2022).

Myomaker et Myomerger sont des protéines directement impliquées dans la fusion et il est normal de penser que leur mutation entraîne une myopathie chez l'homme. De nombreuses myopathies, plus ou moins sévères, impliquent des protéines n'étant pas directement impliquées dans le processus de fusion mais intervenant dans sa régulation. Par exemple, la dynamine-2, une GTPase ubiquitairement exprimée, régulant le dynamique de l'actine, est impliquée dans trois formes de myopathies centronucléées.
Un autre exemple est DOCK3, une Guanine nucleotide exchange factor (GEF) impliquée dans la migration, la fusion et la survie cellulaire. Il a été observé une dérégulation de la cascade miR-486/DOCK dans les muscles déficients en Dystrophine entrainant une surexpression de Dock3 (Reid et al., 2020, p. 3). Une haploinsuffisance de Dock3 causée par un KO de celui-ci dans un modèle murin de Myopathie de Duchenne (DMD) améliore les muscles atteints. Or le KO simple de DOCK3 est délétère pour la fonction musculaire (Reid et al., 2020). En effet, des analyses transcriptomiques révèlent une diminution globale des facteurs myogéniques.

Ces données montrent que des protéines, qui n'ont à priori pas de lien avec la fusion du fait de leur fonction, peuvent causer des pathologies musculaires par leur lien avec le programme myogénique en cas de dérégulation.

Chapitre 3 Le facteur de transcription Srf

Srf est un facteur de transcription ubiquitaire de 67 kD exprimé de la drosophile à l'homme (Posern and Treisman, 2006). Il a été identifié pour la première fois en tant que protéine nucléaire se liant à une courte séquence nucléotidique présente dans l'ADN, le « Serum Response Element » (SRE), médiant l'activation transcriptionnelle transitoire de *c-fos* et des gènes du cytosquelette d'actine après induction par le sérum (Treisman, 1987). Srf appartient à la famille des facteurs de transcription à MADS (MCM1-Agamous-Deficiens-SRF) -box. Ces facteurs de transcription à MADS-box constituent une famille de protéines incluant le facteur de transcription métazoaire SRF et MEF2, le facteur de transcription des levures MCM1 et ARG80, ainsi qu'un grand nombre de produits issus de gènes homéotiques de plantes (Shore and Sharrocks, 1995). Le motif des MADS-box est hautement conservé au cours de l'évolution et comprend le domaine de fixation à l'ADN et une partie du domaine de dimérisation des facteurs de transcription semblables à Srf. La partie N-terminal des MADS-box détermine la spécificité à l'ADN parmi les différents membres. La partie C-terminal des MADS-box représente la surface de dimérisation, cependant une dimérisation efficace requière l'addition de 30 résidus de la boîte MADS C-terminale, qui est nécessaire pour le recrutement de protéines accessoires (Treisman, 1995). Le Srf humain est une protéine longue de 508 acides aminés (aa) (Norman et al., 1988) tandis que le Srf murin n'en possède que 504 (Belaguli et al., 1997). La protéine Srf comprend un domaine de régulation en N-terminal (aa 1-142), une MADS-box (aa 142-171) et un domaine de transactivation en C-terminal (aa 266-508). Le domaine de régulation en N-terminal phosphoryle la CK2 (casein kinase 2) et la kinase ribosomale S6 (Johansen and Prywes, 1995) et contient un NLS (nuclear localization signal) (Rech et al., 1994). Srf se trouve sur le chromosome 17 chez la souris et le chromosome 6 chez l'humain. Son ARNm possède 7 exons et la plus forte expression détectée de son ARNm se trouve dans les muscles squelettiques et cardiaque (Belaguli et al., 1997).

Des expériences *in vivo, in vitro* et *in silico* ont suggéré la présence de plus de 2000 gènes cibles régulés par Srf (Esnauld et al. 2014). Les gènes cibles connus sont caractérisés par la présence d'une seul ou de plusieurs copies de la séquence consensus liant Srf $CC(A/T)_6CG$, la CArG box, dans leur promoteur (Sun et al., 2006). Srf contrôle la transcription de plusieurs « immediate-early » genes (IEG) (Posern and Treisman, 2006) dépendant de CArG, dont l'ARNm peut apparaître dans la cellule, dans les minutes suivant la stimulation, sans avoir le besoin de la synthèse de nouvelles protéines (Bahrami and Drabløs, 2016). La CArG-box a été identifié dans un certain nombre de gènes muscle-spécifiques incluant actine cardiaque et squelettique (Minty and Kedes, 1986), la Dystrophine (Klamut et al., 1990) et la chaîne légère de myosine 1/3 (Ernst et al., 1991). L'activité de Srf peut être différentiellement contrôlée par signaux environnementaux ou des cofacteurs régulateurs muscle-spécifiques (Posern and Treisman, 2006).

1. Les voies de signalisation et de régulation

Comme de nombreux facteurs de transcription, Srf interagit avec d'autres cofacteurs de transcription. Il y a au moins deux voies de signalisation impliquant différents cofacteurs (Figure 20).

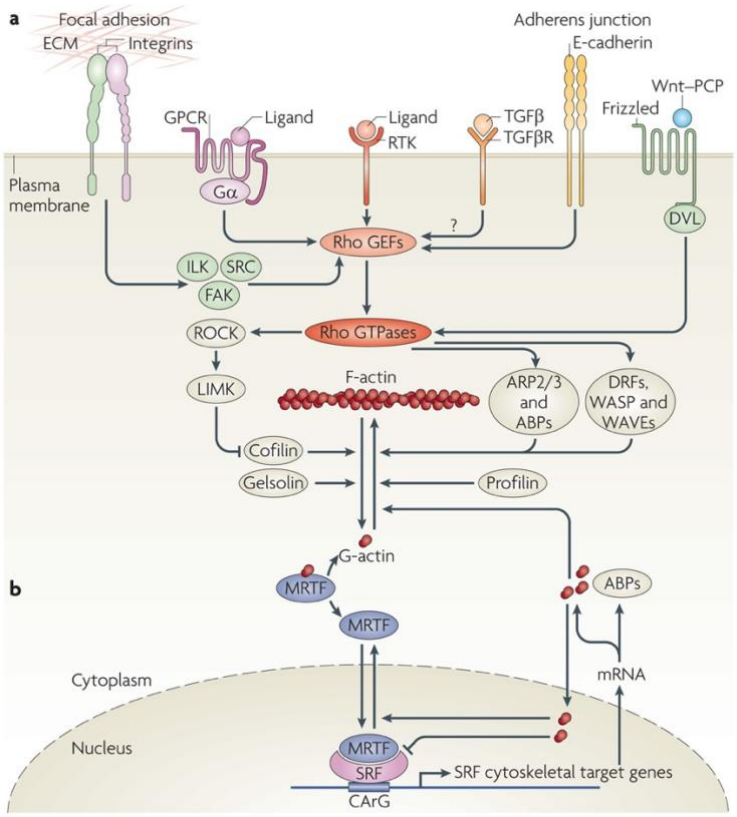


Figure 20 : Voie de signalisation Mrtf/Srf (Olson and Nordheim, 2010).

Srf forme un complexe tertiaire au SRE de c-fos avec les membres de la famille des protéines accessoires au domaine Ets, les facteurs de complexe tertiaire (TCF), qui se lient à un motif Ets conservé voisin au site de fixation de Srf (Treisman, 1994). Ces protéines, incluant SAP-1, Elk-1 et ERP-1/NET/SAP-2, contiennent deux régions N-terminal conservées requis pour la fixation à l'ADN et la formation du complexe avec Srf et un domaine d'activation conservé en C-terminal contenant des potentiels sites consensus de des MAP kinases (Price et al., 1995). Au moins une des voies dont le signal actif le SRE provient de la voie des MAP kinases et est dépendant du complexe tertiaire Srf/ TCF. L'activation des MAPK, par Ras, Raf, MEF et Erk, phosphorylent les TCF et participe à leur activation.

Srf est aussi activé par la famille Rho des petites GTPases (Hill et al., 1995) *via* le recrutement des facteurs de transcription reliés à la myocardine (Mrtf) sur les gènes cibles (Olson and Nordheim, 2010). Les Rho GTPases régulent Srf et ses cofacteurs Mrtfs par leur capacité à induite la polymérisation de l'actine. Des altérations de la dynamique de l'actine (actine- G/actine-F) est nécessaire pour une activation de Srf via RhoA, activation qui est inhibée lorsque l'on traite les cellules avec un agent liant l'actine-G démontrant que le niveau d'actine-G contrôle l'activité de Srf (Sotiropoulos et al., 1999). De plus, la localisation subcellulaire du co-facteur Mrtf dépend de la concentration cytoplasmique d'actine-G, qui maintient Mrtf dans le cytoplasme. Suite à une stimulation par le sérum, la polymérisation de l'actine entraîne une diminution de la quantité d'actine-G induisant ainsi la libération et la translocation nucléaire de Mrtf qui participera dans le noyau à l'activation de la transcription de gènes cibles de Srf. De ce fait, Mrtf agit comme un « senseur transcriptionnel de la quantité d'actine monomérique » dans la cellule, via sa capacité à lier l'actine via les domaines RPEL (Guettler et al., 2008)(Miralles et al., 2003)(Vartiainen et al., 2007). La voie de signalisation RhoA-actine contrôle un sous-ensemble de gènes cibles de Srf, incluant les IEGs tels que la *Vinculine* et *Srf* ainsi que les gènes de l'actine beta et des actines cardiaques, des muscles lisses et des muscles squelettiques (alpha-actine) (Posern and Treisman, 2006). Les cibles de Mrtfs codent pour des régulateurs du cytosquelette, de la transcription et de la croissance cellulaire (Esnault et al., 2014). Des formes constitutivement actives de RhoA et d'autres Rho

GTPase tels que cdc42 et Rac1 peuvent activer Srf en l'absence de signaux extracellulaires (Hill et al., 1995).

De nombreuses études ont montré un rôle majeur de Srf dans la régulation de miARNs et sa régulation par des miARN. Srf régule certains miARNs jouant un rôle dans le développement cardiaque et squelettique. En effet, plusieurs études ont montré que le miR-133 promouvaient la prolifération en réprimant Srf (Chen et al., 2006)(Zhong et al., 2021). La surexpression de Srf dans le cœur (Srf-Tg) entraîne l'altération de l'expression d'un certain nombre de miARNs. De façon intéressante, la downregulation de miR-1, miR-133a et l'upregulation de miR-21 se produit à P7 chez ces souris, bien avant le début de l'hypertrophie cardiaque, suggérant que la surexpression de Srf impacte l'expression des miARNs contribuant à l'hypertrophie cardiaque (Zhang et al., 2011). Un haut niveau de surexpression de Srf entraîne le développement d'une fibrose associée avec une augmentation de l'expression de facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et une forte downrégulation de miR-133a, révélant un rôle clé de l'axe Srf/CTGF/miR-133 dans la régulation de la fibrose cardiaque (Angelini et al., 2015).

Une étude a récemment montré que Nemo-like kinase (NLK) était nécessaire pour promouvoir la signalisation RAS/ERK-ELK/Srf, signalisation contrôlant des gènes impliqués dans la prolifération et la croissance, voie antagoniste à la voie MLK/Srf promouvant la contractilité. Le KO de NLK entraine une hypertrophie musculaire et une upregulation de Srf/NKL et une downrégulation drastique de la voie Srf/ELK (Li et al., 2022).

2. Rôle de Srf au cours du développement et de la myogenèse

Srf est un facteur de transcription dont l'activité est détectée très tôt dans le développement chez la souris, dès E6.6 dans l'ectoderme et l'endoderme. À E7.5, la protéine Srf peut être observée dans les trois couches de l'embryon. De façon intéressante, à E8.5, l'expression ubiquitaire de Srf devient localisée dans le cœur en développement (en particulier le myocarde). À E10.5, une expression de Srf est détectée dans le myotome en développement (Arsenian et al., 1998). Srf est important pour le développement de l'embryon. En effet, une KO constitutive de Srf entraine une mortalité embryonnaire à E12.5 à cause de défauts sévères de gastrulation avec des traces de formation mésodermique (Arsenian et al., 1998) rendant impossible toute étude de son rôle dans le myogenèse embryonnaire chez la souris. Toutefois il est important de noter que *Srf* a été

identifié comme étant l'un des trois gènes (« master genes ») contrôlant la myogenèse chez *Caenorhabditis elegans*, avec *MyoD* et *HAND18* (Fukushige et al., 2006).

Compte tenu de la mortalité du modèle de la délétion constitutive de Srf chez la souris (Arsenian et al., 1998), la création d'un modèle génétique murin « Srf-floxé » a permis d'étudier l'invalidation du gène *Srf* dans le muscle squelettique (Parlakian et al., 2004), (Wiebel et al., 2002). Le rôle de Srf dans la myogenèse embryonnaire a été investigué en délétant Srf dans le lignage musculaire au cours développement en utilisant des lignée Cre sous le contrôle du promoteur de la *Myogénine* (expression dès E8,5) et de la *MCK* (Muscle Creatine Kinase (entraînant la délétion à un stade embryonnaire un peu plus tardif que le modèle précédent) (Li et al., 2005). Dans ces deux modèles, les muscles se forment mais présentent une croissance musculaire très affectée entraînant la létalité périnatale des souris, probablement due à une insuffisante respiratoire.

Un troisième modèle de délétion conditionnelle de *Srf* dans le linéage myogénique a été développé au laboratoire en utilisant une lignée de souris dans laquelle l'expression de la recombinasse Cre est sous le contrôle du promoteur de l' « *human α-Skeletal Actin* » (HSA-Cre), entraînant une invalidation de *Srf* dans les fibres musculaires différenciées dès E9 (Charvet et al., 2006). Dans ce modèle la croissance musculaire embryonnaire n'est pas affectée. Les souris mutantes présentent un retard de croissance qu'au troisième jour après la naissance (P3). Seulement 50% des souris survivent jusqu'à P42. Leurs muscles présentent une atrophie musculaire très sévère, ainsi que de nombreux problèmes structuraux comme des sarcomères désorganisés (Charvet et al., 2006).

L'ensemble de ces études ont montré un rôle important de Srf dans la mise en place du muscle au cours du développement et de la période périnatale à la fois dans les cellules progénitrices et les fibres différenciées.

3. Srf dans le muscle squelettique adulte

Dans les muscles adultes, la délétion de *Srf* a été induite dans deux compartiments cellulaires : les fibres musculaires et les cellules satellites, en utilisant des lignées Cre-ERT2 inductibles par le tamoxifène (*HSA-Cre-ER^{T2}* et *Pax7$^{CreERT2/+}$*).

a) Invalidation de Srf dans les fibres musculaire adultes

La délétion de *Srf* dans les myofibres chez l'adulte (modèle *HSA-Cre-ER^{T2} :Srf$^{flox/flox}$*) n'a pas engendré de phénotype musculaire avant 5 mois post tamoxifène malgré une forte

diminution de l'expression de *Srf* et du gènes codant pour l'alpha actine squelettique, une de ses cibles principales. Ces résultats suggèrent qu'avant ce moment Srf n'est pas requis pour le maintien des fibres musculaires (Lahoute et al., 2008). Cependant, à partir de 5 mois après la perte de Srf, les muscles mutants présentent des signes de vieillissement prématuré caractérisé par une atrophie, une désorganisation des sarcomères, une fibrose et une accumulation lipidique (Lahoute et al., 2008). Il est important de noter qu'au cours du vieillissement musculaire naturel, il a été montré que l'expression de Srf diminuait chez la souris et chez l'homme (Lahoute et al., 2008), (Sakuma et al., 2008).

Par ailleurs, il a également été montré au laboratoire que Srf dans les myofibres était indispensable dans des conditions d'adaptation du muscle (lorsque son homéostasie était compromise) comme c'est le cas au cours de la hypertrophie par surcharge de travail (Guerci et al., 2012) et la régénération musculaire (Lahoute et al., 2008). Cela suggère que Srf est requis pour le maintien d'une niche adéquate à la plasticité musculaire.

Suite à une surcharge fonctionnelle du muscle et à une augmentation des signaux mécaniques, le laboratoire a montré que Srf dans la fibre était indispensable pour l'hypertrophie en exerçant un contrôle paracrine des fonctions des cellules satellites. En effet, Srf participe à la prolifération des SC en contrôlant l'expression d'Il6 et joue un rôle central dans leur fusion aux fibres en croissance en modulant l'expression de Ptgs2 (Cox2) et indirectement la production d'Il4 (Guerci et al., 2012) (Figure 21).

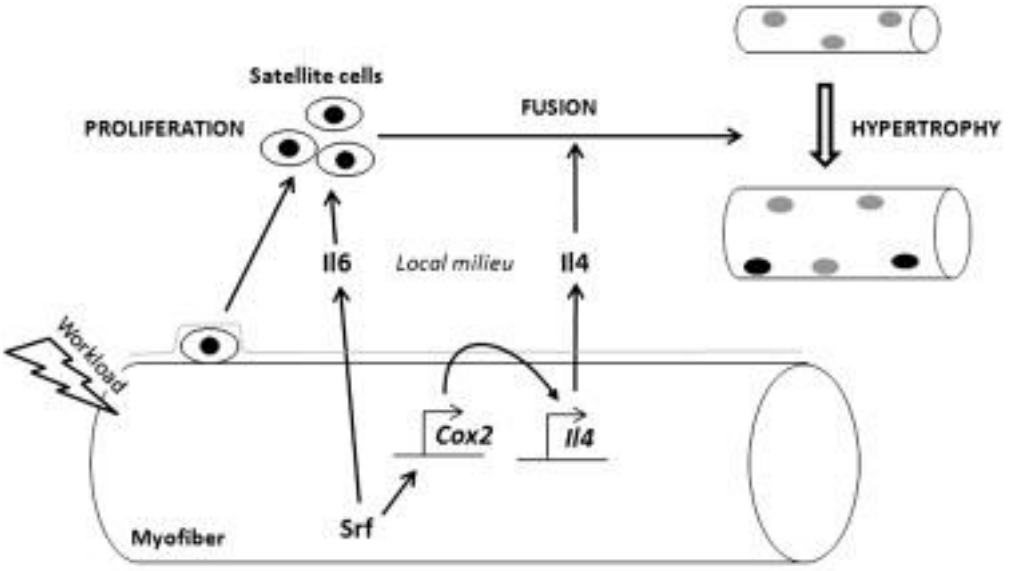


Figure 21 : Modèle schématique : Modèle schématique : en réponse à une charge de travail accrue, Srf à l'intérieur des myofibres module les expressions de Il6 et Cox2/Il4 et, par conséquent, exerce un contrôle paracrine de la prolifération et de la fusion des cellules satellites, respectivement, qui à leur tour soutiennent l'hypertrophie des muscles squelettiques.

Le rôle clé de Srf en tant que médiateur des signaux mécaniques dans les fibres musculaires a été également montré dans des conditions d'atrophie. En effet, notre laboratoire a mis en évidence que l'activité de l'axe actine-Mrtf-Srf était diminuée uniquement dans des conditions de fonte musculaire associées à une perte d'activité musculaire et que l'inhibition de cet axe exacerbait spécifiquement ce type d'atrophie (Collard et al., 2014).

Ces deux études ont ainsi permis l'identification de Srf comme un médiateur clé de la mécanotransduction dans le muscle squelettique.

b) Invalidation de Srf dans les cellules satellites

D'une manière intéressante, des études *in vitro* d'inhibition de Srf dans la lignée des cellules myogéniques (C2C12), par des micro-injection d'anticorps de Srf purifiés ou par l'expression d'ARN antisens, ont démontré que l'activité de Srf était requise pour l'expression de MyoD dans des myoblastes ainsi que pour leur prolifération et leur différenciation en culture (Soulez et al., 1996)(Vandromme et al., 1992) (Gauthier-Rouviere et al., 1996),(Carnac et al., 1998). De manière intéressante, la région régulatrice distale du gène MyoD contient un élément de liaison MEF2/Srf partagé (L'honore et al., 2003). Contrairement à ces études, l'invalidation de Srf dans les cellules satellites adultes *in vivo* et dans des cultures primaires de CS montrent que la progression dans le cycle cellulaire et l'engagement dans la différentiation n'étaient pas affectés *ex vivo* et *in vivo* par la perte de Srf (Randrianarison-Huetz et al., 2018). De plus, la perte de Srf dans la culture de CS primaires n'a pas perturbé l'expression de *MyoD*. Ces résultats mettent en lumière les divergences dans le comportement *in vitro* de lignées cellulaires de myoblastes (C2C12) par rapport à celui des cultures primaires de CS ou des résultats obtenus *in vivo*.

Cependant la délétion de *Srf* dans les cellules satellites adultes a permis de montrer que Srf était un facteur essentiel pour la fusion. En effet, la délétion de *Srf* dans les CS, entraine *in vivo* une importante perturbation de l'hypertrophie induite par surcharge mécanique et de la régénération musculaire (Randrianarison-Huetz et al., 2018). *In vitro*, on observe un important défaut de fusion, une désorganisation du cytosquelette d'actine et une perte des protrusions à la synapse fusogénique. L'ensemble de ces données ont permis de démontrer que Srf est régulateur majeur de la fusion des CS, dont l'expression est indispensable dans les deux partenaires de fusion. Dans une tentative de restauration

de la fusion, l'actine cardiaque a été surexprimée dans les myoblastes mutants. Ces cellules dépourvues de Srf et surexprimant l'actine présentent un cytosquelette d'actine partiellement restauré, réussissent à fusionner avec une cellule contrôle *in vitro* (fusion hétérotypique) et à partiellement rétablir l'hypertrophie (les myofibres sont sauvages et les CS sont mutantes). Cependant elles échouent à fusionner *in vitro* avec une autre cellule mutante surexprimant l'actine et la forte altération du processus de régénération musculaire observé chez les mutants Srf n'est pas améliorée par la surexpression de l'actine. Ainsi, la seule surexpression de l'actine n'est pas suffisante à restaurer la fusion entre deux cellules dépourvues de Srf (fusion homotypique). Ces données indiquent que d'autres cibles de Srf que l'actine sont nécessaires pour que la fusion homotypique puisse avoir lieu.

Objectifs

Le but de mon projet de thèse est d'étudier le rôle de Srf au cours de la fusion des myoblastes. Notre équipe a déjà généré un modèle murin de délétion conditionnelle de Srf dans les cellules satellites, et grâce à ce modèle, nous avons mis en lumière l'importance majeure de ce facteur de transcription pour le processus de fusion et montré pour la première fois chez les mammifères la présence de protrusions composées d'actine au site de fusion, dont la formation dépend de Srf. En effet, Srf contrôle directement l'expression de l'actine et de différents gènes impliqués dans la régulation de la polymérisation de l'actine, et les cellules dépourvues de Srf contiennent peu de F-actine et ont un cytosquelette d'actine désorganisé (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Ces protrusions avaient déjà été mises en évidence dans d'autres modèles (Sens et al., 2010) (Luo et al., 2022b) et il avait été suggéré qu'elles serviraient à créer une force invasive pour faciliter la fusion avec une autre cellule (Kim et al., 2015). De plus, Le rétablissement de l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules sattellites dépourvues de Srf au site de fusion en surexprimant l'actine a permis de restaurer la fusion hétérotypique (entre une cellule contrôle et une cellule mutante) mais pas la fusion homotypique (entre deux cellules mutantes) (Figure 22). Nous avons donc émis l'hypothèse que des gènes cibles de Srf, autres que l'actine, étaient nécessaires pour la fusion homotypique de cellules mutantes.

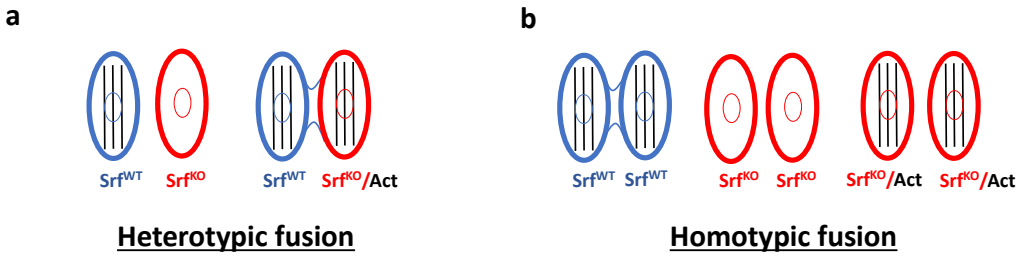


Figure 22 : Schéma des différents types de fusion. (a) Un myoblastes KO pour Srf surexprimant l'actine réussit à fusionner avec une cellule WT, d'un génotype différent : c'est la fusion hétérotypique. (b) Les myoblastes Srf KO surexprimant ou non l'actine ne réussissent pas à effectuer une fusion homotypique, c'est-à-dire à fusionner avec des myoblastes de même génotype.

En réutilisant ces modèles de délétion de Srf et l'analyse transcriptomique réalisée précédemment (Randrianarison-Huetz et al., 2018), nous allons étudier l'impact de potentiel gène/voie de signalisation, cible de Srf, sur la fusion *in vitro* et *in vivo* et déterminer si l'actine y apporte un effet bénéfique.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont été présentés sous la forme d'un article non-soumis et rédigés en anglais.

Article:

Role of Srf in the mechanobiology of muscle cell fusion.

Role of Srf in the mechanobiology of muscle cell fusion

Kassandra Kobon[1,3], David Peireira[3,4], Léa Delivry[1,3], Sandra Sara[3], Atef Asnacios[3,4], Pascal Maire[1,2,3], Voahangy Randrianarison-Huetz[1,2,3] Athanassia Sotiropoulos[1,2,3]

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France

[2]CNRS UMR8104, Paris, France

[3]Université de Paris Cité, Paris, France

[4]Laboratoire Matières et Systèmes Complexes, Paris, France

* Lead Contact and Corresponding author:

Athanassia Sotiropoulos

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

Telephone number: +33 1 44 41 24 32

Fax number: +33 1 44 41 24 21

Email address: athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

Abstract

Repair of muscle tissue and growth of newly formed multinucleated myofibers depend on satellite cells (SCs), the adult muscle stem cells, and on their fusion capacities. In this study, we took advantage of genetic model of defective fusion (Srf mutant SCs (Mut)), which was not rescued by the sole maintenance of actin structures at the fusion site (Mut/ Act+), to decipher new genes and pathways that can restore fusion and provide insight into the mechanisms of mammalian muscle cell fusion. We first showed that Srf acted after membrane mixing in the fusion process. Moreover, Mut and Mut/ Act+ SC were less rigid than control cells and the increase of their membrane rigidity through a hypotonic osmotic shock partially restored their fusion. We then focused our attention on *MLC2*, a bona fide Srf target gene and a major regulator of cellular contractility. MLC2 expression was decreased in Mut SCs and its inhibition blunted fusion. Moreover, the overexpression of MLC2 in Mut and Mut/ Act+ SC partially restored their fusion *in vitro* and *in vivo* in regenerating TA muscles. Of note, a better rescue in vitro, following hypotonic shock or after MLC2 overexpression, was observed in Mut/ Act+ SC presenting preserved actin protrusions at the site of fusion. Altogether, these findings identify MLC2, cellular contractility and membrane rigidity as potential new players of myoblast fusion that may control Srf-dependent fusion in concert with the formation of actin protrusions.

Introduction

Adult skeletal muscle possesses a tremendous degree of plasticity, as it can adapt its size to various stresses, such as functional overload, and can efficiently regenerate after injury. Skeletal muscle tissue contains multinucleated post-mitotic myofibers and a small resident muscle stem cell population, known as satellite cells (SC) maintained in a quiescent state in undamaged muscle. SC are activated in response to muscle damage or increased load and fuse to form new myofibers or supplement growing muscle fibers. Thus, SC fusion is an essential step for both these processes of adaptability of adult muscle.

Fusion is a multistep process beginning by the apposition of membrane, then occurs the lipid mixing of the membranes (hemifusion), the pore formation and its expansion with the formation of actin structures to support this process. In *Drosophila* embryo, it was shown that actin-based protrusions formed at the fusogenic synapse and that opposite forces, a pushing one generated by the protrusion and a resisting one, reflecting cellular rigidity, produced by the actomyosin complex, act together to promote fusion (Martin, 2016), (Kim et al., 2015). Moreover, by combining live imaging and metal-replica electron microscopy (EM) on unroofed muscle cells, our laboratory provided the first description of one of the initial steps of the fusion process in primary vertebrate myoblasts which involves asymmetrically distributed actin-based finger-like protrusions at the site of cell-cell fusion (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

Srf is an ubiquitously expressed transcription factor which target genes regulate actin cytoskeleton organization and are involved in cell growth and migration (Pipes et al., 2006). On the other hand, Rho-regulated actin dynamics have been shown to control the nuclear accumulation of Srf-coactivator Mrtfs and therefore to modulate Srf activity (Nordheim, 2014), (Sotiropoulos et al., 1999). Thus, the actin/Mrtf/Srf pathway forms a homeostatic feedback system to ensure that actin levels are appropriate to support the actin dynamics required for complex cell behaviour such as the fusion of myoblasts.

We showed, using an inducible and conditional deletion mice model of *Srf* in the SC, that Srf was not essential for SC proliferation and differentiation but was required in SC fusion propensity. SC lacking Srf were unable to fuse and actin-based finger-like protrusions were absent at their fusion site. These data showed that Srf is a key regulator of myoblast fusion in mammals which is required in both fusion partners. One mean by which Srf controls fusion is the maintenance of actin scaffold and the formation of actin-based finger-like protrusions at the site of fusion as shown by the rescue of the fusion of Srf mutant SC with wild-type SC when

actin network was restored through alpha actin overexpression (Randrianarison-Huetz et al., 2018). However, the fusion between two Srf mutant SC overexpressing actin (homotypic fusion) was not rescued indicating that additional target genes of Srf (other than those regulating actin scaffold) are important in the control of fusion.

In this study, we took advantage of these unique genetic models of defective homotypic fusion (Srf mutant SC (Mut), and Srf mutant SC overexpressing actin (Mut/ Act+)) to decipher new genes and pathways that can restore fusion and provide insight into the mechanisms of mammalian muscle cell fusion. We first showed that Srf was not necessary for membrane mixing and that Srf acted after hemifusion in the fusion process. Moreover, we demonstrated that Mut and Mut/ Act+ SC were less rigid than control cells and we succeeded to partially restore SC fusion by increasing membrane rigidity through a hypotonic osmotic shock. Among Srf target genes, one of the genes that caught our interest was *MLC2* that regulates cellular contractility and may be involved in the control of cell rigidity. We showed that MLC2 expression was decreased in Mut SC and showed its functional role in fusion by contractility inhibition experiments using Blebbistatin. Interestingly, the overexpression of MLC2 in Mut and Mut/ Act+ SC partially restored their fusion to similar extend to that observed following hypotonic osmotic shock, further suggesting that membrane tension in necessary for SC fusion. Finally, the overexpression of MLC2 *in vivo* in Mut and Mut/ Act+ *TA* muscles after regeneration had also a beneficial effect on fiber growth and on nuclei accretion. Altogether, these finding allowed us to identify MLC2, cellular contractility and membrane rigidity as potential new players of myoblast fusion acting downstream Srf.

Results and discussion

Srf mutant cells hemifusion is not affected

We first wondered why Srf-deleted myoblasts (Mut) cannot fused and which step of the fusion process was controlled by Srf. In a previous transcriptomic study, we identified the genes differentially expressed among myoblasts (DO), myocytes (D1) and myotubes (D3 post differentiation onset) expressing of not Srf (Randrianarison-Huetz et al, 2018). Analysis of potential biological functions of these genes by a gene ontology program (Ingenuity), pointed out an over-representation of genes involved in Cholesterol biosynthesis and metabolism at D1 and D3 (Figure 1A). Interestingly cholesterol has been shown to be important for the control of lipid mixing (hemifusion) initiating membrane fusion (Bu et al., 2018). We thus performed membrane-mixing experiments on control and Srf mutant SC using lipid probes coupled with different dyes and scored hemifusion events as cells exhibiting both lipid probes (Figure 1B). No difference between control and Mut cells (Figure 1D) was observed showing that Srf is not necessary for SC membrane mixing. These findings also suggest that the bending of lipid membrane to form fusion intermediary or hemifusion is not dependent on the actin cytoskeleton as mutant cells displayed hemifusion even with perturbed actin network.

Srf is necessary for SC cellular rigidity

The regulation of actin cytoskeleton was previously identified as one of the main biological functions affected by Srf deletion in muscle cells (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Indeed, Srf deleted muscle cells possess less total actin and F-actin, and an impaired actin architecture. Furthermore, an absence of actin-based protrusions at the site of fusion and a loss of their actin ring composed of F-actin at the cell cortex were observed Mut SC that could affect the behavior of the “attacking” and the “receiving” cells upon fusion (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Indeed, in *Drosophila*, actin remodeling was shown to be important for fusion, in particular for the production of opposite forces at the fusogenic synapse: actin protrusions to attack cells and an actomyosin network under the membrane to resist at the invasive forces (Kim et al., 2015). Moreover, the regulation of cell surface tension by actin cortex architecture has been demonstrated in the literature (Chugh et al., 2017). Given that Mut and Mut/ Act+ SC presented less F-actin at their cortex, we wondered if it could impair their global rigidity. To test this hypothesis,

we measured the cortical tension at the global cell scale of isolated SC using a single cell rheometer which has been suggested to relying on actomyosin contractility (Alibert et al., 2021) (Desprat et al., 2006) (Figure 2A). We showed a decrease of apparent viscoelastic modulus in SC lacking Srf overexpressing or not actin (Figure 2B) underlying the importance of Srf in the control of cellular rigidity in muscle cells. Of note, the overexpression of alpha-actin was not sufficient to maintain cortical tension in Srf mutant SC.

Fusion of SC lacking Srf is partially restored by a hypotonic osmotic shock

To rescue cell rigidity, we artificially increased membrane tension by inducing a hypotonic osmotic shock on myocytes (myoblasts differentiated for 1 day) and we observed the consequences on cell fusion efficacy (Figure 3A). The fusion capacities of the cells were scored after normalization of the percentage of fusion events after osmotic shock to that of cells of the same genotype that did not receive osmotic shock treatment. This representation allows the evaluation of the rescue extend. In control cells, hypotonic shock had no effect, however, in Mut SC, it increased cell fusion by about 1.5-fold (Figure 3C). Nevertheless, it is important to point out that without normalization, the augmentation of fusion capacities of Srf mutant cells did not reach the level of wild-type cells (figure 3D). The hypotonic osmotic shock is an osmotic modification applying a mechanical stress on the membrane and it may also favor the appearance of membrane pore. Thus, the beneficial effect of the osmotic shock observed in Srf mutant SC is probably due to a combination of different physical factors improving fusion.

We then wondered whether the overexpression of actin in Srf mutant cells could further ameliorate cell fusion after osmotic shock. We observed a 2-fold increase of Mut/ Act+ SC fusion following shock that was significantly higher than the one observed without actin overexpression (Figure 3C). Altogether, our results showed that the rescue of rigidity of Srf mutant SC partially restored homotypic fusion and that this restoration was greater in Srf mutant cells harboring a preserved actin scaffold.

Of note, cortical rigidity of Mut SC, as assessed by the measurement of the apparent viscoelastic modulus, was not rescued by alpha-actin ectopic expression (Figure 2B). These results seem to indicate that, in this later model, actin is not involved in the maintenance of cellular rigidity even if alpha-actin overexpression is important for protrusion formation, as shown in our previous study (Randrianarison-Huetz et al.,

2018). The better fusion rescue of Mut/Act+ SC submitted to transient osmotic shock may be due to a combination of different factors improving fusion: transient turgescence of the cells modifying rigidity and membrane characteristics, and restoration of actin-based protrusions at the fusion site.

MLC2 and pMLC2 levels are affected in Srf-depleted SC

We next analyzed which mechanisms dependent on Srf activity could control cellular rigidity and could affect fusion. Thus, we focused our attention on the common genes differentially expressed between control and Srf mutant myoblasts, myocytes and myotubes (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Among the 144 differentially expressed genes, we noticed *MLC2* gene (for *Myosin Light Chain 2*) which is a direct target of Srf (Medjkane et al., 2009) and is involved in the control of cellular contractility (Figure 4A). MLC2 is a protein that allows the interaction of myosin II with actin. Its phosphorylation on Ser19 and Thre18 permits to assemble actomyosin complex and to initiate contraction (Iwasaki et al., 2001). Moreover, in *Drosophila*, MLC2 was shown to accumulate at the fusogenic synapse. It has been proposed that tension in the receiving cell at sites of fusion is critical for fusion pore formation (Kim et al., 2015).

We then verified the transcriptomic data by RT-qPCR and showed that *MLC2* expression at the transcript level was indeed reduced in Srf mutant myoblasts (Figure 4B-D). We also showed that Mut cells displayed less phosphorylated MLC2 (pMLC2) and less MLC2 proteins by immunofluorescence and Western blot analyses (Figure 4E-J). Moreover, the ratio of pMLC2/MLC2 was similar between control and Mut SC (Figure 4K). Altogether, these results show that the decrease of the absolute levels of pMLC2 in Srf mutant SC is mainly due to the decrease of total MLC2 levels rather to perturbations in signalling pathways leading to MLC2 phosphorylation. It is interesting to note that the decrease of total MLC2 tends to be more pronounced than the one of pMLC2. This may suggest that in myoblasts lacking Srf, there was an attempt to compensate MLC2 decline in the cell by slightly enhancing MLC2 phosphorylation.

Contractility is necessary for MB fusion

To get more insight on the implication of MLC2 during fusion process, we investigated the cellular distribution of pMLC2 in control myocytes 1 day after

differentiation onset when fusion occurs. We showed that pMLC2 colocalized with F-actin and accumulated preferentially at the membrane of the myocytes, which is consistent with its role in the maintenance of the cortical tension (Figure 5A). Furthermore, we also observed accumulation of pMLC2 at cell-cell contacts together with an accumulation of F-actin (Figure 5A, yellow arrow). However, this accumulation was not systematic and some cell-cell contacts did not present pMLC2 and F-actin accumulations (Figure 5A, white arrow). Of note, the non-phosphorylated MLC2 did not accumulate with F-actin spot at cell contacts (Figure 5A, red arrow). It is also important to stress out that it is difficult to determine in static images if cells will fuse. Indeed, not all cells entering in contact fuse. We can speculate that, only those with an accumulation of both pMLC2 and F-actin at the cell-cell contact will fuse.

Finally, we investigated the functional implication of MLC2 and contractility in the fusion process by inhibiting actomyosin contractility using Blebbistatin. Importantly, Blebbistatin impaired myoblast fusion (Figure 5B), pointing out MLC2 as a potential regulator of fusion in mammalian cells.

All these information highlighted MLC2 as a good candidate acting downstream Srf to control fusion. By controlling the expression of *MLC2*, Srf could contribute to the maintenance of mechanical tension allowing, in concert with actin-based protrusions, a successful invasion and an efficient fusion.

Homotypic fusion is partially rescue by MLC2 overexpression in Srf-depleted SC

To go further we studied whether the restoration of MLC2 expression level (and potentially of cellular tension) in Mut SC was sufficient to restore Srf mutant myoblast fusion. For this purpose, we overexpressed MLC2 in control and Mut myoblasts with lentiviruses driving MLC2 expression (Figure 6A). After puromycin selection, we checked by RT-qPCR and Western blot the overexpression of MLC2 in the control and mutant myoblasts. We showed an increase by about 40-fold of *MLC2* transcript and a restoration of MLC2 protein amounts to control levels (Figure 6B-D).

Next, we analyzed the consequences of MLC2 overexpression on myoblast fusion and showed that it did not affect the fusion capacity of control SC. However, MLC2 overexpression increased the fusion in Mut SC (when normalized to the condition without shock) and this amelioration was similar to osmotic shock data (Figure 6F, Figure 3C). Furthermore, we treated Mut cells overexpressing MLC2 with a hypotonic osmotic shock

to investigate whether the pathways increasing fusion through osmotic shock and MLC2 overexpression were the same. We observed similar increases of fusion capacities in the conditions with osmotic shock, with MLC2 overexpression and both treatments (Figure 6G). As the effects were not synergistic, these data suggest that both treatments use common means to ameliorate fusion of Srf mutant cells.

To investigate whether alpha-actin together with MLC2 over-expressions could restore fusion to a greater extend as compared to MLC2 overexpression in Mut cells, Mut/ Act+ myoblasts were transduced with MLC2-expressing lentiviruses (Figure 6A). Upon MLC2 overexpression, a further amelioration of fusion capacities was observed in Mut/ Act+ SC as compared with Mut SC (Figure 6F).

Altogether, the fact that the rescue of Mut and of Mut/ Act+ SC defective fusions achieved by MLC2 overexpression were similar to those obtained with osmotic shock suggests that the maintenance of tension at the membrane is necessary to facilitate fusion.

MLC2 overexpression improves Srf mutant myofibers growth during muscle regeneration

To investigate the contribution of MLC2 to fusion *in vivo* and whether MLC2 could restore Srf mutant myofiber growth, we conducted electroporation experiments on *TA* muscles during regeneration in control, Mut and Mut/ Act+ mice. To induce muscle regeneration, cardiotoxin (CTX) was injected in *TA*. Then 4 days later, MLC2-GFP and GFP plasmids were injected in *TA* and electroporation was performed. Six days later, muscles were collected and analyzed (Figure 7A). As previously described, 10 days CTX post-injection, Mut and Mut/ Act+ muscles were 10 times smaller than control muscles (Figure 7B) (Randrianarison-Huetz et al., 2018). To examine MLC2 electroporation effects, muscle sections were stained for Laminin to identify myofibers, for GFP to detect electroporated myofibers and with DAPI to visualize nuclei (Figure 7B). Cross section area of electroporated and surrounding non-electroporated myofibers were measured using Laminin staining and the number of nuclei inside electroporated fibers was counted using Laminin and DAPI stainings. Data are presented as a ratio of the values obtained from electroporated fibers divided by the values obtained from the surrounding non-electroporated myofibers (Figure 7B). In control muscles, we observed no effect of MLC2 overexpression on CSA electroporated/non-electroporated ratio or on the number of nuclei per myofiber. In Mut and Mut/ Act+ muscles, myofiber CSA increased upon MLC2

overexpression and the number of myonuclei per fiber seemed to raise in electroporated fibers (Figure 7C-D), suggesting that MLC2 overexpression ameliorated muscle growth *in vivo*. However, additional experiments will be added to confirm these observations.

