HAL
open science

Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique : Rôle particulier de l'Ω (2,6) sialylation

Amel Bouchatal

▶ **To cite this version:**

Amel Bouchatal. Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique : Rôle particulier de l'Ω (2,6) sialylation. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0016 . tel-01203347

HAL Id: tel-01203347

https://theses.hal.science/tel-01203347

Submitted on 30 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et génétique moléculaire

Présentée et soutenue par

Amel BOUCHATAL

Le 08 Avril 2015

Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique

Rôle particulier de l'(α2,6) sialylation

Thèse co-dirigée par le Professeur Abderrahman MAFTAH,

et le Docteur Paul-François GALLET

JURY

Président du jury

Mr. Jean-Michel PETIT, Professeur, Université de LIMOGES

Rapporteurs

Mme. Anne HARDUIN-LEPERS, Directeur de Recherche CNRS - HDR, Université de Lille1

Mr. Pascal MAIRE, Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin, Paris

Examinateurs

Mr. Yann GUERARDEL, Directeur de Recherche CNRS - HDR, Université de Lille1

Mr. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de LIMOGES

Mr. Paul-François GALLET, Maître de Conférences, Université de LIMOGES

Université de Limoges | FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et génétique moléculaire

Présentée et soutenue par

Amel BOUCHATAL

Le 08 Avril 2015

Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique
Rôle particulier de l'(α2,6) sialylation

Thèse co-dirigée par le Professeur Abderrahman MAFTAH,
et le Docteur Paul-François GALLET

JURY

Président du jury

Mr. Jean-Michel PETIT, Professeur, Université de LIMOGES

Rapporteurs

Mme. Anne HARDUIN-LEPERS, Directeur de Recherche CNRS- HDR, Université de Lille1

Mr. Pascal MAIRE, Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin, Paris

Examinateurs

Mr. Yann GUERARDEL, Directeur de Recherche CNRS- HDR, Université de Lille1

Mr. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de LIMOGES

Mr. Paul-François GALLET, Maître de Conférences, Université de LIMOGES

A mes parents

Les choses vont mieux quant un nombre suffisant de personnes décident qu'elles doivent aller mieux. Les choses changent lorsque les gens ordinaires décident de mener une action ensemble.

KOFI ANNAN, SECRETAIRE GENERAL DES NATIONS-UNIES, 1999.

Remerciements

3 ans… et quelques mois, c'est la fin… c'est avec une certaine nostalgie que j'ai envie de dire Oufff.

La thèse est plus qu'une incroyable expérience scientifique pleine de surprises et de rebondissements ; je trouve que tous les sentiments sont décuplés, notre joie extrême de voir des bandes apparaitre en western blot… et notre profond désespoir face à des cellules qui meurent sans raison… après 3 ans je reviens sur ce que j'ai gagné et ce que j'ai perdu…

J'ai gagné : outre l'aspect scientifique, des rencontres extraordinaires, des amitiés sincères, des moments de partage et de solidarité, des souvenirs plein la tête…

J'ai perdu : quelques kilos, et quelques cellules… rien de bien regrettable !

Pour débuter, je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

J'adresse donc mes sincères remerciements au Docteur Anne HARDUIN-LEPPERS, et au Docteur Pascal MAIRE, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Yann GUERARDEL, d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Mais je tiens surtout à le remercier pour notre précieuse collaboration, et pour son accueil au sein de son équipe particulièrement attachante. UN GRAND MERCI, à vous et à toute l'équipe pour votre accueil, votre gentillesse, vos conseils, mais surtout pour votre patience face à mon désarroi et mon niveau en biochimie ; Emmanuel je n'oublierai jamais ta bonne humeur et ton sourire.

J'ai entendu beaucoup de choses sur le Nord (J'ai regardé 'bienvenue chez les chtis' comme tout le monde), mais je tiens à rétablir certaines vérités, les lillois portent en eux le soleil qu'ils n'ont pas l'occasion de voir souvent, et si vous avez une petite place pour moi dans votre adorable ville, je viendrai avec grand plaisir.

Un grand merci au Professeur Jean-Michel PETIT d'avoir accepté d'être président de jury. Mais je tiens aussi à vous remercier pour vos encouragements, et votre suivi tout au long de ma thèse. Vos conseils sur le plan scientifique ont été d'une pertinence primordiale dans ce projet. Merci aussi de m'avoir fait confiance et de m'avoir associé à votre projet, ceci fut un très grand honneur pour moi. Je tiens aussi à vous remercier pour vos mails très encourageants durant ma convalescence, sachez qu'ils m'ont beaucoup touché !

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur Abderrahman MAFTAH. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe, vos conseils et votre suivi tout le long de ma thèse ont été d'un intérêt capital pour moi. J'essayerai toujours de me souvenir que je ne dois pas me disperser et aller droit au but. Surtout, un grand merci pour votre compréhension pendant les moments difficiles et pour vos encouragements tout au long de ma thèse.