It is important to mention that this experimental setting presents several weaknesses. First, the number of electroporated myofibers is quite low: from 40 to 200 electroporated myofibers per *TA* muscle. Moreover, in this model, we cannot determine whether the fusion occurred between two cells that received ectopic MLC2 or between one cell electroporated with MLC2 and one non-electroporated cell, the later scenario being the most likely to occur. Thus, the fusion configuration happening in the electroporated muscles better understands heterotypic fusion in which fusion occurs between a control and Ctl/ MLC2+, Mut and Mut/ MLC2+ or Mut/ Act+ and Mut/ Act+/ MLC2+ cells. To overcome this restriction, targeting all SC and myocytes is necessary. Experiments using scAAV9-MLC2 are ongoing, to fully investigate the contribution of MLC2 in myoblasts fusion *in vivo*.

MLC2 overexpression does not restore the altered velocity or rigidity of SC lacking Srf

We next investigated how MLC2 could improve fusion of Srf mutant cells. We first studied whether their mobility was affected with MLC2 overexpression as we had previously shown that velocity was reduced in mutant cells (Randrianarison-Huetz et al., 2018). After quantification of cell velocity using time-lapse microscopy, we observed a reduced velocity in Mut cells as expected. In Mut/MLC2+ cells, velocity was reduced as well (Figure 8A). So, MLC2 overexpression did not restore their velocity defect. Of note, experiments using high density of Mut SC showed similar fusion defects as experiments using lower density, suggesting that the decreased motility of Mut SC is not the primary cause of their fusion incapacity.

Then, we investigated whether MLC2 overexpression restored cellular viscoelasticity modulus. We observed that Mut and Mut/ Act+ myoblasts rigidity was not affected by MLC2 overexpression (Figure 8B). However, we need to increase the number of cells measured, in particular for Mut/ Act+/ MLC2+. As MLC2 is known to regulate contractility, we were expecting to see an increase of rigidity when MLC2 was over-expressed, especially with actin overexpression. After all, the rescue of fusion by MLC2 was greater in Mut/Act+ than in Mut SC and MLC2 interacts with actin. A hypothesis to

explain these results is that the device used to measure the viscoelasticity modulus at the global scale is not sensitive enough to monitor subtle subcellular changes of rigidity, that could be due to the accumulation of pMLC2 at cell-cell contacts.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mouse protocols

Srf$^{flox/flox}$ mice are homozygous for Srf floxed alleles harboring LoxP sites flanking exon 2 of endogenous *Srf* gene (Parlakian et al., 2004). *Pax7*$^{CreERT2/+}$ knock-in mice express Cre-ERT2 recombinase from the endogenous *Pax7* locus (provided by C.M. Fan, Carnegie Institution for Science, Washington, DC; Lepper et al., 2009), and Tg:*Pax7-n*GFP transgenic mice express nuclear localized EGFP under the Pax7 promoter (provided by S. Tajbakhsh, Pasteur Institute, Paris, France; BAC containing 55-kbp upstream Pax7 initiator ATG; Sambasivan et al., 2009).

To investigate the effect of SC-specific Srf deletion in adult muscle, the mouse strain *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* was generated. In all experiments, 2-mo-old *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice were given five i.p. injections of tamoxifen (TMX, 1 mg/d; MP Biomedicals) to induce Srf deletion and were referred to as mutant mice. Non-injected *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice were used as control mice.

To assay whether the overexpression of α-actin could rescue some of the outcomes of the Srf loss, the mouse strain *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* was generated (Randrianarison-Huetz et al., 2018). When injected with TMX, *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* mice lost Srf and the CAT cassette allowing the concomitant overexpression of Actc1 in SCs. TMX-injected *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* were referred to as Mut/Act+ mice.

Mice were genotyped by PCR using the following primers: GfpF, 5′-CGACGTAAACGGCCACAAGTTC-3′; Gfp-R, 5′-GACGTT GTGGCTGTTGTAGTTG-3′; Cre-F, 5′-CCTGGAAAATGCTTCTGT CCG-3′; Cre-R, 5′-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3′; ActTg-F, 5′CGAGGGACCTAATAACTTCG-3′; ActTg-R, 5′-GCCGGATAAAAC TTGTGCTT-3′; Srflox-F, 5′-TTCGGAACTGCCGGGCACTAAA-3′; and Srflox-R, 5′-CTGTAAGGGATGGAAGCAGA-3′.

For electro transfer during muscle tissue injury in control, mutant, and Mut/Act+, *Tibialis (TA)* muscles were injected once with 25 µl of 5 µM cardiotoxin (CTX, Latoxan). Four days after, *TA* muscles received an injection of 9 µg of MLC2-IRES-GFP or GFP lentiviral plasmids or 40 µl of saline solution. Then electro transfer was performed: six 80V/cm pulses of 60 ms, with a 100-ms interval, were applied. Mice were allowed to recover for 6 d and TA muscles were harvested. Before the process of regeneration, mutant and Mut/Act+ mice were injected with 5 intraperitoneal injections (i.p.) of TMX.

All animal experiments were conducted in accordance with the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the institutional ethics committee (00315.1).

Primary muscle cell culture

Primary cultures were derived from hindlimb muscles of control, mutant, and Mut/Act+ mice all harbouring the Pax7-nGFP transgene allowing the prospective selection by flow cytometry (fluorescence Activated Cell Sorting or FACS) of SC as previously described in (Randrianarison-Huetz et al., 2018). In standard conditions, myoblasts were grown in proliferation medium (DMEM/F12, 2% Ultroser G (PALL Life Sciences), 20% Fetal Calf Serum) on plastic dishes coated with 0.02% Gelatin. For differentiation, myoblasts were seeded in Matrigel-coated dishes and cultivated in differentiation medium (DMEM/F12, 2% Horse Serum) at 37°C in 5% CO_2.

Lentiviral production and muscle cell transduction

To produce MLC2-IresGFP and control IresGFP lentiviruses, we purchased MLC2-IresGFP (Ex-Mm22879-LV205) and IresGFP (Ex-Neg-LV205) HIV-based lentiviral plasmids from Genecopeia manufacturer (GeneCopoeia Cat No. LT008). We produced 3rd generation lentiviruses according to the user manual. Briefly, into 293T lentiviral packaging cells, we co-transfected the lentiviral plasmid together with the GeneCopoeia Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit using DNA Endofectin reagent. After 5h transfection, we changed the cell medium by a new FCS-enriched DMEM medium and collected the cell supernatant containing the lentiviral particles after 48h culture at 37°C and 5% CO_2.

To select stably expressing MLC2-IresGFP or Ires-GFP myoblasts, we cultivated the cells on Gelatin-coated plates in fresh proliferation medium. After 24h, we transduced them twice at a 24h interval with the lentiviral supernatant and 10 µg/mL of Polybrene (Merck Milipore; TR-1003-G). Then, MLC2-IresGFP or IresGFP stably transduced cells were selected by Puromycin addition (Merck) every 3 days until obtaining drug resistant colonies.

Lipid mixing essays

Primary myoblasts were cultivated in growth medium on 0.02% gelatin-coated dishes for 24h. Then, to detect hemifusion events, primary cells were trypsynized, divided in two sets and labelled with either fluorescent lipid the Vybrant DiI or DiO probes (ThermoFisher Scientific, V22885), as recommended by the manufacturer. After, cells were placed in differentiation medium for 24h and fixed with 4% PFA. Nuclei were stained with DAPI.

Muscle section and cell immunostaining

TA muscles overexpressing MLC2–GFP or GFP were prefixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 h and incubated overnight in 40% sucrose before snap-freezing in liquid nitrogen-cooled isopentane. Eight µm-thick muscle sections were blocked 1h15 min at room temperature in PBS 1x, 15% goat serum, 1.5% BSA, 0.5% Triton X-100. Then, they were incubated overnight at 4°C with diluted primary antibodies in PBS 1x, 15% goat serum, 1.5% BSA, 0.5% Triton X-100. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Laminin (Sigma, L9393, 1/500), chicken anti-GFP (abcam, ab13970). After washes in PBS 1x, sections were incubated with secondary antibodies for 1h at room temperature (RT). The following secondary antibodies used were donkey anti-rabbit Alexa 546 (LifeTechnologies, A10040, 1/1000) and goat anti-chicken Alexa 488 (LifeTechnologies, A11039, 1/1000). Nuclei staining were performed using DAPI. Muscles sections were then mounted in Moviol and kept at 4°C until image acquisition.

Muscle cells cultured in dishes were fixed for 10 min in 4% PFA and then permeabilized and blocked in PBS with 0.1% Triton X-100 and 5% horse serum for 1h at RT. Cells were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: mouse anti-MF20 (1/130; DSHB), rabbit anti-MLC2 (Cell signaling, 3672, 1/50) and rabbit anti phosphorylated MLC2 (anti-pMLC2) (Cell signaling, 3674, 1/50) diluted in the same buffer. After incubation for 1h at RT with fluorescent secondary antibodies anti–mouse IgG2b Alexa 546 (1/1000; Life Technologies, A21143) and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1/1,000; Life Technologies, A11008), cells were stained with DAPI (for nuclei) and phalloidin Alexa Fluor 488 (1/500; Thermo Fisher Scientific, A12379; for F-actin) and mounted in Fluorescent Mounting Medium (Dako, S3023).

Western blot analysis

Plantaris muscles were lysed directly in 2X laemmli buffer with anti-phosphatase (Roche; 4906837001) and anti-proteases (Roche; 11697498001) and proteins were separated through denaturating SDS-PAGE electrophoresis using Mini-Protean TGX precast gels 4-15% (Biorad) and transferred on Nitrocellulose (0.2µm, Biorad) membrane using the Trans-Blot turbo transfer system (Biorad). Membranes were blocked with 5% skinned milk in TBS-1% Tween (TBST) 1h at RT and probed overnight at 4°C with primary antibodies in TBST 5% BSA. The following antibodies were used: rabbit anti-MLC2 (Cell signaling, 3672, 1/150), rabbit anti-pMLC2 (Cell signaling, 3674, 1/150), and mouse anti-Gapdh (Cell Signaling, D16H11, 1/1000). Following washes in TBST, membranes were hybridized with secondary antibodies goat anti-mouse- or goat anti-rabbit-coupled to HRP (ThermoFisher, 62-6520 and A27036, 1/10 000). Proteins were revealed using SuperSignal West Femto substrate (ThermoFisher, 34096).

Single-cell microplate whole-cell microrheology

Primary myoblasts were cultivated in growth medium on 0.02% gelatin-coated dishes. Twenty four hours after, cells were trypsinized, washed 2 times in PBS and resuspended in growth medium. Isolated cells were caught between one rigid and one flexible glass microplates, which were previously coated with a 2% pluronic F127 solution (Sigma-Aldrich) for 45 min. Oscillations in the frequency range of 0.1–6.4 Hz were applied to the flexible plate by a computer-controlled piezo electric stage.

Image acquisition

Fluorescence images were acquired using an Olympus BX63F microscope with 20x objectives (UPLSAPO, NA 0.75) coupled with an ORCA-Flash4.0 LT camera (Hamamatsu), or using a Zeiss Axiovert 200M microscope with 20x objectives (LD PLANNEOFLUAR, NA 0.4), coupled with a CoolSnap-HQ camera (Photometrics), or using a Spinning Disk confocal microscope (Yokogawa X1) with a 100x oil-immersion objective (HCX PL APO, NA 1.47), coupled with a CoolSnap-HQ^2 camera (Photometrics) and Cell sens 7.7.5 (Molecular Devices). Images were merged and edited in ImageJ. Background was reduced using brightness and contrast adjustments applied to the whole image.

Morphometric analysis

Myofiber cross section area (CSA) was analyzed by using immunostaining of Laminin, marking basal lamina, with ImageJ. All electroporated myofibers and between 100 and 400 non-electroporated myofibers were analyzed. For the quantification of the number of nuclei per myofibers ImageJ was used.

Cell migration assay

Migration of primary mouse muscle cells was quantified using timelapse microscopy. Myoblasts (MBs) were seeded in matrigel-coated eight-well Ibidi plates (Ibidi Cat. No 80806) and grown in rich medium. The next day, cells were filmed using an inverted Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with a LCI PlN 10×/0.8 W DICII objective and an incubation chamber at 37°C and 5% CO2. Live cells were monitored every 6 min for 2 h with bright-field and Inscoper software. Cell velocities were calculated in micrometers per minute using ImageJ by tracking the paths of cells. At least 100 cells were tracked for each sample.

Application of Hypotonic Osmotic Shock

To assess an ability for osmotic stress to improve fusion, we treated the cells with diluted by H2O (1:3) during 60 seconds as described in (Leikina et al., 2018). Then we cultivated them into the differentiation medium at 37C°.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy minikit (ref: 74004) and reverse-transcribed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). cDNA was synthesized from 1□g of RNA. Quantitative PCR analysis was performed using a Light Cycler (Roche) according to the manufacturer's instructions using a SYBR Green I kit (Roche). Values were normalized using *Hydroxymethylbilane synthetase* (*Hmbs*). The following primers were used: Srf-F, 5′-CACCTACCAGGTGTCGGAAT-3′; Srf-R, 5′-GCT GTGTGGATTGTGGAGGT-3′; ActTg-F, 5′-TGCTGGTTATTGTGCTGTCT-3′; ActTg-R, 5′-CTGTGGTCTCCTCGTCGT-3′; Hmbs-F 5'-TGCACGATCCTGAAACTCTG-3'; Hmbs-R 5'-

TGCATGCTATCTGAGCCATC-3'; Myl9-F, 5'-GGAGGCCTTCAACATGATTG; Myl9-R, 5'-CATTGTGAGGAACATGGTGAAG.

Statistical analysis

Quantitative data sets were analyzed using an unpaired-test with Welsh correction (Figure 1D, 4B, 4C, 4D, 4F, 4G, 4I, 4J 4K, 5B) when two groups were analyzed, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (Figure 2B, 6B,6C 6D, 8A, 8B) when three groups or more were analyzed and two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (Figure 3C, 6F, 7C, 7D) for when two categorical variables, using GraphPad Prism 8.0 software. Statistical significance was set at a p value <0,05.

Bibliography

Alibert, C., Pereira, D., Lardier, N., Etienne-Manneville, S., Goud, B., Asnacios, A., Manneville, J.-B., 2021. Multiscale rheology of glioma cells. Biomaterials 275, 120903. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120903

Bu, B., Crowe, M., Diao, J., Ji, B., Li, D., 2018. Cholesterol suppresses membrane leakage by decreasing water penetrability. Soft Matter 14, 5277–5282. https://doi.org/10.1039/C8SM00644J

Chugh, P., Clark, A.G., Smith, M.B., Cassani, D.A.D., Dierkes, K., Ragab, A., Roux, P.P., Charras, G., Salbreux, G., Paluch, E.K., 2017. Actin cortex architecture regulates cell surface tension. Nat Cell Biol 19, 689–697. https://doi.org/10.1038/ncb3525

Desprat, N., Guiroy, A., Asnacios, A., 2006. Microplates-based rheometer for a single living cell. Review of Scientific Instruments 77, 055111. https://doi.org/10.1063/1.2202921

Iwasaki, T., Murata-Hori, M., Ishitobi, S., Hosoya, H., 2001. Diphosphorylated MRLC is Required for Organization of Stress Fibers in Interphase Cells and the Contractile Ring in Dividing Cells. Cell Struct. Funct. 26, 677–683. https://doi.org/10.1247/csf.26.677

Kim, J.H., Ren, Y., Ng, W.P., Li, S., Son, S., Kee, Y.-S., Zhang, S., Zhang, G., Fletcher, D.A., Robinson, D.N., Chen, E.H., 2015. Mechanical Tension Drives Cell Membrane Fusion. Developmental Cell 32, 561–573. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.005

Martin, S.G., 2016. Role and organization of the actin cytoskeleton during cell-cell fusion. Seminars in Cell & Developmental Biology 60, 121–126. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.025

Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., Treisman, R., 2009. Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. Nat Cell Biol 11, 257–268. https://doi.org/10.1038/ncb1833

Nordheim, A., 2014. SRF regulation — actin branches out. Nat Rev Mol Cell Biol 15, 368–368. https://doi.org/10.1038/nrm3803

Pipes, G.C.T., Creemers, E.E., Olson, E.N., 2006. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. Genes Dev. 20, 1545–1556. https://doi.org/10.1101/gad.1428006

Randrianarison-Huetz, V., Papaefthymiou, A., Herledan, G., Noviello, C., Faradova, U., Collard, L., Pincini, A., Schol, E., Decaux, J.F., Maire, P., Vassilopoulos, S., Sotiropoulos, A., 2018. Srf controls satellite cell fusion through the maintenance of actin architecture. Journal of Cell Biology 217, 685–700. https://doi.org/10.1083/jcb.201705130

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., Treisman, R., 1999. Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics. Cell 98, 159–169. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81011-9

A

D0

Top 5 canonicals pathways (Ingenuity)	-log (p value)
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	4,05E+00
ILK Signaling	3,71E+00
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	3,69E+00
Regulation of Actin-based Motility by Rho	3,38E+00
Calcium Signaling	3,34E+00

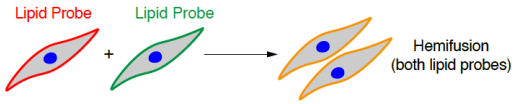
D1

Top 5 canonicals pathways (Ingenuity)	-log (p value)
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	4.67E00
Regulation of Actin-based Motility by Rho	3.91E00
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	**3.79E00**
RhoA Signaling	3.53E00
Actin Cytoskeleton Signaling	3.25E00

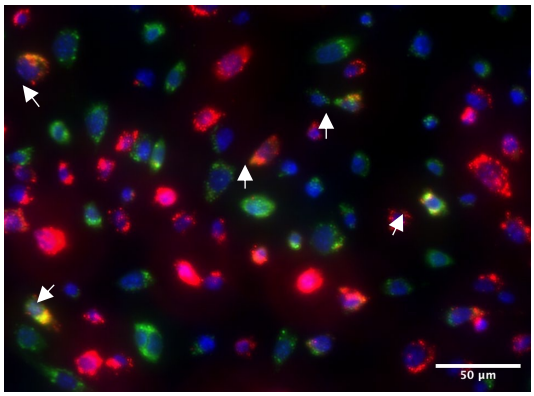
D3

Top 5 canonicals pathways (Ingenuity)	-log(p value)
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	**5.02E00**
Mevalonate Pathway I	3.9E00
Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I	3.33E00
MSP-RON Signaling Pathway	2.81E00
RhoA Signaling	2.74E00

B



C



D

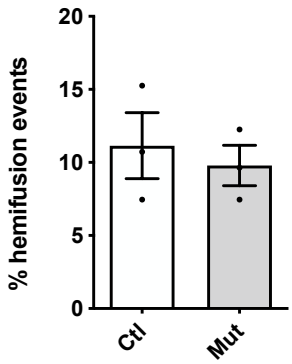
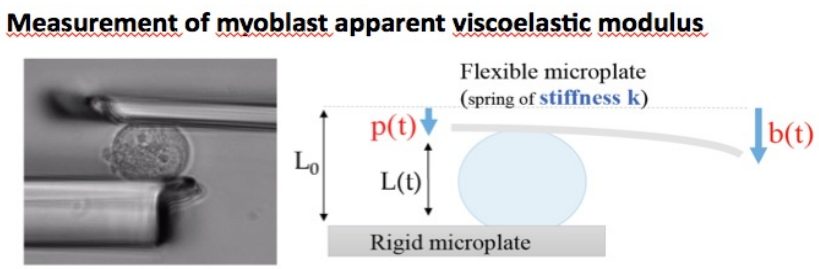


Figure 1. Hemifusion is not impaired with Srf loss within SCs.

(A) Top five canonical pathways identified by gene ontology analysis using Ingenuity of genes differentially regulated by Srf in MBs (D0), myocytes at onset of differentiation (D1), and differentiated cells (D3).
(B) Shematic representation of the assay to evaluate hemifusion, where one set of myoblasts is labelled with DiI lipid probe (red) and another set is labelled with DiO lipid probe (green). Hemifusion events are scored as mononucleated cells that contain both lipid probes (leikina. Et al, 2018)
(C) Representative image from primary myoblasts. Arrows show double-labelled mononucleated cells. Scale bar 50 µm.
(D) Quantification of mononucleated double-labelled cells as a percentage of total cells in control and mutant cells (n=3). Data are mean ± SEM.

A



B

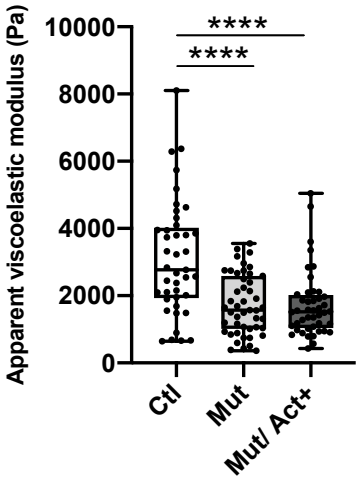


Figure 2. Srf loss within SCs impaired cellular rigidity.

(A) Principle of an experiment with the single cell rheometer. A myoblast is caught between two microplates, a flexible one (top, stiffness k) and the rigid one (bottom, much stiffer than cells). At the beginning of the experiment, the flexible microplate is displaced by a distance b, held constant over time by a feedback loop applying a displacement ΔL(t) = L(t) – L0 to the rigid microplate. The cell strain is retrieved from its elongation ΔL(t).

(B) Boxplots of the values of elastoviscosity obtained with single cell rheometer from Ctl, Mut and Mut/ Act+ MBs (n=41 to 47 cells). Data are mean ± SEM. ****p value <0.0001.

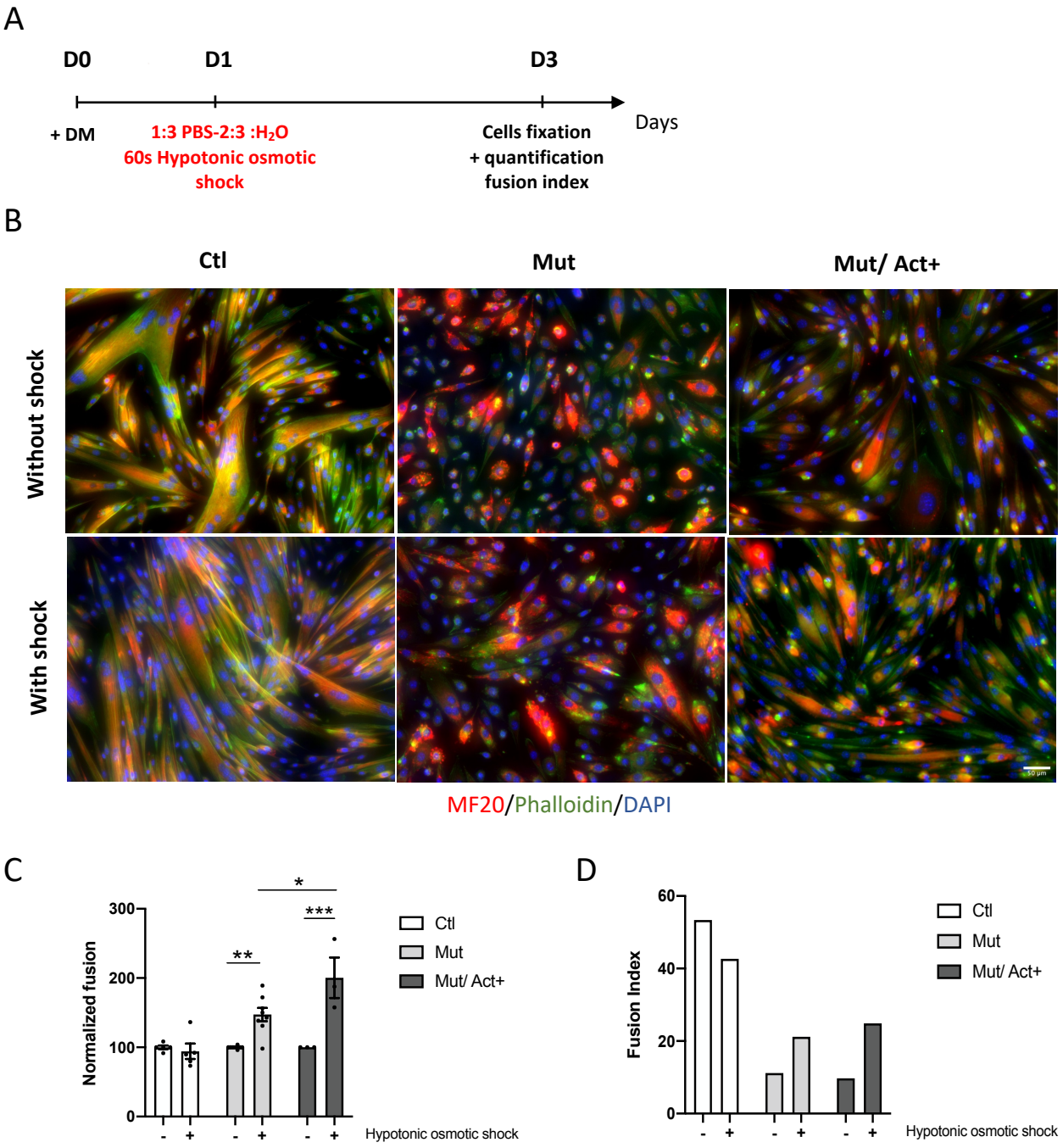


Figure 3: Hypotonic osmotic shock partially restores the fusion of MBs lacking Srf.

(A) Cell fusion assay to evaluate the restoration of fusion by osmotic shock. After 1 day of differentiation, cells were treated with a hypotonic buffer (1/3 PBS, 2/3 H2O) during 60 seconds. Then, they were grown in differentiation medium for two additional days and fixed.

(B) Immunostaining for myosin heavy chain with MF20, nuclear staining with DAPI and F-actin staining with phalloidin on Ctl, Mut and Mut/ Act+ myoblasts 3 days after differentiation induction. Scale bar 50 µm.

(C) Quantification of normalized fusion events as a percentage of the fusion index of the same genotype that did not receive a hypotonic shock) in Ctl, Mut and Mut/ Act+ cells after 3 days of differentiation (n=3-8).

(D) A representative experiment of osmotic shock experiment. Complete fusion was quantified as a proportion of nuclei within multinucleated cells (fusion index) in Ctl, Mut and Mut/ Act+ cells after 3 days of differentiation (n=1). Data are mean ± SEM. *p value <0.05, **p value <0.01, ***p value <0.001.

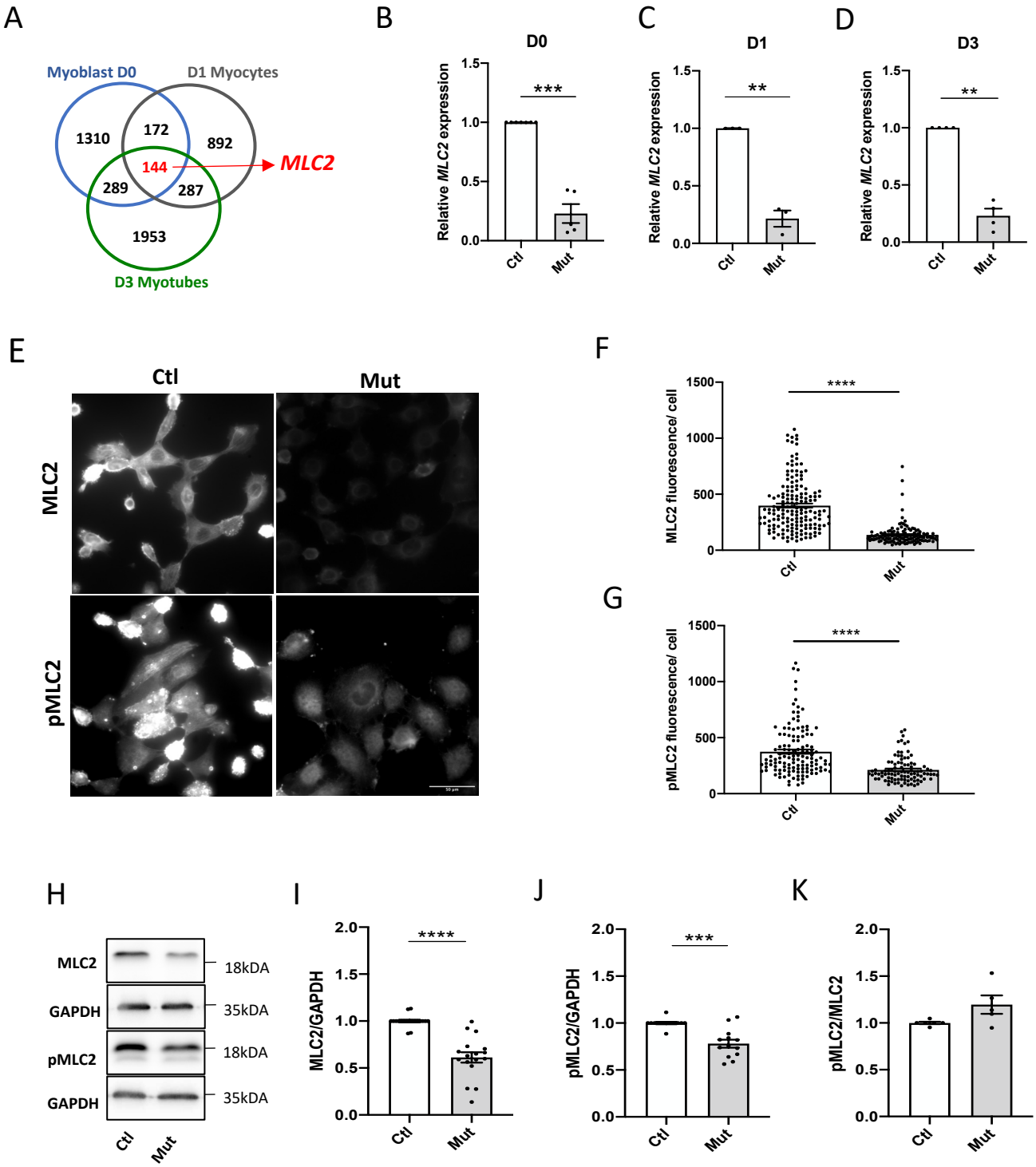


Figure 4: MLC2 expression is decreased in mutant MBs.

(A) Venn diagram showing the intersections between genes differentially regulated by Srf (P <0.05) in myoblasts (D0), myocytes (D1) and myotubes (D3). In red indicated the number of common genes (144) that are modulated by Srf independently of the differentiation state.

(B) Analysis of *MLC2* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut MBs at day 0, (C) day 1 and (D) day 3. Data were normalized by *Hmbs* expression (n=3-7).

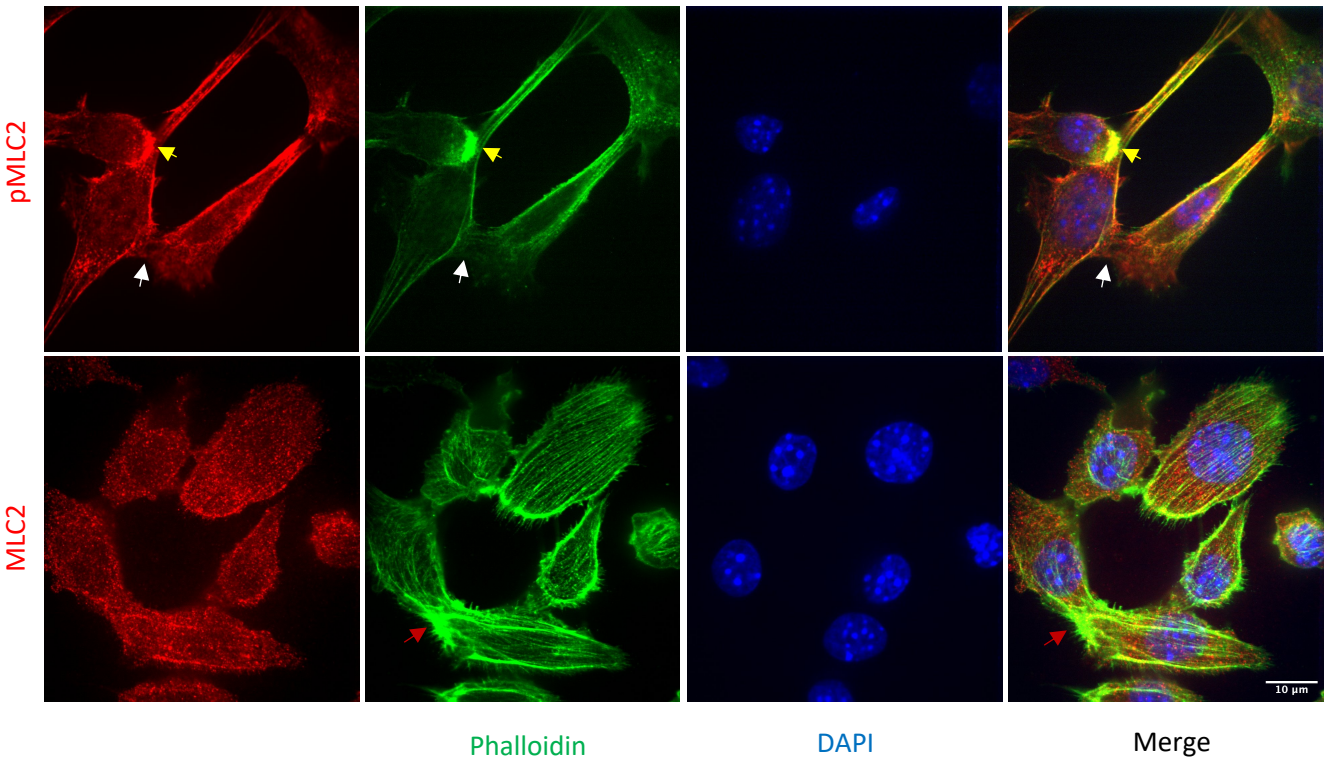
(E) Staining for MLC2 and phosphorylated MLC2 (pMLC2) on Ctl and Mut MBs. Scale bar 50 µm.

(F) Quantification of MLC2 and (G) pMLC2 by measuring the total fluorescence intensity per cell (ImageJ) in Ctl and Mut MBs (n=95-163).

(H) Representative immunoblot showing total MLC2 and pMLC2 in Ctl and Mut MBs.

(I) Quantification of GAPDH normalized MLC2 protein, (J) of GAPDH normalized phosphorylated-MLC2 protein and (K) of pMLC2/MLC2 protein ratio from immunoblots (n=6-19). Data are mean ± SEM. **p value <0.01, ***p value <0.001, ****p value <0.0001.

A



B

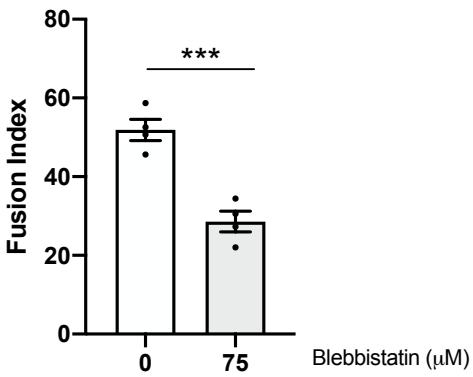


Figure 5: Actomyosin contractility affects myoblasts fusion.

(A) Confocal Images of F-actin staining with phalloidin and pMLC2 or MLC2 staining in Ctl MBs after 1 day of differentiation. Yellow arrows show both pMLC2 and F-actin accumulations, white arrows no accumulation of pMLC2 and red arrows F-actin accumulation at cell contacts. Scale bar 10 µm.

(B) Proportion of nuclei within multinucleated cells (fusion index) 3 days after differentiation in Ctl and Mut cells treated with 75uM Blebbistatin (n=4). Data are mean ± SEM. ***p value <0.001.

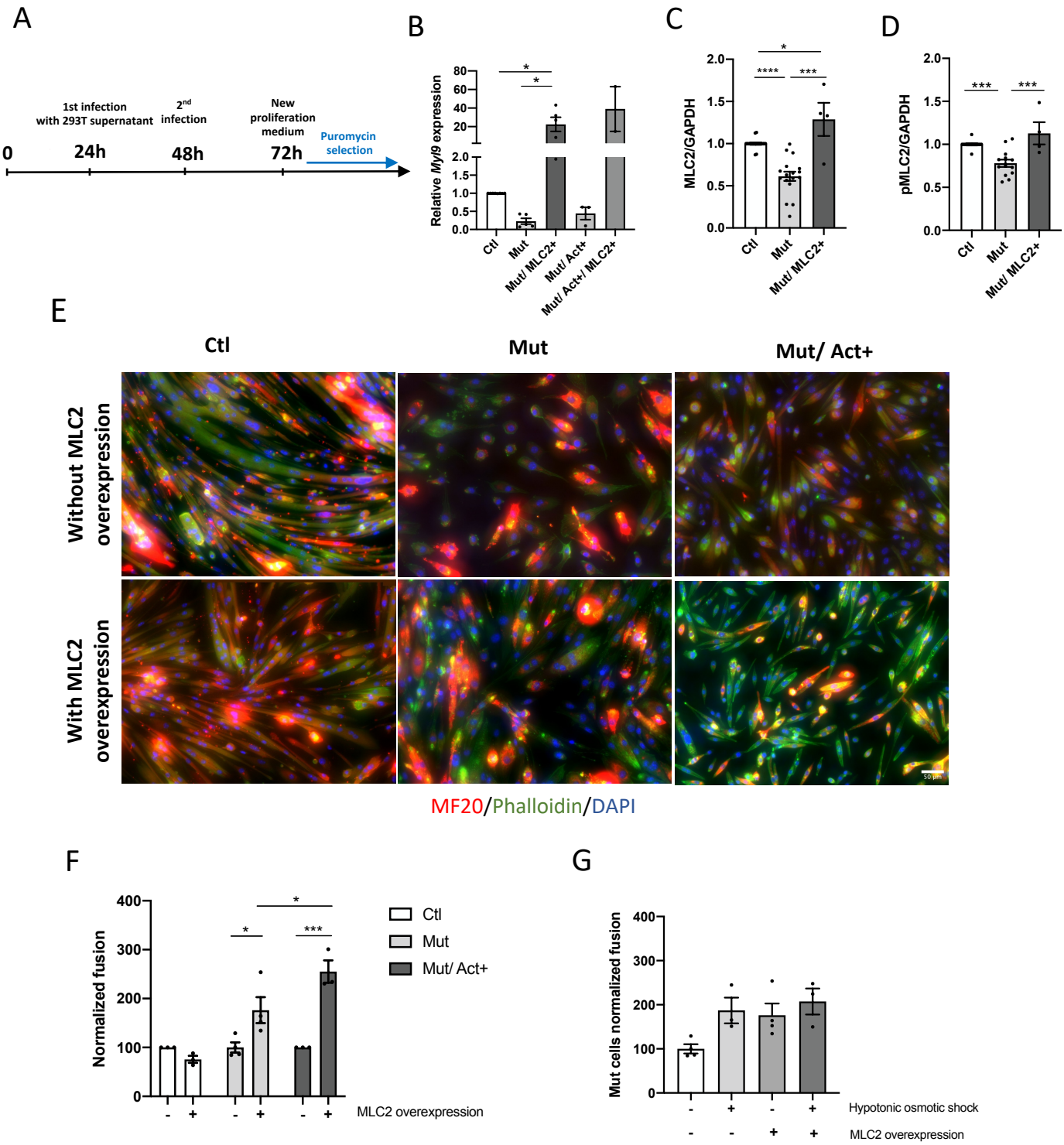


Figure 6: MLC2 overexpression partially restores the fusion of MBs lacking Srf.

(A) MLC2 lentiviral infection protocol of MBs.

(B) Analysis of *MLC2* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl, Mut and Mut/ Act+ MBs overexpressing MLC2 or not at day 0. Data were normalized by *Hmbs* expression (n=2-8).

(C) Quantification of MLC2 and (D) pMLC2 from immunoblots (n=4-19).

(E) Immunostaining for myosin heavy chain with MF20, nuclear staining with DAPI and F-actin staining with phalloidin on Ctl, Mut and Mut/ Act+ MBs overexpressing MLC2 or not MLC2 3 days after differentiation induction. Scale bar 50 µm.

(F) Quantification of complete fusion as a percentage of the fusion index of the same genotype that did not receive MLC2 overexpression in Ctl, Mut and Mut/ Act+ cells after 3 days of differentiation (n=3-4).

(G) Quantification of complete fusion in Mut cells with both or not hypotonic osmotic and MLC2 overexpression treatment(n=3-4).

Data are mean ± SEM. *p value <0.05, ***p value <0.001, ****p value <0.0001.