François, je pense que les lignes ne vont pas me suffire pour te remercier, tu as été plus qu'un encadrant. Un grand merci d'abord de m'avoir supportée… (Je sais que je suis têtue, à la limite de l'insupportable à certains moments), mais aussi d'avoir toujours été présent scientifiquement et humainement, de m'avoir fait confiance et merci pour la liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de ma thèse. Merci pour ta gentillesse, tes encouragements, ta compréhension, et ton soutien indéfectible.

Je tiens à adresser un grand merci au Professeur Véronique BLANQUET, la directrice de l'école doctorale Biologie-santé. Au-delà de vos encouragements durant ma thèse, vous étiez la première à croire en moi. Merci d'avoir défendu ma cause en M2, c'est grâce à vous que j'ai obtenu ma place, merci pour tout ce que vous m'aviez appris durant cette année de M2 tant au niveau scientifique, qu'humain, merci d'avoir toujours gardé un œil protecteur sur moi.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale qui ont fait de ces années de thèse un moment si intense et intéressant.

Spéciale dédicace à Déborah, la plus fun des secrétaires de tous les temps, mais aussi, à Odile, je t'avoue que se séparer de Déborah a été un déchirement pour nous tous, mais ta gentillesse, et ta bonne humeur nous ont conquis, merci à toutes les deux.

Je remercie l'ensemble des ingénieurs et des techniciens pour leur disponibilité et leur soutien. Karine et Nathalie, grâce à vous je suis incollable sur l'hygiène et la sécurité, merci de veiller sur nous. Merci à Lionel pour les précieux conseils en biologie moléculaire. Un grand merci à

Fabienne et Emilie pour nos fructueuses collaborations ; Fabienne, travailler avec toi était une partie de plaisir, outre tes compétences et les magnifiques photos fluo, merci pour ta bonne humeur, et ta gentillesse. Emilie, je ne saurais trop te remercier pour ton engagement sans faille dans notre projet et les supers résultats obtenus grâce à tes compétences, merci aussi pour ta gentillesse et de m'avoir sauvé la mise plus d'une fois alors que j'étais désespérée avec mon ordinateur capricieux.

Je remercie l'ensemble des techniciens de surface qui veillent tous les jours à notre confort dans la joie et la bonne humeur, merci à Virginie, et une pensé pour Isaura qui m'a marqué par sa gentillesse sans limite, j'espère que tu profites bien de ta retraite.

Je remercie l'ensemble des doctorants pour tous ce qu'on a pu partager, merci à Luce pour ces soirées que tu as passé au laboratoire pour me permettre de ne pas me retrouver seule alors que j'étais en train de craquer sur ma rédaction, et pour les sushi « à pas d'heure » ! Et toutes ces superbes soirées qu'on a passé tous ensembles ; merci à Stéphane, mon ancien « colocataire de bureau » avec qui on a partagé bien des soirées et des vadrouilles, merci à Audrey pour les échanges scientifiques très pertinents que nous avons pu avoir, et les superbes soirées « tu es sans conteste la reine du barbecue ». Sans oublier, Victor avec sa légendaire discrétion mais qui peut se montrer surprenant après un ou deux verres pendant les séminaires.

Je remercie Billal et Rayane, mes compagnons du dimanche, pour ces weekends « culture cell » dans la bonne humeur, et pour nos discussions philosophiques-politiques qui pouvaient durer bien des heures.

Claire, je te remercie de m'avoir appris que le monde des bisounours existe vraiment, et qu'il y a des personnes qui y vivent, tu m'as fait rentrer dans ton univers, et tu m'as fait faire le tour, je ne pense pas retrouver une personne aussi fun, spontanée, et gentille que toi ; merci pour ces 3 années magiques.

Carole, ma petite libanaise préférée, merci pour ta gentillesse, ton sourire, tes petits brunchs libanais, et tous les moments de complicité que nous avons partagés. Tu nous as fait découvrir ta culture avec tellement d'amour, tu es toujours à l'écoute des autres, tu débordes de compréhension et de bon sens, tu es une personne extraordinaire.

Mélanie, franchement quand on te voit arriver dans tes petites robes BCBG, on ne s'attend pas à ta folie si charmante et délicate, un grand merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne. Tu m'as fait découvrir des choses tellement improbables (comme le poney aquatique…), tu es débordante d'énergie et d'imagination mais tu es surtout une cuisinière hors paire. Tes petits plats si raffinés m'ont beaucoup inspirée.

Vincent, Delphine mes amis cinéphiles, nous avons partagé tellement de séances ensemble, mais pas que… Delphine, tu es une personne d'une générosité incroyable, tu nous as toujours accueillis avec le sourire, merci pour tout et notamment pour nos craquages shopping pendant ma convalescence, tu as réussi à rendre cette période particulièrement pénible tellement plus douce. Vincent, en plus d'être un collaborateur de qualité, tu es un ami de choix, tu as toujours répondu présent, merci pour tout ce qu'on a partagé, en science et en dehors. Et merci à vous deux d'avoir partagé avec nous votre bonheur avec l'arrivée de la petite Eva.