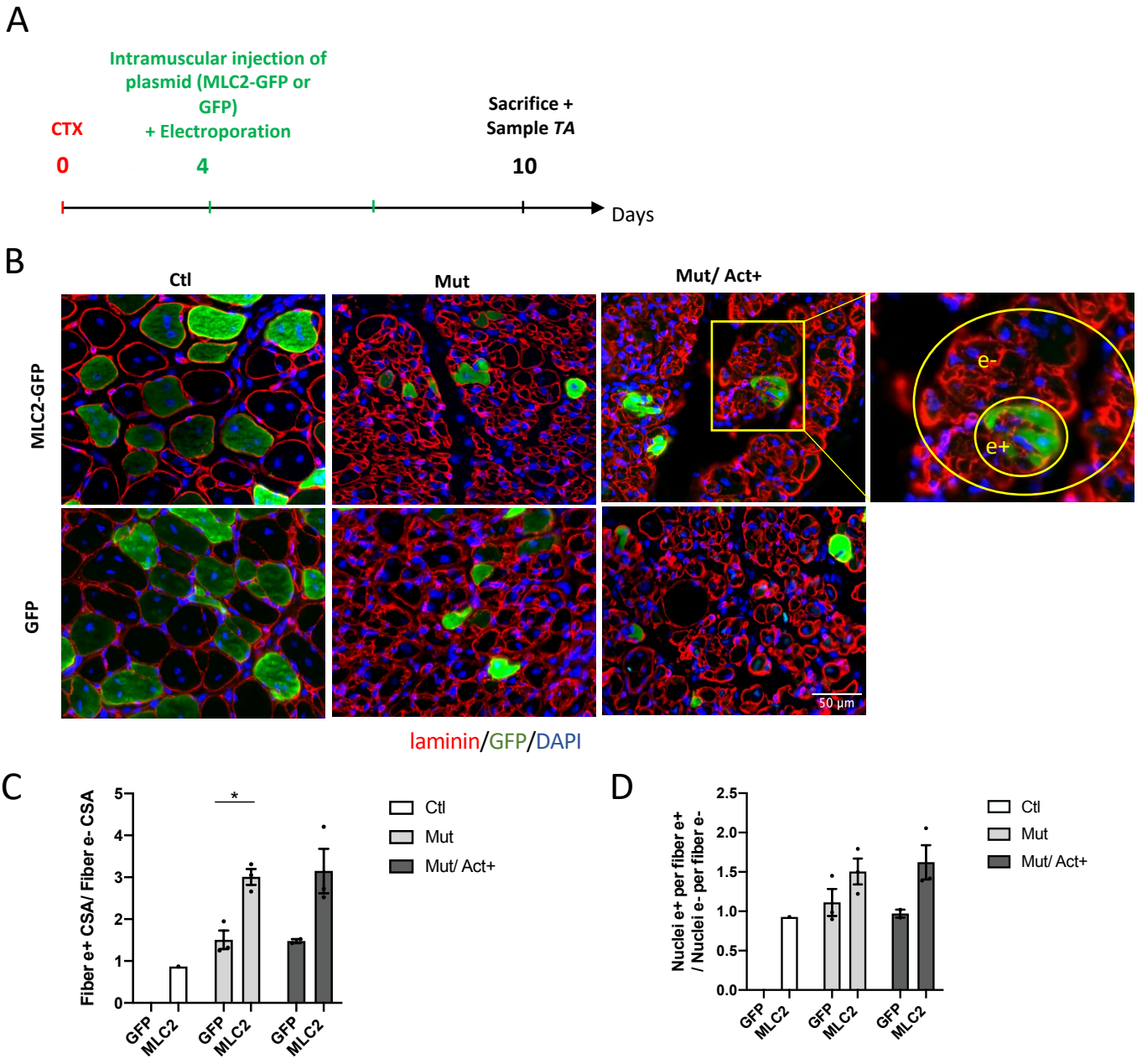


Figure 7: MLC2 overexpression improves regeneration in Mut and Mut/ Act+ mice.

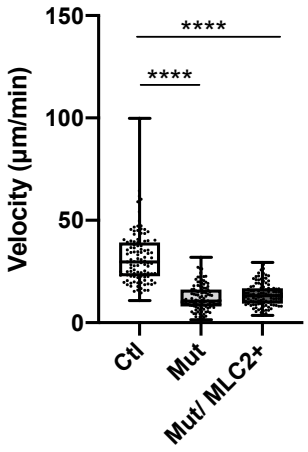
(A) Ctl, Mut and Mut/ Act+ mice are injected with CTX in *Tibialis anterior* (*TA*) muscle. Four days later, MLC2-GFP or GFP lentiviral plasmids were injected in *TA* and electroporation was performed. *TA* muscles were isolated 6 days after electroporation.

(B) *TA* section immunostained for laminin (red), GFP (green) and nuclear staining with DAPI for Ctl, Mut, and Mut/ Act+ electroporated muscles. Focus on an electroporated fiber (e+) and a non-elecroporated area (e-). Scale bar 50 µm.

(C) Ratio of CSA of electroplated fibers (e+) and CSA of non-electroplated fibers (e-) in Ctl, Mut and Mut/ Act+ (n=1-3).

(D) Nuclei of electroporated fibers per electroporated fibers (e+) normalised by the number of nuclei of non-electroporated fibers per non-electroporated fibers (e-) in Ctl, Mut and Mut/ Act+ (n=1-3). Data are mean ± SEM. *p value <0.05.

A



B

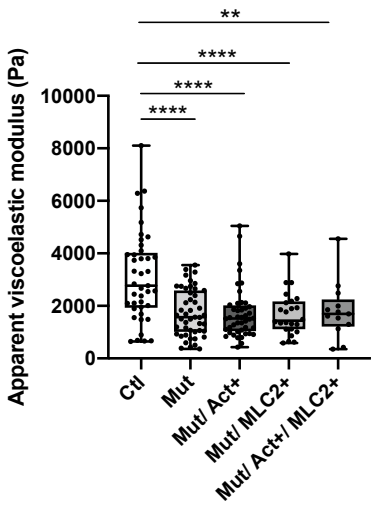


Figure 8: MLC2 overexpression does not rescue velocity, nor viscoelasticity.

(A) Mean velocity (micrometers per minute) of Ctl, Mut and Mut/ MLC2+ MBs overexpressing MLC2 or not at day 0 determined by time-lapse videomicroscopy (at least 100 cells analyzed per genotype of a representative experiment) .

(B) Boxplots of the values of elastoviscosity obtained with single cell rheometer from Ctl, Mut, Mut/ Act+, Mut/ MLC2+, Mut/ Act+/ MLC2+ MBs (n=41 to 47 cells). Data are mean ± SEM. **p value <0.01, ****p value <0.0001.

Discussion et perspectives

La fusion des myoblastes est un processus en plusieurs étapes commençant par la reconnaissance et l'adhésion des membranes grâce à l'action de diverses protéines d'adhérence. Celles-ci vont permettre le rapprochement des membranes plasmiques à des très courtes distances pour la formation de la synapse fusogénique. Lorsque les membranes seront suffisamment proches, un diaphragme lipidique entre les deux cellules va se former permettant l'échange de lipides membranaires, étape aussi appelée hémifusion. Après formation de cette intermédiaire de fusion, un pore se formera entre les deux cellules, pore qui s'élargira par la suite permettant au contenu cytoplasmique des deux cellules de se mélanger formant un syncytium. Les réarrangements du cytosquelette d'actine ont été montrés comme étant importants tout aussi bien pour la formation de protrusions au site de fusion que pour le réarrangement du cortex d'actine. La combinaison de ces deux actions va permettre de favoriser l'apparition de pores.

MLC2 est une protéine qui a été notamment décrite pour ses capacités de régulation de la contractilité cellulaire (Amano et al., 1996). Mais elle est également impliquée dans des cas pathologiques comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Dans ces pathologies, la voie Rho-ROCK-MLC2 est up-régulée favorisant la prolifération et la migration de cellules cancéreuses, une augmentation de la rigidité des voies vasculaires ou des problèmes cardiaques (Sheikh et al., 2015), (Jiang et al., 2014), (Wu et al., 2021). La voie Srf/Mrtf se retrouve aussi up-régulé dans les cancers, qui ont par conséquent un cytosquelette d'actine plus dynamique entrainant la dissémination des métastases (Azam et al., 2022). Cependant, peu de choses sont connues sur le rôle de MLC2 dans la fusion des cellules souches musculaires, hormis son implication décrite chez la *Drosophile* notamment via sa contribution dans la production d'une force de résistance rigidifiant la membrane cellulaire au moment de la fusion (Kim et al., 2015).

Mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes et d'identifier les molécules régulant la fusion des CS chez les mammifères en utilisant des approches de restauration des capacités de fusion de cellules dépourvues de Srf, incapables de fusionner. L'approche générale a consisté à : i) identifier les caractéristiques cellulaires et les gènes cibles de Srf qui pourraient être impliqués dans le défaut de fusion des cellules mutantes ; ii) complémenter génétiquement ou par des approches physiques les cellules mutantes afin de rétablir leur capacité de fusion.

La caractérisation phénotypique des cellules dépourvues de Srf nous a permis de montrer que Srf n'était pas impliqué dans l'étape d'hémifusion et que les cellules mutantes présentaient une rigidité (viscoélasicité) réduite à l'échelle de la cellule. D'une manière intéressante, l'augmentation transitoire de la rigidité membranaire des CS par un choc hypotonique a permis d'améliorer les capacités de fusion des CS mutantes. D'autre part, parmi les gènes cibles de Srf dont les expressions étaient diminuées chez les CS mutantes, le gène *MLC2* a retenu notre attention compte tenu de son rôle dans le maintien de la contractilité et donc indirectement de la tension des cellules. Après avoir montré le rôle primordial de la contractilité cellulaire dans le processus de fusion en utilisant la Blebbistatine, nous nous sommes interrogés sur le rôle joué par MLC2. Les surexpressions de MLC2 *in vitro* et *in vivo* ont permis d'améliorer les capacités de fusion des mutants Srf, sans toutefois atteindre le niveau de fusion des contrôles, démontrant ainsi le rôle joué par MLC2 dans le contrôle de la fusion en aval de Srf. Il est important de noter que la surexpression de l'actine dans les CS dépourvues de Srf associée à un choc osmotique ou à la surexpression de MLC2 a permis une meilleure restauration de la fusion in *vitro*. Ceci suggère que la formation des protrusions d'actine au site de fusion, rendue possible par la surexpression de l'actine (Randrianarison-Huetz et al., 2018), et le maintien de la rigidité membranaire sont impliqués dans le processus de fusion.

Cependant de nombreuses questions, que nous discuterons dans cette section, restent en suspens. Notamment, comment la protéine MLC2 favorise-t-elle la fusion des cellules mutantes ? Comment le choc osmotique agit pour améliorer la fusion des cellules mutantes ? Quelles autres voies pourraient être impliquées dans le défaut de fusion des cellules mutantes pour Srf ?

1. Pourquoi la surexpression de MLC2 n'a pas d'effet sur la viscoélasticité globale des cellules dépourvues de Srf ?

Dans cette étude, nous avons montré que l'augmentation de fusion des cellules mutantes observée suite à la surexpression de MLC2 n'était pas associée à la restauration de l'architecture d'actine ni à celle de la rigidité globale des cellules.

a) Rôle de la F-actine corticale

Il serait intéressant de savoir pourquoi l'actine corticale n'a pas été restaurée par la surexpression de l'actine dans les CS mutantes (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

L'hypothèse la plus probable est que l'isoforme surexprimée (alpha actine cardiaque) n'a pas pour spécialité de former de l'actine corticale. Les vertébrés expriment six isoformes de l'actine dont certaines s'expriment préférentiellement dans un tissu comme l'alpha-actine squelettique dans le muscle squelettique, l'alpha-actine cardiaque dans le muscle cardiaque et l'alpha et la gamma-« smooth » actine dans le muscle lisse. Les deux dernières isoformes, les beta et gamma actines cytoplasmiques sont ubiquitaires et exprimées dans toutes les cellules à des ratios différents. Ces actines possèdent différentes affinités avec les protéines se liant à l'actine ce qui peut entraîner la formation de structures d'actine particulières dans les cellules (Dugina et al., 2019). Il a été montré que la beta actine cytoplasmique était plus associée au point d'adhésion focal (FAK) montrant son implication dans la formation de filopodes, de fibres de stress et de faisceaux circulaires mettant en avant son rôle dans la motilité et l'adhésion. La gamma actine cytoplasmique forme de manière prédominante le réseau d'actine corticale. Les différentes isoformes alpha de l'actine vont, elles, former les myofibrilles et fibres de stress spécifiques de leur tissu (Herman, 1993)(Dugina et al., 2019). Cela expliquerait pourquoi, avec la surexpression de l'alpha actine cardiaque dans les mutants Srf, on voit une restauration des faisceaux d'actine au niveau ventral des cellules mais pas de la F-actine corticale. Il est possible qu'en surexprimant de l'actine gamma, on puisse restaurer le réseau d'actine corticale et que, couplé à la surexpression de MLC2, la rigidité à l'échelle cellulaire des mutants soit restaurée et que leur fusion soit plus efficace.

b) Méthodes alternatives pour évaluer la rigidité

Les expériences de rhéologie qui ont été menées n'ont pas permis de montrer un effet de la surexpression de MLC2 sur la rigidité à l'échelle globale de la cellule chez les mutants. Les mesures ont montré que les mutants Srf présentaient une rigidité diminuée qu'elle soit accompagnée ou non d'une surexpression de l'actine et/ou MLC2. Mais en regardant de plus près la significativité des données, on s'aperçoit qu'avec la surexpression de MLC2, cette significativité passe à deux étoiles avec seulement MLC2 et une étoile avec MLC2 et l'actine (dans ce dernier cas peu de cellules ont été analysées par rapport aux autres conditions, une quinzaine versus une quarantaine de cellules). Ainsi des expériences supplémentaires seront effectuées pour les cellules Mut/ Act+/ MLC2+.

Il est aussi possible que notre modèle de mesure de la rigidité ne soit pas le plus optimal, car pas assez sensible, pour détecter les modifications dues à la surexpression de

MLC2 et qu'il faille avoir recours à une autre approche plus adaptée. Il est important de noter que dans le dispositif utilisé, les cellules sont détachées de leur substrat et sont maintenues entre deux lamelles de verre. Ainsi le fait qu'elles ne soient pas adhérentes et plus dans leur environnement « normal » pourrait affecter leurs propriétés physiques. Nous avions, dans un premier temps, pensé à l'**A**tomic **F**orce **M**icroscopy (AFM) qui permet de mesurer la tension membranaire des cellules tout en ayant celles-ci adhéré à leur substrat. Cependant, cette technique nous avait été déconseillée par nos collaborateurs physiciens (Atef Asnacios, Univ de Paris Cité, Laboratoire des matières complexes). Cette technique permet de balayer la surface d'un échantillon à l'aide d'une pointe très fine capable de se déplacer dans toutes les directions de l'espace. Cependant, selon l'endroit examiné par la pointe de l'AFM, les mesures pouvant différer en fonction de la présence ou non de microdomaines membranaires. De plus, cette technique ne permet de mesurer la tension qu'à un endroit à la fois, rendant nécessaires de multiples mesures sur une même cellule.

Nous nous sommes alors intéressés à une autre technique, l'utilisation de la sonde fluorescente Flipper-TR (Spirochrome) qui permet de percevoir les variations de tension à la membrane plasmique (Colom et al., 2018). Cette sonde va s'insérer dans la membrane lipidique et en fonction de la tension à la surface de celle-ci, elle va changer de conformation entraînant une modification de la demi-vie de fluorescence. Grâce à un microscope particulier, le FLIM, pour **F**luorescence **LI**fetime **M**icroscopy, on est capable de discriminer des structures en fonction de leur état de tension. Il est possible d'utiliser cette sonde sur des cellules vivantes ce qui la rend potentiellement intéressante pour suivre la tension membranaire des cellules au cours de la fusion. Cependant, nous n'avons pas réussi à l'utiliser de manière convaincante. En effet, nous avions réalisé des expériences préliminaires pour déterminer si cette sonde émettait de la fluorescence dans nos cellules en culture avec la dose préconisée (dose réponse effectuée). Bien que la sonde soit détectée par le microscope, nous ne sommes pas parvenus à détecter de différence de demi-vie entre les différents compartiments subcellulaires qui possèdent des tensions membranaires différentes. Nous avons aussi effectué un choc hypotonique osmotique (contrôle positif) pour savoir si dans nos conditions expérimentales la sonde arrivait à distinguer des variations de tension membranaires. Même après un choc osmotique, aucune variation de tension n'a pu être mesurée, indiquant que des calibrations supplémentaires étaient nécessaires pour qu'elle soient utilisables. Cette sonde s'est

montrée plus difficile d'utilisation que prévu, ce qui nous a poussé à utiliser une autre approche plus maîtrisée par nos collaborateurs comme la rhéologie.

Afin d'aller plus loin il serait intéressant d'utiliser une autre approche de mesure de la tension membranaire qui se base sur l'expression d'un canal fluorescent vert mécanosensible d'*Escherichia coli* dans des cellules. Ce canal subit une modification de ses propriétés optiques en fonction de sa structure qui change avec la tension et qui permet son activation (Hsu et al., 2022).

c) Effet localisé de MLC2 au niveau de la cellule

Il est possible que l'effet facilitateur de MLC2 sur la fusion des CS dépourvues de Srf soit dû à un rôle très localisé de MLC2 dans la cellule. En effet, nous avons montré une accumulation et une co-localisation de la F-actine et de phospho MLC2 au point de contact entre cellules contrôle, quand la fusion est engagée (jour 1 post induction de la différenciation, voir Figure 5 de la section des résultats). Il serait très intéressant d'effectuer ces mêmes marquages à J1 de différenciation sur des cellules Mut, Mut/ Act+, Mut/ MLC2+ et Mut/ Act+/ MLC2+ afin de déterminer s'il y a une corrélation entre la localisation subcellulaire de pMLC2 et l'amélioration de la fusion.

2. Effet de la surexpression de MLC2 sur la fusion et la croissance musculaire *in vivo*

Les expériences d'électroporation qui nous avons menées nous ont permis de montrer que la surexpression de MLC2 dans le muscle en régénération restaurait très partiellement la croissance des myofibres et l'accrétion des noyaux. Cependant, cette procédure comporte de nombreuses limites techniques : i) l'électroporation est réalisée à j4 post CTX chez les mutants, ainsi les cellules musculaires électroporées peuvent être soit des myoblastes, soit des myocytes, soit des myofibres néoformées (très peu présentes à ce stade chez les mutants) ; ii) le nombre de cellules électroporées est limité.

Ainsi, la fusion entre cellules musculaires se fait très probablement de façon hétérotypique (entre cellules Mut et Mut/ MLC2+ ou entre cellules Mut/ Act+ et Mut/ Act+/ MLC2+) ce qui fait que la comparaison avec le modèle *in vitro*, qui est homotypique entre cellules du même génotype, est difficile. Des expériences de fusion hétérotypique *in vitro* seront menées en parallèle, entre cellules Mut et Mut/ MLC2+ ou entre cellules Mut/ Act+ et Mut/ Act+/ MLC2+. De plus, des expériences de fusion héterotypiques *in vitro*

entre des cellules Mut/ Act+ et Mut/ MLC2 versus Mut/ Act+/ MLC2+ et Mut/ Act+ versus Mut/ Act+/ MLC2+ et Mut/ MLC2+ permettront de déterminer si l'actine et/ou MLC2 sont nécessaires dans un ou les deux partenaires de fusion.

Pour pallier aux limitations techniques de l'électroporation, nous avons décidé d'utiliser des scAAV9 capables de transduire efficacement les myoblastes/myocytes chez la souris adulte. En effet Nathalie Didier (laboratoire de F. Relaix, Univ de Créteil) a montré que 65% de cellules satellites étaient transduites après injection en intra-musculaire d'un scAAV9-GFP chez une souris adulte (communication personnelle de Nathalie Didier). Nous avons fait produire des scAAV9-MLC2 afin de surexprimer MLC2 dans les myoblastes. De cette manière, nous aurons la certitude que la majorité des CS auront reçu notre gène d'intérêt MLC2 et de pouvoir observer une fusion homotypique entre deux CS transduites. Il est possible que dans ce cas une meilleure amélioration de la fusion et de la croissance des fibres régénérées soient observées.

3. Défaut de fusion dans les CS KO pour Srf : une potentielle implication des fusogènes Myomaker et Myomixer ?

Grâce à un modèle génétique murin de délétion conditionnelle et spécifique de Srf dans les CS, nous avons mis en évidence la contribution de MLC2 à la fusion des myoblastes *in vitro* et *in vivo*. La surexpression de MLC2 dans les CS *in vitro* et *in vivo* a permis de restaurer partiellement la fusion des CS. Cependant, cette restauration n'est pas totale indiquant qu'il manque toujours un élément pour avoir une fusion complète. Nous nous sommes demandés, dans un premier temps, si les fusogènes spécifiques du muscle, Myomaker et Myomixer, pouvaient être affectés par la délétion de Srf (Millay et al., 2013). Nos analyses transcriptiomiques n'ont pas révélé de variation dans les expressions de *Myomaker* et *Myomixer* entre les myoblastes, myocytes et myotubes contrôles et mutants Srf . De plus, nous avons montré que l'hémifusion n'était pas perturbée par la délétion de Srf. Étant donné que Myomaker contrôle cette étape (Leikina et al., 2018), nous avons porté notre attention sur Myomixer. D'une manière intéressante, les myoblastes KO Myomixer présentent un phénotype similaire aux myoblastes KO Srf, avec un défaut de fusion (et pas de l'engagement dans la différenciation), une possibilité de pouvoir effectuer l'hémifusion et avec une restauration partielle de la fusion suite à un choc osmotique hypotonique.

Nous avons donc analysé l'expression protéique de Myomixer par WB et avons constaté que celle-ci n'était pas modifiée entre les contrôles et les mutants Srf. La spécificité de l'anticorps anti-Myomixer a été validée par WB sur des extraits de cellules contrôle et KO Myomixer. De plus, nous avons étudié la localisation de Myomixer (résultats non montrés). En effet, il est possible que même si l'expression génique et protéique ne sont pas modifiées, la localisation de la protéine puisse être affectée. Des travaux du laboratoires de Sampath ont suggéré une interaction potentielle de Myomixer avec la F-actine et dans les cellules mutantes Srf l'architecture du cytosquelette d'actine est fortement altérée (Zhang et al., 2017). Nous avons donc effectué des expériences d'immunofluorescence afin de détecter Myomixer sur des CS Ctl, KO Srf et KO Myomixer. Cependant, voyant qu'il n'y avait pas de différence dans les marquages des cellules KO Myomixer et contrôle, nous avons opté pour une autre approche. Pour pouvoir déterminer la localisation de Myomixer et la quantifier, nous avons réalisé une biotinylation des protéines de surface couplée avec un WB. Avec la biotinylation, il nous est possible d'associer de la biotine aux protéines membranaires puis, après lyse des cellules, de pouvoir les récupérer avec des billes magnétiques enrobées de streptavidine capables de lier la biotine. Ces expériences nous ont permis de montrer que la localisation de Myomixer dans les cellules mutantes Srf n'était pas perturbée (résultats non montrés) et que, très probablement, les fusogènes Myomaker et Myomixer n'étaient pas impliqués dans le défaut de fusion observé dans les cellules mutantes pour Srf.

4. La composition lipidique des CS dépourvues de Srf pourrait affecter leur fusion

Lors de l'analyse transcriptomique, nous avons remarqué qu'en plus des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine, les gènes impliqués dans régulation de la biogenèse du cholestérol étaient diminués dans les cellules musculaires KO pour Srf. De nombreuses études ont montré l'importance du cholestérol dans la régulation de la fusion membranaire (Bu et al., 2018). En effet, celui-ci va jouer sur la fluidité et la perméabilité membranaire, la diffusion latérale de lipides, épaisseur de la bicouche et la pénétration de l'eau dans la bicouche : le cholestérol augmente la viscosité des membranes réduisant la diffusion des lipides et augmente l'encastrement des protéines membranes (Yang et al., 2016). De plus, le cholestérol génère des courbures négatives intrinsèques dans la bicouche lipidique donnant au cholestérol le potentiel de favoriser la formation de diaphragme lipidique apparaissant lors de la fusion

membranaire. Le cholestérol augmente ainsi le paramètre de courbure et donc la rigidité des membranes. Un jour après le début de la différenciation, quand débute la fusion, le fait que la composition de la membrane soit affectée pourrait expliquer la perturbation de la fusion chez les mutants Srf, en plus des problèmes d'organisation d'actine. Une diminution de cholestérol dans nos membranes pourrait modifier la formation d'intermédiaires de fusion, toutefois l'étape d'hémifusion n'est pas affectée chez les mutants Srf. Il serait intéressant d'analyser la composition de la membrane plasmique des cellules mutantes par spectrométrie de masse et/ou d'effectuer des expériences d'enrichissement de la membrane plasmique avec du cholestérol pour détecter une éventuelle modification de la fusion.

5. La perméabilité de la membrane et fusion – implication de MLC2 ?

Nos expériences de choc osmotique ont montré qu'en appliquant un choc hypotonique, il était possible d'augmenter la fusion des cellules mutantes Srf. Le choc osmotique a été décrit dans la littérature comme augmentant la tension membranaire et favorisant la formation de pore dans la membrane (Taupin et al., 1975), (Koslov and Markin, 1984), (Alam Shibly et al., 2016). Étant donné la similarité des résultats obtenus entre le choc osmotique et la surexpression de MLC2 et le fait qu'ils ne soient pas additifs, il est possible que MLC2 et le choc osmotique produisent des effets similaires. Compte tenu des résultats de rhéologie, avec une absence d'effet sur la rigidité à l'échelle de la cellule, nous pouvons suggérer que MLC2 favoriserait la formation de pores dans la membrane plasmique. Des expériences de perméabilisation comme effectué dans (Leikina et al., 2018) pourraientt nous apporter des réponses sur la question. En utilisant du octyl-ß-glucoside ou du magainine 2, tous deux connus comme interagissant directement avec la membrane et générant un stress membranaire perméabilisant la membrane, on pourrait savoir si la perméabilisation de la membrane est le paramètre qui augmente la fusion dans nos cellules mutantes. Il est aussi intéressant de noter que le cholestérol réduit la fluidité de la membrane, la rendant moins perméable. Par conséquent, une diminution de cholestérol dans les membranes pourrait expliquer une éventuelle baisse de la perméabilité dans les myoblastes Srf KO.

Annexes

Table S1. List of the genes whose expressions in muscle cells depend on Srf							
	Day 0		**Day 1**		**Day 3**		
Symbol	**p-value**	**Fold Change**	**p-value**	**Fold Change**	**p-value**	**Fold Change**	**Gene Name**
0610009L18Rik	4,76 E-03	-1,335	2,59 E-05	-1,795	2,85 E-04	-1,546	RIKEN cDNA 0610009L18 gene
1700086L19Rik	2,66 E-02	-1,168	2,75 E-03	-1,266	2,06 E-02	1,179	RIKEN cDNA 1700086L19 gene
1700095B10Rik	1,47 E-03	-1,667	2,70 E-02	-1,356	8,50 E-03	-1,469	RIKEN cDNA 1700095B10 gene
2810410L24Rik	1,27 E-02	-1,202	1,18 E-02	-1,206	5,35 E-03	1,24	RIKEN cDNA 2810410L24 gene
4833423E24Rik	1,53 E-02	-1,136	4,53 E-02	-1,105	3,42 E-03	-1,181	RIKEN cDNA 4833423E24 gene
4933403O08Rik	1,30 E-06	-2,336	1,07 E-04	-1,667	4,97 E-03	-1,347	RIKEN cDNA 4933403O08 gene
ABHD17C	1,27 E-02	-1,238	4,29 E-02	-1,177	4,55 E-04	-1,433	abhydrolase domain containing 17C
ABRA	2,58 E-02	-1,634	2,19 E-02	-1,663	3,55 E-03	-2,036	actin binding Rho activating protein
ACTA2	1,27 E-08	-4,731	1,89 E-03	-1,476	5,78 E-04	-1,587	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ACTB	2,65 E-03	-1,247	5,66 E-06	-1,622	4,24 E-08	-2,265	actin beta
ACTR3	2,95 E-03	-1,25	2,75 E-02	-1,159	6,24 E-03	-1,218	ARP3 actin related protein 3 homolog
Adam4/Gm4787	2,74 E-02	-1,256	3,04 E-02	-1,249	2,82 E-02	1,254	a disintegrin and metallopeptidase domain 4
APOE	5,00 E-03	1,646	1,94 E-02	1,472	4,61 E-03	1,657	apolipoprotein E
ARHGAP29	3,24 E-02	-1,348	3,15 E-02	-1,351	1,68 E-02	-1,411	Rho GTPase activating protein 29
ARL4A	1,07 E-03	-1,317	3,54 E-02	-1,159	8,79 E-03	-1,218	ADP ribosylation factor like GTPase 4A
ASGR1	3,74 E-02	1,215	1,25 E-02	-1,28	2,88 E-02	-1,23	asialoglycoprotein receptor 1
ASPA	3,54 E-03	-1,802	1,76 E-03	-1,927	5,68 E-05	-2,81	aspartoacylase
AZIN2	1,37 E-02	1,309	1,02 E-03	1,511	2,64 E-02	1,265	antizyme inhibitor 2

BLVRB	5,04 E-03	1,196	2,43 E-02	1,142	1,72 E-03	1,236	biliverdin reductase B
C20orf24	3,30 E-02	-1,068	1,52 E-02	1,081	7,94 E-05	1,185	chromosome 20 open reading frame 24
C8orf4	3,15 E-04	1,438	1,37 E-03	1,345	3,50 E-04	1,431	chromosome 8 open reading frame 4
C9orf16	7,96 E-03	1,204	4,68 E-02	1,136	7,72 E-03	1,205	chromosome 9 open reading frame 16
CA3	6,03 E-05	-2,34	8,77 E-04	-1,825	1,75 E-06	-3,574	carbonic anhydrase 3
CAMK2N1	1,21 E-03	1,391	7,48 E-03	-1,28	2,91 E-02	-1,207	calcium/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor 1
CD68	1,51 E-03	1,655	4,74 E-04	1,809	2,81 E-03	1,581	CD68 molecule
CNN2	1,95 E-07	-4,928	2,50 E-06	-3,358	5,61 E-04	-1,883	calponin 2
COL4A1	8,84 E-04	-1,543	2,53 E-03	-1,449	2,25 E-03	-1,459	collagen type IV alpha 1 chain
COPRS	3,51 E-03	1,167	8,77 E-03	1,142	2,56 E-02	1,113	coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator
CSRP1	1,33 E-04	-1,848	9,07 E-04	-1,61	1,88 E-02	-1,332	cysteine and glycine rich protein 1
CSTF2T	3,45 E-02	-1,115	1,86 E-02	1,133	1,10 E-02	1,149	cleavage stimulation factor subunit 2 tau variant
CTNNA1	4,78 E-03	-1,072	1,81 E-05	-1,158	2,07 E-04	-1,115	catenin alpha 1
DCXR	3,02 E-02	1,282	3,18 E-03	1,462	3,48 E-03	1,454	dicarbonyl and L-xylulose reductase
DIO2	2,46 E-02	-1,6	1,02 E-02	-1,753	3,58 E-02	-1,538	iodothyronine deiodinase 2
DIRAS2	1,29 E-02	-1,387	4,80 E-02	-1,276	3,34 E-02	1,306	DIRAS family GTPase 2
DUSP2	2,00 E-02	-1,374	6,62 E-03	-1,48	1,38 E-05	-2,468	dual specificity phosphatase 2
ECM1	1,62 E-04	1,617	4,43 E-06	2,082	1,17 E-02	-1,287	extracellular matrix protein 1
EEF1A2	1,50 E-02	1,379	1,57 E-02	1,375	3,35 E-02	1,31	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
EGR1	4,58 E-05	-3,86	3,89 E-06	-6,006	9,14 E-07	-8,171	early growth response 1
EMCN	8,62 E-04	-1,246	2,97 E-02	1,126	1,26 E-02	1,153	endomucin
EME1	3,09 E-03	1,253	2,36 E-02	-1,168	2,15 E-02	-1,172	essential meiotic structure-specific endonuclease 1

ERBB2	1,76 E-02	-1,198	1,57 E-03	-1,314	4,69 E-04	-1,383	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
F630040 K05Rik	9,53 E-03	1,331	6,91 E-03	1,353	6,10 E-03	1,362	RIKEN cDNA F630040K05 gene
FAF1	7,11 E-03	-1,165	4,35 E-03	-1,181	4,13 E-03	-1,183	Fas associated factor 1
FAM167 A	4,56 E-02	-1,353	9,18 E-03	-1,531	7,81 E-04	-1,875	family with sequence similarity 167 member A
FAM171 A2	1,46 E-02	-1,474	3,01 E-02	-1,395	1,63 E-02	-1,461	family with sequence similarity 171 member A2
FAM53B	5,54 E-03	-1,209	1,62 E-02	-1,168	4,79 E-02	-1,129	family with sequence similarity 53 member B
FBXO4	3,87 E-02	1,138	9,30 E-03	-1,191	3,48 E-02	-1,142	F-box protein 4
FERMT2	1,25 E-06	-1,825	9,46 E-06	-1,617	3,08 E-04	-1,371	fermitin family member 2
FHL1	3,67 E-02	-1,701	1,68 E-02	-1,881	1,01 E-04	-3,926	four and a half LIM domains 1
FHL2	3,16 E-04	-1,766	3,92 E-04	-1,738	1,02 E-02	-1,398	four and a half LIM domains 2
FLNA	1,33 E-02	-1,624	3,65 E-03	-1,839	4,15 E-04	-2,307	filamin A
FRAS1	4,99 E-02	-1,256	2,33 E-02	-1,314	1,11 E-02	-1,374	Fraser extracellular matrix complex subunit 1
GADD45 G	3,37 E-02	-1,182	8,63 E-03	1,248	2,04 E-03	1,324	growth arrest and DNA damage inducible gamma
GCHFR	8,17 E-03	1,53	2,43 E-03	1,682	4,68 E-02	1,341	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
Gm6978	3,19 E-02	-1,326	5,08 E-03	-1,499	1,98 E-02	-1,369	predicted gene 6978
Gm7056	3,33 E-02	1,123	4,65 E-03	-1,185	1,30 E-02	-1,152	predicted gene 7056
Gm2060 3	1,19 E-02	1,26	5,54 E-03	-1,304	8,02 E-03	1,283	predicted gene 20603
GML	2,04 E-03	1,309	1,52 E-02	-1,21	6,81 E-04	-1,37	glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like
GNA13	4,01 E-02	1,103	4,14 E-02	1,102	2,57 E-02	-1,115	G protein subunit alpha 13
GPNMB	1,89 E-03	1,402	1,95 E-06	2,206	3,00 E-06	2,127	glycoprotein nmb
GSTM1	1,06 E-02	1,436	1,99 E-03	1,615	9,99 E-04	1,699	glutathione S-transferase mu 1
Gucy2g	2,55 E-03	1,163	1,86 E-02	-1,112	4,19 E-02	-1,092	guanylate cyclase 2g
HPSE	3,44 E-06	2,298	1,26 E-03	1,495	7,58 E-03	1,352	heparanase

IFITM3	1,60 E-02	1,121	3,98 E-07	1,583	2,62 E-02	1,109	interferon induced transmembrane protein 3
IGFBP7	9,76 E-03	-1,563	2,76 E-04	-2,152	2,02 E-03	-1,787	insulin like growth factor binding protein 7
IL2RG	4,50 E-02	-1,279	4,86 E-02	-1,273	3,92 E-02	-1,291	interleukin 2 receptor subunit gamma
ILK	3,31 E-03	-1,438	2,95 E-02	-1,272	1,87 E-02	-1,304	integrin linked kinase
ITGB1BP 2	2,30 E-03	-2,329	2,81 E-03	-2,269	1,72 E-02	-1,811	integrin subunit beta 1 binding protein 2
KCNAB2	5,69 E-03	1,353	1,28 E-02	1,298	1,29 E-02	1,298	potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta 2
KLF5	5,18 E-03	-1,264	2,81 E-02	-1,184	3,90 E-04	-1,41	Kruppel like factor 5
KLK3	2,86 E-02	-1,324	3,59 E-02	1,309	3,99 E-02	1,443	kallikrein related peptidase 3
KRT18	1,14 E-05	3,565	2,85 E-02	1,499	1,03 E-03	2,061	keratin 18
LARGE1	2,31 E-02	-1,136	2,62 E-03	-1,208	2,07 E-04	-1,309	LARGE xylosyl- and glucuronyltransferase 1
LAYN	4,86 E-02	1,306	2,37 E-02	1,373	2,77 E-02	1,358	layilin
LBH	2,06 E-03	-1,444	1,95 E-03	-1,448	1,76 E-04	-1,673	limb bud and heart development
LDLR	4,76 E-02	-1,159	1,87 E-02	-1,201	4,93 E-02	1,157	low density lipoprotein receptor
LILRB3	2,32 E-02	-1,825	3,14 E-02	-1,436	5,59 E-04	-2,053	leukocyte immunoglobulin like receptor B3
LIMA1	1,31 E-03	-1,739	9,20 E-03	-1,497	5,46 E-03	-1,556	LIM domain and actin binding 1
LSP1	6,59 E-04	-1,388	2,53 E-03	-1,309	5,50 E-04	-1,399	lymphocyte-specific protein 1
MAPKAP K2	9,25 E-04	-1,246	3,10 E-04	-1,291	7,77 E-03	-1,17	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MARVEL D1	1,97 E-02	-1,204	2,78 E-02	-1,188	3,15 E-02	-1,182	MARVEL domain containing 1
MARVEL D2	1,81 E-02	-1,453	4,27 E-02	-1,36	1,51 E-02	-1,473	MARVEL domain containing 2
ME3	1,18 E-02	-1,37	5,22 E-03	-1,439	7,02 E-04	-1,638	malic enzyme 3
MED14	5,68 E-04	-1,21	5,52 E-03	-1,145	4,12 E-05	-1,305	mediator complex subunit 14
MED12L	3,36 E-02	-1,179	1,68 E-02	-1,211	2,38 E-02	-1,195	mediator complex subunit 12 like

MGST2	4,36 E-02	1,534	3,64 E-02	1,565	7,70 E-03	1,852	microsomal glutathione S-transferase 2
MPDU1	8,10 E-05	1,917	3,70 E-04	1,71	1,05 E-02	1,378	mannose-P-dolichol utilization defect 1
MRPS6	2,03 E-02	1,203	8,18 E-04	1,373	7,18 E-04	1,381	mitochondrial ribosomal protein S6
MS4A10	8,98 E-05	1,562	1,55 E-03	1,357	1,36 E-05	1,746	membrane spanning 4-domains A10
MSRB3	8,83 E-05	-2,228	6,00 E-04	-1,87	6,97 E-03	-1,537	methionine sulfoxide reductase B3
MYADM	1,64 E-02	-1,227	6,07 E-03	-1,28	2,82 E-03	-1,323	myeloid associated differentiation marker
MYL9	**9,64 E-08**	**-5,337**	**5,40 E-08**	**-5,928**	**1,55 E-07**	**-4,917**	**myosin light chain 9**
MYO18B	3,89 E-04	-1,746	2,44 E-02	-1,326	4,06 E-02	-1,285	myosin XVIIIB
NAB2	2,46 E-02	-1,436	3,61 E-03	-1,678	1,75 E-05	-2,847	NGFI-A binding protein 2
Ngp	4,77 E-03	-1,238	2,34 E-02	1,171	6,62 E-03	1,224	neutrophilic granule protein
NMB	2,71 E-03	1,611	2,25 E-02	1,384	6,17 E-03	1,517	neuromedin B
NUDT14	3,50 E-02	-1,081	1,55 E-02	1,097	8,04 E-06	1,305	nudix hydrolase 14
NXT2	1,63 E-03	-1,278	2,29 E-02	1,167	9,13 E-03	1,203	nuclear transport factor 2 like export factor 2
OXCT1	1,20 E-02	-1,257	4,84 E-04	-1,46	1,62 E-04	-1,547	3-oxoacid CoA-transferase 1
PARP8	3,78 E-02	-1,116	1,63 E-04	1,309	3,87 E-02	1,116	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8
PCDH19	2,69 E-04	-1,697	6,54 E-03	-1,391	7,18 E-03	-1,384	protocadherin 19
PDLIM7	6,63 E-07	-2,359	2,12 E-02	-1,238	2,05 E-03	-1,38	PDZ and LIM domain 7
PFAS	4,79 E-02	-1,203	1,97 E-02	1,255	2,50 E-03	-1,388	phosphoribosylformylglycinamidine synthase
PIK3CB	6,78 E-04	1,291	2,28 E-02	-1,152	2,33 E-04	-1,342	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic beta
PLA2G10	4,83 E-02	-1,195	2,30 E-02	1,237	1,41 E-02	-1,265	phospholipase A2 group X
Plpp1	2,19 E-02	-1,114	4,11 E-02	1,097	4,14 E-03	1,158	phospholipid phosphatase 1
PLTP	3,43 E-05	1,865	2,43 E-04	1,632	1,95 E-02	1,278	phospholipid transfer protein

PPP2R3A	1,30 E-02	-1,244	4,20 E-02	-1,184	9,30 E-03	-1,262	protein phosphatase 2 regulatory subunit B''alpha
PRSS23	1,28 E-02	-1,312	4,09 E-03	-1,394	3,18 E-03	-1,414	protease, serine 23
PTGES3L	1,40 E-06	-3,131	6,78 E-08	-4,835	5,09 E-08	-5,072	prostaglandin E synthase 3 like
REEP6	1,17 E-04	1,559	1,16 E-02	1,252	3,25 E-02	-1,198	receptor accessory protein 6
RFTN2	2,15 E-02	-1,287	2,33 E-02	-1,281	1,70 E-02	-1,303	raftlin family member 2
RSU1	2,25 E-04	-1,471	5,72 E-04	-1,407	1,91 E-03	-1,333	Ras suppressor protein 1
SASH1	3,75 E-02	1,218	8,04 E-04	1,475	1,43 E-04	1,629	SAM and SH3 domain containing 1
SBK3	1,21 E-03	1,47	1,52 E-03	1,451	1,02 E-02	1,313	SH3 domain binding kinase family member 3
SDHD	4,16 E-02	-1,079	1,47 E-02	1,1	1,49 E-02	1,1	succinate dehydrogenase complex subunit D
SEMA3C	1,72 E-03	-1,406	1,48 E-02	-1,267	2,09 E-03	-1,393	semaphorin 3C
Serpina1f	7,14 E-04	1,27	4,78 E-02	1,118	4,62 E-02	1,12	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1F
SH3BP2	1,63 E-03	1,296	1,62 E-02	1,192	8,19 E-03	-1,221	SH3 domain binding protein 2
SLC9A3R2	6,62 E-05	1,458	2,11 E-02	-1,171	4,86 E-02	-1,138	SLC9A3 regulator 2
Snora41	2,96 E-02	-1,543	3,95 E-02	-1,499	1,17 E-02	-1,693	small nucleolar RNA, H/ACA box 41
Sorbs2os	1,99 E-02	-1,164	3,71 E-02	-1,141	4,27 E-04	-1,328	sorbin and SH3 domain containing 2, opposite strand
SRF	1,48 E-02	-1,298	1,03 E-02	-1,323	3,56 E-03	-1,4	serum response factor
SVIL	4,93 E-02	-1,188	1,95 E-02	-1,238	2,58 E-02	-1,223	supervillin
SYT13	1,97 E-03	1,371	4,82 E-02	1,187	3,59 E-03	1,333	synaptotagmin 13
Tac4	2,58 E-02	1,185	4,72 E-02	1,158	4,38 E-03	1,269	tachykinin 4
TAGLN	2,70 E-03	-1,813	2,31 E-04	-2,317	4,10 E-03	-1,744	transgelin
TBC1D1	4,39 E-05	-1,294	1,71 E-02	-1,113	6,10 E-04	-1,203	TBC1 domain family member 1
TGFB1I1	5,48 E-07	-3,552	3,22 E-06	-2,845	1,11 E-04	-1,998	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1