Je tiens à remercier les nouvelles venues, Caro, et Jess, franchement, vous étiez ma plus belle surprise cette année. Vous avez apporté de la fraicheur au laboratoire. Caro, j'ai deux missions à accomplir avant de quitter le laboratoire, la première : détruire à jamais ton fer à repasser ; la deuxième : te trouver un mari. Je pense avoir plus de mal à accomplir la première tâche. Miss Guadeloupe, tu es sans conteste la personne la plus hilarante du laboratoire, ton sens de l'humour et ta bonne humeur quotidienne égayent mes journées. Merci pour ta spontanéité.

Un coucou aux stagiaires de M2, Thibault alias le bleu, Alexis, et Ludovic, je vous souhaite bonne chance, vous êtes des graines de chercheurs, j'espère que vous allez réussir. Alexis, merci pour toutes ces soirées délirantes de l'année dernière et pour ta gentillesse.

Je tiens à remercier tous les maitres de conférences et les professeurs du laboratoire pour leur soutien et leur aide.

Merci à Lætitia Magnol, pour ta gentillesse et les repas que nous avons pu partager. Merci à Laure Brémaud et Didier Delourme pour avoir partagé avec nous toutes ces histoires sur la Jordanie, et leur ouverture extraordinaire sur les autres.

Merci à Agnès GERMOT, pour ton aide en pédagogie, toujours avec le sourire, pour ta gentillesse et les légendaires «Bonsoir Amel !».

Sébastien, un grand merci pour ton aide précieuse en Biochimie et tes conseils dans l'établissement de mes protocoles, mais surtout merci pour tous ces weekends et ces vacances au laboratoire, dans la bonne humeur.

Fabrice, au-delà de ton aide indéfectible en M2, tu as toujours été là dans les moments de doute. Surtout un grand merci de m'avoir offert la possibilité de faire des enseignements pendant ma thèse, et tes précieux conseils en pédagogie. Grâce à cette petite expérience, je sais maintenant que j'adore enseigner et que c'est exactement ce que je veux faire de ma vie.

Je profite pour remercier mes étudiants de CPEL2-2014, c'était un grand plaisir de vous avoir comme première expérience d'enseignement, vous étiez juste supers, j'espère que vous allez réussir. Ainsi que mes étudiants de licence 1ere année-2015 pour tous ces TP de biodiversité dans la bonne humeur.

Un grand merci à tous mes enseignants de Master1 qui ont su garder un œil sur nous et qui nous ont tellement apporté ; particulièrement à Christophe SIRAC pour ton aide en pédagogie, et à Catherine RIOU, pour ta bonne humeur et nos pauses philosophiques (spécialement celles du dimanche), un grand merci à monsieur Fabrice LALOUE pour votre aide en pédagogie et pour votre gentillesse.

Daniel, je ne crois pas me tromper si je dis que tu as été un père pour moi pendant ces 3 années, ton sourire et ta bonne humeur remplissaient mes journées, je me rappellerai toujours de mon petit surnom « la petite souris transcendentale ». Au-delà de ça, un grand merci de m'avoir initiée à la zoologie, de m'avoir transmis ta passion et de m'avoir tellement aidée en pédagogie et pour nos petit repas mots fléchés et philosophie. Il aura fallu attendre les remerciements pour que je puisse te tutoyer, j'y suis arrivée…On peut collaborer en recherche maintenant, c'est parti…

Parlant des repas mot fléchés et philosophie, merci à Gaëlle SALADIN, et à Florence VALLET pour toute cette bonne humeur… Mamie Flo, tu es une vraie grand- mère pour moi, merci pour toutes tes délicates attentions, les TP avec toi c'est juste une partie de plaisir. Gaëlle, merci pour toutes nos pauses, ton sens du partage, ton aide précieuse en pédagogie, mais surtout pour ton extraordinaire sens de l'humour.

Ahmad, j'ai envie de commencer par dire merci pour nos cafés du matin à « pas d'heure », mais en fait ce n'était pas juste des pauses café mais un réel échange qui m'a aidé tout le long de ma thèse, je t'ai toujours tout dit, tu as toujours été à l'écoute et de très bon conseil, tu m'as toujours soutenue et encouragée, tu as toujours eu la blague qu'il faut pour me rendre le courage quand j'étais découragée et bien sûr un grand merci pour ma boîte de chocolats de Noël.

Khaled, ta rigueur scientifique et le chercheur qui est en toi m'ont toujours fascinée, ton aide en recherche m'a été très précieuse, j'ai beaucoup appris avec toi, je te remercie, mais c'est surtout pour votre si belle amitié que j'ai envie de vous remercier avec Khaoula, merci pour votre soutien et pour tous les moments que nous avons partagés. Nermine, merci pour toutes tes chansons, ton magnifique sourire innocent et tous les câlins et bisous auxquels j'ai eu droit.

Et bien sûr n'oubliant pas ceux qui sont partis mais qui restent dans nos cœurs, Renaud mon mentor en recherche, merci à toi et à Audrey pour votre belle amitié qui dure encore depuis des années. Merci à Almine et à Nathalie LE ROY Alias la monégasque pour tout ce qu'on a partagé. Nat, franchement le labo n'est plus le même depuis ton départ.

Sylvia, merci pour tous, tu es la personne la plus passionnée que j'ai rencontrée, un grand merci pour tes corrections, tes conseils et les supers légumes BIO de la herta.

Et un grand merci à Lamia pour tout ce que tu as fait pour moi, je n'oublierai jamais ces longues heures que vous avez passé à mon chevet à l'hôpital avec Anne à faire les pitres pour me rendre le sourire. Ton amitié m'est très chère.

Anne, ma grande sœur, ensemble on a réussi à construire quelque chose de tellement beau « la famille des petits scarabées », maman scarabée avec ta petite famille vous m'avez ouvert votre porte, votre cœur et vous m'avez entouré de votre amour, je ne me suis jamais sentie étrangère dans cette ville tellement loin des miens notamment grâce à vous. Tu resteras à jamais l'amie la plus fidèle et dévouée que j'ai eu la chance d'avoir, ta bonne humeur et ton rire communicatif resteront à jamais dans ma mémoire , et comme promis, même à l'autre bout de la planète je reviendrai tous les ans manger ma petite tarte au citron meringuée et faire une petite partie d'escalade.

Maya, et Rebecca, face à votre innocence la vie est juste belle, merci pour la grosse boite remplie de vos dessins, et tous nos après-midi débordants de créativité, mais aussi pour vos crêpes

préparées et tartinées avec tellement d'amour, et sans oublier la multitude de spectacles organisés en mon honneur. Stéphane merci d'avoir partagé ta merveilleuse famille avec moi et pour toutes les fois où tu m'as préparée à manger alors que j'étais à la limite de l'agonie par hypoglycémie.

Sofiane, comment te dire merci pour tout ça, grâce à toi ma dernière année de thèse était sucrée, merci simplement pour ce que tu es, c'est-à-dire un ami foncièrement serviable et gentil, tu donnes tellement sans jamais rien attendre en retour. Merci d'avoir refait ma culture humoristique, pour ta bonne humeur permanente, pour la force que tu transmets autour de toi, pour ton soutien indéfectible et tes encouragements… Et enfin pour toutes ces longues soirées chocovores de rédaction à la fac de médecine. Tu es une belle personne pleine de bon sens et de respect. MERCI POUR TOUT.

Je tiens à dire un GRAND MERCI, à mes parrains, Christine et Xavier pour leur soutien, leur amour, et leur protection. Vous étes une vrais famille pour moi, vous avez réussi à atténuer ma solitude, loin des miens, je ne vous oublierai jamais.

Je tiens à terminer ces remerciements par ceux grâce à qui j'ai l'occasion aujourd'hui d'écrire ces remerciements… Ma famille

Papa, Maman je pense que c'est indécent de prétendre vous remercier en quelques lignes pour tout ce que vous représentez pour moi et pour tout ce que vous m'avez apporté … Cette thèse pour nous est une revanche, aujourd'hui Maman tu pourras tenir ta promesse de revenir voir ces personnes à qui tu as tenu il ya déjà 20 ans ces propos : «ma fille survivra, elle grandira et deviendra docteur, et ce jour-là je reviendrai vous voir !».

Je sais à quel point cela a été dur pour vous d'avoir un enfant malade mais vous êtes toujours restés digne et fort face à ça, vous m'avez donné le courage de me battre, et de ne jamais baisser les bras. MERCI.

Papa, tu es mon exemple dans la vie, ta droiture et ton sens du principe m'ont toujours fasciné, je travaille tous les jours pour essayer d'atteindre ton niveau un jour, le chemin est encore long… ta protection et ton amour m'ont tellement apporté, tu as toujours cru en moi. Mais ce n'est pas pour tout ça que j'ai surtout envi de te remercier, je veux te dire MERCI de m'avoir donné le choix ; je me rappelais toujours de ta grimace quand je t'ai annoncé que je voulais devenir généticienne… Tu m'as répondu : « Fais ce que tu veux ! Mais fais le bien… »

Maman, je pense que je peux faire le tour du monde, je ne pourrai pas trouver une personne aussi généreuse et aimante que toi ! Tu m'as appris le partage et le pardon, tu as le cœur sur la main, merci pour tout ton amour et ton soutien indéfectible.

Mon petit frère, tu es un one-man-show à toi seul ! Tes blagues et tes bêtises délicates ont toujours mis une bonne humeur à la maison, tu es tellement intelligent, je suis sûre que tu feras de très grandes choses.

Vous êtes ma famille, mes repères, mon pilier, je vous aime…

UN GRAND MERCI A TOUS.

Communications et congrès

➢ Communications Orales :

- 16éme Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale 2013: Amboise, 2013 (France).

➢ Communications écrites :

- 9th International Symposium on Glycosyltransferases: Porto (Portugal) – 2014.

"Functional analysis of the impact of sialylation in myogenesis"

Amel BOUCHATAL, Fabienne BARAIGE, Nathalie DUPRAT, Emilie PINAULT, Abderrahman MAFTAH, Jean- Michel PETIT and Paul-François GALLET.

- Journée Scientifique GEIST 2014 : Limoges (France) – 2014.

"Alpha 2,6 sialylation modulates the C2C12 myoblasts differentiation"

Amel BOUCHATAL, Yann GUERARDEL, Emilie PINAULT, Fabienne BARAIGE, Nathalie DUPRAT, Abdou MAFTAH, Jean-Michel PETIT and Paul-François GALLET.