TMEM109	3,94 E-08	-1,386	6,04 E-03	1,079	2,96 E-05	1,172	transmembrane protein 109
TNC	2,76 E-03	-1,744	8,19 E-03	-1,59	5,93 E-03	-1,633	tenascin C
Tpm1	4,78 E-03	-1,115	5,25 E-03	-1,113	2,19 E-02	-1,085	tropomyosin 1, alpha
Tpm4	6,42 E-03	-1,697	4,79 E-03	-1,743	9,89 E-05	-2,607	tropomyosin 4
TRAF3IP3	1,09 E-05	-1,593	7,78 E-03	1,211	4,23 E-04	1,347	TRAF3 interacting protein 3
TSC22D1	6,98 E-03	-1,214	1,40 E-02	1,186	5,11 E-03	-1,227	TSC22 domain family member 1
TSPO2	1,62 E-02	-1,239	1,74 E-02	-1,235	1,51 E-03	1,378	translocator protein 2
UBALD1	9,94 E-06	-1,936	2,04 E-04	-1,584	6,79 E-05	-1,695	UBA like domain containing 1
UGDH	3,38 E-02	1,283	1,55 E-03	1,547	3,23 E-02	1,286	UDP-glucose 6-dehydrogenase
Vmn1r214	3,06 E-02	-1,211	2,67 E-02	1,308	6,52 E-03	-1,366	vomeronasal 1 receptor 214
WDR1	1,28 E-04	-1,492	5,77 E-04	-1,389	3,50 E-05	-1,597	WD repeat domain 1
ZBBX	5,96 E-03	-1,26	4,23 E-02	1,167	2,06 E-03	-1,315	zinc finger B-box domain containing
ZBTB41	4,45 E-02	1,076	5,00 E-02	-1,073	3,87 E-05	-1,248	zinc finger and BTB domain containing 41
ZNF365	3,72 E-02	1,137	2,09 E-03	1,247	3,62 E-03	-1,225	zinc finger protein 365
ZNF878	9,51 E-03	1,264	5,90 E-03	1,29	1,73 E-02	-1,232	zinc finger protein 878

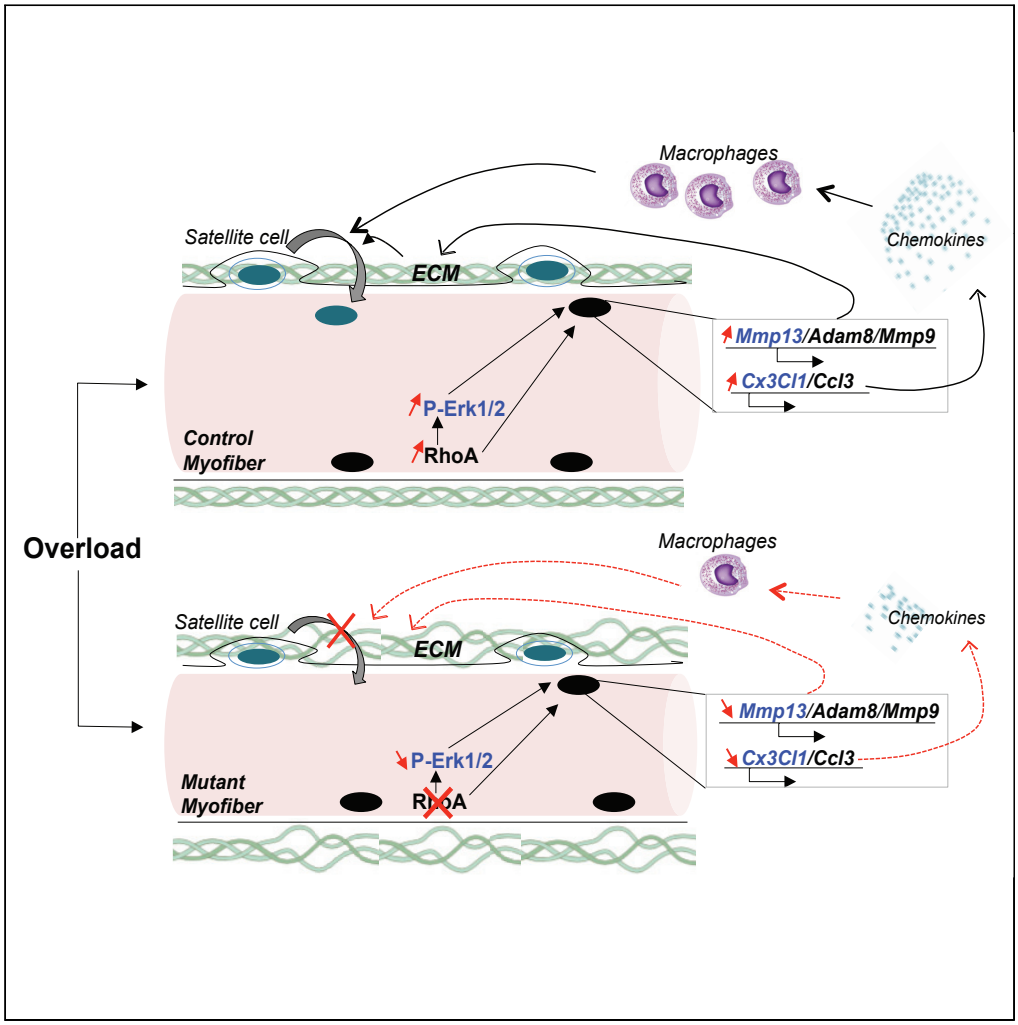
Transcriptomic analysis of genes regulated by Srf in myoblasts (*Srf*$^{lx/lx}$) transduced with Ad-GFP or Ad-Cre adenoviruses and during the course of differentiation. This list represents the 144 genes that are regulated by Srf in myoblasts (Day 0) and in differentiating cells (Day 1 and Day 3) with a p-value <0.05 versus Ad-GFP.

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

RhoA within myofibers controls satellite cell microenvironment to allow hypertrophic growth



Chiara Noviello, Kassandra Kobon, Léa Delivry, ..., Pascal Maire, Voahangy Randrianarison-Huetz, Athanassia Sotiropoulos

athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

Highlights

RhoA within myofibers controls SC fusion and muscle hypertrophic growth

RhoA controls the expression of *Mmps* and of macrophage chemoattractants (*Ccl3/Cx3cl1*)

RhoA controls ECM remodeling and macrophage recruitment upon hypertrophy

Mmp inhibition and macrophage depletion phenocopy the blunted growth of RhoA mutant muscles

Noviello et al., iScience *25*, 103616
January 21, 2022 © 2021 The Authors.
https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103616

iScience

CellPress
OPEN ACCESS

Article

RhoA within myofibers controls satellite cell microenvironment to allow hypertrophic growth

Chiara Noviello,[1,2,3] Kassandra Kobon,[1,2,3] Léa Delivry,[1,2,3] Thomas Guilbert,[1,2,3] Florian Britto,[1,2,3] Francis Julienne,[1,2,3] Pascal Maire,[1,2,3] Voahangy Randrianarison-Huetz,[1,2,3] and Athanassia Sotiropoulos[1,2,3,4,*]

SUMMARY

Adult skeletal muscle is a plastic tissue that can adapt its size to workload. Here, we show that RhoA within myofibers is needed for overload-induced hypertrophy by controlling satellite cell (SC) fusion to the growing myofibers without affecting protein synthesis. At the molecular level, we demonstrate that RhoA controls in a cell autonomous manner Erk1/2 activation and the expressions of extracellular matrix (ECM) regulators such as *Mmp9/Mmp13/Adam8* and macrophage chemo-attractants such as *Ccl3/Cx3cl1*. Their decreased expression in RhoA mutants is associated with ECM and fibrillar collagen disorganization and lower macrophage infiltration. Moreover, matrix metalloproteinases inhibition and macrophage depletion in controls phenocopied the altered growth of RhoA mutants while having no effect in mutants showing that their action is RhoA-dependent. These findings unravel the implication of RhoA within myofibers, in the building of a permissive microenvironment for muscle hypertrophic growth and for SC accretion through ECM remodeling and inflammatory cell recruitment.

INTRODUCTION

The skeletal muscle is a highly plastic tissue and among the most abundant in the vertebrate body. The cellular muscle unit is the myofiber that is mainly composed of sarcomeric proteins with contractile properties. Physiological demands such as exercise or functional overload (OV) lead to an increase of muscle mass due to a hypertrophic growth of myofibers. In the adult, the two major mechanisms related to muscle growth and sarcoplasmic volume enlargement are: (1) protein synthesis increase to add new contractile filaments to pre-existing sarcomere units, and (2) the fusion of new nuclei provided by resident muscle stem cells, the satellite cells (SCs). In response to increased workload, SCs exit the quiescent state, proliferate, differentiate and subsequently fuse to growing myofibers (Fukada et al., 2020).

Furthermore, at the cellular level, skeletal muscle tissue homeostasis requires the coordinated function of other cell types present in the muscle itself. During the regenerative process, a network of interactions of SCs with different cell types including endothelial cells, fibro/adipogenic progenitors (FAPs), and macrophages orchestrates muscle regeneration (Mashinchian et al., 2018; Wosczyna et al., 2019). Indeed, macrophages play various sequential roles during skeletal muscle regeneration (reviewed in Chazaud, 2020). In the early stages of injury, pro-inflammatory macrophages stimulate SC proliferation and, later on, after their conversion into anti-inflammatory macrophages, they support SC differentiation and fusion into myofibers. However, the contribution of muscle resident cells other than SCs and myofibers to muscle hypertrophy and the role of muscle microenvironment remain poorly studied so far.

In addition, modifications of muscle tissue microenvironment, such as ECM remodeling, occurring upon increased workload have not been fully explored. The major roles of ECM are: (1) to create tissue scaffold for vessels and nerves; (2) to contribute to the force transmission through the passive elastic response of muscle; and (3) to regulate dynamic cell functions through ECM-embedded molecules such as growth factors. In addition, ECM provides a structural support to the integrity of SC niche, physically separating the stem cell pool from other tissue resident cells, and can thus play an important role in SC accretion during hypertrophy. Among the proteins mostly present in ECM are Collagens, Fibronectin (Fn1), and TenascinC (Tnc-C) that are crucial components of SC niche regulating their self-renewal (Bentzinger et al., 2013; Urciuolo et al., 2013) and their regenerative potential (Tierney et al., 2016).

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France

[2]CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France

[3]Université de Paris, F-75006 Paris, France

[4]Lead contact

*Correspondence: athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103616

This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

The major enzymes responsible for the physiological breakdown of ECM are matrix metalloproteinases (Mmps). One of the best characterized Mmp in SCs and muscle tissue is Mmp9 (Chenette et al., 2016; Rayagiri et al., 2018). *Mmp9* deletion is deleterious to muscle mass (Mehan et al., 2011) while its constitutive muscle-specific over-expression promotes growth (Dahiya et al., 2011), supporting the notion that a precise regulation of muscle ECM is necessary during periods of adaptation to ensure optimal muscle growth. Nevertheless, how ECM is remodeled and regulated upon increased workload remains unclear.

Ras homolog family member A (RhoA) is a small GTPase protein that oscillates between GTP bound and GDP bound states, regulating a wide spectrum of cellular functions. RhoA controls contractility, actin polymerization, and actin cytoskeleton organization. RhoA is an important player of mechanotransduction that translates physical forces into biochemical signaling pathways and transmits the signal in the nucleus, activating specific transcription factors (Burridge et al., 2019; Lessey et al., 2012). Among them, serum response factor (Srf) activity is regulated by RhoA through the control of actin dynamics (Sotiropoulos at al, 1999). In muscle tissue, mRNA and protein expressions of RhoA have been shown to increase upon chronic functional OV and hypertrophy-stimulating resistance training in rats and humans, respectively (McClung et al., 2003). *In vitro*, cyclic stretch activated RhoA in cultured myotubes (Zhang et al., 2007). However, the functional role of RhoA in skeletal muscle physiology and in muscle mass regulation has not been investigated.

In this study, we assessed the role played by RhoA within myofibers during skeletal muscle hypertrophy by inducing compensatory hypertrophy of *plantaris* muscles harboring a conditional and inducible deletion of *RhoA* in myofibers. We showed compromised hypertrophic growth in the absence of RhoA. The impaired growth was not associated with a protein synthesis defect but rather with altered SC function and fusion to the growing myofibers. We showed that the most down-regulated genes in OV mutant (Mut) muscles compared to controls (Ctl) are those involved in ECM remodeling, like *Mmp9/13* and *Adam8*. Furthermore, a decreased expression of these genes in Mut is associated with un-degraded ECM proteins and fibrillar collagen disorganization. Inhibition of Mmps activity affected muscle growth by preventing SC recruitment and thus phenocopying RhoA mutants. Finally, we showed that the expression of potent chemo-attracting chemokines (*Cx3Cl1* and *Ccl3*) is reduced in *RhoA*-deleted myofibers upon OV and is associated with diminution of macrophage infiltration which functional necessity was demonstrated by depletion experiments.

Altogether our data highlighted a new role of RhoA within myofibers in the regulation of muscle microenvironment upon OV. By modulating ECM remodeling and inflammation, RhoA may allow the constitution of a correct SC niche that will affect SC behavior and thus permits the correct hypertrophic growth.

RESULTS

RhoA is required in myofibers for OV-induced hypertrophy

In order to investigate the signaling pathways functionally involved in the control of adult skeletal muscle growth in response to increased load, we performed a transcriptomic study of genes expressed in *plantaris* muscles at the basal state (Sham Operated, SO) and 1 week after OV-induced hypertrophy (OV 1wk). We identified genes differentially expressed before and after OV (fold change >1.2 and pvalue <0.05). Analysis of the canonical pathways using ingenuity pathway analysis (IPA) pointed out RhoA signaling among the first 10 pathways ranked by their significance with predicted activation (*Z* score>2) (Table S1). We thus hypothesized that RhoA signaling could have a crucial role during skeletal muscle hypertrophy.

To examine the contribution of RhoA during muscle hypertrophic growth, we generated a mouse model in which *RhoA* is deleted in a specific and inducible manner only in the adult myofiber compartment by injecting tamoxifen (Tmx) to *HSA-Cre^{ERT2}:Rho$^{flox/flox}$* mice (referred to as mutant) and performed OV-induced hypertrophy of the *plantaris* muscle (Figure 1A). At the steady state (SO), a significant 60% RhoA loss was achieved at the protein and transcript levels in different muscles including *gastrocnemius*, *tibialis anterior*, and *plantaris* (Figures 1B and 1C). Because different cell types are present in the muscles and myofiber myonuclei represent roughly 50% of the total nuclei (Dos Santos et al., 2020), we checked the expression of *RhoA* transcripts in isolated control (Ctl) and mutant (Mut) *plantaris* single myofibers. We showed an efficient 85% mRNA decrease upon Tmx treatment (Figure 1D, SO condition). No difference of muscle weight of myofiber mean cross -section area (CSA) and of myofiber size distribution was observed before hypertrophy between Ctl and Mut *plantaris* (Figures 1E, 1F, 1G, and S1A left panel, SO condition). Following OV, *RhoA* expression increased at the onset of the hypertrophy process (1wk after surgery) in muscle tissue and

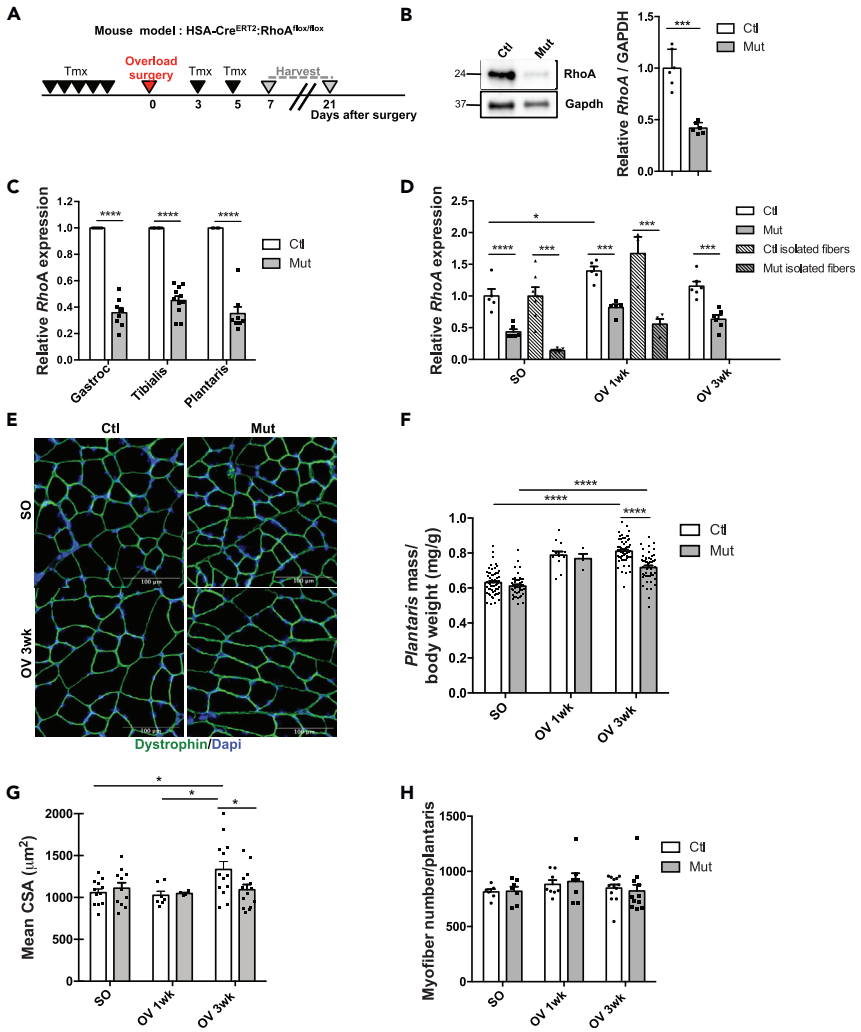


Figure 1. RhoA loss within myofibers impairs overload-induced hypertrophy

(A) RhoA mutant (Mut) mice were injected with Tmx 1 week (wk) before OV procedure. *Plantaris* muscles were isolated 1 and 3 wk after surgery.

(B) RhoA protein was analyzed by Western blot in Ctl and Mut *plantaris* muscles. Gapdh was used as a loading control.

(C) Analysis of *RhoA* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut *gastrocnemius*, *tibialis anterior* and *plantaris* muscles. Data were normalized by *Hmbs* expression and relative to Ctl (n = 6–11).

(D) Analysis of *RhoA* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut *plantaris* muscles or isolated myofibers before (SO) and after 1 and 3wk OV. Data were normalized by *Hmbs* expression and relative to Ctl SO (n = 3–7).

(E)*Plantaris* sections immunostained for Dystrophin (green) and nuclear staining with DAPI for Ctl and Mut before (SO) and after 3 wk OV. Scale bar 100 µm.

(F) Ratio of *plantaris* mass (mg) to body weight (g) before (SO) and after 1 and 3 wk OV in Ctl and Mut (n = 5–20).

(G) Mean CSA (µm^2) before (SO) and after 1 and 3 wk OV in Ctl and Mut (n = 6–14).

(H) Mean myofiber number before (SO) and after 1 and 3 wk OV in Ctl and Mut. Data are mean ± SEM. *p value<0.05, ***p value<0.001, ****p value<0.0001. See also Figure S1.

isolated myofibers (Figure 1D) in agreement with the increased *RhoA* expression observed in overloaded rat muscles (McClung et al., 2003). Three weeks after OV, *plantaris* muscle mass and mean CSA were increased in Ctl as compared to unloaded muscles (SO Ctl). However, the extent of hypertrophic growth was lower in Mut *plantaris* muscles (Figure 1F), mean CSA of overloaded mutant myofibers was significantly smaller compared to the control myofibers (Figure 1G) and, concerning their size, there was a shift toward smaller myofibers upon OV in Mut (Figure S1A right panel, OV condition). Mut *plantaris* muscles displayed a 15% increase in muscle weight (after 3 wk OV) instead of 30% in Ctl and no significant increase of their CSA (Figures 1E, 1F, and 1G). Following hypertrophy, myofiber type distribution was similar between Ctl and

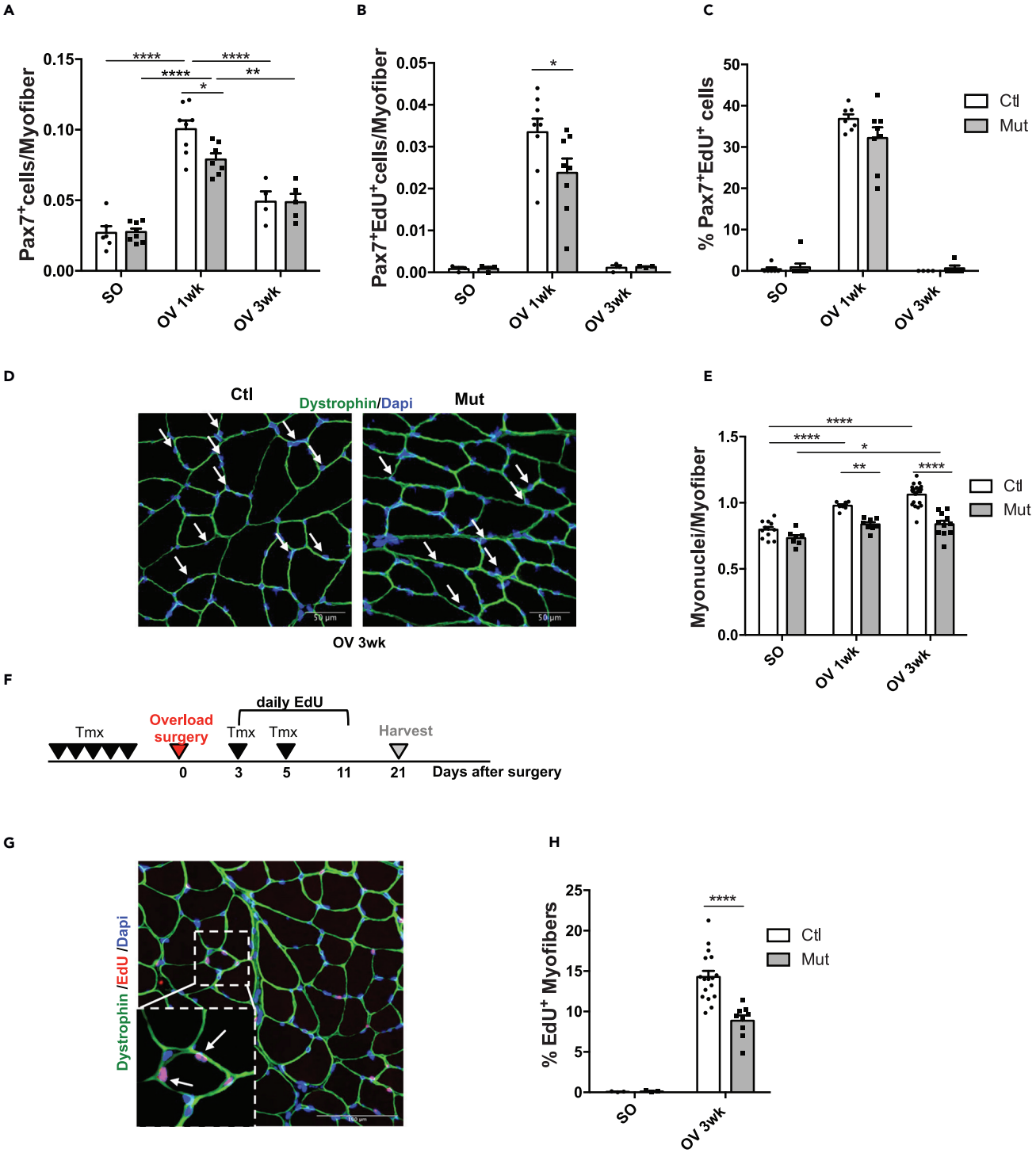


Figure 2. RhoA loss within myofibers impairs SC fusion

(A)Number of Pax7$^+$ cells per myofiber (n = 4–8) (A).

(B) Number of Pax7+EdU + cells per myofiber (n = 3–8).

(C) Percentage of Pax7+EdU + among Pax7+ cells (n = 4–8) in Ctl and Mut plantaris sections before (SO) and after 1 and 3wk OV.

(D) Plantaris sections immunostained for Dystrophin (green) and nuclear staining with DAPI for Ctl and Mut after 3wk of OV. White arrows indicate myonuclei within Dystrophin + sarcolemma. Scale bar 50 µm.

(E) Number of myonuclei within sarcolemma per myofiber before (SO) and after 1 and 3wk OV (n = 7–19).

Figure 2. *Continued*

(F) Ctl and Mut mice were injected daily with EdU from day 3–11 after OV. Plantaris were isolated after 3 wk OV.

(G) Representative image of Plantaris Ctl section immunostained for Dystrophin (green), EdU (red) and nuclear staining with DAPI after 3wk OV. Fusion was scored as an EdU+ nucleus within a Dystrophin+ myofiber as depicted by the arrows. Scale bar 100 μm.

(H) Percentage of EdU + myofibers in Ctl and Mut plantaris sections before (SO) and after 3wk OV (n = 9–14). Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value<0.01, ****p value<0.0001. See also Figure S3.

Mut suggesting that the smaller CSA of Mut myofibers observed upon OV was not due to changes in myofiber typology (Figure S1B). In addition, the increase in muscle mass was mainly caused by myofiber hypertrophy as the total number of myofibers did not vary after OV (Figure 1H). These data show that RhoA in the myofibers is necessary for optimal myofiber OV-induced hypertrophy and that its absence causes muscle growth defect.

RhoA is dispensable for protein synthesis control upon hypertrophy

Hypertrophic growth is associated with an increase of protein synthesis and a decrease of protein degradation at the onset of compensatory hypertrophy procedure. Akt signaling plays a central role in this control by activating mTOR pathway and reducing FoxO-mediated atrogenes transcription (Sandri et al., 2004). So, we first tested whether the impaired OV-induced hypertrophy of Mut *plantaris* muscles could be attributed to impaired global protein synthesis. The rate of total protein synthesis was measured *in vivo* using the SUrface SEnsing of Translation (SUnSET) technique that relies on the incorporation of puromycin in newly translated proteins. By Western blot, we showed a similar augmentation of proteins that incorporated puromycin (normalized by the protein total amount) in both Ctl and Mut muscles 1wk following OV, which came back to SO levels after 3wk, with no significant difference between the two groups (Figure S2A). We then analyzed Akt and p70S6K signaling and we observed no difference in Akt and p70S6K phosphorylations between Ctl and Mut, with a 6-fold and 2.5-fold increase upon OV respectively (Figure S2B). These findings suggest that the signaling pathways leading to the activation of protein synthesis are not affected by *RhoA* deletion. However, these experimental approaches do not permit to monitor the absolute level of translation per myofiber that depends on the signaling activating translation and on other parameters such as the amount of mRNA available. To assess this parameter, we performed, on muscle sections, immunostaining for phosphorylated S6 protein that is used as an indicator of PI3k/Akt/mTOR pathway and indirectly protein synthesis. The quantification of pS6 signal intensity (at 1wk after OV) per myofiber showed a trend toward a decrease in the Mut as compared to the Ctl (Figure S2D). We cannot exclude that this tendency to a decreased absolute protein synthesis may participate to the altered hypertrophic growth of RhoA mutants.

By phosphorylating FoxO transcription factors, Akt activation prevents their nuclear localization and the transcription of their target genes, among which are the atrogenes encoding MuRF1 and MAFbx ubiquitin ligases. In line with the activation of Akt, *MuRF1* and *MAFbx* expressions decreased in a similar manner in Ctl and Mut *plantaris* 1wk after OV and came back to basal levels after 3wk (Figure S2C). Altogether, these data suggest that the deletion of RhoA in the myofibers does not affect protein synthesis and degradation pathways upon OV-induced hypertrophy.

Loss of RhoA in myofibers impairs SC behaviors and in particular their fusion

In addition to the increase of protein content, muscle compensatory hypertrophy relies on the accretion of new nuclei through the mobilization of SCs. We hypothesized that RhoA in the myofibers may control the behavior of SCs under OV-induced hypertrophic conditions. We investigated whether RhoA loss in myofibers altered the number of SCs, expressing Pax7 and RhoA. Before OV, $Pax7^+$ SC number was identical between Ctl and Mut (Figure 2A, SO). One week after OV, there was a significant increase in $Pax7^+$ SCs in both genotypes, but the number of SCs was slightly lower in Mut muscles. We further assessed the proliferative potential of SCs by determining the number of SCs that entered S-Phase (*in vivo* EdU injection 24 hr and 4hr prior the end of the experiment – $Pax7^+EdU^+$ cells) and showed that the number of $Pax7^+EdU^+$ proliferating SCs is slightly reduced in the Mut muscles. However, the proportion of proliferating SCs ($Pax7^+EdU^+/Pax7^+$ cells) was not significantly affected (Figures 2B and 2C). Overall, following an increased load, RhoA in myofibers may slightly affect the proliferative and/or the activation potential of SCs.

We next investigated whether *RhoA* deletion in the myofiber could affect SCs myogenic differentiation potential and their fusion to the Mut myofibers. Upon OV, *Myogenin* transcript levels did not differ between

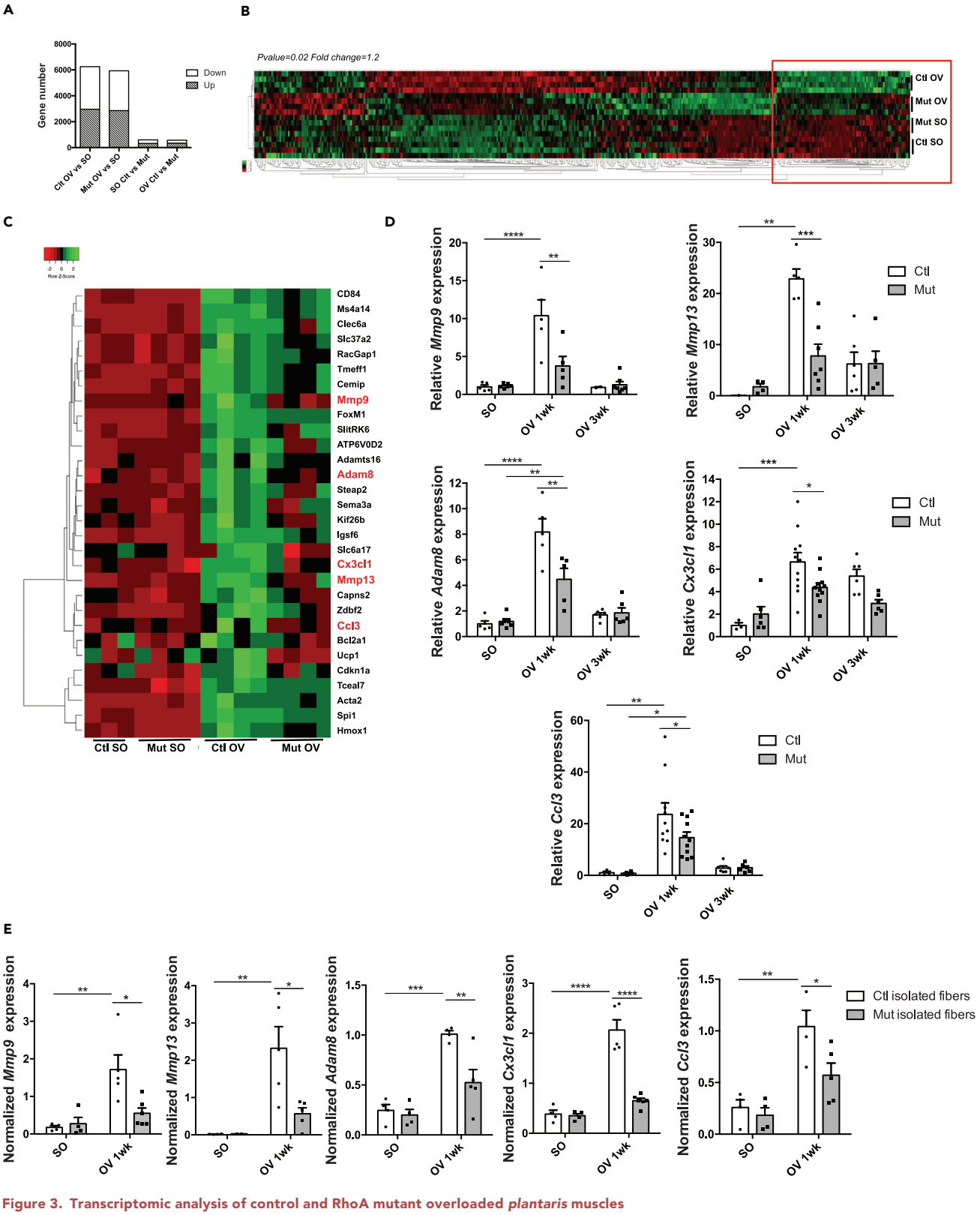


Figure 3. Transcriptomic analysis of control and RhoA mutant overloaded *plantaris* muscles

(A) Affymetrix analysis has been performed from RNA extracted from Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1 wk OV. Number of genes differentially expressed (fold change>1.2; p value<0.05) depending on the condition SO/OV and on the RhoA expression Ctl/Mut.

Figure 3. *Continued*

(B) Heatmap representing up- and down-regulated genes between Ctl and Mut *plantaris* before and after 1wk OV. Genes whose expressions increased upon OV in Ctl are highlighted with a red box.

(C) Close-up on the top 30 differentially expressed genes between Ctl OV and Mut OV.

(D) Analysis of *Mmp9*, *Mmp13*, *Adam8*, *Ccl3* and *Cx3Cl1* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1 and 3wk OV (n = 3–10). Data were normalized by *Hmbs* expression.

(E) Analysis of *Mmp9*, *Mmp13*, *Adam8*, *Ccl3*, and *Cx3Cl1* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut isolated myofibers from *plantaris* muscles before (SO) and after 1 week OV (n = 4–6). Data were normalized by *Hmbs* expression. Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value<0.01, ***p value<0.001, ****p value<0.0001. See also Table S4.

Ctl and Mut *plantaris*, with a sharp increase 1wk after OV that came back to SO levels after 3wk (Figure S3). Thus, the loss of RhoA within myofibers did not affect the engagement of SCs in myogenic differentiation. Then, the fusion potential of SCs to the growing myofibers was assessed by counting the number of myonuclei within the dystrophin-labeled myofiber sarcolemma (Figure 2D). The number of myonuclei per myofiber was similar before OV between Ctl and Mut and significantly increased 1 and 3 wk after OV in Ctl and to a lesser extend in Mut muscles 3 wk after OV (Figure 2E). Importantly, in Mut *plantaris*, the number of myonuclei was significantly decreased as compared to Ctl 1 and 3 wk after OV (Figure 2E).

To further assert the impaired fusion capacities of SCs to the Mut myofibers *in vivo*, we chronically injected mice subjected to compensatory hypertrophy with EdU and we tracked EdU^{+} nuclei incorporated into growing myofibers (Figures 2F and 2G). This experiment was designed to track the newly fused myonuclei that are derived from cycling SC (as myofibers are postmitotic). Only the nuclei inside the dystrophin-stained sarcolemma were considered and counted (Figure 2G). Three weeks after OV, the percentage of myofibers harboring EdU+ myonuclei was significantly reduced in Mut compared to Ctl (Figure 2H). These data suggest that within myofibers RhoA is needed for an efficient mobilization of SCs during hypertrophy by controlling their number and their recruitment to the growing myofibers. The altered behavior of SCs in absence of RhoA could account, at least in part, for the impaired growth observed in mutant.

RhoA control of SC behaviors is environment dependent

To investigate whether the altered behaviors of SCs, especially cell fusion, in *RhoA*-deleted muscles subjected to OV are cell autonomous and unrelated to the local environment and/or mechanical stimuli, we set up an *in vitro* assay. This assay was designed to assess whether the absence of RhoA within myotubes (Adeno-Cre-mCherry transduced $RhoA^{flox/flox}$ myotubes) affects their fusion with RhoA-expressing mononucleated myocytes (expressing GFP) (Figures S4A and S4C). We observed that the lack of *RhoA* expression in myotubes (Figure S4B) did not alter the ability of myocytes to fuse to myotubes *in vitro* (dual-labeling) (Figure S4D). These data suggest that the defect on SC recruitment to *RhoA* mutant myofibers observed *in vivo* relies on muscle environment linked to the *in vivo* OV context, conditions that cannot be reproduced *in vitro*. This highlights the importance of RhoA *in vivo* context under mechanical cues and of *in vivo* microenvironment in the control of muscle compensatory growth. To further analyze how RhoA in the myofibers may control hypertrophic growth, we focused on *in vivo* studies.

Mmps and chemokines expression is affected in absence of RhoA within myofibers

In order to decipher the molecular mechanisms underlying the growth defects of *RhoA*-deleted myofibers, we performed a genome-wide microarray analysis of gene expression from Ctl and Mut *plantaris* muscles, before and 1wk after OV procedure. Gene expression profiling evidenced that a massive change occurred in muscles upon increased load, with more than 6000 genes up- and down-regulated in Ctl and in Mut muscles (SO vs OV 1wk; fold change>1.2; pvalue<0.05). Upon OV, 569 genes were differentially expressed between Ctl and Mut *plantaris* (Figure 3A). Among the 233 down-regulated genes in OV Mut muscles as compared to Ctl, we focused our attention on genes up-regulated in Ctl after hypertrophy (and to a lesser extend in mutants) (Figure 3B, highlighted by a red box). The 30 most differentially expressed genes of this category (Mut OV vs Ctl OV) are shown in Figure 3C. Among them, we identified genes encoding proteins involved in ECM remodeling, such as *Mmp9* gelatinase, *Mmp13* collagenase, and *Adam8* metalloproteinase, and important chemokines such as *Cx3cl1* and *Ccl3* (Figure 3C). We confirmed by RT-qPCR that these genes were strongly and transiently expressed upon OV in Ctl while their expression was significantly reduced in Mut (Figure 3D).

To determine whether the altered expression of these genes could be linked to the absence of RhoA in myofibers or to other cell types expressing RhoA present in the muscle, we isolated single myofibers

from Ctl and Mut *plantaris* before and following OV. In line with the data on bulk RNA, we showed that expression levels of *Mmp9, Mmp13, Adam8, Cx3Cl1*, and *Ccl3* genes were strongly increased in Ctl single myofibers following OV and were significantly diminished in Mut (Figure 3E).

Moreover, we performed a transcriptomic analysis of gene differentially expressed between $RhoA^{flox/flox}$ myotubes expressing (Ad-mCherry transduced) or not RhoA (Ad-Cre-mCherry transduced). There was very little overlap between the genes differentially expressed in myotubes in culture expressing or not RhoA and the genes differentially expressed in Ctl and Mut OV *plantaris* muscles (Mut OV 1wk vs Ctl OV 1wk) (41 genes) or Ctl and Mut SO muscles (43 genes). The expression of only 25 and 34 genes varied in the same direction (up or down) in the common genes with OV and SO conditions respectively (Figure S4E, Tables S2 and S3). *Mmp9, Mmp13, Adam8*, and *Cx3Cl1* genes were not among them, indicating that their expression was not affected by *RhoA* deletion in basal culture conditions (Figure S4B, Tables S2 and S3). Together, these findings further bring out that the deletion of RhoA in myotubes *in vitro* cannot recapitulate the *in vivo* setting both at basal state and following hypertrophy. One parameter that is lacking *in vitro*, as compared to *in vivo*, is the mechanical load applied to the cultured myotubes that could be associated with low RhoA activity. Indeed it has been shown that stretch can activate RhoA in myotubes (Zhang et al., 2007). To activate RhoA in standard culture conditions, we treated myotubes with a RhoA activator (Rho Activator II) and we monitored gene expression after 8 hr. Importantly, the expression levels of *Mmp13, Adam8,* and *Cx3Cl1* were significantly increased following RhoA activation (Figure 4C). These observations are in line with the data obtained in isolated single myofibers (Figure 3E). They suggested that at least a part of the impaired expression of these genes *in vivo* can be attributed to the specific absence of RhoA in myofibers and is thus cell autonomous. We hypothesized that the decreased expression of those genes in myofibers upon OV might participate in the incorrect hypertrophic response of mutant muscles.

Pathways impaired by RhoA depletion in overloaded myofibers

To obtain further insights on the pathways that might be impaired by *RhoA* deletion, we focused our attention on the upstream regulators predicted activated or inhibited following OV in Ctl, but not in Mut muscles using IPA analysis (*Z* score>2 or <2, and pvalue<0.05). Several upstream regulators were involved in the remodeling of ECM such as Mmp9 and Tnc-C (Table S4). Mmp9 stood as an interesting molecule because: (1) it is one of the genes whose expression was the most decreased in Mut OV as compared to Ctl OV (Figure 3C), (2) it is among the Upstream Regulator predicted activated only in the Ctl, and (3) it is connected to the predicted activation/inhibition of other several Upstream Regulators such as Mmps substrates Tnc-C, Fgf, Tnf, Cxcl1 and SerpinA4 (Table S4). Mmps are proteolytic enzymes that hydrolyze components of the ECM participating to its remodeling and release many bioactive cytokines and growth factors entrapped in ECM (Page-McCaw et al., 2007). For instance, the release and activation of Tnfα and the matrix-associated growth factor Fgf by Mmp9 have been reported and consistently their activities were predicted to be activated in our IPA analysis (Table S4) (Allen et al., 2003). In the case of SerpinA4, its cleavage by Mmp9 inactivates Serpin and accordingly its activity was predicted to be decreased (*Z* score = −2.17) (Table S4) (Liu et al., 2000).

In addition, several upstream regulators, predicted activated only in Ctl but not in Mut after OV, were associated with inflammation such as IL3, IL17RA and Gm-csf (implicated in the functional activation and survival of macrophages) and chemokines Ccl2, Cxcl1, chemokine receptors CcR1 (Ccl3 receptor) and CcR2 (Ccl2 receptor) participating to macrophage recruitment (Table S4).

Finally, several signaling pathways including Erk1 (Mapk3), Jnk (Mapk8), Stat3, Nfkb (RelA and Sn50 peptide) were predicted activated in Ctl OV *plantaris* and not in Mut OV (Table S4). We thus checked by Western blot their activity (Erk1/2, Stat3, JNK) in OV Ctl and OV Mut muscles. A difference between Ctl and Mut was only observed for Erk1/2 activity. Indeed, the increase of P-Erk1/2 following OV is significantly less in Mut as compared to Ctl muscles (Figure 4A). In order to investigate whether RhoA can activate directly Erk1/2 within myofibers, we treated Ctl myotubes *in vitro* with a Rho activator. Interestingly, a short activation of Rho GTPases (3hr) was sufficient to induce an increase of P-Erk1/2 in a dose-dependent manner (Figure 4B) suggesting that the decrease of P-Erk1/2 observed in the OV Mut muscles could be partially attributed to the lack of RhoA in myofibers. Interestingly, the inhibition of Erk signaling using Binimetinib blunted the increase of *Cxcl3* and *Mmp13* expression induced by RhoA activation in Ctl myotubes (Figure 4C). In contrast to what was observed *in vivo*, no change in *Mmp9*mRNA expression was observed *in vitro* following RhoA activation (Figure 4C) suggesting that *Mmp9* expression may be dependent on *in vivo* microenvironment and that *in vitro* RhoA activation "alone" may not be sufficient.

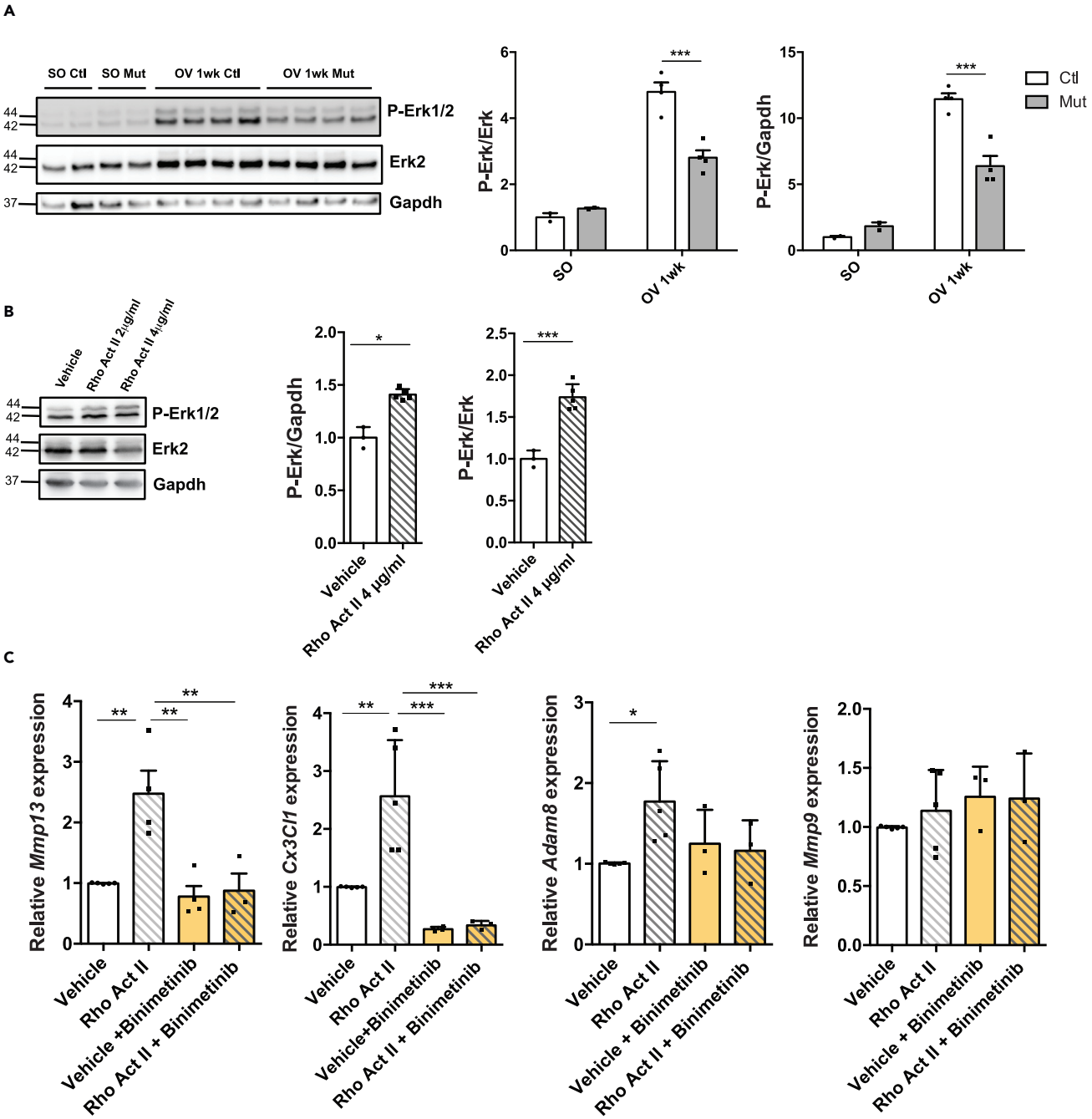


Figure 4. RhoA loss within myofibers impairs Erk1/2 activation upon overload-induced hypertrophy

(A) Phosphorylated Erk1/2 and total Erk2 were analyzed by Western blot in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1wk OV (n = 4). Gapdh was used as a loading control. Ratio of the quantification of P-Erk1/2 to Erk1/2 relative to Ctl SO and ratio of the quantification of P-Erk1/2 to Gapdh are shown in the right panels.

(B) Phosphorylated Erk1/2 and total Erk2 were analyzed by Western blot in Ctl myotubes treated with Rho Activator II or vehicle for 3 hr (n = 3–5). Gapdh was used as a loading control. Ratio of the quantification of P-Erk1/2 to Erk1/2 and ratio of the quantification of P-Erk1/2 to Gapdh are shown in the right panels.

(C) Analysis of *Mmp9*, *Mmp13*, *Adam8*, and *Cx3Cl1* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl myotubes treated with Rho Activator II (4 µg/mL) and/or Erk inhibitor (Binimetenib) for 8hr (n = 3–4). Data were normalized by *Hmbs* expression. Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value <0.01, *** p value<0.001.

Altogether, these data suggest that upon hypertrophy, RhoA in the myofibers might affect pathways involving Erk1/2 signaling, ECM remodeling and macrophage recruitment/activity.

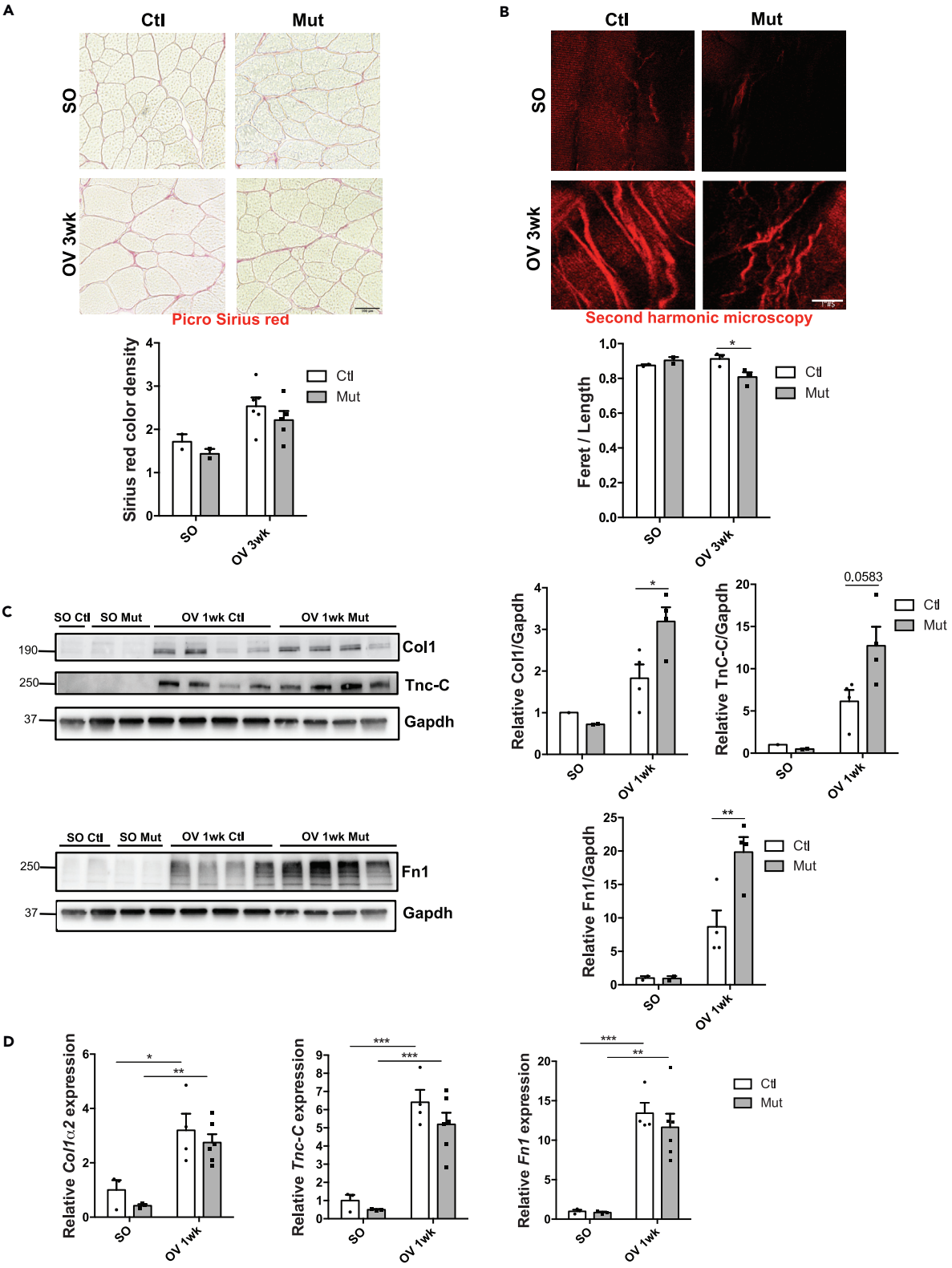


Figure 5. RhoA loss within myofibers impairs ECM organization upon overload-induced hypertrophy

(A) Picrosirius red staining of *plantaris* muscle sections from Ctl and Mut mice before (SO) and after 3wk OV. Quantification of color density was performed using CaseViewer and shown in the lower panel (n = 2–5). Scale bar 100 μm.

Figure 5. *Continued*

(B) Visualization of fibrillar collagen using second harmonic generation imaging on thick *plantaris* muscle sections from Ctl and Mut before (SO) and after 3 wk OV. Tortuosity quantification (ratio Feret to length of one collagen fiber) from Ctl and Mut before (SO) and after 3 wk OV (n = 3) is shown in the bottom panel. Scale bar 5 μm.

(C) Collagen1, Tenascin-C and Fibronectin were analyzed by Western blot in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1 wk OV. Gapdh was used as a loading control (n = 3–4). Ratio of the quantification of Col1, TnC and Fn1 to Gapdh and relative to Ctl SO is shown in the right panel.

(D) Analysis of *Col1α2*, *Tnc*, and *Fn1* mRNA expression by RT-qPCR in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1 and 3 wk OV (n = 3–4). Data were normalized by *Hmbs* expression. Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value<0.01, ***p value<0.001, ****p value<0.0001.

RhoA in myofiber impairs ECM organization and Mmps activity

Based on the transcriptomic and IPA analyses, we hypothesized that ECM remodeling and Mmp activity might be affected by RhoA loss in the growing myofibers. We demonstrated that the global collagen content (quantified by Picrosirius red staining) increased in a similar extent upon OV in both Ctl and Mut muscles (Figure 5A). To further analyze ECM organization, we investigated ECM biophysical aspect by performing second harmonic generation (SHG) imaging that allows the visualization of fibrillar collagen (Figure 5B). We observed that fibrillar collagen appears more tortuous in Mut compared to Ctl 3wk after OV, as shown by the decrease of the ratio of fibrillar collagen Feret's diameter to length (Figure 5B lower panel). Moreover, it accumulated between the myofibers rather than surrounding them. These data suggest that in hypertrophic conditions RhoA impacts ECM organization in terms of tortuosity and assembly.

Because Mmps are key proteolytic enzymes that hydrolyze components of the ECM, we next quantified the protein amount of ECM substrates of Mmp9 and Mmp13 such as Collagen1 (Col1, Tnc-C and Fn1 by Western blot (Figure 5C)). We observed that Col1, Tnc-C and Fn1 protein amounts augmented with OV in both Ctl and Mut muscles and that there was a further significant accumulation of these proteins in Mut OV muscles. Interestingly, the sharp increase upon OV in both genotypes was also seen at mRNA level indicating that this may mainly be due to increased transcription of these genes (Figure 5D). Importantly, there was no difference in transcript level between OV Ctl and OV Mut *plantaris* suggesting that the increase in Col1, Tnc-C and Fn1 proteins amounts observed in the Mut might be due to their decreased cleavage by Mmp9 and Mmp13 (Figure 5D).

Thus, we could speculate that in the absence of RhoA, Mmp expression diminution might affect the correct ECM protein hydrolysis and that a wrong ECM rearrangement could impair muscle growth.

Mmps are functionally involved in compensatory hypertrophy

To get insights on the functional implication of Mmps in the hypertrophic process, we treated Ctl and Mut mice using the broad spectrum Mmp inhibitor GM6001 (targeting Mmp1, 2, 9, 8, 3) and we assessed its effect on compensatory hypertrophy (Figure 6A). One week after OV, Fn1 protein amount, a common substrate of several Mmps, significantly increased only in GM6001-treated muscles, showing the *in vivo* efficacy of the drug (Figure 6B). In addition, to further verify *in vivo* the efficacy of the drug, we measured Mmps gelatinase activity upon OV in muscle sections before and after GM6001 injection using *in situ* zymography (Figure S5) (Yeghiazaryan et al., 2012). As expected, there was an increase of interstitial and nuclear Mmp activity staining in OV muscles as compared to SO. In addition, after GM6001 treatment the intensity of interstitial staining in overloaded muscles decreased (Figure S5) showing the efficacy of the drug. Importantly, *plantaris* muscles of GM6001-treated Ctl mice were less hypertrophied 3wk after OV than muscles of vehicle-injected mice as assessed by their decreased weight, while GM6001 treatment had no effect on RhoA mutant overloaded muscle weights as compared to vehicle-treated muscles (Figure 6C). The lack of effect of GM6001 on Mut muscle hypertrophy supports the fact that Mmps operate downstream RhoA.

In the case of Ctl *plantaris*, their altered hypertrophic growth following GM6001 treatment was accompanied by a reduction of CSA and of the number of myonuclei per myofiber (Figures 6D and 6E). To clarify whether the reduced fusion was due to SC reduced number, we quantified the number of Pax7+ cells in GM6001-treated Ctl mice and observed no difference with vehicle-treated mice (Figure 6F), suggesting that the inhibition of Mmps from the fourth day of OV affected mainly SC fusion and not their number.

Altogether these results show the important role of Mmps to achieve optimal hypertrophy in response to increased load. As Mmp inhibition in Ctl phenocopied the altered growth and SC fusion observed in RhoA

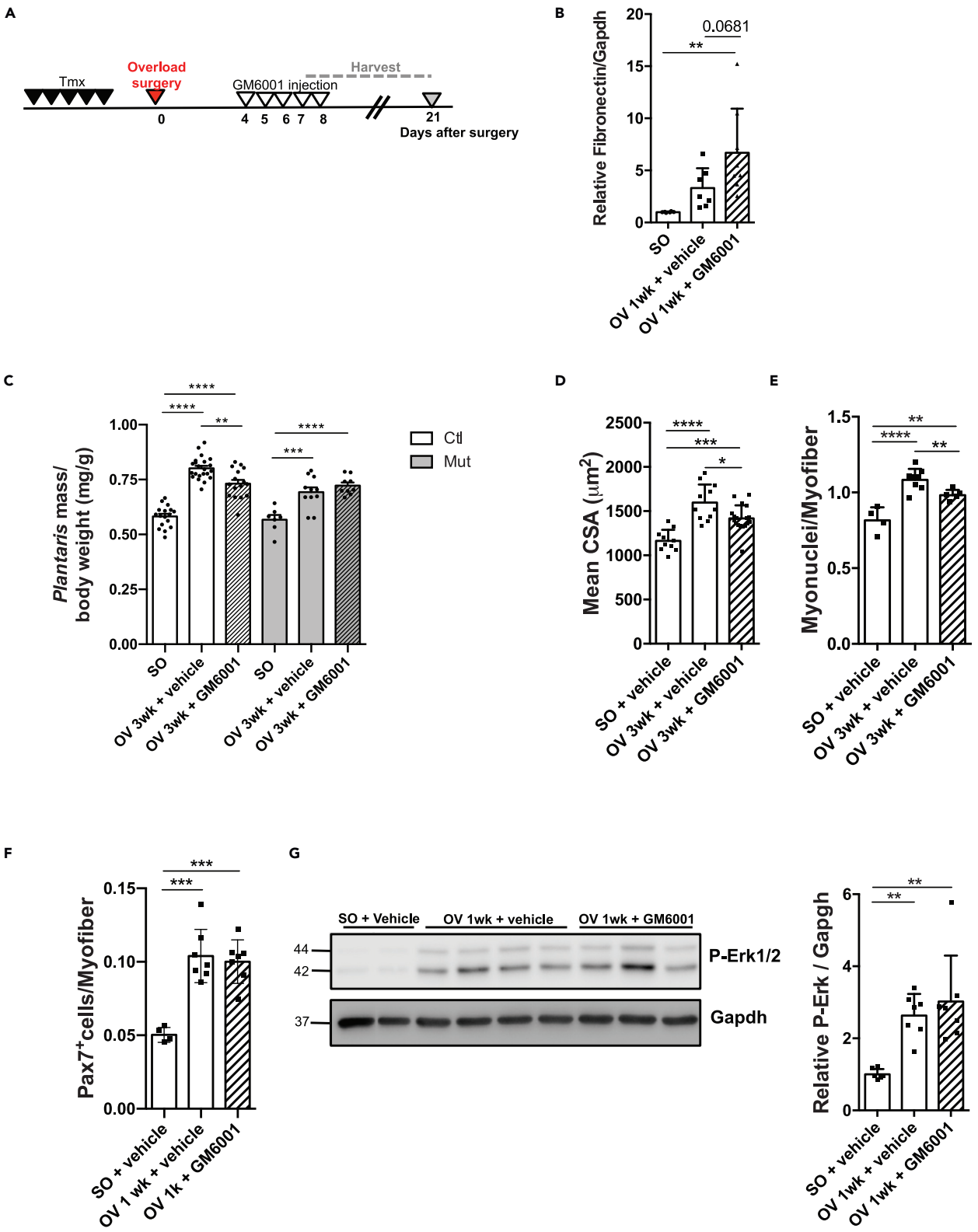


Figure 6. Mmps activity are important for overload-induced hypertrophy

(A) Ctl and Mut mice were submitted to OV and injected with Mmp inhibitor (GM6001) or vehicle from day 4–8 after surgery. *Plantaris* muscles were isolated after 1 and 3 wk OV.

Figure 6. *Continued*

(B) Fibronectin was analyzed by Western blot in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1wk OV. Gapdh was used as a loading control. Ratio of the quantification of Fn1 to Gapdh relative to Ctl SO is shown (n = 6–8).

(C) Ratio of *plantaris* mass (mg) to body weight (g) before (SO) and after 3 wk OV in Ctl and Mut treated or not with GM6001 (n = 7–14).

(D) Mean CSA (μm^2) before (SO) and after 3 wk OV in Ctl treated or not with GM6001 (n = 4–14).

(E) Number of myonuclei within sarcolemma per myofiber in *plantaris* sections before (SO) and after 3 wk OV from Ctl treated or not with GM6001 (n = 4–8).

(F) Number of $Pax7^+$ cells per myofiber in *plantaris* sections before (SO) and after 1 week OV from Ctl treated with GM6001 or vehicle (n = 4–7).

(G) Phosphorylated Erk1/2 was analyzed by Western blot in Ctl treated or not with GM6001 before and 1 wk OV. Gapdh was used as a loading control. Ratio of the quantification of P-Erk1/2 to Gapdh is shown in the right panel (n = 3–8). Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value<0.01, ****p value<0.0001.

mutant muscles, as Mmp inhibition did not further affect Mut impaired hypertrophic growth and as *Mmp9/13* expression was decreased in RhoA mutants upon OV, our findings suggest that the blunted hypertrophy of *RhoA* deleted muscles may be partially due to a decreased Mmp activity.

Mmp processing can release ECM-tethered growth factors and bioactive cytokines that can indirectly activate different signaling pathways. Therefore, we wondered whether the attenuated activation of Erk1/2 observed in RhoA mutant OV muscles (Figure 4A) could be partially attributed to the diminished Mmp expression/activity. Importantly, GM6001-and vehicle-treated muscles displayed similar levels of P-Erk1/2 upon OV suggesting that the alteration of Erk signaling is not downstream of the Mmps (Figure 6G).

RhoA in overloaded myofibers impacts macrophage recruitment implicated in muscle growth

In absence of RhoA, we showed a decreased expression of *Ccl3* and *Cx3cl1* by the growing myofibers (Figures 3D and 3E). These two chemokines/chemo-attractants are implicated in inflammation by recruiting and activating macrophages (Zhao et al., 2016; Maurer and von Stebut, 2004). In addition, IPA analysis highlighted several Upstream Regulators activated in OV Ctl linked to the inflammatory response (Table S4). Therefore, we investigated the number of macrophages ($F4/80^+$) present in muscle sections following compensatory hypertrophy. One week after OV, there was a 10-fold increase in macrophage number in Ctl muscles that came back almost to SO levels 3wk after OV, showing a transient and strong inflammatory response in the muscle following increased workload (Figure 7A). Strikingly, $F4/80^+$ macrophage number was significantly reduced in Mut compared to Ctl 1wk after OV (Figure 7A). This prompted us to hypothesize that RhoA in the myofibers may influence macrophage recruitment (by controlling indirectly *Ccl3* and *Cx3cl1* expression levels) in the muscle tissue following mechanical load increase.

It has been shown that macrophages are very important to ensure the proper regeneration of muscle by controlling SC behaviors such as proliferation and fusion (Chazaud, 2020). To investigate whether macrophages play a functional role during hypertrophy, we depleted the macrophages by intraperitoneally injecting Clodronate liposomes that induce macrophage death in Ctl and RhoA Mut mice (Figure 7B). First, we checked macrophage depletion efficacy in Ctl mice by counting the number of $F4/80^+$ macrophages on *plantaris* sections. We observed a 30% and a 50% decrease 1wk and 3wk after OV, respectively (Figure 7C). This partial depletion was sufficient to blunt hypertrophic growth of Ctl *plantaris* muscles 3wk after OV as evidenced by the reduced *plantaris* weight while having no effect on mutants, suggesting that macrophage recruitment upon OV depends on RhoA activity (Figure 7D). We focus our further analyses on Clodronate-treated Ctl mice and we observed that macrophage depletion led to diminished number and fusion of SCs (Figures 7E, 7F, and 7G), suggesting that, in hypertrophic conditions, macrophages modulate SC behavior. These results are reminiscent of those observed in RhoA Mut overloaded muscles, in which SC behaviors are altered (Figure 2). Altogether these data are in agreement with a putative role of RhoA within the myofiber in the control of muscle growth, by favoring the recruitment of macrophages in overloaded muscles.

DISCUSSION

Taking advantage of a genetic model that allows the deletion of *RhoA* in myofibers and not in SCs, we demonstrated that RhoA is needed for skeletal muscle hypertrophy and for the recruitment of SCs to the growing fibers. We provided evidence for the implication of RhoA within myofibers in the building of a permissive microenvironment for muscle growth and for SC accretion through ECM remodeling and macrophage recruitment. At the molecular level, we propose that in response to increased workload, RhoA controls in a cell autonomous manner Erk1/2 activation and the expression of ECM regulators such as *Mmp9/Mmp13/Adam8* and of macrophage chemo-attractants such as *Ccl3/Cx3cl1* (Figure S6).

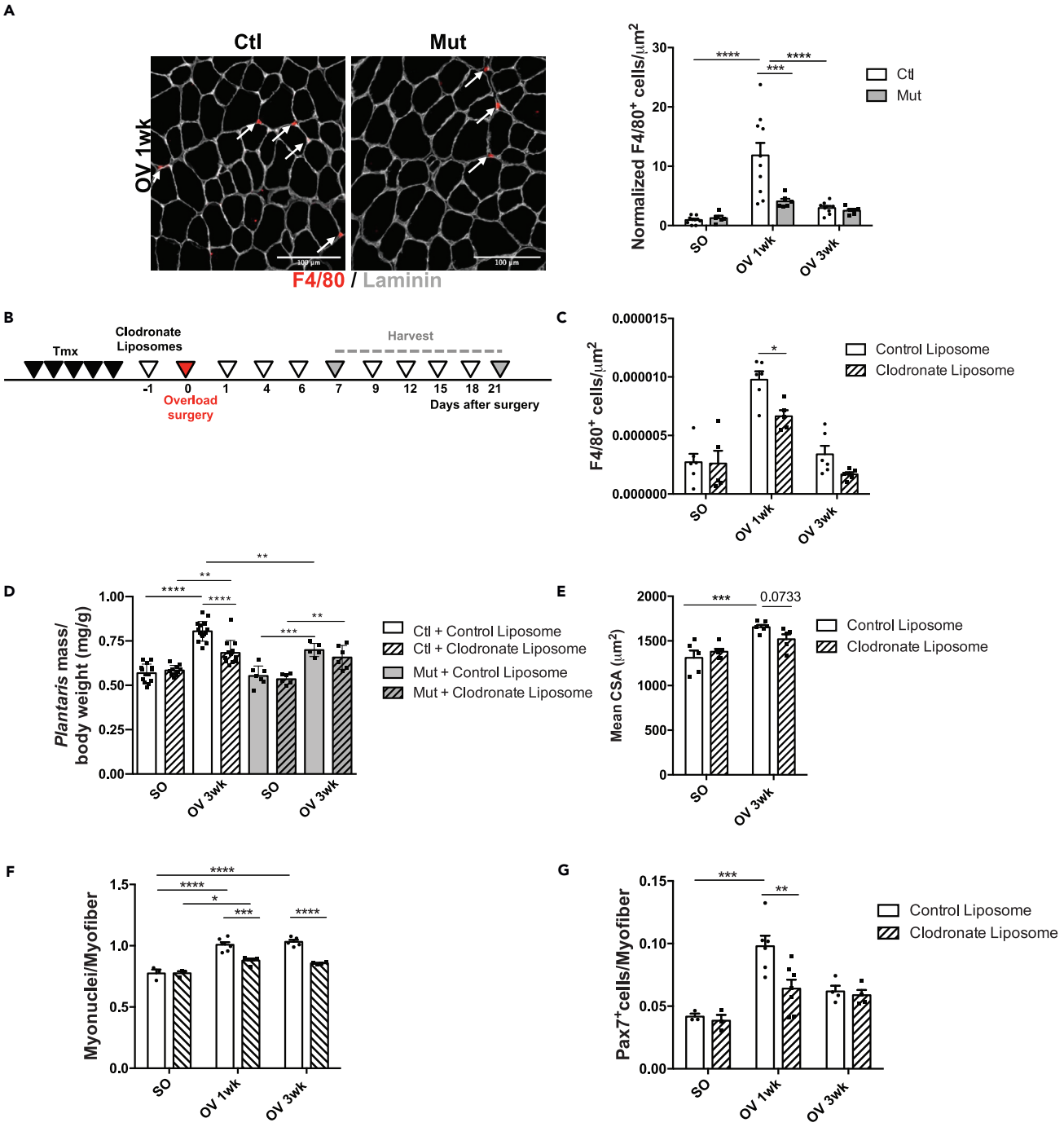


Figure 7. RhoA loss within myofiber impairs macrophage recruitment

(A) *Plantaris* sections were immunostained for F4/80 (red), Laminin (gray) and nuclear staining with DAPI for Ctl and Mut after 1 wk OV. White arrows indicated F4/80$^+$/DAPI macrophages. Number of macrophages (F4/80$^+$) per µm^2 before (SO) and after 1 and 3wk OV relative to Ctl SO are quantified in the right panel (n = 5–6). Scale bar 100 µm.

(B) Ctl and Mut mice were injected with Clodronate-loaded liposomes or control liposomes one day before OV and at day 1, 4, 6, 9, 12, 15, 18 after OV. *Plantaris* muscles were harvested after 1 and 3 wk OV.

(C) Number of macrophages (F4/80$^+$) per µm^2 before (SO) and after 1 and 3 wk OV in *plantaris* sections from Ctl treated with Clodronate loaded liposomes or control liposomes (n = 5–6).

(D) Ratio of *plantaris* mass (mg) to body weight (g) before (SO) and after 3 wk OV in Ctl and Mut mice treated with Clodronate loaded liposomes or control liposomes (n = 6–10).

Figure 7. *Continued*

(E) Mean CSA (μm^2) before (SO) and after 3 wk OV in Ctl treated Clodronate loaded liposomes or control liposomes (n = 5–6).

(F) Number of $Pax7^+$ cells per myofiber in *plantaris* sections before (SO) and after 1 and 3 wk OV from Ctl treated with Clodronate loaded liposomes or control liposomes (n = 3–7).

(G) Number of myonuclei within sarcolemma per myofiber in *plantaris* sections before (SO) and after 1 and 3 wk OV from Ctl treated with Clodronate loaded liposomes or control liposomes (n = 4–8). Data are mean ± SEM. *p value<0.05, **p value<0.01, **p value<0.01, ***p value<0.001, ****p value<0.0001. See also Figure S5.

Hypertrophic growth of skeletal muscle of young mice relies on both the increase of net protein content and the addition of new nuclei in the growing myofibers provided by SCs as both blunting of protein synthesis signaling by rapamycin treatment (Bodine et al., 2001) and of SC fusion (Goh and Millay, 2017; Guerci et al., 2012; Randrianarison-Huetz et al., 2018), impair myofiber growth upon increased load. We showed that in the absence of RhoA, the hypertrophy defect is not accompanied by a major deregulation of protein synthesis/degradation balance nor by a compromised Akt signaling, but mostly by a deficiency of SC behavior and mainly fusion. We propose that upon OV-induced hypertrophy, the altered recruitment of SC to *RhoA* mutant myofibers may be responsible for their impaired growth rather than their slight decrease of SC number (21%). Interestingly, we have previously shown, in a model of a conditional deletion of Srf in myofibers, that the reduced number of SCs observed (35% reduction) was not the limiting step responsible for the lack of hypertrophy of Srf mutant muscles (Guerci et al., 2012). Indeed, the restoration of SC proliferation did not improve SC fusion and was unable to drive muscle hypertrophy. In contrast, the restoration of SC fusion was sufficient to rescue OV-induced growth of Srf mutant muscles without any increase in SC proliferation. These data support the idea that SC fusion is one of the limiting cellular events to achieve a correct muscle hypertrophy.

The contribution of SCs in skeletal muscle hypertrophic growth has been highly debated and one factor that could explain the discrepancies toward the necessity of new myonuclei accretion is the age of the mice, as young mice (less than 4 months old) and not mature mice (more that 4 months old) require SC fusion to support myofiber hypertrophy (Murach et al., 2017, 2021a). Because age dependence was not the main focus of this study, we pointed our attention on 2- to 3-month-old mice. Moreover, the necessity of competent fusing SCs to have the correct muscle hypertrophy in young mice has been clearly demonstrated using genetic mouse models in which SCs are unable to fuse (Prasad and Millay, 2021). For instance, SC deletion of *Myomaker*, a muscle-specific membrane protein necessary for fusion of muscle progenitors, compromised muscle hypertrophic response (Goh and Millay, 2017). In addition, loss of Srf in SCs, a master regulator of F-actin scaffold, impaired OV-induced muscle growth by the absence of SC fusion and restoration of Srf mutant SC fusion capacities was sufficient to rescue muscle hypertrophic growth (Randrianarison-Huetz et al., 2018).

As previously mentioned, in RhoA mutant muscles, global protein neosynthesis (in whole muscle) and Akt/S6K activities were not significantly affected. Accordingly, when *Srf* was deleted in myofibers, Akt signaling (controlling protein translation) increased in a similar manner in control and mutant upon OV, suggesting that the physiological level of Akt activation upon OV was not as such sufficient to support growth independently of SC accretion (Guerci et al., 2012). Interestingly, when Akt was constitutively activated in mutant myofibers through MyrAkt electroporation, myofiber growth was achieved in absence of increased load and of SC accretion (Guerci et al., 2012). Thus, constant supra-physiological level of Akt activity is sufficient to induce growth in Srf mutants and in absence of SC fusion. According to these findings, we favor the following scenario: Upon increased load, the physiological activation levels of Akt and protein synthesis participate in growth, but in the absence of myonuclei accretion they are not sufficient to support growth unless supra-physiologic activation levels of translational activity are reached.

RhoA is an important small GTPase protein regulating contractility, actin cytoskeleton rearrangement, and actin polymerization through its downstream effector Rho-associated coiled-coil protein kinase and mammalian diaphanous protein among many others. Moreover, RhoA activation responds to mechanical stimuli and mechanical force transmitted and mediated by cell-matrix and cell-cell-interaction (Lessey et al., 2012). In cultured C2C12 myotubes, it has been shown that cyclic mechanical stretch increased RhoA activity (Zhang et al., 2007) suggesting that RhoA participates in the mechanical stretch response in myotubes. To identify the molecular mechanisms underlying the lack of hypertrophic growth of *RhoA* mutant myofibers, we compared the data of microarray experiments performed *in vivo* on SO or OV *plantaris* Ctl and Mut muscles and the data of microarrays performed on differentiated myotubes expressing or not RhoA. The intersection sets were very small, suggesting that the pathways regulated by RhoA *in vivo*

(before or during OV) are very different from those operating in myotubes cultured in standard static conditions. The following genes *Mmp9, Mmp13, Adam8, Ccl3, Cx3Cl1,* which were differentially expressed between Clt and Mut overloaded whole *plantaris* muscles and isolated myofibers, were not expressed differentially in myotubes expressing or not RhoA. Additionally, we were not able to reproduce the fusion defects of Ctl myocytes with RhoA mutant myotubes *in vitro*. These discrepancies between *in vivo* and *in vitro* settings highlight the need of mechanical inputs to trigger RhoA-dependent muscle hypertrophy. In addition, in response to increased load, RhoA in the myofibers may affect other cell types present in the muscle, but absent *in vitro*, that may participate in muscle growth. Altogether, this emphasizes the importance of *in vivo* models to analyze RhoA contribution to muscle hypertrophy.

While searching for additional players responsible for the impaired growth of RhoA mutant muscles, we have to consider fibrogenic cells, FAPs and/or macrophages implication. Upon hypertrophy, $TCF4^+$ interstitial fibrogenic cells have been shown to functionally interact with SC (Fry et al., 2017). In this study, SC depleted muscles were compared with control muscles and it was shown that SCs secrete exosomes containing miR-206 that regulates a regulator of collagen biosynthesis, Rrbp. In SC-depleted overloaded muscles there was an increase of *Rrbp1, Col1α2, Col3α1*, and *Col12α1* expressions as compared to controls that was not observed in RhoA mutant overloaded *plantaris* muscles. Recently, the same group showed that muscle hypertrophy may be supported by a permissive environment through communication between FAPs (*Pdgfrα* expressing cells) and SCs, independently of SC fusion (Murach et al., 2021b). However, in overloaded *RhoA* deleted muscles, *Pdgfrα* gene expression was not significantly different from Ctl muscles 1wk after OV. Altogether, these observations argue against the implication of fibrogenic/FAPs cells in the impaired growth phenotype of RhoA mutant.

It has been shown that Rho GTPases, and in particular RhoA, are potent activators of Srf transcriptional activity (Sotiropoulos et al., 1999; Hill et al., 1995). In addition, we have previously shown that Srf within the myofibers is required for muscle OV-induced hypertrophy by exerting a paracrine control on SC recruitment to the growing fibers through Ptgs2/IL4 (Guerci et al., 2012). We could wonder whether a decrease of Srf activity could be responsible for the impaired hypertrophic growth of *RhoA* deleted muscles. Several data argue against this possibility. First, our *in vivo* and *in vitro* transcriptomic data on muscles upon OV and on myotubes suggested that RhoA governs downstream signaling pathways independently from Srf, as almost none of the *bona fide* Srf target genes are down-regulated when RhoA is absent. For instance, *Ptgs2* (a Srf target gene), which expression increases during OV in Ctl muscles and is blunted in Srf mutants, displays a similar expression in Ctl and RhoA Mut *plantaris* 1wk after OV. In cultured myotubes, *RhoA* deletion did not affect the expression of Srf target genes such as *Egr1, Myl9, Cnn2, Ptgs2* and *Acta1* (Guerci et al., 2012; Randrianarison-Huetz et al., 2018). Second, the expression of several "RhoA responsive" genes such as *Mmp13, Adam8,* and *Cx3Cl1* that increased following chemical activation of RhoA *in vitro* on cultured myotubes and that decreased in overloaded RhoA Mut muscles, remained unaffected by constitutive Srf activation in myotubes (induced by Ad-SrfVP16 transduction) (Guerci et al., 2012). Thus, we propose that the impeded muscle growth of RhoA mutant is likely not due to a decreased Srf activity and that Srf-independent signaling pathways are operating downstream RhoA upon hypertrophy.

In the present study, we showed that genes involved in the ECM remodeling, like *Mmp9* and *Mmp13* are among the genes mostly down-regulated in overloaded muscles in the absence of RhoA. In addition, *in vivo* Mmp inhibition (from day 4 to day 8 after OV) by a broad-spectrum Mmp inhibitor impaired OV-induced hypertrophy and SC accretion without affecting SC number. However, Mmp inhibitor GM6001 was shown to alter SC number following muscle laceration-induced injury (Bellayr et al., 2013). This discrepancy could be attributed to the different muscle homeostasis perturbation (OV versus muscle laceration injury) and timing at which muscles were treated (5 consecutive days of treatment after OV from day 4 *versus* first- and fourth-day treatment following the laceration injury). Thus, we propose that *Mmp9* and *Mmp13* decreased expression may contribute to the altered muscle growth of RhoA mutants by modulating mainly SC fusion. Many studies were conducted to show the importance of Mmps on muscle growth. Fiber size is decreased in adult hindlimb muscles from *Mmp9* null mice (Mehan et al., 2011) and increased in muscles harboring a specific overexpression of *Mmp9* (Dahiya et al., 2011). In the context of hypertrophic growth, Peterson's laboratory recently proposed that Mmp9 levels in muscle fibers should be finely regulated (through miRNA secreted by SCs among others) to have a correct ECM integrity and to facilitate the long-term hypertrophic response; too much or not enough Mmp9 being deleterious (Murach et al., 2020). In line, continuous unregulated high Mmp9 activity disrupted SC niche through ECM damages

(Chenette et al., 2016). *Mmp13* null mice did not exhibit any histological or functional muscle deficits; however, muscle hypertrophy caused by increased IGF-1 was impaired (Smith et al., 2020). Mmp9 and 13 have also been shown to modulate myoblast migration *in vitro* (Lei et al., 2013; Lewis et al., 2000). It is reasonable to assume that the remodeling of ECM by Mmps enables more efficient movement of myoblasts toward myofibers and thus contributes to SC recruitment upon growth.

Among the genes mostly affected in RhoA Mut muscles upon OV, we focused our interest on two potent macrophage attractants: *Cx3cl1* and *Ccl3* whose expression is increased upon OV in Ctl and not in Mut. Data obtained in Ctl and Mut isolated myofibers and in myotubes treated with a Rho activator plus an Erk inhibitor further demonstrated that RhoA stimulated the expression of these chemokines in a myofiber cell-autonomous and in an Erk1/2-dependent manner. We do not know whether Cx3cl1 and Ccl3 influence SCs directly, but we can strongly relate their decreased expressions to a significant impairment of macrophages recruitment in RhoA mutants. Indeed, OV induced a transient accumulation of macrophages in Ctl *plantaris* muscles that was blunted in Mut. However, we cannot exclude that the impairment of macrophage recruitment in Mut might be due to the alteration of ECM (Figure 5) (Sapudom et al., 2020). In humans, it has been shown that resistance exercise increases the expression of chemotaxic factors including *Cx3cl1*, mobilizes monocytes (Della Gatta et al., 2014; Jajtner et al., 2018; Strömberg et al., 2016), and that macrophage number positively correlates with myofibers hypertrophy (Walton et al., 2019). Knowing the multifaceted roles of macrophages during muscle regeneration to support tissue recovery, in particular by promoting SC differentiation (Chazaud, 2020) and establishing a transient SC activating niche providing proliferation-inducing cues (Du et al., 2017; Ratnayake et al., 2021), we proposed that macrophages may as well participate in muscle hypertrophy by facilitating SC recruitment to myofibers. By depleting macrophages in Ctl mice, we showed that macrophages were required for muscle hypertrophy. Our results are in agreement with those of DiPasquale who showed that macrophages depletion also negatively affected muscle hypertrophic growth (DiPasquale et al., 2007). However, we provide additional data concerning the positive action of macrophages on SC number and fusion.