- 15éme Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale 2012: Ile d'Oléron (France) – 2012.

"Structural and functional analysis of the *N*-glycosylation of glycoproteins during muscle cell differentiation"

Amel BOUCHATAL, Abderrahman MAFTAH, Paul-François GALLET.

➢ Participations:

- Congrès du Groupe Français des Glycosciences : Les 24èmes Journées du GFG - domaine du ValJoly (France) - 2012.

- 17éme Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale : Jouy-en-Josas (France) - 2014.

Publications

- **Modifications of glycosylation-related genes expression in brains and spleens of mice infected with two strains of scrapie.**

  Amel Bouchatal[1], Annick Le-Dur[2], Daniel Petit[1], Raymond Julien[1], Hubert Laude[2], Paul-François Gallet[1]

  1 : INRA, UMR1061 Génétique Moléculaire Animale – Université de Limoges, 87060 Limoges, France.

  2 : INRA, UR892 Virologie Immunologie Moléculaires, 78350 Jouy-en-Josas, France.

  En correction pour une première soumission.

- **Regulation of glycosylation related gene expression during trans-differentiation of murine satellite cells.**

  Vincent Grassot[1,2], **Amel Bouchatal**[1,2], Anne Da Silva[1,2], Sandrine Chantepie[3,4], Dulce Papy-Garcia[3,4], Abderrahman Maftah[1,2], Paul-François Gallet[1,2] and Jean-Michel Petit[1,2]

  1 : INRA, UMR 1061, F- 87000 Limoges, France.

  2 : Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Unité de Génétique Moléculaire Animale, UGMA, F-87060 Limoges, France.

  3 : CNRS, EAC 7149, F-94000 Créteil, France.

  4 : Université Paris Est Créteil, Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire Croissance, Régénération, Réparation et Régénération Tissulaires, CRRET, F-94000 Créteil, France.

  En révision pour une seconde soumission.

- **Modification of alpha 2,6 sialylation mediates the differentiation of C2C12 myoblast cell line.**

  Amel Bouchatal[1,2], Vincent Grassot[1,2], Emilie Pinault[1,2], Fabienne Baraige[1,2], Nathalie Duprat[1,2], Yann Guerardel[3,4], Jean-Michel Petit[1,2], Abderrahman Maftah[1,2], Paul-François Gallet[1,2]

  1: Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Unité de Génétique Moléculaire Animale, UGMA, F-87060 Limoges, France.

  2: INRA, UMR 1061, F-87060 Limoges, France.

  3: Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France.

  4: CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France.

  Soumise.

Liste des abréviations

Ac: Anticorps
Ach: Acétylcholine
ActRIIa/IIb: Activin receptor type-IIa/IIb
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ADP: Adénosine diphosphate
AFM: Association Française Myopathie
Akt: Protein kinase A
ALK4/5: Activin receptor type-1B 4/5
AMPK: AMP-activated protein kinase
AP2: adipocyte fatty acid binding protein 2
APS: Ammonium persulfate
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messager
ARNi: ARN interférent
ARNr: ARN ribosomique
Asn: Asparagine
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Adénosine triphosphate
BAlk4/5: Activin-like kinase
BCR: B cell receptor
bHLH: Basic helix-loop-helix
BMP: Bone morphogenetic protein
BMPR: Bone morphogenetic protein receptor
BSA: Sérum albumine bovine
CBP: Acetyltransferase 2B associated factor
CDG: Congenital disorder of glycosylation
CDK: Cyclin-dependent kinase
c-Myc: Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CHST1: Carbohydrate sulfotransferase 1
CLL: Chronic lymphocytic leukaemia
CMP: Cytidine monophosphate
C-met: MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
Cer: Ceramide
Ct: Cycle threshold
C4ST-1: Chondroïtine 4-O-sulfotransférases-1
Dapi: 4',6-diamino-2-phénylindole
DGC: Dystrophin-associated Glycoprotein Complex
α-DG: α-Dystroglycanne
Dll: Delta-like
DM: Differentiation medium
DMEM: Dubelcco's modified Eagle's medium
DSA: *Datura stramonium* agglutinin
DSL : Delta, Serrate, Lag-2
DTT: Dithiotreitol
E-box : Enhancer box
EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique
EGF: Epidermal growth factor
EGF-like: Epidermal growth factor-like
eIF: Translation initiation factor
ELC: Essential light chain
EPO: Erythropoïétine
EPO-R: Erythropoïétine receptor
ERK1/2: Extracellular signal regulated kinase 1/2
ES: Cellules souches embryonnaires
4E-BP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
E12/E47: E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47
Eya: Eyes absent homolog protein
Fc: Fragment cristallisable des Ig
FKRP: Fukutin related protein
FGF: Fibroblast growth factor
FoxO: Forkhead box protein O
Fuc: Fucose
FUT: Fucosyltransferase
Gab1: GRB2-associated-binding protein 1
GAG: Glycosaminoglycanne
Gal: Galactose
GalNac: *N*-acétylgalactosamine
GalT: Galactosyltransférase
Gapdh: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénésase
GD2: Disialoganglioside
GDF: Growth and differentiation factor
GDP: Guanosine diphosphate
Glc: Glucose
GlcNAc: *N*-acétylglucosamine
GM: Growth medium
GM1/2/3: monosialotetrahexosylganglioside
GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin
GNE/MNK: UDP-*N*-acétylglucosamine 2-épimérase/*N*-acétylmannosamine kinase
GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2
G-Rho: Petites protéines G
GSK3: Glycogen synthase kinase 3
GTDC2: Glycosyltransferase-like domain containing 2
HCG: β-human chronic gonadotropin
Hesr: Hairy/Enhancer of split related protein
HIBM: Hereditary inclusion body myopathy
HGF: Hepatocyte growth factor
HS6ST: Héparane sulfate 6-*O*-sulfotransférase
IGF: Insulin-like growth factors
IGF-R: Insulin-like growth factor-receptor
IL-12: Interleukine 12
ITAM: Immunoreceptor tyrosine-base activation motifs
ITF1/2: Later renamed E2-2Alt
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-base inhibition motifs
ISPD: Isoprenoid synthase domain containing
JNK: c-Jun *N*-terminal kinase
KO: Knock-out