It is important to note that the absence of RhoA in the myofibers is sufficient to affect the behavior of RhoA expressing SCs, highlighting the importance of RhoA signaling in myofibers for the remodeling of SC microenvironment upon hypertrophy. How the SC niche is remodeled during hypertrophy process remains poorly examined. It was already proved that after increased load, myofibers secrete myokines like IL-4 and IL-6 that are able to influence SC proliferation and fusion (Guerci et al., 2012; Serrano et al., 2008; Horsley et al., 2003), and it has been recently shown that SC-derived extracellular vesicle may participate in the creation of an environment facilitating hypertrophic growth (Murach et al., 2021b). In addition, important transcriptional modifications of the expression of several genes encoding ECM components (such as *Collagens*, *Fn1*, and *Tnc-C*) have been reported shortly after OV, in this study (1wk) and Carson's study (3 days after OV in rat) (Carson et al., 2002). By affecting the expression of *Mmp9* and *Mmp13*, RhoA might promote an important global ECM rearrangement and a modification of SC niche upon OV that could influence SC behavior, such as fusion. We show protein accumulation of several Mmp9/13 ECM protein substrates such as Col1, Tnc-C, and Fn1. Moreover, analysis of collagen fibrils structure in OV Mut muscles displayed a significant increase in fibrillar collagen tortuosity as compared to Ctl. These data suggest that the correct rearrangement of ECM/collagen is crucial to build an SC microenvironment appropriated for muscle growth and SC fusion. Importantly, SCs are sensitive to their extracellular matrix environment and respond differently to different collagen architecture (Hu et al., 2021). Interestingly, both Tnc-C and Fn1 have been shown to remodel and adapt SC niche (Tierney et al., 2016) and to regulate a feedback signal to promote symmetric division and replenish the SC pool (Bentzinger et al., 2013), respectively. In both cases, the proteins are produced by SCs that auto-regulate their own niche. Because in our instance SCs are "wild type", we could speculate that this auto-regulation is not sufficient alone but should be associated with enzyme activity for ECM remodeling from the myofiber. Of note, as the macrophage number is decreased in RhoA Mut compared with Ctl muscles upon OV, on top of a myofibers intrinsic deficit, one part of the defective ECM reorganization occurring in Mut could be attributed to macrophages which also secrete Mmp9 in a context of muscle regeneration (Rahman et al., 2020). Moreover, we should consider the influence of ECM on other cells type beyond SCs and on other muscle tissue components (like microvessels), and its crucial role in maintaining and stabilizing muscle structure. Failure of ECM modifies myofibers mechanical properties making them more load-resistant and increasing their susceptibility to mechanical stress (Kritikaki et al., 2021) that may influence their.

In conclusion, we have described an important role for RhoA within myofibers in regulating muscle hypertrophic growth and SC accretion. We propose that it is achieved through a modification of SC

microenvironment by a fine ECM remodeling and by inflammatory cells recruitment. It will be important in future works to define more comprehensively the molecular pathways and the specific cellular contributions involved in the control of muscle mass, in particular in response to increased mechanical load. This may be essential to identify and design treatments able to alleviate loss of muscle mass during disuse or aging.

Limitations of the study

Although we have identified RhoA signaling as a key pathway in myofibers during overload-induced hypertrophy by building a permissive environment, future *in vivo* rescue studies will be required to demonstrate the causal role of ECM remodeling and macrophage recruitment in the altered SC fusion. Furthermore, the relative contribution of protein synthesis and of SC recruitment in the altered growth response of RhoA mutant myofibers will demand further investigations.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Material availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Mouse protocols
- METHOD DETAILS
  - Macrophage depletion
  - MMP activity
  - SUnSET
  - Multiphoton imaging and characterization of ECM topography and architecture
  - Primary muscle cell culture and recombinant virus transduction
  - Cell mixing fusion assays
  - Single fiber isolation
  - Muscle section immunostaining
  - Western blot analysis
  - Image acquisition
  - Morphometric analysis
  - RNA extraction and RT-qPCR
  - Affymetrix microarrays
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103616.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CyBio, Genom'IC and Animal care core facilities of Cochin Institute (Paris, France). We are grateful to Evelyne Bloch-Gallego for critical reading of the manuscript and So-ichiro Fukada for technical expertise. SHG images acquisition and analysis were performed at the IMAG'IC Facility, supported by the National Infrastructure France BioImaging (grant ANR-10-INBS-04) and IBISA consortium.

Financial support to this work was provided by the Association Française contre les Myopathies (n°22365 and 22776), IdEx Emergence Université de Paris (IP 2019-030) the Agence Nationale de la Recherche (Myolinc, ANR-R17062KK), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CN and KK designed and carried out experiments, analyzed results, and wrote the manuscript. LD, FB, FJ, and TG conducted and analyzed experiments. PM provided expertise and financial support. VR provided

expertise and wrote the manuscript. AS designed and carried out experiments, analyzed results, wrote the manuscript, and provided financial support.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Received: January 19, 2021
Revised: August 2, 2021
Accepted: December 9, 2021
Published: January 21, 2022

REFERENCES

Allen, D.L., Teitelbaum, D.H., and Kurachi, K. (2003). Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *284*, 805–815. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00215.2002.

Bellayr, I., Holden, K., Mu, X., Pan, H., and Li, Y. (2013). Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *6*, 124–141.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Von Maltzahn, J., Soleimani, V.D., Yin, H., and Rudnicki, M.A. (2013). Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. Cell Stem Cell *12*, 75–87. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.015.

Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat. Cell Biol. *3*, 1014–1019. https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014.

Burridge, K., Monaghan-Benson, E., and Graham, D.M. (2019). Mechanotransduction: from the cell surface to the nucleus via RhoA. Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. *374*, 1779. https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0229.

Carson, J.A., Nettleton, D., and Reecy, J.M. (2002). Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. FASEB J. *16*, 207–209. https://doi.org/10.1096/fj.01-0544fje.

Chazaud, B. (2020). Inflammation and skeletal muscle regeneration: leave it to the macrophages! Trends Immunol. 1–12. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.04.006.

Chenette, D.M., Cadwallader, A.B., Antwine, T.L., Larkin, L.C., Wang, J., Olwin, B.B., and Schneider, R.J. (2016). Targeted mRNA decay by RNA Binding protein AUF1 regulates adult muscle stem cell fate, promoting skeletal muscle integrity. Cell Rep. *16*, 1379–1390. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.095.

Dahiya, S., Bhatnagar, S., Hindi, S.M., Jiang, C., Paul, P.K., Kuang, S., and Kumar, A. (2011). Elevated levels of active matrix metalloproteinase-9 cause hypertrophy in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice. Hum. Mol. Genet. *20*, 4345–4359. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr362.

Della Gatta, P.A., Cameron-Smith, D., and Peake, J.M. (2014). Acute resistance exercise increases the expression of chemotactic factors within skeletal muscle. Eur. J. Appl. Physiol. *114*, 2157–2167. https://doi.org/10.1007/s00421-014-2936-4.

DiPasquale, D.M., Cheng, M., Billich, W., Huang, S.A., Van Rooijen, N., Hornberger, T.A., and Koh, T.J. (2007). Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *293*, 1278–1285. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00201.2007.

Dos Santos, M., Backer, S., Saintpierre, B., Relaix, F., Sotiropoulos, A., and Maire, P. (2020). Single-nucleus RNA-seq and FISH reveal coordinated transcriptional activity in mammalian myofibers. Nat. Commun. *11*. https://doi.org/10.1101/2020.04.16.043620.

Du, H., Shih, C.H., Wosczyna, M.N., Mueller, A.A., Cho, J., Aggarwal, A., et al. (2017). Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation. Nat. Commun. *8*. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00522-7.

Fry, C.S., Kirby, T.J., Kosmac, K., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2017). Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy. Cell Stem Cell *20*, 56–69. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.09.010.

Fukada, S., Akimoto, T., and Sotiropoulos, A. (2020). Role of damage and management in muscle hypertrophy: different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. *1867*, 118742. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118742.

Goh, Q., and Millay, D.P. (2017). Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. ELife *6*, 1–19. https://doi.org/10.7554/eLife.20007.

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., et al. (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab. *15*, 25–37. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.001.

Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Racl, and CDC42Hsregulate transcriptional activation by SRF. Cell *81*, 1159–1170. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80020-0.

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. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00319-2.

Hu, L.-Y., Mileti, C.J., Loomis, T., Brashear, S.E., Ahmad, S., Chellakudam, R.R., et al. (2021). Skeletal Muscle progenitors are sensitive to collagen architectural features of fibril size and crosslinking. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *321*, C330–C342. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00065.2021.

Jajtner, A.R., Townsend, J.R., Beyer, K.S., Varanoske, A.N., Church, D.D., Oliveira, L.P., et al. (2018). Resistance exercise selectively mobilizes monocyte subsets: role of polyphenols. Med. Sci. Sports Exerc. *50*. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001703.

Kritikaki, E., Asterling, R., Ward, L., Padget, K., Barreiro, E., and Simoes, D.C.M. (2021). Exercise training-induced extracellular matrix protein adaptation in locomotor muscles: a systematic review. Cells *10*, 1–28. https://doi.org/10.3390/cells10051022.

Lauriol, J., Keith, K., Jaffré, F., Couvillon, A., Saci, A., Goonasekera, S.A., et al. (2014). RhoA signaling in cardiomyocytes protects against stress-induced heart failure but facilitates cardiac fibrosis. Sci. Signal. *7*. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005262.

Lei, H., Leong, D., Smith, L.R., and Barton, E.R. (2013). Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *305*, 529–538. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00051.2013.

Lessey, E., Guilluy, C., and Burridge, K. (2012). From mechanical force to RhoA activation. Biochemistry *51*, 7420–7432. https://doi.org/10.1021/bi300758e.

Lewis, M.P., Tippett, H.L., Sinanan, A.C.M., Morgan, M.J., and Hunt, N.P. (2000). Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures. J. Muscle Res. Cell Motil. *21*, 223–233. https://doi.org/10.1023/A:1005670507906.

Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S.D., Shipley, J.M., Twining, S.S., Diaz, L.A., et al. (2000). The serpin α1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. Cell *102*, 647–655. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00087-8.

Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E., and Bentzinger, C.F. (2018). The muscle stem cell niche in health and disease. Curr. Top. Dev. Biol. *126*. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.003.

Maurer, M.J., and von Stebut, E. (2004). Macrophage inflammatory protein-1. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 1882–1886. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.019.

Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., et al. (2018). MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. Skeletal Muscle *8*, 1–11. https://doi.org/10.1186/s13395-018-0171-0.

McClung, J., Lee, W.J., Thompson, R.W., Lowe, L.L., and Carson, J.A. (2003). RhoA induction by functional overload and nandrolone decanoate administration in rat skeletal muscle. Pflugers Arch. *447*, 345–355. https://doi.org/10.1007/s00424-003-1151-7.

Mehan, R.S., Greybeck, B., Emmons, K., Byrnes, W.C., and Allen, D.L. (2011). Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in decreased fiber cross-sectional area and alters fiber type distribution in mouse hindlimb skeletal muscle. Cells Tissues Organs *194*, 510–520. https://doi.org/10.1159/000323654.

Murach, K.A., Fry, C.S., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2021a). Fusion and beyond: satellite cell contributions to loading-induced skeletal muscle adaptation. FASEB J. *35*. https://doi.org/10.1096/fj.202101096r.

Murach, K.A., Peck, B.D., Policastro, R.A., Vechetti, I.J., Van Pelt, D.W., Dungan, C.M., et al. (2021b). Early satellite cell communication creates a permissive environment for long-term muscle growth. IScience *24*. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102372.

Murach, K.A., Vechetti, I.J., Van Pelt, D.W., Crow, S.E., Dungan, C.M., Figueiredo, V.C., et al. (2020). Fusion-independent satellite cell communication to muscle fibers during load-induced hypertrophy. Function (Oxf) *1*. https://doi.org/10.1093/function/zqaa009.

Murach, K.A., White, S.H., Wen, Y., Ho, A., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2017). Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. Skeletal Muscle *7*, 1–13. https://doi.org/10.1186/s13395-017-0132-z.

Page-McCaw, A., Ewald, A., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 221–233. https://doi.org/10.1038/nrm2125.

Prasad, V., and Millay, D.P. (2021). Skeletal muscle fibers count on nuclear numbers for growth. Semin. Cell Dev. Biol. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.04.015.

Rahman, F.A., Angus, S.A., Stokes, K., Karpowicz, P., and Krause, M.P. (2020). Impaired ECM remodeling and macrophage activity define necrosis and regeneration following damage in aged skeletal muscle. Int. J. Mol. Sci. *21*, 1–23. https://doi.org/10.3390/ijms21134575.

Randrianarison-Huetz, V., Papaefthymiou, A., Herledan, G., Noviello, C., Faradova, U., Collard, L., et al. (2018). Srf controls satellite cell fusion through the maintenance of actin architecture. J. Cell Biol. *217*, 685–700. https://doi.org/10.1083/jcb.201705130.

Ratnayake, D., Nguyen, P.D., Rossello, F.J., Wimmer, V.C., Tan, J.L., Galvis, L.A., et al. (2021). Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. Nature *591*, 281–287. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03199-7.

Rayagiri, S.S., Ranaldi, D., Raven, A., Mohamad Azhar, N.I.F., Lefebvre, O., Zammit, P.S., and Borycki, A.G. (2018). Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. Nat. Commun. *9*, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03425-3.

Sambasivan, R., Gayraud-Morel, B., Dumas, G., Cimper, C., Paisant, S., Kelly, R., and Tajbakhsh, S. (2009). Distinct regulatory Cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. Dev.Cell *16*, 810–821. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.05.008.

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell *117*, 399–412. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3.

Sapudom, J., Mohamed, W.K.E., Garcia-Sabaté, A., Alatoom, A., Karaman, S., Mahtani, N., and Teo, J.C.M. (2020). Collagen fibril density modulates macrophage activation and cellular functions during tissue repair. Bioengineering *7*. https://doi.org/10.3390/bioengineering7020033.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods *9*, 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.

Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P., and Metzger, D. (2005). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. Genesis *41*, 165–170. https://doi.org/10.1002/gene.20107.

Serrano, A.L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardi, M., and Munoz-Canoves, P. (2008). Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab *7*, 33–44. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.011.

Smith, L.R., Kok, H.J., Zhang, B., Chung, D., Spradlin, R.A., Rakoczy, K.D., et al. (2020). Matrix metalloproteinase 13 from satellite cells is required for efficient muscle growth and regeneration. Cell Physiol. Biochem. *54*, 333–353. https://doi.org/10.33594/000000223.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. Cell *98*, 159–169. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81011-9.

Stearns-Reider, K.M., D'Amore, A., Beezhold, K., Rothrauff, B., Cavalli, L., Wagner, W.R., et al. (2017). Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. Aging Cell *16*, 518–528. https://doi.org/10.1111/acel.12578.

Strömberg, A., Olsson, K., Dijksterhuis, J.P., Rullman, E., Schulte, G., and Gustafsson, T. (2016). CX3CL1—a macrophage chemoattractant induced by a single bout of exercise in human skeletal muscle. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *310*, R297–R304. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00236.2015.

Tierney, M.T., Anastasia, G., Boscolo, F.S., Sala, D., Spenlé, C., Orend, G., and Sacco, A. (2016). Autonomous extracellular matrix remodeling controls a progressive adaptation in muscle stem cell regenerative capacity during development. Cell Rep. *14*, 1940–1952. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.072.

Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Grumati, P., Montemurro, F., et al. (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. Nat. Commun. *4*, 1964. https://doi.org/10.1038/ncomms2964.

Walton, R.G., Kosmac, K., Mula, J., Fry, C.S., Peck, B.D., Groshong, J.S., et al. (2019). Human skeletal muscle macrophages increase following cycle training and are associated with adaptations that may facilitate growth. Sci. Rep. *9*, 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37187-1.

Wosczyna, M.N., Konishi, C.T., Perez Carbajal, E.E., Wang, T.T., Walsh, R.A., Gan, Q., et al. (2019). Mesenchymal stromal cells are required for regeneration and homeostatic maintenance of skeletal muscle. Cell Rep. *27*, 2029–2035.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.074.

Yeghiazaryan, M., Żybura-Broda, K., Cabaj, A., Włodarczyk, J., Sławińska, U., Rylski, M., and Wilczyński, G.M. (2012). Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography. Histochem. Cell Biol. *138*, 75–87. https://doi.org/10.1007/s00418-012-0940-5.

Zhang, S.J., Truskey, G.A., and Kraus, W.E. (2007). Effect of cyclic stretch on β 1D -integrin expression and activation of FAK and RhoA. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *292*, C2057–C2069. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00493.2006.

Zhao, W., Lu, H., Wang, X., Ransohoff, R.M., and Zhou, L. (2016). CX3CR1 deficiency delays acute skeletal muscle injury repair by impairing macrophage functions. FASEB J. *30*, 380–393. https://doi.org/10.1096/fj.14-270090.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse anti-Dystrophin	Novocastra	Cat# NCL-Dys2; RRID: AB_442081
Rat anti-F4/80	Invitrogen	Cat# MA1-91124; RRID: AB_2277854
Rabbit anti-phospho-S6 Ribosomal protein (Ser235/236)	Cell Signaling	Cat# 4858; RRID: AB_916156
Rabbit anti-Laminin	Sigma	Cat# L9393; RRID: AB_477163
Mouse anti-puromycin antibody	Merck Millipore	Cat# MABE343; RRID: AB_2566826
Mouse anti-RhoA	Santa Cruz	Cat# sc-418; RRID: AB_628218
Rabbit anti-P-Akt	Cell Signaling	Cat# 9271S; RRID: AB_329825
Rabbit anti-Col1	Abcam	Cat# ab34710; RRID: AB_731684
Rabbit anti-Fibronectin	Sigma	Cat# F3648; RRID: AB_476976
Rabbit anti-Erk2	Cell Signaling	Cat# 9102; RRID: AB_330744
Rabbit anti-P-Erk1/2	Cell Signaling	Cat# 9101; RRID: AB_331646
Rat anti-TenascinC	Invitrogen	Cat# MA1-26778; RRID: AB_2256026
Rouse anti-Gapdh	Cell Signaling	Cat# D16H11; RRID: AB_11129865
Mouse anti-Pax7 antibody	Santa Cruz	Cat# sc-81648; RRID: AB_2159836
Rat anti-laminin	Sigma	Cat# L0663; RRID: AB_477153
Bacterial and virus strains		
Ad-mCherry	Vector Biolabs	Cat# 1767
Ad-Cre-mCherry adenoviruses	Vector Biolabs	Cat# 1771
Recombinant Lenti-GFP	This paper	NA
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Clophosome-A and control liposome anionic	ChemQuest	Cat# F70101C-A-2
Tamoxifen	MP Biomedicals	Cat# 156,738
EdU	Life Technologies	Cat# A10044
GM6001	Merck Millipore	Cat# CC1010
Erk inhibitor binimetenib (MEK162)	Selleckchem	Cat# S7007
Puromycin	Sigma	Cat# CP7255
Critical commercial assays		
EnzChek™ Gelatinase/Collagenase assay kit	Invitrogen/Molecular Probes	Cat# E12055
Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 kit	Life Technologies	Cat# C10340
Deposited data		
Raw and analyzed data	This paper	GEO: GSE166597 and GEO: GSE166598
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: HSA-Cre-ER^{T2}:RhoAflox/flox	Lauriol et al., 2014; Schuler et al., 2005	N/A
Mouse: Pax7-nGFP:RhoAflox/flox	Lauriol et al., 2014	
Sambasivan et al., 2009	N/A	
Oligonucleotides		
See Table S1 for a list of oligonucleotides	Eurogentec	N/A

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Software and algorithms		
Ingenuity (IPA) software	Qiagen	https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/
Prism 6.0 software	GraphPad	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
ImageJ	Schneider et al., 2012	https://imagej.nih.gov/ij/
MuscleJ plugin	Mayeuf-Louchart et al., 2018	https://github.com/ADanckaert/MuscleJ/blob/master/MuscleJ_1_0_2.ijm
Oligonucleotides (RT-qPCR)		
RhoA F	Eurogentec	5′-AACCTGTGTGTTTTCAGCACC-3′
RhoA R	Eurogentec	5′-ACCTCTGGGAACTGGTCCTT-3′
MuRF1 F	Eurogentec	5′-GAATAGCATCCAGATCAGCAG-3′
MuRF1 R	Eurogentec	5′-GAGAATGTGGCAGTGTTTGCA-3′
MAFbx F	Eurogentec	5′-TGTGGGTGTATCGGATGGAGA-3′
MAFbx R	Eurogentec	5′-CTGCATGATGTTCAGTTGTAAGC-3′
Mmp9 F	Eurogentec	5′-TCCTACTCTGCCTGCACCACTAAAG-3′
Mmp9 R	Eurogentec	5′-CTGTACCCTTGGTCTGGACAGAAAC-3′
Mmp13 F	Eurogentec	5′-AGTTGACAGGCTCCGAGAAA-3′
Mmp13 R	Eurogentec	5′-CACATCAGGCACTCCACATC-3′
Adam8 F	Eurogentec	5′-GCAGGACCATTGCCTCTACC-3′
Adam8 R	Eurogentec	5′-TGGACCCAACTCGGAAAAAGC-3′
Ccl3 F	Eurogentec	5′-TTCTCTGTACCATGACACTCTGC-3′
Ccl3 R	Eurogentec	5′-CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG-3′
Cx3Cl1 F	Eurogentec	5′-ACGAAATGCGAAATCATGTGC-3′
Cx3Cl1 R	Eurogentec	5′-CTGTGTCGTCTCCAGGACAA-3′
Col1α2 F	Eurogentec	5′-GTAACTTCGTGCCTAGCAACA-3′
Col1α2 R	Eurogentec	5′-CCTTTGTCAGAATACTGAGCAGC-3′
Tnc-C F	Eurogentec	5′-CACACACCGCATCAACATCC-3′
Tnc-C R	Eurogentec	5′-GACGACTTCTGCAGCTTGGA-3′
Fn F	Eurogentec	5′-GGCCACACCTACAACCAGTA-3′
Fn R	Eurogentec	5′-TCGTCTCTGTCAGCTTGCAC-3′
Hmbs F	Eurogentec	5′-TGCACGATCCTGAAACTCTG-3′
Hmbs R	Eurogentec	5′-TGCATGCTATCTGAGCCATC-3′
Oligonucleotides (PCR)		
Cre F	Eurogentec	5′-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3′
Cre R	Eurogentec	5′-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3′
RhoA lox F	Eurogentec	5′-AGGGTTTCTCTGTACGGTAGTC-3′
RhoA lox R	Eurogentec	5′-GCAGCTAGTCTAACCCACTACA-3′

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Dr Athanassia Sotiropoulos (athanassia.sotiropoulos@inserm.fr).

Material availability

This study did not generate nor use any new or unique reagents.

Data and code availability

Transcriptomic data have been deposited in the Gene Expression Omnibus as accession GEO: GSE166597 and GEO: GSE166598.

This paper does not report original code. Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mouse protocols

RhoA$^{flox/flox}$ mice are homozygous for RhoA floxed alleles harbouring LoxP sites flanking exon 3 of endogenous *RhoA* gene (Lauriol et al., 2014). HSA-*Cre-ER*^{T2} transgenic mice express Cre-ERT2 recombinase under the control of human skeletal actin promoter (Schuler et al., 2005). Tg :Pax7-nGFP transgenic mice express nuclear localized EGFP under the Pax7 promoter (Sambasivan et al., 2009).

To investigate the effect of myofiber-specific RhoA-deletion in adult muscle, the mouse strain following mice were generated: HSA-*Cre-ER*^{T2}:*RhoA*$^{flox/flox}$. In all experiments, 3-month-old HSA-*Cre-ER*^{T2}:*RhoA*$^{flox/flox}$ mice (males and females) were given five intraperitoneal (i.p.) tamoxifen (Tmx, 1 mg/day; MP Biomedicals) injections to induce *RhoA* deletion and were referred as mutant mice (Mut). *RhoA*$^{flox/flox}$ mice injected with Tmx were used as control mice (Ctl).

No statistical difference in body weights were observed after Tmx in HSA-*Cre-ER*^{T2}:*RhoA*$^{flox/flox}$ and *RhoA*$^{flox/flox}$ mice up to 2 months post Tmx injection.

Mice were genotyped by PCR using the following primers: Cre-F 5′-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3′; Cre-R 5′-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3′; RhoAlox-F 5′-AGGGTTTCTCTGTACGGTAGTC-3′; RhoAlox-R 5′-GCAGCTAGTCTAACCCACTACA-3′.

Overload-induced hypertrophy (OV) of *plantaris* muscles of Ctl and Mut mice was induced through the incapacitation of *soleus* and *gastrocnemius* muscles by sectioning their tendon. This procedure was achieved in both legs. During the process of OV, Mut mice were injected with TMX at day 3, 5 and 7 post OV. At the indicated time (1 and 3wk post OV), *plantaris* muscles were dissected and subsequently processed for histological analyses. When indicated mice were administered intraperitoneally with 50 or 20 μg/g EdU (Life Technologies) or with 20μg/g GM6001 (Merck Millipore).

All animal experiments were conducted in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional ethic committee and French Ministry of Research (number A751402).

METHOD DETAILS

Macrophage depletion

Clodronate liposome and control liposome (Clophosome-A and control liposome anionic) were purchased from ChemQuest. Mice were injected with Clodronate- or control liposomes (0.15 mL administrated intraperitoneally i.p.) 1 day prior overload-induced hypertrophy. Additionally, liposomes (Clodronate- or control) were continued to be administrated day 1, 4, 6, 9, 12, 15 and 18 post-surgery (0.1 mL, i.p.). The muscles were harvested 7 days or 21 days post compensatory hypertrophy. No statistical difference in body weights were observed after Clodronate injections in Tmx-treated HSA-*Cre-ER*^{T2}:*RhoA*$^{flox/flox}$ and *RhoA*$^{flox/flox}$ mice.

MMP activity

Fourteen μm thick cryostat sections of *Plantaris* were air dried at room temperature and pre-incubated 5min in dye-quenched (DQ) buffer with 0.01% Triton X-100 (buffer supplied by the manufacturer, Invitrogen/Molecular Probes) thrice. Sections were then overlaid with a fluorogenic substrate DQ gelatin (Invitrogen/Molecular Probes) diluted 1/100 in the DQ buffer and incubated for 2 hr at 37°C. Slides were then rinsed 10 min in PBS containing 0.01% Triton X-100 thrice. Cleavage of the substrate by gelatinases results in increase of fluorescence intensity by unblocking of quenched fluorescence. After washing, sections were used for immunohistochemical staining. The gelatinolytic activity (fluorescein-conjugated DQ-gelatin),

dystrophin labeling (Alexa 546) and nuclei (DAPI) were acquired using an IXplore Spinning Disk microscope with a 60X objective (PLAN APOCHROME, NA 1.42), coupled with a sCMOS Orca flash 4.0 V3 camera (Hamamatsu).

SUnSET

The SUnSET, or SUrface SEnsing of Translation, technique allows estimation of global protein synthesis in tissue of living animals, specifically involves the use of an anti-puromycin antibody for the immunological detection of puromycin-labeled peptides. Briefly we injected mice with puromycin (Sigma) at 0.04 μg/g body mass via an i.p. injection 30min before samples harvesting. Western blot was then performed with a mouse anti-puromycin antibody (1/1000 Merck Millipore) and HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody. Puromycin incorporation was measured by Fusion FX system (Vilber company) with Comassie blue staining as loading control.

Multiphoton imaging and characterization of ECM topography and architecture

Plantaris muscle was excised and placed in 2% paraformaldehyde (PFA) for 1hr at 4°C and then included in agarose low gelling 6%. Muscle was then sliced in thick sections (300μm) using a Leica VT1200 S vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Leica SP5 multiphoton microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled with an Ultra II Chameleon Coherent TI:sapphire laser (Coherent, Saclay, France) was used to image collagen fibers by second harmonic generation microscopy. The laser beam was circularly polarized and a Leica Microsystems HCX IRAPO 25×/0.95 W objective was used. From z-stack images, the tortuosity was calculated using collagen fibrils Feret's diameter divided by length (ImageJ software) of at least 50 single collagen fibrils per sample, as described in (Stearns-Reider et al., 2017).

Primary muscle cell culture and recombinant virus transduction

Primary cultures were derived from hindlimb muscles of *RhoA*$^{flox/flox}$ *mice* harbouring Pax7-*nGFP* transgene that allowed the prospective selection by flow cytometry (Fluorescence Activated Cell Sorting or FACS) of satellite cells as described in (Randrianarison-Huetz et al., 2018). In standard conditions, myoblasts were grown in growth medium (DMEM/F12, 2% Ultroser G (PALL Life Sciences), 20% Fetal Calf Serum) on plastic dishes coated with 0.02% Gelatin. For differentiation, myoblasts were seeded in Matrigel-coated dishes and cultured in differentiation medium (DMEM/F12, 2% Horse Serum). When indicated cells were treated with Rho activator II CN03 (Cytoskeleton, 2 and 4 μg/mL) and/or Erk inhibitor Binimetenib (Selleckchem, 6 μM).

To induce in culture the excision of the floxed *RhoA* allele in myotubes, *RhoA*$^{flox/flox}$ myoblasts were differentiated for 3 days and then transduced with Ad-mCherry or Ad-Cre-mCherry adenoviruses (100MOI, Vector Biolabs).

To generate a stable *RhoA*$^{flox/flox}$ cell line expressing GFP, RhoA$^{flox/flox}$ myoblasts were transduced twice with recombinant Lenti-GFP (100MOI, Vector Biolabs) and 8 μg/mL of polybrene then selected by FACS sorting.

Cell mixing fusion assays

To analyze fusion, myotubes (at day 2 of differentiation) were transduced with Ad-Cre-mCherry or Ad-mCherry. Two days post transduction, they were co-cultured with Lenti-GFP transduced myocytes (myoblasts incubated overnight in DM). Two days later, cultured cells were fixed for 8 min in 4% PFA and nuclei were stained using DAPI and then mounted in Dako Fluorescence Mounting Medium and kept at 4°C until image acquisition. Fusion events were scored by counting the dual-labeled cells (green cells GFP$^+$/mCherry$^+$). The number of fusion events was normalized by the total number of nuclei.

Single fiber isolation

Plantaris muscles were dissected from the legs by handling tendons only. Muscles were then placed in Collagenase Type I solution (2 mg/mL in DMEM; Life Technologies) and incubated in shaking water bath at 35°C for 50 min. Muscles were transferred to DMEM-filled horse serum–coated Petri dishes (to prevent fiber attachment to the plastic) using heat-polished glass Pasteur pipettes (with bore sizes that are just big enough to let the muscle go through). One at a time, muscles were triturated until fibers were separated. The bulk of fibers were then transferred to a Petri dish, and the dish containing the isolated fibers

was placed in the culture incubator. The fibers should not be hypercontracted. Under the dissecting scope they should look long thin and shiny. After 15min, the damaged fibers shrink and the good fibers were collected, washed in PBS and freezed in liquid nitrogen in order to perform RNA extraction later.

Muscle section immunostaining

Plantaris muscles were collected and snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Eight μm-thick muscle sections were fixed in 4%PFA for 8 min at room temperature and blocked overnight at 4°C in PBS 1×, 10% Horse serum, 0.5% Triton X-100. Then, they were incubated with primary antibodies overnight at 4°C in PBS 1×, 10% Horse serum, 0.5% Triton X-100. The following primary antibodies were used: mouse anti-Dystrophin (Novocastra, NCL-Dys2, 1/50), anti-F4/80 (Invitrogen, MA1-91124, 1/400), rabbit anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (Cell Signaling, 4858, 1/100), rabbit anti-Laminin (Sigma, L9393, 1/200) or rat anti-laminin (Sigma, L0663, 1/100). After washes in PBS 1x, sections were incubated with secondary antibodies for 1hr at room temperature. The following secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG1 Alexa 488 (ThermoFisher, A21121, 1/1000) and donkey anti-rabbit Alexa 546 (LifeTechnologies, A10040, 1/1000). Nuclei staining were performed using DAPI. Muscles sections were then mounted in Dako Fluorescence Mounting Medium and kept at 4°C until image acquisition.

For Pax7 staining, muscle sections were fixed in 4%PFA for 8 min at RT and permeabilized in ice-cold methanol for 6 min. Muscle sections were treated with Antigen Unmaking Solution pH6 (Vector, H-3300) 15 min at 95°C and cooled on ice for 30 min. Blocking and incubation with primary and secondary antibodies were conducted as described in the previous paragraph. Primary mouse anti-Pax7 antibody (Santa Cruz, sc-81648) was used at dilution 1/50.

EdU detection was performed using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 kit, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies).

Western blot analysis

Plantaris muscles were lysed in RIPA buffer (Sigma) and proteins were separated through denaturating SDS-PAGE electrophoresis using Mini-Protean TGX precast gels 4-15% (Biorad) and transferred on PVDF or Nitrocellulose (0.2μm, Biorad) membrane using the Trans-Blot turbo transfer system (Biorad). Membranes were blocked with 5% skinned milk in TBS-1% Tween (TBST) 1hr at room temperature and probed overnight at 4°C with primary antibodies in TBST 5% BSA. The following antibodies were used: mouse anti-RhoA (Santa Cruz, sc-418, 1/150), rabbit anti-P-Akt (Cell Signaling, #9271S, 1/1000), rabbit anti-Col1 (Abcam, ab34710, 1/1000), rabbit anti-Fibronectin (Sigma F3648, 1/1000), rabbit anti-Erk2 (Cell Signaling, #9102, 1/1000), rabbit anti-P-Erk1/2 (Cell Signaling, #9101, 1/1000), rat anti-TenascinC (Invitrogen, MA1-26778, 1/200), and mouse anti-Gapdh (Cell Signaling, D16H11, 1/1000). Following washing in TBST, membranes were hybridized with secondary antibodies goat anti-mouse- or goat anti-rabbit-coupled to HRP (ThermoFisher, 62–6520 and A27036, 1/10,000). Proteins were revealed using SuperSignal West Femto substrate (ThermoFisher).

Image acquisition

Fluorescence images were acquired using an Olympus BX63F microscope with 10× (UplanFL, NA 0.3×) and 20× objectives (UPLSAPO, NA 0.75), coupled with an ORCA-Flash4.0 LT camera (Hamamatsu), or using a Zeiss Axiovert 200M microscope with 5× (PLANFLUAR, NA 0.25×) and 20× objectives (LD PLANNEOFLUAR, NA 0.4), coupled with a CoolSnap-HQ camera (Photometrics), or using a Spinning Disk confocal microscope (Yokogawa X1) with a 100× oil-immersion objective (HCX PL APO, NA 1.47), coupled with a CoolSnap-HQ^2 camera (Photometrics) and Metamorph 7.7.5 (Molecular Devices). Images were merged and edited in ImageJ. Background was reduced using brightness and contrast adjustments applied to the whole image.

Morphometric analysis

Myofiber cross-section area (CSA) was analyzed by using immunostaining of Dystrophin, marking myofiber sarcolemma, and then using MuscleJ tool (Mayeuf-Louchart et al., 2018) or ImageJ macro previously developed in our laboratory (Randrianarison-Huetz et al., 2018). Between 600 and 800 myofibers were analyzed. For the quantification of the number of nuclei per myofibers ImageJ was used and at least 500 myofibers were counted per muscle.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent and reverse-transcribed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). cDNA was synthesized from 1μg of RNA. Quantitative PCR analysis was performed using a Light Cycler (Roche) according to the manufacturer's instructions using a SYBR Green I kit (Roche). Values were normalized using *Hydroxymethylbilane synthetase* (*Hmbs*). The following primers were used: RhoA-F 5′-AACCTGTGTGTTTTCAGCACC-3′; RhoA-R 5′-ACCTCTGGGAACTGGTCCTT-3′; MuRF1-F 5′-GAATAGCATCCAGATCAGCAG-3′; MuRF1-R 5′-GAGAATGTGGCAGTGTTTGCA-3′; MAFbx-F 5′-TGTGGGTGTATCGGATGGAGA-3′; MAFbx-R 5′-CTGCATGATGTTCAGTTGTAAGC-3′; Mmp9-F 5′-TCCTACTCTGCCTGCACCACTAAAG-3′; Mmp9-R 5′-CTGTACCCTTGGTCTGGACAGAAAC-3′, Mmp13-F 5′-AGTTGACAGGCTCCGAGAAA-3′; Mmp13-R 5′-CACATCAGGCACTCCACATC-3′; Adam8-F 5′-GCAGGACCATTGCCTCTACC-3′; Adam8-R 5′-TGGACCCAACTCGGAAAAAGC-3′; Ccl3-F 5′-TTCTCTGTACCATGACACTCTGC-3′. Ccl3-R 5′-CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG-3′; Cx3Cl1-F 5′-ACGAAATGCGAAATCATGTGC-3′; Cx3Cl1-R 5′-CTGTGTCGTCTCCAGGACAA-3′; Col1α2-F 5′-GTAACTTCGTGCCTAGCAACA-3′; Col1α2-R 5′-CCTTTGTCAGAATACTGAGCAGC-3′; Tnc-C-F 5′-CACACACCGCATCAACATCC-3′; Tnc-C-R 5′-GACGACTTCTGCAGCTTGGA-3′; Fn-F 5′-GGCCACACCTACAACCAGTA-3′; Fn-R 5′-TCGTCTCTGTCAGCTTGCAC-3′; Hmbs-F 5′-TGCACGATCCTGAAACTCTG-3′; Hmbs-R 5′-TGCATGCTATCTGAGCCATC-3′.

Affymetrix microarrays

Microarray analysis was performed from: i) four *plantaris* muscles coming from four different mice per group. Four conditions (groups) were analyzed: SO Ctl, 1wOV Ctl, SO Mut, 1wOV Mut; ii) three independent *RhoA*$^{flox/flox}$ differentiated myoblast cultures transduced with Ad-mCherry or Ad-Cre-mCherry adenoviruses for 2 days. Total RNAs were obtained using TRIzol reageant and DNAse treatment (Qiagen). RNA integrities were certified on bioanalyzer (Agilent). Hybridation to Mouse Gene 2.0-ST arrays (Affymetrix) and scans (GCS3000 7G expression Console software) were performed on the Genom'IC plateform (Institut Cochin, Paris). Probe data normalization and gene expression levels were processed using the Robust Multi-array Average (RMA) algorithm in expression Console software (Affymetrix). Gene ontology analysis was performed using Ingenuity (IPA) software.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative data sets were analyzed using an unpaired parametric t-test with Welsh correction (Figures 1B, 1C, 4B, 6B, 6E, 7E, S4B, and S4D) (when two groups were analyzed), two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test (Figures 1D, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2E, 2H, 3D, 3E, 4A, 5A, 5B, 5C, 5D, 6C, 7A, 7C, 7E, 7F, 7G, S1A, S1B, S2A–S2D, andS3) (when two categorial variables were analyzed), one-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test (Figures 4C, 6B, 6D, 6E, 6F, 6G, and 7D) (for three or more groups), using GraphPad Prism 6.0 software. Statistical significance was set at a p value<0.05.

iScience, Volume *25*

Supplemental information

RhoA within myofibers controls satellite cell microenvironment to allow hypertrophic growth

Chiara Noviello, Kassandra Kobon, Léa Delivry, Thomas Guilbert, Florian Britto, Francis Julienne, Pascal Maire, Voahangy Randrianarison-Huetz, and Athanassia Sotiropoulos

Figure S1

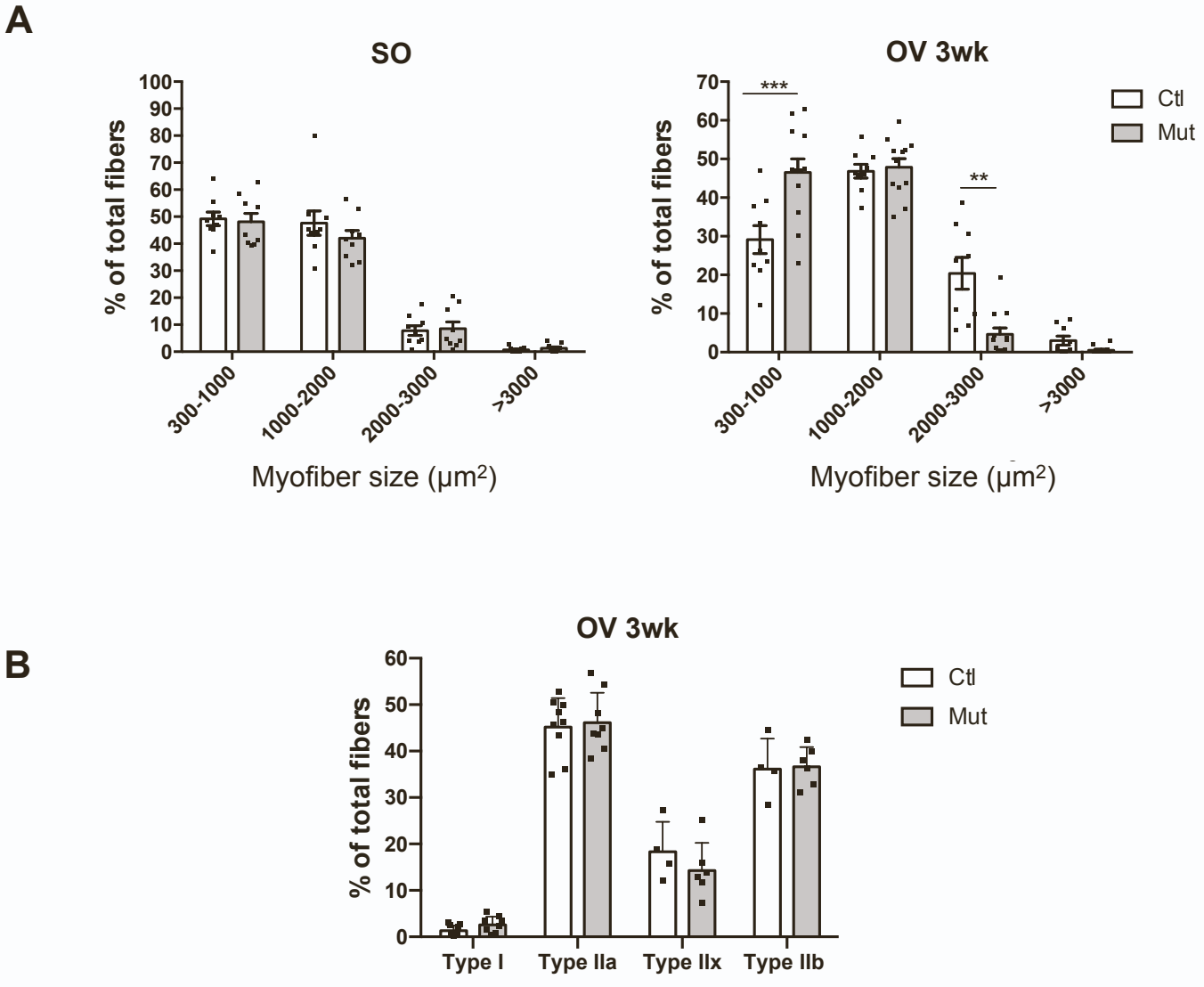


Figure S1. RhoA loss within myofibers does not affect myofiber type. **(A)** Myofiber CSA (µm²) distribution of SO *Plantaris* muscle (left panel) and 3wk after OV (right panel) in Ctl and Mut mice (n=9-12). **(B)** Percentage of myofiber type in *plantaris* muscle after 3wk OV in Ctl and Mut (n=4-9). Data are mean±SEM. *pvalue<0.05, ***pvalue<0.001. Related to Figure 1.