LacNAc: *N*-acetyl-D-lactosamine
LARGE: Acetylglucosaminyltransferase-like protein
Lbx1: Ladybird homeobox protein homolog 1
LC3: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain3
Lnfg: Lunatic fringe
MAA: *Maackia amurensis* agglutinin
MAFbx: Muscle atrophy F-box
Man: Mannose
ManNAc: *N*-Acetyl-D-mannosamine
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MCK: Créatine kinase musculaire
MCM1: Minichromosome maintenance protein 1
MEF2: Myocytes enhancer factor 2
MEK: MAPK/Erk kinase
Mesp2: Mesoderm posterior protein 2
MIS: Müllerian Inhibiting Substance
MIST1: Muscle, intestine and stomach expression
MNF: Myocyte nuclear factor
Mox2: Mesodermal transcription factor
MPC: Muscle progenitor cells
MPS : Mésoderme pré-somitique
MRF: Myogenic regulatory factor
MSD: Muscle specific domain
MSTN: Myostatine
Msx: Muscle-segment homeobox
mTOR: Mammalian target of rapamycin
MuRF1: Muscle RING-finger protein 1
Myf5: Myogenic factor 5
Myf6: Myogenic factor 6
MyoG: Myogénine
MyHC: Myosine heavy chain
MyoD: Myoblast determination protein
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide
NCAM: Neural cell adhesion molecule
NeuAc: Acide Neuraminique (Acide sialique)
Neu5Ac (NANA): 5-*N*-acétyl-neuraminique acid
Neu: Neuraminidase
NECD: Notch extracellular domain
NFATC2: Nuclear factor of actived T-cells
NFκB : Nuclear factor-κ-B
NICD: Notch intracellular domain
OMS: Organisation mondiale de la Santé
OGT: *O*-GlcNac-transférase
OST: Oligosaccharyltransférase
OMIM: Online mendelian inheritance in man
PAX-7/3: Paired box protein
PBS: Phosphate buffered salin
p.c: *Post coïtum*
pCAF: P300/CBP-associated factor
P-Dol: Dolichol phosphate
Pitx2: Pituitary homeobox 2
Pi3K: Phosphoinositide 3 kinase
PKC: Protéine kinase C
PMM: Phosphomannomutase
PNA: arachis hypogaea agglutinin
Pofut1: Protein-*O*-fucosyltransferase 1
Poglut1: Protein-*O*-glucosyltransferase 1
POMT1/2: Protein O-mannosyl-transferase 1
POMGnT1: Protein O-linked-mannose beta-1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1
Pparδ2: Peroxisome proliferator activated receptor gamma2
PSA: Polysialic acids
PSM: Mésoderme présomitique
P21/P16: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1/2A
P38: P38 mitogen-activated protein kinases
p300: p300-CBP coactivator family
RALDH2: Retinaldehyde dehydrogenase 2
Rb: Retinoblastoma protein
RLC: Regulatory light chain
REL: Réticulum endoplasmique lisse
RNase (ou ARNase): Ribonucléase
SA: Sialidases
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SePN: sélénoprotéine Np, protéine musculaire contenant du sélénium
SF: Scatter factor
Shh: Sonic hedgehog
ShRNA: Short hairpin Ribonucleic Acid
SIGLEC: Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
Six: Sine oculis homeobox homolog protein
sLex: Sialyl lewis x
Smad2/3: Sma mothers against decapentaplegic homolog
SNA: *Sambucus nigra* agglutinin
spl: Mutation split
SRF: Facteur de réponse au sérum
ST: Sialyltransférases
STn: sialyl-Tn
S6K1: Ribosomal protein S6 kinase1
TAD: Notch transactivation domain
Tbx1: T-box transcription factor 1
T-CD4: Lymphocytes T auxiliaires (helper)
TCF: T-cell factor
TEMED: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGFβ: Transforming growth factors β
TLDA: TaqMan Low Density Array
TNFα: Tumor necrosis factor α
Tris: Trishydroxyméthylaminométhane
TSR: Thrombospondine 1-repeats
UDP: Uridine diphosphate
UTR: Untranslated region
VCAM: Vascular cell adhesion molecule
Wnt: Wingless
Wt: Wild type
Xyl: xylose