Figure S2

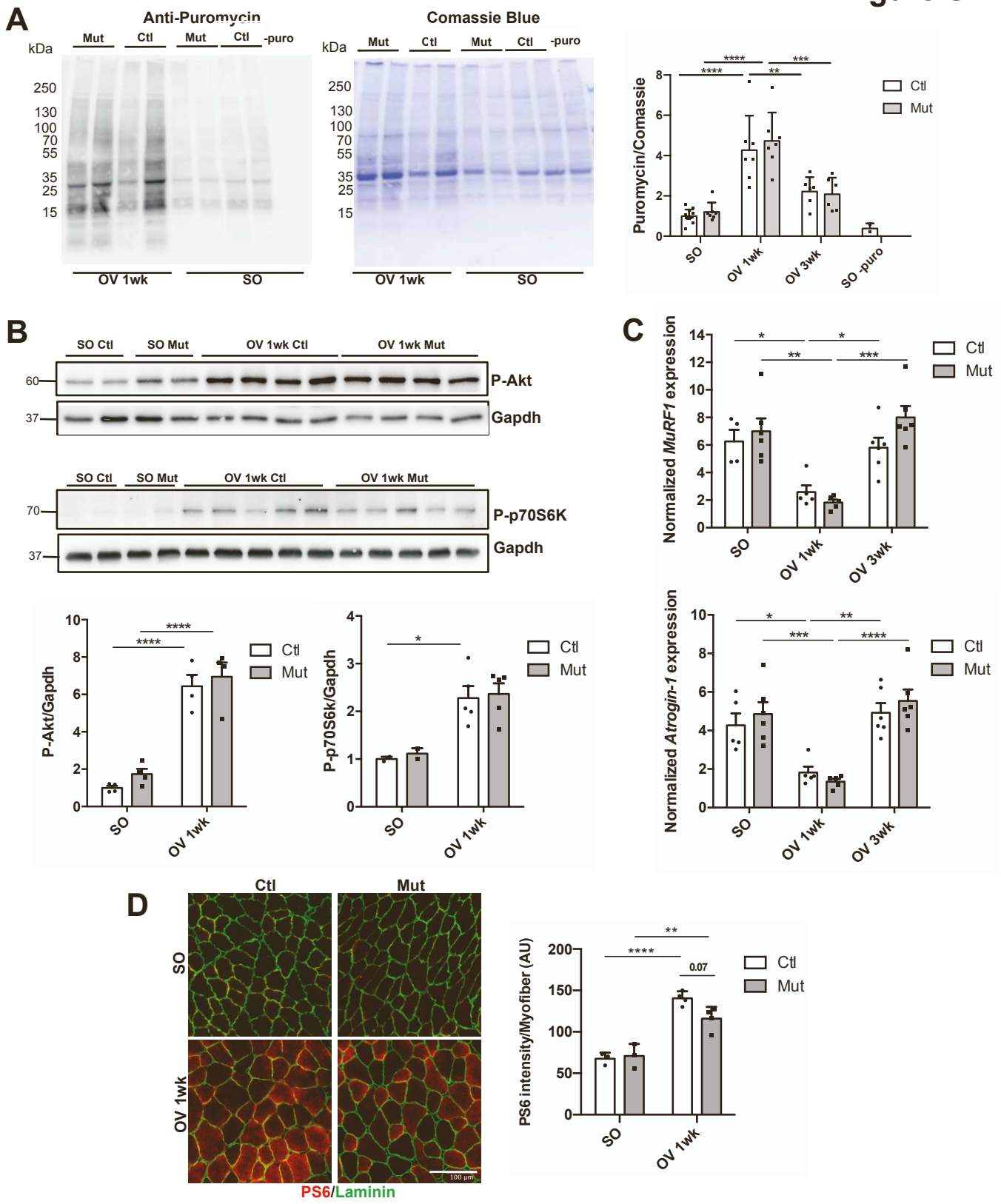


Figure S2. RhoA is not required for Akt dependent signaling and protein synthesis. (A) Representative SUnSET experiment performed on Ctl and Mut plantaris muscles before (SO) and after 1wk and 3wk OV. Puromycin was injected 30 min before harvesting. Puromycin-labeled peptides were quantified by Western blot using anti-Puromycin antibody. Coomassie was used as a loading control (n=4-8). Ratio of the quantification of Puromycin to Coomassie is shown in the right panel. **(B)** Phosphorylated Akt and p70S6K were analysed by Western blot in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1wk OV. Gapdh was used as a loading control (n=4). Ratio of the quantification of P-Akt or P-p70S6K to Gapdh is shown in the right panel. **(C)** *MuRF1* and *Atrogin-1* mRNA expressions were analysed by RT-qPCR in Ctl and Mut *plantaris* before (SO) and after 1 and 3wk OV (n=4-6). Data were normalized by *Hmbs* expression. **(D)** Intensity of PS6 staining per myofiber on Ctl and Mut muscles sections before and after 1wk OV (n=3-4). Myofibers were delimitated using Laminin staining, PS6 fluorescence intensity was measured in 75 to 100 myofibers per condition. Data are mean±SEM. *pvalue<0.05, **pvalue<0.01, ***pvalue<0.001, ****pvalue<0.0001. Related to Figure 1.

Figure S3

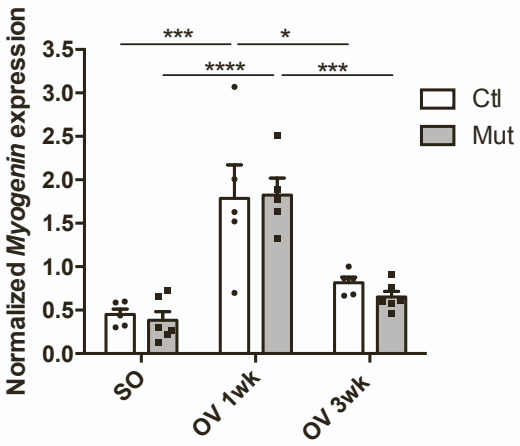


Figure S3. RhoA loss within myofibers does not affect *Myogenin* expression. *Myogenin* mRNA expression was analysed by RT-qPCR in Ctl and Mut *plantaris* muscles before (SO) and after 1 and 3wk OV (n=5-6). Data were normalized by *Hmbs* expression. Data are mean±SEM. **pvalue<0.01, ***pvalue<0.001, ****pvalue<0.0001. Related to Figure 2.

Figure S4

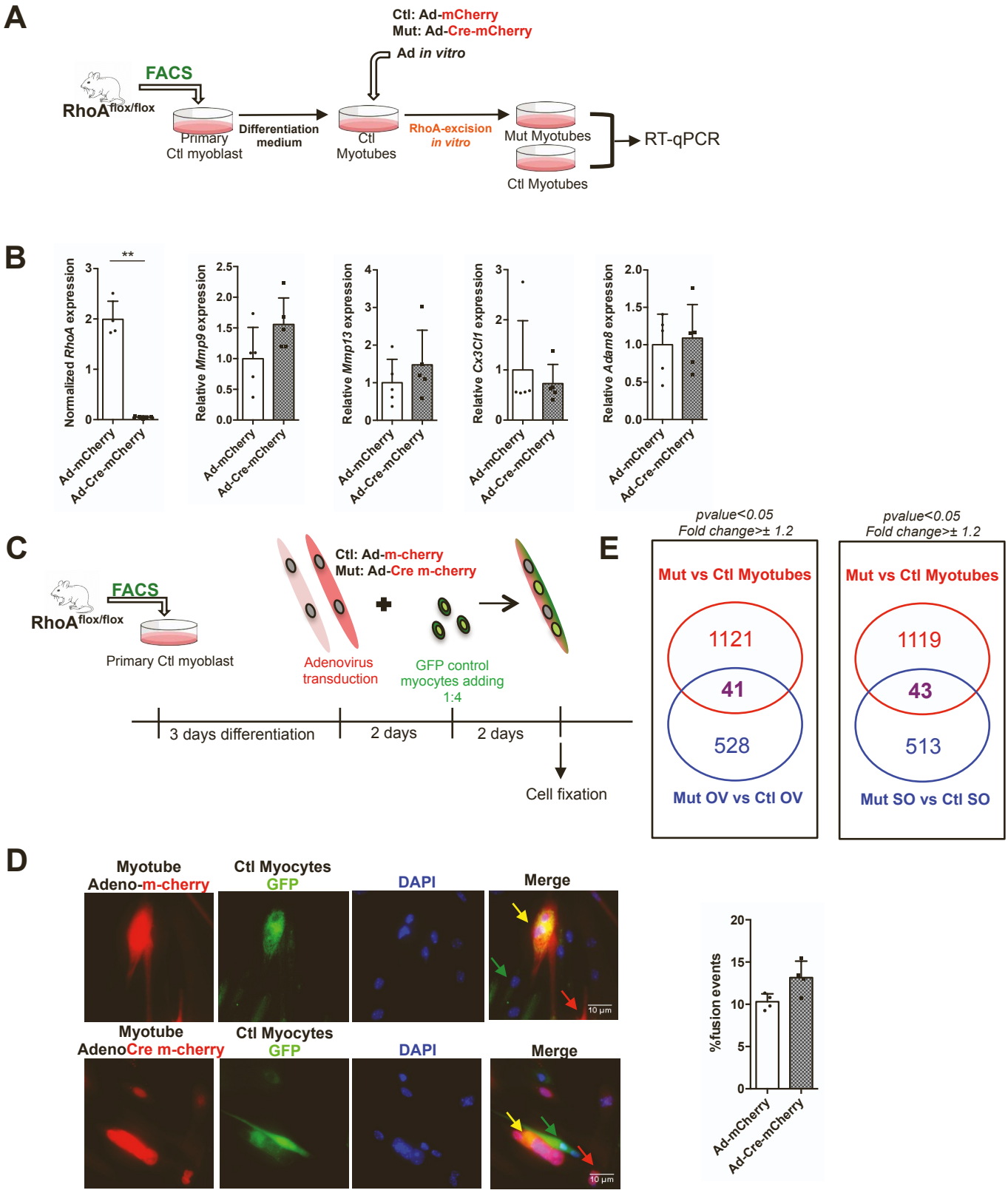


Figure S4. RhoA loss within myotubes *in vitro* does not affect myoblast fusion. (A) RhoA$^{flox/flox}$ Myotubes (at 3 days post differentiation) were transduced with Ad-mCherry (Ctl, red) or Ad-Cre-mCherry (Mut, red) and harvested 2 days later. **(B)** *RhoA, Mmp9*, *Mmp13*, *Adam8* and *Cx3Cl1* expressions were analysed by RT-qPCR *in RhoA*$^{flox/flox}$ myoblasts transduced with Ad-mCherry or Ad-Cre-mCherry to induce RhoA loss. Data were normalized by *Hmbs* expression (n=4-5). **(C)** Myotubes transduced with Ad-mCherry (Ctl, red) or Ad-Cre-mCherry (Mut, red) were mixed with Ctl myocytes transduced with Lenti-GFP (green). After 48hr of co-culture, myotubes were analysed for dual labeling. **(D)** The percentage of dual-labeled cells per total number of nuclei (fusion events) was scored (n=3).**(E)** Affymetrix analysis has been performed from mRNA from Myotubes transduced with Ad-mCherry (Ctl) or Ad-Cre-mCherry (Mut). Venn diagram showing the intersection between genes differentially regulated by RhoA (fold change>±1.2; pvalue<0.05) in Myotubes, and *plantaris* overloaded muscles (Mut OV vs Ctl OV) or *plantaris* sham operated (Mut SO vs Ctl SO). Data are mean±SEM. ** pvalue<0.01. Related to Figure 3.

Figure S5

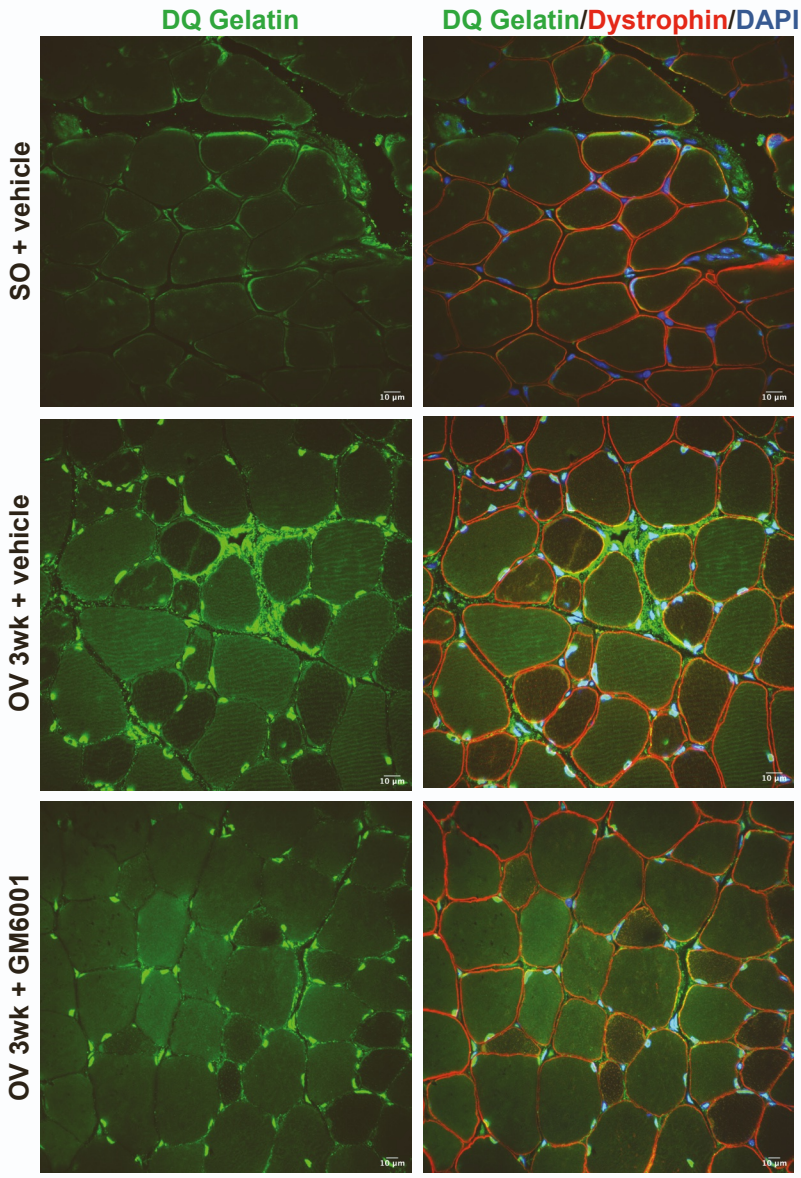


Figure S5. GM6001 treatment inhibits Mmps activity. Representative images of gelatinase activity (DQ-gelatin, green) in muscle section from vehicle- and GM6001-treated SO and OV mice. *In situ* zymography is represented in *Plantaris* muscle section. Note the OV induces prominent increase of the fluorescent signal both in the cell nuclei and in the intersitial space and that GM6001 treatment reduces gelatinase activity. Scale bar 10 μm. Related to Figure 7.

Figure S6

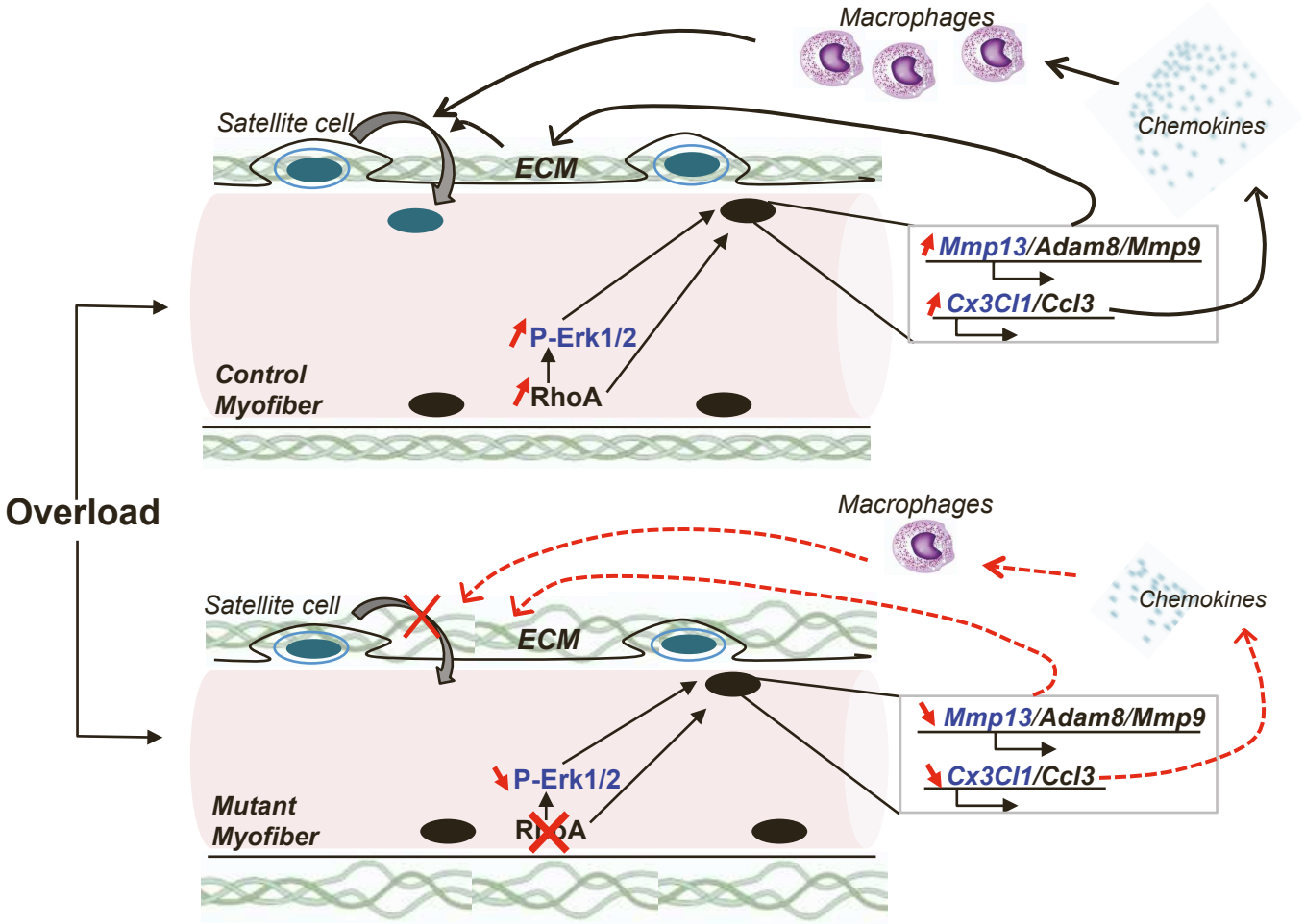


Figure S6. Schematic model: in response to increased workload, RhoA within myofibers gets activated and modulates *Mmp13/Cx3cl1* and *Mmp9/Adam8/Ccl3* expressions in a Erk-dependent and independent manner respectively. In turn, Mmp9/Mmp13/Adam8 modify ECM organization and Cxcl3/Ccl3 chemokines attract macrophages that will remodel SC microenvironment and thus support skeletal muscle hypertrophy and SC accretion. Related to Figure 1 to 7.

Table S1 - Microarray GO analysis in control *plantaris* 1 week after overload versus SO (related to Figure 1 and 3)

Canonical Pathways	pvalue	Z-score
Integrin Signaling	2.0^{E}-11	4.07
IL-8 Signaling	5.6^{E}-09	4.12
FcÎ³ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	6.6^{E}-09	5.25
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	2.0^{E}-08	2.23
Leukocyte Extravasation Signaling	5.6^{E}-08	3.75
Regulation of Actin-based Motility by Rho	1.2^{E}-07	4.23
RhoA Signaling	**2.5^{E}-07**	**3.71**
Rac Signaling	4.7^{E}-07	4.15
Glioma Signaling	8.1^{E}-07	2.14
Phospholipase C Signaling	1.5^{E}-06	3.16
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	1.5^{E}-06	3.88
Cdc42 Signaling	2.0^{E}-06	2.54
Dendritic Cell Maturation	4.3^{E}-06	3.44
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	6.3^{E}-06	3.44
Signaling by Rho Family GTPases	6.8^{E}-06	3.47
p70S6K Signaling	7.1^{E}-06	2.56

Table S2 –Common genes differentially expressed in Myotubes expressing or not RhoA and in Control vs Mutant overloaded-*plantaris* that were similarly regulated (up or down) (related to Figure 3 and Figure S4)

	Myotubes lacking RhoA vs Ctl		Overloaded-plantaris Mut vs Ctl	
Gene Symbol	**Fold Change**	**pvalue**	**Fold Change**	**pvalue**
AmmerR1	-1.92	0.009	-1.233	0.00182
Bcl2A1	-1.63	0.0051	-1.623	0.0148
Csnk1g1	-1.76	0.004	-1.235	0.00366
Cst12	-1.33	0.0027	-1.221	0.00989
Lrp11	-1.91	0.0082	-1.25	0.022
RhoA	-1.68	0.0181	-1.204	0.00418
Slx4	-1.43	0.0054	-1.283	0.0117
Znf8	-1.44	0.0144	-1.216	0.00272
1700001F09Rik (includes others)	1.28	0.0481	1.306	0.0171
Akap1	2.78	0.0262	1.25	0.031
Arpc5l	1.46	0.0229	1.358	0.0146
Chchd1	1.35	0.0414	1.353	0.0218
Cog4	2.17	0.0284	1.267	0.0121
Cox19	1.69	0.0458	1.263	0.00886
Crygd	1.48	0.0129	1.369	0.021
Lonp1	1.5	0.044	1.246	0.0104
Mrpl12	1.58	0.0065	1.219	0.000396
Mrpl53	1.72	0.0404	1.248	0.0032
Ndufb5	1.23	0.0274	1.21	0.00386
Neurl2	1.81	0.0152	1.271	0.00937
Pipox	1.24	0.0384	1.267	0.0319
PolR2F	2.32	0.0366	1.302	0.00096
Ppa1	2.56	0.0391	1.226	0.0141
Timm10	1.86	0.0108	1.217	0.0458
Twf2	2.38	0.014	1.26	0.00321

Table S3 –Common genes differentially expressed in Myotubes expressing or not RhoA and in Control vs Mutant SO-*plantaris* that were similarly regulated (up or down) (related to Figure 3 and Figure S4)

	Myotubes lacking RhoA vs Ctl		Sham Operated-plantaris Mut vs Ctl	
Gene Symbol	**Fold Change**	**pvalue**	**Fold Change**	**pvalue**
Cep170	-2.93	0.0139	-1.254	0.0429
Cyth3	-2.12	0.0027	-1.274	0.0406
Eda2r	-1.96	0.0047	-1.34	0.0346
Sclt1	-1.74	0.0353	-1.235	0.0046
Arid2	-1.64	0.0181	-1.208	0.00991
Slc39a10	-1.63	0.0243	-1.221	0.0397
Hsd3b1	-1.62	0.0177	-1.364	0.0365
Tlr4	-1.52	0.0488	-1.375	0.0139
Optc	-1.48	0.0476	-1.259	0.0478
Ssbp2	-1.45	0.0322	-1.227	0.0147
C14orf28	-1.42	0.0421	-1.254	0.0213
Pus10	-1.42	0.0322	-1.298	0.0454
Gm10408 (includes others)	-1.4	0.0312	1.324	0.00291
Ptprc	-1.36	0.0341	-1.339	0.00811
Arl14epl	-1.35	0.0151	-1.273	0.0466
Mospd4	-1.29	0.044	-1.215	0.00784
1700009j07rik	-1.28	0.0091	-1.297	0.0159
Klk3	1.23	0.0449	1.26	0.000858
Hsd17b14	1.26	0.0196	1.212	0.0149
Klra7 (includes others)	1.28	0.0426	1.349	0.0155
Mrm3	1.43	0.0435	1.395	0.0333
Gm12253	1.46	0.0031	1.239	0.00801
Crygd	1.48	0.0129	1.4	0.0219
Tbc1d22a	1.51	0.0429	1.252	0.0156
Igfbp1	1.53	0.0111	1.254	0.019
Scgb2b27 (includes others)	1.53	0.028	1.22	0.0148
Polr2j	1.56	0.0448	1.391	0.00958
Cox19	1.69	0.0458	1.205	0.0387
Mrpl15	1.71	0.0283	1.261	0.013
Ifi35	1.72	0.0279	1.267	0.0303
Borcs8	1.8	0.0268	1.206	0.000825
Timm10	1.86	0.0108	1.336	0.0107
Dhrs11	2.39	0.023	1.247	0.0302
Tprn	2.75	0.025	1.372	0.0292

Table S4 – Predicted activated/inhibited Upstream Regulators in Control *plantaris* 1 week after overload vs SO but not in Mutant *plantaris* (related to Figure 3)

Function	Upstream Regulator		Activation Z-score	pvalue of overlap	Link with Mmps	Link with inflammation
Modulation of ECM	**Mmp9**	Peptidase	2.167	1.24E-04		
	Postn	Secreted extracellular matrix protein	2.199	4.17E-02		
	TnC	matricellular protein	2.427	1.73E-04	Mmp9 substrat Generation of integrin-activating peptides	
	Cyr61	matricellular protein	2.457	1.27E-05		
	Loxl2	enzyme	2.392	7.54E-03		
	Plau	peptidase/in ECM	2.825	1.02E-03		
Integrin Receptor	**Itga9**	transmembrane receptor	3.569	5.45E-03	Generation of integrin-activating peptides from TnC	
	ItgaV	transmembrane receptor	2.218	9.51E-04		
Growth Factor	**Pgf**	growth factor VEGF sub-family	2.929	1.45E-03		
	Fgf	group/growth factor	2.128	9.91E-03	Mmp9 substrat/Active	
	Fgf7	growth factor	2.643	6.68E-04	Mmp9 substrat/Active	
	Gdf2	growth factor	2.923	2.71E-02		
	EgfR	kinase/ growth factor receptor	2.721	2.24E-03		
Cytokines	**Faslg**	cytokine	2.583	3.56E-02	Cleaved by Mmm7	
	Tnf (family)	group/cytokine	3.455	9.01E-04	Mmp9 substrat	
	TgfbR1	cytokine receptor	2.308	3.35E-03	Generation of active Tgfb by Mmp9	
	Il3	cytokine	2.389	1.76E-03		Activation of macrophages
	Il17Ra	cytokine receptor	2.686	3.56E-02		
	Gm-csfR	group/cytokine receptor	3.229	8.76E-03		Macrophage survival
Chemokine	**Ccl2**	chemokine chemoattractant	3.630	4.59E-03		Recrutes monocytes
	CcR1	Ccl3 chemokine receptor	2.387	1.49E-06		Macrophage chemoattractant
	CcR2	CCL2 chemokine receptor	2.452	3.26E-03		Recrutes monocytes
	CxCl1	chemokine chemoattractant	2.800	1.62E-02	Mmp9 substrat /Active	Regulation of inflammatory response
	CxCR4	CXCL12/Sdf1 chemokine receptor	2.798	7.82E-03		
Signaling	**Mapk3/Erk1**	Kinase	2.790	1.19E-02		
	Mapk8	Kinase	2.344	6.34E-04		
	Stat3	transcription regulator	3.036	3.26E-07		
	Rock2	kinase	2.393	3.44E-03		
	RelA	transcription regulator Nfkb	2.408	2.18E-02		
	Sn50 peptide	Nfkb inhibitor	-2.608	2.11E-02		
Other	**SerpinA4**	protease inhibitor	-2.171	3.67E-03	Mmp9 substrat/Inactive	

Bibliographies

Abbott, K.L., Friday, B.B., Thaloor, D., Murphy, T.J., Pavlath, G.K., 1998. Activation and Cellular Localization of the Cyclosporine A-sensitive Transcription Factor NF-AT in Skeletal Muscle Cells. MBoC 9, 2905–2916. https://doi.org/10.1091/mbc.9.10.2905

Ahmed, R.E., Tokuyama, T., Anzai, T., Chanthra, N., Uosaki, H., 2022. Sarcomere maturation: function acquisition, molecular mechanism, and interplay with other organelles. Phil. Trans. R. Soc. B 377, 20210325. https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0325

Alam Shibly, S.U., Ghatak, C., Sayem Karal, M.A., Moniruzzaman, Md., Yamazaki, M., 2016. Experimental Estimation of Membrane Tension Induced by Osmotic Pressure. Biophysical Journal 111, 2190–2201. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.043

Allbrook, D.B., Han, M.F., Hellmuth, A.E., 1971. Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. Pathology 3, 233–243. https://doi.org/10.1080/00313027109073739

Allen, D.L., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. Muscle Nerve 22, 1350–1360. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199910)22:10<1350::AID-MUS3>3.0.CO;2-8

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K., 1996. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). Journal of Biological Chemistry 271, 20246–20249. https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246

Angelini, A., Li, Z., Mericskay, M., Decaux, J.-F., 2015. Regulation of Connective Tissue Growth Factor and Cardiac Fibrosis by an SRF/MicroRNA-133a Axis. PLoS ONE 10, e0139858. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139858

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., Chazaud, B., 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. Journal of Experimental Medicine 204, 1057–1069. https://doi.org/10.1084/jem.20070075

Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rüther, U., Nordheim, A., 1998. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. The EMBO Journal 17, 6289–6299. https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6289

Azam, H., Pierro, L., Reina, M., Gallagher, W.M., Prencipe, M., 2022. Emerging role for the Serum Response Factor (SRF) as a potential therapeutic target in cancer. Expert Opinion on Therapeutic Targets 26, 155–169. https://doi.org/10.1080/14728222.2022.2032652

Bahrami, S., Drabløs, F., 2016. Gene regulation in the immediate-early response process. Advances in Biological Regulation 62, 37–49. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001

Belaguli, N.S., Schildmeyer, L.A., Schwartz, R.J., 1997. Organization and Myogenic Restricted Expression of the Murine Serum Response Factor Gene. Journal of Biological Chemistry 272, 18222–18231. https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18222

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Rudnicki, M.A., 2012. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4, a008342–a008342. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342

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

Bi, P., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2018. Fusogenic micropeptide Myomixer is essential for satellite cell fusion and muscle regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115, 3864–3869. https://doi.org/10.1073/pnas.1800052115

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

Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J., 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. Nature 508, 483–487. https://doi.org/10.1038/nature13203

Biressi, S., Molinaro, M., Cossu, G., 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Developmental Biology 308, 281–293. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.006

Bjornson, C.R.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., Rando, T.A., 2012. Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. Stem Cells 30, 232–242. https://doi.org/10.1002/stem.773

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J., 2014. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. Physiological Reviews 94, 235–263. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013

Bois, P.R.J., Grosveld, G.C., 2003. FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. EMBO J 22, 1147–1157. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg116

Bothe, I., Deng, S., Baylies, M., 2014. PI(4,5)P2 regulates myoblast fusion through Arp2/3 regulator localization at the fusion site. Development 141, 2289–2301. https://doi.org/10.1242/dev.100743

Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., Arnold, H.H., 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. The EMBO Journal 8, 701–709. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03429.x

Bruusgaard, J.C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K., Gundersen, K., 2003. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied *in vivo*. The Journal of Physiology 551, 467–478. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045328

Bu, B., Crowe, M., Diao, J., Ji, B., Li, D., 2018. Cholesterol suppresses membrane leakage by decreasing water penetrability. Soft Matter 14, 5277–5282. https://doi.org/10.1039/C8SM00644J

Buckingham, M., 2007. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. Comptes Rendus Biologies 330, 530–533. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.03.015

Camacho, A., Martínez, B., Alvarez, S., Gil-Fournier, B., Ramiro, S., Hernández-Laín, A., Núñez, N., Simón, R., 2020. Carey-Fineman-Ziter Syndrome: A MYMK-Related Myopathy Mimicking Brainstem Dysgenesis. JND 7, 309–313. https://doi.org/10.3233/JND-200477

Cardasis, C.A., Cooper, G.W., 1975. An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: A satellite cell-muscle fiber growth unit. J. Exp. Zool. 191, 347–357. https://doi.org/10.1002/jez.1401910305

Carnac, G., Primig, M., Kitzmann, M., Chafey, P., Tuil, D., Lamb, N., Fernandez, A., 1998. RhoA GTPase and Serum Response Factor Control Selectively the Expression of MyoD

without Affecting Myf5 in Mouse Myoblasts. MBoC 9, 1891–1902. https://doi.org/10.1091/mbc.9.7.1891
Chal, J., Pourquié, O., 2017. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. Development 144, 2104–2122. https://doi.org/10.1242/dev.151035
Charrin, S., Latil, M., Soave, S., Polesskaya, A., Chrétien, F., Boucheix, C., Rubinstein, E., 2013. Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. Nat Commun 4, 1674. https://doi.org/10.1038/ncomms2675
Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., Li, Z., Daegelen, D., Tuil, D., 2006. New Role for Serum Response Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-Like Growth Factor 1 Pathways. Mol Cell Biol 26, 6664–6674. https://doi.org/10.1128/MCB.00138-06
Cheek, D.B., 1985. The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20-year study. Early Human Development 12, 211–239. https://doi.org/10.1016/0378-3782(85)90144-6
Cheek, D.B., Holt, A.B., Hill, D.E., Talbert, J.L., 1971. Skeletal Muscle Cell Mass and Growth: The Concept of the Deoxyribonucleic Acid Unit. Pediatr Res 5, 312–328. https://doi.org/10.1203/00006450-197107000-00004
Chen, E.H., 2011. Invasive Podosomes and Myoblast Fusion, in: Current Topics in Membranes. Elsevier, pp. 235–258. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385891-7.00010-6
Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., Wang, D.-Z., 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet 38, 228–233. https://doi.org/10.1038/ng1725
Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., 2003. Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. Annu. Rev. Biochem. 72, 175–207. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504
Chuang, M.-C., Lin, S.-S., Ohniwa, R.L., Lee, G.-H., Su, Y.-A., Chang, Y.-C., Tang, M.-J., Liu, Y.-W., 2019. Tks5 and Dynamin-2 enhance actin bundle rigidity in invadosomes to promote myoblast fusion. Journal of Cell Biology 218, 1670–1685. https://doi.org/10.1083/jcb.201809161
Collard, L., Herledan, G., Pincini, A., Randrianarison-Huetz, V., Guerci, A., Sotiropoulos, A., 2014. Nuclear actin and Mrtfs control disuse muscle atrophy *via* Srf activity regulation. Journal of Cell Science jcs.155911. https://doi.org/10.1242/jcs.155911
Collins, B.C., Arpke, R.W., Larson, A.A., Baumann, C.W., Xie, N., Cabelka, C.A., Nash, N.L., Juppi, H.-K., Laakkonen, E.K., Sipilä, S., Kovanen, V., Spangenburg, E.E., Kyba, M., Lowe, D.A., 2019. Estrogen Regulates the Satellite Cell Compartment in Females. Cell Reports 28, 368-381.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.025
Colom, A., Derivery, E., Soleimanpour, S., Tomba, C., Molin, M.D., Sakai, N., González-Gaitán, M., Matile, S., Roux, A., 2018. A fluorescent membrane tension probe. Nature Chem 10, 1118–1125. https://doi.org/10.1038/s41557-018-0127-3
Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., 1996. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. Cell Calcium 19, 365–374. https://doi.org/10.1016/S0143-4160(96)90109-8
Cossu, G., Tajbakhsh, S., 2007. Oriented Cell Divisions and Muscle Satellite Cell Heterogeneity. Cell 129, 859–861. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.029

Cristea, A., Qaisar, R., Edlund, P.K., Lindblad, J., Bengtsson, E., Larsson, L., 2010. Effects of aging and gender on the spatial organization of nuclei in single human skeletal muscle cells: Spatial arrangement of myonuclei with age. Aging Cell 9, 685–697. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00594.x

de la Pompa, J.L., Timmerman, L.A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A.J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., Crabtree, G.R., Mak, T.W., 1998. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. Nature 392, 182–186. https://doi.org/10.1038/32419

Degrelle, S.A., Gerbaud, P., Leconte, L., Ferreira, F., Pidoux, G., 2017. Annexin-A5 organized in 2D-network at the plasmalemma eases human trophoblast fusion. Sci Rep 7, 42173. https://doi.org/10.1038/srep42173

Demonbreun, A.R., Fahrenbach, J.P., Deveaux, K., Earley, J.U., Pytel, P., McNally, E.M., 2011. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. Human Molecular Genetics 20, 779–789. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq522

Dhanyasi, N., Segal, D., Shimoni, E., Shinder, V., Shilo, B.-Z., VijayRaghavan, K., Schejter, E.D., 2015. Surface apposition and multiple cell contacts promote myoblast fusion in Drosophila flight muscles. Journal of Cell Biology 211, 191–203. https://doi.org/10.1083/jcb.201503005

Dinev, D., Jordan, B.W.M., Neufeld, B., Lee, J., Lindemann, D., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2001. Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. EMBO Rep 2, 829–834. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve177

Dugina, V.B., Shagieva, G.S., Kopnin, P.B., 2019. Biological Role of Actin Isoforms in Mammalian Cells. Biochemistry Moscow 84, 583–592. https://doi.org/10.1134/S0006297919060014

Dupressoir, A., Vernochet, C., Harper, F., Guégan, J., Dessen, P., Pierron, G., Heidmann, T., 2011. A pair of co-opted retroviral envelope *syncytin* genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108. https://doi.org/10.1073/pnas.1112304108

Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., Gundersen, K., 2017. An apparent lack of effect of satellite cell depletion on hypertrophy could be due to methodological limitations. Response to 'Methodological issues limit interpretation of negative effects of satellite cell depletion on adult muscle hypertrophy.' Development 144, 1365–1367. https://doi.org/10.1242/dev.148163

Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., Gundersen, K., 2016. Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. Development 143, 2898–2906. https://doi.org/10.1242/dev.134411

Eigler, T., Zarfati, G., Amzallag, E., Sinha, S., Segev, N., Zabary, Y., Zaritsky, A., Shakked, A., Umansky, K.-B., Schejter, E.D., Millay, D.P., Tzahor, E., Avinoam, O., 2021. ERK1/2 inhibition promotes robust myotube growth via CaMKII activation resulting in myoblast-to-myotube fusion. Developmental Cell 56, 3349-3363.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.11.022

Englund, D.A., Figueiredo, V.C., Dungan, C.M., Murach, K.A., Peck, B.D., Petrosino, J.M., Brightwell, C.R., Dupont, A.M., Neal, A.C., Fry, C.S., Accornero, F., McCarthy, J.J., Peterson, C.A., 2020. Satellite Cell Depletion Disrupts Transcriptional Coordination and Muscle Adaptation to Exercise. Function 2, zqaa033. https://doi.org/10.1093/function/zqaa033

Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., Treisman, R., 2014. Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. Genes Dev. 28, 943–958. https://doi.org/10.1101/gad.239327.114

Fong Yew, S., 1998. Effects of prostaglandin F2α on intracellular pH, intracellular calcium, cell shortening and L-type calcium currents in rat myocytes. Cardiovascular Research 40, 538–545. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00195-3

Friday, B.B., Pavlath, G.K., 2001. A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells. Journal of Cell Science 114, 303–310. https://doi.org/10.1242/jcs.114.2.303

Frontera, W.R., Ochala, J., 2015. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. Calcif Tissue Int 96, 183–195. https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y

Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., 2007. Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. Stem Cells 25, 2448–2459. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0019

Fukushige, T., Brodigan, T.M., Schriefer, L.A., Waterston, R.H., Krause, M., 2006. Defining the transcriptional redundancy of early bodywall muscle development in *C. elegans* : evidence for a unified theory of animal muscle development. Genes Dev. 20, 3395–3406. https://doi.org/10.1101/gad.1481706

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N., 2000. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. Biochemical Journal 349, 629–634. https://doi.org/10.1042/bj3490629

Gamage, D.G., Leikina, E., Quinn, M.E., Ratinov, A., Chernomordik, L.V., Millay, D.P., 2017. Insights into the localization and function of myomaker during myoblast fusion. Journal of Biological Chemistry 292, 17272–17289. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811372

Gamage, D.G., Melikov, K., Munoz-Tello, P., Wherley, T.J., Focke, L.C., Leikina, E., Huffman, E., Diao, J., Kojetin, D.J., Prasad, V., Chernomordik, L.V., Millay, D.P., 2022. Phosphatidylserine orchestrates Myomerger membrane insertions to drive myoblast fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 119, e2202490119. https://doi.org/10.1073/pnas.2202490119

Ganassi, M., Badodi, S., Ortuste Quiroga, H.P., Zammit, P.S., Hinits, Y., Hughes, S.M., 2018. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. Nat Commun 9, 4232. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06583-6

García-Prat, L., Perdiguero, E., Alonso-Martín, S., Dell'Orso, S., Ravichandran, S., Brooks, S.R., Juan, A.H., Campanario, S., Jiang, K., Hong, X., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Flández, M., Moiseeva, V., Rebollo, E., Jardí, M., Sun, H.-W., Musarò, A., Sandri, M., del Sol, A., Sartorelli, V., Muñoz-Cánoves, P., 2020. FoxO maintains a genuine muscle stem-cell quiescent state until geriatric age. Nat Cell Biol 22, 1307–1318. https://doi.org/10.1038/s41556-020-00593-7

Gattazzo, F., Laurent, B., Relaix, F., Rouard, H., Didier, N., 2020. Distinct Phases of Postnatal Skeletal Muscle Growth Govern the Progressive Establishment of Muscle Stem Cell Quiescence. Stem Cell Reports 15, 597–611. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.07.011

Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., Lamb, N., 1996. Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing

and differentiating mouse C2C12 myoblasts. MBoC 7, 719–729. https://doi.org/10.1091/mbc.7.5.719

Girardi, F., Taleb, A., Ebrahimi, M., Datye, A., Gamage, D.G., Peccate, C., Giordani, L., Millay, D.P., Gilbert, P.M., Cadot, B., Le Grand, F., 2021. TGFβ signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. Nat Commun 12, 750. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20289-8

Goel, A.J., Rieder, M.-K., Arnold, H.-H., Radice, G.L., Krauss, R.S., 2017. Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. Cell Reports 21, 2236–2250. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.102

Goh, Q., Millay, D.P., 2017. Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. eLife 6, e20007. https://doi.org/10.7554/eLife.20007

Goh, Q., Song, T., Petrany, M.J., Cramer, A.A., Sun, C., Sadayappan, S., Lee, S.-J., Millay, D.P., 2019. Myonuclear accretion is a determinant of exercise-induced remodeling in skeletal muscle. eLife 8, e44876. https://doi.org/10.7554/eLife.44876

Golani, G., Leikina, E., Melikov, K., Whitlock, J.M., Gamage, D.G., Luoma-Overstreet, G., Millay, D.P., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., 2021. Myomerger promotes fusion pore by elastic coupling between proximal membrane leaflets and hemifusion diaphragm. Nat Commun 12, 495. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20804-x

Gopinath, S.D., Webb, A.E., Brunet, A., Rando, T.A., 2014. FOXO3 Promotes Quiescence in Adult Muscle Stem Cells during the Process of Self-Renewal. Stem Cell Reports 2, 414–426. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.02.002

Grefte, S., Kuijpers-Jagtman, A.M., Torensma, R., Von den Hoff, J.W., 2007. Skeletal Muscle Development and Regeneration. Stem Cells and Development 16, 857–868. https://doi.org/10.1089/scd.2007.0058

Grifone, R., Demignon, J., Houbron, C., Souil, E., Niro, C., Seller, M.J., Hamard, G., Maire, P., 2005. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. Development 132, 2235–2249. https://doi.org/10.1242/dev.01773

Gruenbaum-Cohen, Y., Harel, I., Umansky, K.-B., Tzahor, E., Snapper, S.B., Shilo, B.-Z., Schejter, E.D., 2012. The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 11211–11216. https://doi.org/10.1073/pnas.1116065109

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., Tuil, D., Daegelen, D., Sotiropoulos, A., 2012. Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Metabolism 15, 25–37. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.001

Guettler, S., Vartiainen, M.K., Miralles, F., Larijani, B., Treisman, R., 2008. RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but Not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding. Mol Cell Biol 28, 732–742. https://doi.org/10.1128/MCB.01623-07

Hammers, D.W., Hart, C.C., Matheny, M.K., Heimsath, E.G., Lee, Y. il, Hammer, J.A., Cheney, R.E., Sweeney, H.L., 2021. Filopodia powered by class x myosin promote fusion of mammalian myoblasts. eLife 10, e72419. https://doi.org/10.7554/eLife.72419

Hamoud, N., Tran, V., Aimi, T., Kakegawa, W., Lahaie, S., Thibault, M.-P., Pelletier, A., Wong, G.W., Kim, I.-S., Kania, A., Yuzaki, M., Bouvier, M., Côté, J.-F., 2018. Spatiotemporal regulation of the GPCR activity of BAI3 by C1qL4 and Stabilin-2 controls myoblast fusion. Nat Commun 9, 4470. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06897-5

Hamoud, N., Tran, V., Croteau, L.-P., Kania, A., Côté, J.-F., 2014. G-protein coupled receptor BAI3 promotes myoblast fusion in vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 3745–3750. https://doi.org/10.1073/pnas.1313886111

He, B., Reguart, N., You, L., Mazieres, J., Xu, Z., Lee, A.Y., Mikami, I., McCormick, F., Jablons, D.M., 2005. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. Oncogene 24, 3054–3058. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208511

Herberg, S., Gert, K.R., Schleiffer, A., Pauli, A., 2018. The Ly6/uPAR protein Bouncer is necessary and sufficient for species-specific fertilization. Science 361, 1029–1033. https://doi.org/10.1126/science.aat7113

Heredia, J.E., Mukundan, L., Chen, F.M., Mueller, A.A., Deo, R.C., Locksley, R.M., Rando, T.A., Chawla, A., 2013. Type 2 Innate Signals Stimulate Fibro/Adipogenic Progenitors to Facilitate Muscle Regeneration. Cell 153, 376–388. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053

Herman, I.M., 1993. Actin isoforms. Current Opinion in Cell Biology 5, 48–55. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(05)80007-9

Hernández, J.M., Podbilewicz, B., 2017. The hallmarks of cell-cell fusion. Development 144, 4481–4495. https://doi.org/10.1242/dev.155523

Hill, C.S., Wynne, J., Treisman, R., 1995. The Rho family GTPases RhoA, Racl , and CDC42Hsregulate transcriptional activation by SRF. Cell 81, 1159–1170. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80020-0

Hindi, S.M., Tajrishi, M.M., Kumar, A., 2013. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. Sci. Signal. 6. https://doi.org/10.1126/scisignal.2003832

Ho, I.-C., Kim, J.H.-J., Rooney, J.W., Spiegelman, B.M., Glimcher, L.H., 1998. A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15537–15541. https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15537

Horsley, V., Friday, B.B., Matteson, S., Kegley, K.M., Gephart, J., Pavlath, G.K., 2001. Regulation of the Growth of Multinucleated Muscle Cells by an Nfatc2-Dependent Pathway. Journal of Cell Biology 153, 329–338. https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.329

Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., Pavlath, G.K., 2003. IL-4 Acts as a Myoblast Recruitment Factor during Mammalian Muscle Growth. Cell 113, 483–494. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00319-2

Horsley, V., Pavlath, G.K., 2004. Forming a Multinucleated Cell: Molecules That Regulate Myoblast Fusion. Cells Tissues Organs 176, 67–78. https://doi.org/10.1159/000075028

Hsu, Y.-Y., Resto Irizarry, A.M., Fu, J., Liu, A.P., 2022. Mechanosensitive channel-based optical membrane tension biosensor (preprint). Biophysics. https://doi.org/10.1101/2022.10.04.510821

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M., 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature 434, 234–238. https://doi.org/10.1038/nature03362

Jeong, J., Conboy, I.M., 2011. Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes. Biochemical and Biophysical Research Communications 414, 9–13. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.128

Jiang, Y., Wang, Y., Wang, T., Hawke, D.H., Zheng, Y., Li, X., Zhou, Q., Majumder, S., Bi, E., Liu, D.X., Huang, S., Lu, Z., 2014. PKM2 phosphorylates MLC2 and regulates cytokinesis of tumour cells. Nat Commun 5, 5566. https://doi.org/10.1038/ncomms6566

Johansen, F.-E., Prywes, R., 1995. Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1242, 1–10. https://doi.org/10.1016/0304-419X(94)00014-S

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

Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., Kaibuchi, K., 1999. Phosphorylation of Myosin-Binding Subunit (Mbs) of Myosin Phosphatase by Rho-Kinase in Vivo. Journal of Cell Biology 147, 1023–1038. https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.1023

Kegley, K.M., Gephart, J., Warren, G.L., Pavlath, G.K., 2001. Altered Primary Myogenesis in NFATC3−/− Mice Leads to Decreased Muscle Size in the Adult. Developmental Biology 232, 115–126. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0179

Kelly, R.G., Zammit, P.S., Schneider, A., Alonso, S., Biben, C., Buckingham, M.E., 1997. Embryonic and Fetal Myogenic Programs Act through Separate Enhancers at the MLC1F/3F Locus. Developmental Biology 187, 183–199. https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8577

Kim, J.H., Chen, E.H., 2019. The fusogenic synapse at a glance. Journal of Cell Science 132, jcs213124. https://doi.org/10.1242/jcs.213124

Kim, J.-H., Han, G.-C., Seo, J.-Y., Park, I., Park, W., Jeong, H.-W., Lee, S.H., Bae, S., Seong, J., Yum, M.-K., Hann, S.-H., Kwon, Y.-G., Seo, D., Choi, M.H., Kong, Y.-Y., 2016. Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. Nat Cell Biol 18, 930–940. https://doi.org/10.1038/ncb3401

Kim, J.H., Ren, Y., Ng, W.P., Li, S., Son, S., Kee, Y.-S., Zhang, S., Zhang, G., Fletcher, D.A., Robinson, D.N., Chen, E.H., 2015. Mechanical Tension Drives Cell Membrane Fusion. Developmental Cell 32, 561–573. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.005

Kirby, T.J., Patel, R.M., McClintock, T.S., Dupont-Versteegden, E.E., Peterson, C.A., McCarthy, J.J., 2016. Myonuclear transcription is responsive to mechanical load and DNA content but uncoupled from cell size during hypertrophy. MBoC 27, 788–798. https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0585

Kitazawa, S., Ross, F.P., McHugh, K., Teitelbaum, S.L., 1995. Interleukin-4 Induces Expression of the Integrin αvβ3 via Transactivation of the β3 Gene. Journal of Biological Chemistry 270, 4115–4120. https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.4115

Klamut, H.J., Gangopadhyay, S.B., Worton, R.G., Ray, P.N., 1990. Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol Cell Biol 10, 193–205. https://doi.org/10.1128/mcb.10.1.193-205.1990

Koslov, M.M., Markin, V.S., 1984. A theory of osmotic lysis of lipid vesicles. Journal of Theoretical Biology 109, 17–39. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(84)80108-3

Krauss, R.S., Joseph, G.A., Goel, A.J., 2017. Keep Your Friends Close: Cell–Cell Contact and Skeletal Myogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 9, a029298. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029298

Kuang, S., Chargé, S.B., Seale, P., Huh, M., Rudnicki, M.A., 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. Journal of Cell Biology 172, 103–113. https://doi.org/10.1083/jcb.200508001

Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M.A., 2007. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. Cell 129, 999–1010. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044

Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., Ito, M., 1997. Rho-associated Kinase Directly Induces Smooth Muscle Contraction through Myosin Light Chain Phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 272, 12257–12260. https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12257

Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., Daegelen, D., 2008. Premature Aging in Skeletal Muscle Lacking Serum Response Factor. PLoS ONE 3, e3910. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003910

Landemaine, A., Rescan, P.-Y., Gabillard, J.-C., 2014. Myomaker mediates fusion of fast myocytes in zebrafish embryos. Biochemical and Biophysical Research Communications 451, 480–484. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.093

Laurin, M., Fradet, N., Blangy, A., Hall, A., Vuori, K., Côté, J.-F., 2008. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 15446–15451. https://doi.org/10.1073/pnas.0805546105

Le Grand, F., Jones, A.E., Seale, V., Scimè, A., Rudnicki, M.A., 2009. Wnt7a Activates the Planar Cell Polarity Pathway to Drive the Symmetric Expansion of Satellite Stem Cells. Cell Stem Cell 4, 535–547. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.013

Lee, D.M., Chen, E.H., 2019. *Drosophila* Myoblast Fusion: Invasion and Resistance for the Ultimate Union. Annu. Rev. Genet. 53, 67–91. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024603

Leikina, E., Gamage, D.G., Prasad, V., Goykhberg, J., Crowe, M., Diao, J., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., Millay, D.P., 2018. Myomaker and Myomerger Work Independently to Control Distinct Steps of Membrane Remodeling during Myoblast Fusion. Developmental Cell 46, 767-780.e7. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.006

Leikina, E., Melikov, K., Sanyal, S., Verma, S.K., Eun, B., Gebert, C., Pfeifer, K., Lizunov, V.A., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., 2013. Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion. Journal of Cell Biology 200, 109–123. https://doi.org/10.1083/jcb.201207012

Lenhart, K.C., Becherer, A.L., Li, J., Xiao, X., McNally, E.M., Mack, C.P., Taylor, J.M., 2014. GRAF1 promotes ferlin-dependent myoblast fusion. Developmental Biology 393, 298–311. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.06.025

Lepper, C., Conway, S.J., Fan, C.-M., 2009. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. Nature 460, 627–631. https://doi.org/10.1038/nature08209

Lepper, C., Partridge, T.A., Fan, C.-M., 2011. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Development 138, 3639–3646. https://doi.org/10.1242/dev.067595

Levaot, N., Ottolenghi, A., Mann, M., Guterman-Ram, G., Kam, Z., Geiger, B., 2015. Osteoclast fusion is initiated by a small subset of RANKL-stimulated monocyte progenitors, which can fuse to RANKL-unstimulated progenitors. Bone 79, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.021

L'honore, A., Lamb, N.J., Vandromme, M., Turowski, P., Carnac, G., Fernandez, A., 2003. MyoD Distal Regulatory Region Contains an SRF Binding CArG Element Required for MyoD Expression in Skeletal Myoblasts and during Muscle Regeneration. MBoC 14, 2151–2162. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0451

Li, S., Czubryt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., Olson, E.N., 2005. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 1082–1087. https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102

Li, S.-Z., Zhang, Z.-Y., Chen, J., Dong, M.-Y., Du, X.-H., Gao, J., Shu, Q.-P., Li, C., Liang, X.-Y., Ding, Z.-H., Du, R.-L., Wang, J., Zhang, X.-D., 2022. NLK is required for Ras/ERK/SRF/ELK signaling to tune skeletal muscle development by phosphorylating SRF and antagonizing the SRF/MKL pathway. Cell Death Discov. 8, 4. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00774-9

Lind, M., Deleuran, B., Yssel, H., Fink-Eriksen, E., Thestrup-Pedersen, K., 1995. IL-4 and IL-13, but not IL-10, are Chemotactic Factors for Human Osteoblasts. Cytokine 7, 78–82. https://doi.org/10.1006/cyto.1995.1010

Liu, Y., Tewari, R., Ning, J., Blagborough, A.M., Garbom, S., Pei, J., Grishin, N.V., Steele, R.E., Sinden, R.E., Snell, W.J., Billker, O., 2008. The conserved plant sterility gene *HAP2* functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes. Genes Dev. 22, 1051–1068. https://doi.org/10.1101/gad.1656508

López-Rodríguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., Rao, A., 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 7214–7219. https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7214

Luo, W., Li, E., Nie, Q., Zhang, X., 2015. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. IJMS 16, 26186–26201. https://doi.org/10.3390/ijms161125946

Luo, Z., Shi, J., Pandey, P., Ruan, Z.-R., Sevdali, M., Bu, Y., Lu, Y., Du, S., Chen, E.H., 2022a. The cellular architecture and molecular determinants of the zebrafish fusogenic synapse. Developmental Cell 57, 1582-1597.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.05.016

Luo, Z., Shi, J., Pandey, P., Ruan, Z.-R., Sevdali, M., Bu, Y., Lu, Y., Du, S., Chen, E.H., 2022b. The cellular architecture and molecular determinants of the zebrafish fusogenic synapse. Developmental Cell 57, 1582-1597.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.05.016

MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Developmental Cell 17, 9–26. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016

Machado, L., Esteves de Lima, J., Fabre, O., Proux, C., Legendre, R., Szegedi, A., Varet, H., Ingerslev, L.R., Barrès, R., Relaix, F., Mourikis, P., 2017. In Situ Fixation Redefines Quiescence and Early Activation of Skeletal Muscle Stem Cells. Cell Reports 21, 1982–1993. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.080

Mauro, A., 1961. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 9, 493–495. https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493

McCarthy, J.J., Dupont-Versteegden, E.E., Fry, C.S., Murach, K.A., Peterson, C.A., 2017. Methodological issues limit interpretation of negative effects of satellite cell depletion on adult muscle hypertrophy. Development 144, 1363–1365. https://doi.org/10.1242/dev.145797

McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., Van Zant, G., Campbell, K.S., Esser, K.A., Dupont-Versteegden, E.E., Peterson, C.A., 2011. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-

depleted skeletal muscle. Development 138, 3657–3666. https://doi.org/10.1242/dev.068858
McNally, A.K., Anderson, J.M., 2002. β1 and β2 Integrins Mediate Adhesion during Macrophage Fusion and Multinucleated Foreign Body Giant Cell Formation. The American Journal of Pathology 160, 621–630. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64882-1
Melendez, J., Sieiro, D., Salgado, D., Morin, V., Dejardin, M.-J., Zhou, C., Mullen, A.C., Marcelle, C., 2021. TGFβ signalling acts as a molecular brake of myoblast fusion. Nat Commun 12, 749. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20290-1
Millay, D.P., 2022. Regulation of the myoblast fusion reaction for muscle development, regeneration, and adaptations. Experimental Cell Research 415, 113134. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113134
Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. Nature 499, 301–305. https://doi.org/10.1038/nature12343
Millay, D.P., Sutherland, L.B., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2014. Myomaker is essential for muscle regeneration. Genes Dev. 28, 1641–1646. https://doi.org/10.1101/gad.247205.114
Minty, A., Kedes, L., 1986. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. Mol Cell Biol 6, 2125–2136. https://doi.org/10.1128/mcb.6.6.2125-2136.1986
Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., Treisman, R., 2003. Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. Cell 113, 329–342. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2
Mohler, W.A., Shemer, G., del Campo, J.J., Valansi, C., Opoku-Serebuoh, E., Scranton, V., Assaf, N., White, J.G., Podbilewicz, B., 2002. The Type I Membrane Protein EFF-1 Is Essential for Developmental Cell Fusion. Developmental Cell 2, 355–362. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00129-6
Monroy, J.A., Powers, K.L., Gilmore, L.A., Uyeno, T.A., Lindstedt, S.L., Nishikawa, K.C., 2012. What Is the Role of Titin in Active Muscle? Exercise and Sport Sciences Reviews 40, 73–78. https://doi.org/10.1097/JES.0b013e31824580c6
Moore, C.A., Parkin, C.A., Bidet, Y., Ingham, P.W., 2007. A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. Development 134, 3145–3153. https://doi.org/10.1242/dev.001214
Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., Kuroiwa, T., 2006. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. Nat Cell Biol 8, 64–71. https://doi.org/10.1038/ncb1345
Moss, F.P., Leblond, C.P., 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. Anat. Rec. 170, 421–435. https://doi.org/10.1002/ar.1091700405
Murach, K.A., White, S.H., Wen, Y., Ho, A., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., Peterson, C.A., 2017. Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. Skeletal Muscle 7, 14. https://doi.org/10.1186/s13395-017-0132-z
Murphy, M., Kardon, G., 2011. Origin of Vertebrate Limb Muscle, in: Current Topics in Developmental Biology. Elsevier, pp. 1–32. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00001-2

Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., Treisman, R., 1988. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. Cell 55, 989–1003. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9
Ober, C., Loisel, D.A., Gilad, Y., 2008. Sex-specific genetic architecture of human disease. Nat Rev Genet 9, 911–922. https://doi.org/10.1038/nrg2415
Oikawa, T., Matsuo, K., 2012. Possible role of IRTKS in Tks5-driven osteoclast fusion. Communicative & Integrative Biology 5, 511–515. https://doi.org/10.4161/cib.21252
Olguin, H.C., Olwin, B.B., 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. Developmental Biology 275, 375–388. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.015
Olson, E.N., Nordheim, A., 2010. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 353–365. https://doi.org/10.1038/nrm2890
Oren-Suissa, M., Podbilewicz, B., 2007. Cell fusion during development. Trends in Cell Biology 17, 537–546. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.09.004
Ottenheijm, C.A.C., Granzier, H., 2010. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. Physiology 25, 304–310. https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2010
Oustanina, S., Hause, G., Braun, T., 2004. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. EMBO J 23, 3430–3439. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600346
Park, S.-Y., Yun, Y., Lim, J.-S., Kim, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, J.-E., Kim, I.-S., 2016. Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. Nat Commun 7, 10871. https://doi.org/10.1038/ncomms10871
Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.-P., Paulin, D., Li, Z., Daegelen, D., 2004. Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality. Mol Cell Biol 24, 5281–5289. https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5281-5289.2004
Patrakka, J., Tryggvason, K., 2007. Nephrin – a unique structural and signaling protein of the kidney filter. Trends in Molecular Medicine 13, 396–403. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.06.006
Pei, J., Millay, D.P., Olson, E.N., Grishin, N.V., 2011. CREST - a large and diverse superfamily of putative transmembrane hydrolases. Biol Direct 6, 37. https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-37
Peng, X.L., So, K.K., He, L., Zhao, Y., Zhou, J., Li, Y., Yao, M., Xu, B., Zhang, S., Yao, H., Hu, P., Sun, H., Wang, H., 2017. MyoD- and FoxO3-mediated hotspot interaction orchestrates super-enhancer activity during myogenic differentiation. Nucleic Acids Research 45, 8785–8805. https://doi.org/10.1093/nar/gkx488
Perroud, J., Bernheim, L., Frieden, M., Koenig, S., 2017. Distinct roles of NFATc1 and NFATc4 in human primary myoblast differentiation and in reserve cell maintenance. Journal of Cell Science jcs.198978. https://doi.org/10.1242/jcs.198978
Petrany, M.J., Millay, D.P., 2019. Cell Fusion: Merging Membranes and Making Muscle. Trends in Cell Biology 29, 964–973. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.09.002
Peulen, Rademaker, Anania, Turtoi, Bellahcène, Castronovo, 2019. Ferlin Overview: From Membrane to Cancer Biology. Cells 8, 954. https://doi.org/10.3390/cells8090954

Podbilewicz, B., 2000. Membrane fusion as a morphogenetic force in nematode development. Nematol 2, 99–111. https://doi.org/10.1163/156854100508818

Podbilewicz, B., Leikina, E., Sapir, A., Valansi, C., Suissa, M., Shemer, G., Chernomordik, L.V., 2006. The C. elegans Developmental Fusogen EFF-1 Mediates Homotypic Fusion in Heterologous Cells and In Vivo. Developmental Cell 11, 471–481. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.004

Posern, G., Treisman, R., 2006. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. Trends in Cell Biology 16, 588–596. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008

Posey, A.D., Pytel, P., Gardikiotes, K., Demonbreun, A.R., Rainey, M., George, M., Band, H., McNally, E.M., 2011. Endocytic Recycling Proteins EHD1 and EHD2 Interact with Fer-1-like-5 (Fer1L5) and Mediate Myoblast Fusion. Journal of Biological Chemistry 286, 7379–7388. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157222

Pötgens, A.J.G., Drewlo, S., Kokozidou, M., Kaufmann, P., 2004. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. Human Reproduction Update 10, 487–496. https://doi.org/10.1093/humupd/dmh039

Powell, G.T., Wright, G.J., 2011. Jamb and Jamc Are Essential for Vertebrate Myocyte Fusion. PLoS Biol 9, e1001216. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001216

Price, M.A., Rogers, A.E., Treisman, R., 1995. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). The EMBO Journal 14, 2589–2601. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07257.x

Prives, J., Shinitzky, M., 1977. Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. Nature 268, 761–763. https://doi.org/10.1038/268761a0

Qaisar, R., Renaud, G., Morine, K., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Larsson, L., 2012. Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level? FASEB j. 26, 1077–1085. https://doi.org/10.1096/fj.11-192195

Quinn, M.E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D.G., Petrany, M.J., Prasad, V., Millay, D.P., 2017. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. Nat Commun 8, 15665. https://doi.org/10.1038/ncomms15665

Ramirez-Martinez, A., Zhang, Y., van den Boogaard, M.-J., McAnally, J.R., Rodriguez-Caycedo, C., Chai, A.C., Chemello, F., Massink, M.P.G., Cuppen, I., Elferink, M.G., van Es, R.J.J., Janssen, N.G., Walraven-van Oijen, L.P.A.M., Liu, N., Bassel-Duby, R., van Jaarsveld, R.H., Olson, E.N., 2022. Impaired activity of the fusogenic micropeptide Myomixer causes myopathy resembling Carey-Fineman-Ziter syndrome. Journal of Clinical Investigation 132, e159002. https://doi.org/10.1172/JCI159002

Randrianarison-Huetz, V., Papaefthymiou, A., Herledan, G., Noviello, C., Faradova, U., Collard, L., Pincini, A., Schol, E., Decaux, J.F., Maire, P., Vassilopoulos, S., Sotiropoulos, A., 2018. Srf controls satellite cell fusion through the maintenance of actin architecture. Journal of Cell Biology 217, 685–700. https://doi.org/10.1083/jcb.201705130

Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., Glimcher, L.H., 1998. Inhibitory Function of Two NFAT Family Members in Lymphoid Homeostasis and Th2 Development. Immunity 9, 627–635. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80660-3

Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G., 1997. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY:Regulation and Function. Annu. Rev. Immunol. 15, 707–747. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707

Rech, J., Barlat, I., Veyrune, J.L., Vie, A., Blanchard, J.M., 1994. Nuclear import of serum response factor (SRF) requires a short amino-terminal nuclear localization sequence and is independent of the casein kinase II phosphorylation site. Journal of Cell Science 107, 3029–3036. https://doi.org/10.1242/jcs.107.11.3029

Redelsperger, F., Raddi, N., Bacquin, A., Vernochet, C., Mariot, V., Gache, V., Blanchard-Gutton, N., Charrin, S., Tiret, L., Dumonceaux, J., Dupressoir, A., Heidmann, T., 2016. Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. PLoS Genet 12, e1006289. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006289

Reid, A.L., Wang, Y., Samani, A., Hightower, R.M., Lopez, M.A., Gilbert, S.R., Ianov, L., Crossman, D.K., Dell'Italia, L.J., Millay, D.P., van Groen, T., Halade, G.V., Alexander, M.S., 2020. DOCK3 is a dosage-sensitive regulator of skeletal muscle and Duchenne muscular dystrophy-associated pathologies. Human Molecular Genetics 29, 2855–2871. https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa173

Relaix, F., Zammit, P.S., 2012. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. Development 139, 2845–2856. https://doi.org/10.1242/dev.069088

Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S., Cohen, P., Unterman, T.G., 2001. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targetting. Biochemical Journal 354, 605–612. https://doi.org/10.1042/bj3540605

Richard, J.-P., Leikina, E., Langen, R., Henne, W.M., Popova, M., Balla, T., McMahon, H.T., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., 2011. Intracellular curvature-generating proteins in cell-to-cell fusion. Biochemical Journal 440, 185–193. https://doi.org/10.1042/BJ20111243

Rion, N., Castets, P., Lin, S., Enderle, L., Reinhard, J.R., Eickhorst, C., Rüegg, M.A., 2019. mTOR controls embryonic and adult myogenesis *via* mTORC1. Development dev.172460. https://doi.org/10.1242/dev.172460

Rodgers, J.T., King, K.Y., Brett, J.O., Cromie, M.J., Charville, G.W., Maguire, K.K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C.-R., Goodell, M.A., Rando, T.A., 2014. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. Nature 510, 393–396. https://doi.org/10.1038/nature13255

Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Mackey, A.L., Arnold, L., Ardjoune, H., Magnan, M., Sailhan, F., Chelly, J., Pavlath, G.K., Mounier, R., Kjaer, M., Chazaud, B., 2013. Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. Stem Cells 31, 384–396. https://doi.org/10.1002/stem.1288

Saez, R., Goñi, F.M., Alonso, A., 1985. The effect of bilayer order and fluidity on detergent-induced liposome fusion. FEBS Letters 179, 311–315. https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80541-X

Sakuma, K., Akiho, M., Nakashima, H., Akima, H., Yasuhara, M., 2008. Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1782, 453–461. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.03.008

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., Galy, A., 2011. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. Development 138, 3647–3656. https://doi.org/10.1242/dev.067587

Sampath, Srihari C., Sampath, Srinath C., Millay, D.P., 2018. Myoblast fusion confusion: the resolution begins. Skeletal Muscle 8, 3. https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3

Sapir, A., Choi, J., Leikina, E., Avinoam, O., Valansi, C., Chernomordik, L.V., Newman, A.P., Podbilewicz, B., 2007. AFF-1, a FOS-1-Regulated Fusogen, Mediates Fusion of the Anchor Cell in C. elegans. Developmental Cell 12, 683–698. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.003

Schiaffino, S., Mammucari, C., 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. Skeletal Muscle 1, 4. https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4

Schiaffino, S., Pierobon Bormioli, S., Aloisi, M., 1976. The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. Virchows Arch. B Cell Path. 21, 113–118. https://doi.org/10.1007/BF02899148

Schiaffino, S., Pierobon Bormioli, S., Aloisi, M., 1972. Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 11, 268–273. https://doi.org/10.1007/BF02889406

Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. Physiological Reviews 91, 1447–1531. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010

Schiaffino, S., Rossi, A.C., Smerdu, V., Leinwand, L.A., Reggiani, C., 2015. Developmental myosins: expression patterns and functional significance. Skeletal Muscle 5, 22. https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6

Schmalbruch, H., Hellhammer, U., 1976. The number of satellite cells in normal human muscle. Anat. Rec. 185, 279–287. https://doi.org/10.1002/ar.1091850303

Schmidt, M., Schüler, S.C., Hüttner, S.S., von Eyss, B., von Maltzahn, J., 2019. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. Cell. Mol. Life Sci. 76, 2559–2570. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6

Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O.M., Ruegg, U.T., Schittny, J., Müller, U., 2003. β1 Integrins Regulate Myoblast Fusion and Sarcomere Assembly. Developmental Cell 4, 673–685. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00118-7

Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, J., 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. Nat Cell Biol 3, 346–352. https://doi.org/10.1038/35070019

Segev, N., Avinoam, O., Podbilewicz, B., 2018. Fusogens. Current Biology 28, R378–R380. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.024

Sens, K.L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L., Chen, E.H., 2010. An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. Journal of Cell Biology 191, 1013–1027. https://doi.org/10.1083/jcb.201006006

Sheikh, F., Lyon, R.C., Chen, J., 2015. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease. Gene 569, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.027

Shi, J., Bi, P., Pei, J., Li, H., Grishin, N.V., Bassel-Duby, R., Chen, E.H., Olson, E.N., 2017. Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 11950–11955. https://doi.org/10.1073/pnas.1715229114

Shilagardi, K., Li, S., Luo, F., Marikar, F., Duan, R., Jin, P., Kim, J.H., Murnen, K., Chen, E.H., 2013. Actin-Propelled Invasive Membrane Protrusions Promote Fusogenic Protein

Engagement During Cell-Cell Fusion. Science 340, 359–363. https://doi.org/10.1126/science.1234781
Shore, P., Sharrocks, A.D., 1995. The MADS-Box Family of Transcription Factors. Eur J Biochem 229, 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x
Short, B., 2012. Protrusion drives osteoclast fusion. Journal of Cell Biology 197, 460–460. https://doi.org/10.1083/jcb.1974iti3
Singh, K., 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. https://doi.org/10.1111/febs.12188
Sohn, R.L., Huang, P., Kawahara, G., Mitchell, M., Guyon, J., Kalluri, R., Kunkel, L.M., 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. https://doi.org/10.1073/pnas.0904398106
Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., Treisman, R., 1999. Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics. Cell 98, 159–169. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81011-9
Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., Tuil, D., 1996. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. Mol Cell Biol 16, 6065–6074. https://doi.org/10.1128/MCB.16.11.6065
Sousa-Victor, P., García-Prat, L., Muñoz-Cánoves, P., 2022. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 23, 204–226. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00421-2
Srinivas, B.P., Woo, J., Leong, W.Y., Roy, S., 2007. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. Nat Genet 39, 781–786. https://doi.org/10.1038/ng2055
Stantzou, A., Schirwis, E., Swist, S., Alonso-Martin, S., Polydorou, I., Zarrouki, F., Mouisel, E., Beley, C., Julien, A., Le Grand, F., Garcia, L., Colnot, C., Birchmeier, C., Braun, T., Schuelke, M., Relaix, F., Amthor, H., 2017. BMP signaling regulates satellite cell dependent postnatal muscle growth. Development dev.144089. https://doi.org/10.1242/dev.144089
Stockdale, F.E., 1992. Myogenic cell lineages. Developmental Biology 154, 284–298. https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90068-R
Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Miano, J.M., 2006. Defining the mammalian CArGome. Genome Res. 16, 197–207. https://doi.org/10.1101/gr.4108706
Tajbakhsh, S., 2009. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. Journal of Internal Medicine 266, 372–389. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x
Taupin, C., Dvolaitzky, M., Sauterey, C., 1975. Osmotic pressure-induced pores in phospholipid vesicles. Biochemistry 14, 4771–4775. https://doi.org/10.1021/bi00692a032
Tidball, J.G., 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury: Medicine & Science in Sports & Exercise 27, 1022–1032. https://doi.org/10.1249/00005768-199507000-00011
Trappe, T.A., 2001. Skeletal Muscle PGF2 and PGE2 in Response to Eccentric Resistance Exercise: Influence of Ibuprofen and Acetaminophen. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86, 5067–5070. https://doi.org/10.1210/jc.86.10.5067

Treisman, R., 1995. Inside the MADS box. Nature 376, 468–469. https://doi.org/10.1038/376468a0

Treisman, R., 1994. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. Current Opinion in Genetics & Development 4, 96–101. https://doi.org/10.1016/0959-437X(94)90097-3

Treisman, R., 1987. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. The EMBO Journal 6, 2711–2717. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02564.x

Tseng, B.S., Kasper, C.E., Edgerton, V.R., 1994. Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. Cell Tissue Res 275, 39–49. https://doi.org/10.1007/BF00305374

Tsivitse, S., 2010. Notch and Wnt Signaling, Physiological Stimuli and Postnatal Myogenesis. Int. J. Biol. Sci. 268–281. https://doi.org/10.7150/ijbs.6.268

Tsuchiya, M., Hara, Y., Okuda, M., Itoh, K., Nishioka, R., Shiomi, A., Nagao, K., Mori, M., Mori, Y., Ikenouchi, J., Suzuki, R., Tanaka, M., Ohwada, T., Aoki, J., Kanagawa, M., Toda, T., Nagata, Y., Matsuda, R., Takayama, Y., Tominaga, M., Umeda, M., 2018. Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. Nat Commun 9, 2049. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04436-w

Valansi, C., Moi, D., Leikina, E., Matveev, E., Graña, M., Chernomordik, L.V., Romero, H., Aguilar, P.S., Podbilewicz, B., 2017. Arabidopsis HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens. Journal of Cell Biology 216, 571–581. https://doi.org/10.1083/jcb.201610093

Vandenburgh, H.H., Shansky, J., Solerssi, R., Chromiak, J., 1995. Mechanical stimulation of skeletal muscle increases prostaglandin F2? production, cyclooxygenase activity, and cell growth by a pertussis toxin sensitive mechanism. J. Cell. Physiol. 163, 285–294. https://doi.org/10.1002/jcp.1041630209

Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Carnac, G., Lamb, N., Fernandez, A., 1992. Serum response factor p67SRF is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines. Journal of Cell Biology 118, 1489–1500. https://doi.org/10.1083/jcb.118.6.1489

Varga, T., Mounier, R., Patsalos, A., Gogolák, P., Peloquin, M., Horvath, A., Pap, A., Daniel, B., Nagy, G., Pintye, E., Poliska, S., Cuvellier, S., Ben Larbi, S., Sansbury, B.E., Spite, M., Brown, C.W., Chazaud, B., Nagy, L., 2016. Macrophage PPARγ, a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. Immunity 45, 1038–1051. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.016

Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., Treisman, R., 2007. Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. Science 316, 1749–1752. https://doi.org/10.1126/science.1141084

Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H., Birchmeier, C., 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 8935–8940. https://doi.org/10.1073/pnas.0902501106

Verma, S.K., Leikina, E., Melikov, K., Chernomordik, L.V., 2014. Late stages of the synchronized macrophage fusion in osteoclast formation depend on dynamin. Biochemical Journal 464, 293–300. https://doi.org/10.1042/BJ20141233

Verma, S.K., Leikina, E., Melikov, K., Gebert, C., Kram, V., Young, M.F., Uygur, B., Chernomordik, L.V., 2018. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. Journal of Biological Chemistry 293, 254–270. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809681

Wakelam, M.J., 1985. The fusion of myoblasts. Biochemical Journal 228, 1–12. https://doi.org/10.1042/bj2280001
Wang, G., Zhu, H., Situ, C., Han, L., Yu, Y., Cheung, T.H., Liu, K., Wu, Z., 2018. p110α of PI3K is necessary and sufficient for quiescence exit in adult muscle satellite cells. EMBO J 37. https://doi.org/10.15252/embj.201798239
Wang, Q., Zhou, Y., Jackson, L.N., Johnson, S.M., Chow, C.-W., Evers, B.M., 2011. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling regulates PTEN expression and intestinal cell differentiation. MBoC 22, 412–420. https://doi.org/10.1091/mbc.e10-07-0598
Wang, R., Dang, Y.-L., Zheng, R., Li, Y., Li, W., Lu, X., Wang, L.-J., Zhu, C., Lin, H.-Y., Wang, H., 2014. Live Cell Imaging of In Vitro Human Trophoblast Syncytialization1. Biology of Reproduction 90. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114892
White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., Zammit, P.S., 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. BMC Dev Biol 10, 21. https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-21
Whitlock, J.M., Chernomordik, L.V., 2021. Flagging fusion: Phosphatidylserine signaling in cell–cell fusion. Journal of Biological Chemistry 296, 100411. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100411
Wiebel, F.F., Rennekampff, V., Vintersten, K., Nordheim, A., 2002. Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF. genesis 32, 124–126. https://doi.org/10.1002/gene.10049
Wilschut, J., Duzgunes, N., Hoekstra, D., Papahadjopoulos, D., 1985. Modulation of membrane fusion by membrane fluidity: temperature dependence of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles. Biochemistry 24, 8–14. https://doi.org/10.1021/bi00322a002
Witwicka, H., Nogami, J., Syed, S.A., Maehara, K., Padilla-Benavides, T., Ohkawa, Y., Imbalzano, A.N., 2019. Calcineurin Broadly Regulates the Initiation of Skeletal Muscle-Specific Gene Expression by Binding Target Promoters and Facilitating the Interaction of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzyme. Mol Cell Biol 39, e00063-19. https://doi.org/10.1128/MCB.00063-19
Wright, W.E., Sassoon, D.A., Lin, V.K., 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell 56, 607–617. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90583-7
Wu, B.-W., Wu, M.-S., Liu, Y., Lu, M., Guo, J.-D., Meng, Y.-H., Zhou, Y.-H., 2021. SIRT1-mediated deacetylation of NF-κB inhibits the MLCK/MLC2 pathway and the expression of ET-1, thus alleviating the development of coronary artery spasm. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 320, H458–H468. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00366.2020
Wu, P., Yong, P., Zhang, Z., Xu, R., Shang, R., Shi, J., Zhang, J., Bi, P., Chen, E., Du, S., 2022. Loss of Myomixer Results in Defective Myoblast Fusion, Impaired Muscle Growth, and Severe Myopathy in Zebrafish. Mar Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s10126-022-10159-3
Wu, Z., Woodring, P.J., Bhakta, K.S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J.R., Karin, M., Wang, J.Y.J., Puri, P.L., 2000. p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. Mol Cell Biol 20, 3951–3964. https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.3951-3964.2000
Xu, M., Chen, X., Chen, D., Yu, B., Huang, Z., 2017. FoxO1: a novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type

specification. Oncotarget 8, 10662–10674. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12891
Yamaguchi, M., Watanabe, Y., Ohtani, T., Uezumi, A., Mikami, N., Nakamura, M., Sato, T., Ikawa, M., Hoshino, M., Tsuchida, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsujikawa, K., Takeda, S., Yamamoto, H., Fukada, S., 2015. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. Cell Reports 13, 302–314. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.083
Yang, S.-T., Kreutzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V., Tamm, L.K., 2016. The role of cholesterol in membrane fusion. Chemistry and Physics of Lipids 199, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003
Yang, Y., Zhang, Y., Li, W.-J., Jiang, Y., Zhu, Z., Hu, H., Li, W., Wu, J.-W., Wang, Z.-X., Dong, M.-Q., Huang, S., Ou, G., 2017. Spectraplakin Induces Positive Feedback between Fusogens and the Actin Cytoskeleton to Promote Cell-Cell Fusion. Developmental Cell 41, 107-120.e4. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.006
Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A., 2013. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. Physiological Reviews 93, 23–67. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011
Zetser, A., Gredinger, E., Bengal, E., 1999. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Promotes Skeletal Muscle Differentiation. Journal of Biological Chemistry 274, 5193–5200. https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5193
Zhang, H., Wen, J., Bigot, A., Chen, J., Shang, R., Mouly, V., Bi, P., 2020. Human myotube formation is determined by MyoD–Myomixer/Myomaker axis. Sci. Adv. 6, eabc4062. https://doi.org/10.1126/sciadv.abc4062
Zhang, Q., Vashisht, A.A., O'Rourke, J., Corbel, S.Y., Moran, R., Romero, A., Miraglia, L., Zhang, J., Durrant, E., Schmedt, C., Sampath, Srinath C., Sampath, Srihari C., 2017. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. Nat Commun 8, 15664. https://doi.org/10.1038/ncomms15664
Zhang, X., Azhar, G., Helms, S.A., Wei, J.Y., 2011. Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor. J Biomed Sci 18, 15. https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-15
Zhong, R., Miao, R., Meng, J., Wu, R., Zhang, Y., Zhu, D., 2021. Acetoacetate promotes muscle cell proliferation via the miR-133b/SRF axis through the Mek-Erk-MEF2 pathway. ABBS 53, 1009–1016. https://doi.org/10.1093/abbs/gmab079
Zhou, S., Han, L., Wu, Z., 2022. A Long Journey before Cycling: Regulation of Quiescence Exit in Adult Muscle Satellite Cells. IJMS 23, 1748. https://doi.org/10.3390/ijms23031748