Table des matières

Introduction 27
Chapitre I : Le muscle squelettique et la myogenèse 29
Partie 1 : Le muscle squelettique.....35
a) Les filaments épais 37
b) Les filaments fins.....37
Métabolisme du muscle squelettique 39
➢ Le système phosphagène 39
➢ La respiration cellulaire anaérobie 39
➢ La respiration cellulaire aérobie 41
Types de fibres musculaires 41
➢ Fibres de type I 41
➢ Fibres de type IIA 43
➢ Fibres de type IIX/IIB.....43
Partie 2 : Myogenèse et origine des muscles squelettiques chez les vertébrés - De la somitogenèse à la cellule migratrice 45
Partie 3 : Différenciation terminale de la cellule musculaire 55
- Des myoblastes à la fibre musculaire.....55
Encart 1 : Croissance néo-natale et post-natale du muscle squelettique..... 58
Les acteurs de la différenciation myogénique terminale.....59
1- Les MRFs.....59
2- Les facteurs Pax (Paired box protein).....63
3- Les protéines MADS-box 65
➢ Les Myocyte Enhancer Factors 2 (MEF2) 65
➢ Le facteur de Réponse au Sérum (SRF) 69
➢ Les facteurs de croissance IGFs 71
Les facteurs répresseurs de la myogenèse.....73
➢ Les facteurs de croissance TGF-β 73
➢ Le facteur de croissance FGF 75
Les voies de signalisation impliquées dans la myogenèse 77
➢ La voie PI3k-Akt 77
➢ La voie p38 MAPK.....77
➢ La voie de la petite protéine G Rho 79
➢ La voie de signalisation mTOR 81
Chapitre II : La glycosylation.....83
La *N*-glycosylation 91
La *O*-glycosylation 93
1. Le type mucine (*O*-GalNAc).....95
2. Le type *O*-GlcNAc 97
3. Le type protéoglycannes (*O*-xyl).....99
4. Le type collagène (*O*-Gal).....99

5. Le type *O*-Mannosylation (*O*-Man) 101
6. Le type *O*-Fucosylation (*O*-Fuc) 101
7. Le type *O*-glucosylation (*O*-Glc) 103
Les autres types de glycosylation - La *C*-mannosylation....105
La biosynthèse des glycoprotéines....107
Biosynthèse des *N*-glycannes....111
Extension des branches dans les *N*-glycannes de type complexe 113
Chapitre III : La sialylation 115
Les acides sialiques et leurs rôles biologiques 115
Les sialyltransférases....121
La famille des α(2,3) sialyltransférases 123
La famille des α(2,6) sialyltransférases 125
1. Les St6galNAc 125
2. Les St6galles 129
La famille des α(2,8) sialyltransférases 137
Les sialidases....141
Les altérations de la sialylation dans les désordres métaboliques....143
Chapitre IV : Fonctions des glycannes....147
Modulation des propriétés biologiques 151
1. Glycosylation et activité enzymatique des glycoprotéines 151
2. Glycosylation et transduction du signal 151
3. *N*-glycosylation et les désordres congénitaux de la glycosylation....153
4. Glycosylation et cancer....155
Glycosylation et myogenèse....161
1. La voie de Notch 167
2. Le dystroglycanne et les dystroglycanopathies....175
La sialylation et la myogenèse 179
Résultats 191
Partie 1 : Glycosylation périphérique et fusion myoblastique 193
Article 1- Modification of alpha 2,6 sialylation mediates the differentiation of C2C12 myoblast cell line 193
Résultats complémentaires :....229
1. Analyse structurale globale des glycoconjugués de surface 229
1. a. Approche par des lectines....229
i. Spécificité du marquage....231
ii. Détermination de la concentration saturante en lectines....231
1. b. Résultats du marquage PNA .... **Erreur ! Signet non défini.**
1. c. Analyse par spectrométrie de masse....233
i. Evolution des différents types de gangliosides lors du processus de différenciation myogénique 237
ii. Evolution des gangliosides durant la différenciation de la cellule musculaire 239
iii. Evolution de la sialylation des structures *N*-glycanniques lors du processus de différenciation myogénique....241
2. Evolution de la glycosylation d'une protéine candidate 243
2. a. Titration de la protéine prion par Elisa....245

2. b. Etat de glycosylation de la protéine prion 247
3. Etude fonctionnelle des populations clonales sous-exprimant *St6gal1* 249
3. a. Validation des clones sous-exprimant *St6Gal1* 251
i. Stabilité du transgène 251
ii. Validation par les lectines de l'hyposialylation périphérique en α2,6 253
iii. Test de prolifération 255
Discussion 257
Partie 2 : Glycosylation et adipogenèse 269
Article 2 - Glycosylation related genes are involved in regulation of early adipogenesis of murine satellite cells 271
Discussion 299
& 299
Conclusion 299
Discussion Générale 301
Conclusion et perspectives 311
Références 325

Table des illustrations

Figure 1: Structure du muscle squelettique. 34
Figure 2 : Représentation schématique d'un sarcomère. 36
Figure 3 : Composition des filaments fins et épais. 38
Figure 4: Prise en charge du glucose dans la cellule. 40
Figure 5 : Différents types de fibres. 42
Figure 6 : Le modèle « Clock and wavefront » de somitogenèse chez les vertébrés 46
Figure 7 : Les signaux contrôlant la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires. 48
Figure 8 : formation des progéniteurs myoblastiques à partir des somites. 50
Figure 9 : Facteurs impliqués dans la détermination des progéniteurs de différents muscles squelettiques : 52
Figure 10 : Représentation schématique de la différenciation myogénique terminale avec la hiérarchie d'expression des facteurs impliqués 54
Figure 11 : Equilibre de la régulation de la masse musculaire : exemple de voies de signalisation antagonistes impliquant IGF1 et la myostatine dans la régulation de la masse musculaire. 72
Figure 12 : Représentation schématique des structures glycanniques liées aux protéines et aux lipides. 86
Figure 13 : Liaisons sucre-protéine pour les *O*- et *N*-glycannes. 89
Figure 14 : Représentation schématique des structures glycanniques des trois principales classes de *N*-glycanne présents dans le règne eucaryote. 90
Figure 15 : Vue d'ensemble des différents noyaux *O*-glycanniques de type mucines. 92
Figure 16 : Biosynthèse des *O*-glycannes de type mucines. 94
Figure 17 : Structure des glycannes fucosylés les plus communs 100
Figure 18 .A : Synthèse et maturation des *N*-glycannes. 110
Figure 19 : Représentation schématique des structures *N*-glycanniques et des anténnages possibles. 114
Figure 20 : L'acide *N*-acétylneuraminique (NANA) est un constituant caractéristique des sucres aminés. Il est un dérivé de sucre (ose) à onze atomes de carbone. Ce sont des molécules qui proviennent de la condensation de l'acide pyruvique et d'un *N*-acetyl-D-mannosamine. 115
Figure 21 : Les motifs conservés de sialyltransférases. 122
Figure 22 : Représentation schématique des transcrits majoritaires de *ST6Gal I* 128
Figure 23 : Représentation schématique des transcrits connus de ST6GAL II humaine 130
Figure 24 : Interactions entre Lectines et glycannes 146
Figure 25 : Les motifs de glycosylation altérés sont une caractéristique du phénotype de la tumeur. 156
Figure 26 : Représentation schématique de la protéine Notch 1. 168
Figure 27 : Les glycannes portés par Notch1 chez la souris. 168
Figure 28 : Les voies canoniques de transduction du signal Notch1. 170
Figure 29 : Représentation schématique du complexe glycoprotéine/dystrophine (DGC). 174
Figure 30 : Représentation schématique du *O*-mannosylglycanne. 176
Figure 31 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du CMP-NeuAc. 178
Figure 32 : Tests de sensibilité des marquages par les lectines 230
Figure 33 : Mesure du signal émis par les lectines au contact de cellules C2C12 en prolifération. 232
Figure 34 : Fixation de la PNA des C2C12 avec la PNA : .... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 35 : Analyse des taux de gangliosides durant la différenciation des C2C12 236

Figure 36 : Evolution de la proportion de certains gangliosides durant la différenciation des cellules C2C12 238
Figure 37 : Analyse de la structure des *N*-glycannes durant la différenciation des C2C12.....240
Figure 38 : Etude de l'évolution de la protéine prion (Prnp) durant la différenciation de la cellule musculaire.....242
Figure 39: Résultat Elisa lectine sur la protéine prion au cours de la cinétique de différenciation des C1C12.....244
Figure 40 : Quantification de la protéine prion au cours de la cinétique de différenciation des C2C12.....244
Figure 41: Expression de *St6Gal1* dans différents clones C2C12 transfectés stablement par le vecteur pSiren-Sh *St6Gal1* 250
Figure 42: Détection de la α2, 6 sialylation sur les clones sous exprimant la St6gal1 253
Figure 43: Test de prolifération sur les clones pSiren St6Gal1.....254

Table des tableaux

Tableau 1 : Les monosaccharides les plus couramment observés dans les structures des glycannes. 85
Tableau 2 : Les différents types de *O*-glycannes chez les mammifères. 93
Tableau 3 : Liste des sialyltransférases 120
Tableau 4 : Exemples de quelques motifs antigéniques avec les tissus cancéreux au sein desquels ils sont exprimés. 158
Tableau 5 : Masses moléculaires des céramides et des structures sialylées.....235

Introduction

Chapitre I : Le muscle squelettique et la myogenèse

Il existe trois catégories de muscles dans l'organisme : le muscle lisse, le muscle strié cardiaque et le muscle strié squelettique. Bien qu'ils soient physiologiquement différents, qu'ils fonctionnent différemment et qu'ils soient innervés par différentes parties du système nerveux ; ils sont tous constitués de la même unité cellulaire appelée fibre musculaire.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement au muscle strié squelettique qui représente environ 40% de la masse corporelle totale d'un individu sain. Ce tissu remplit des fonctions primordiales telles que la locomotion, la respiration, la thermogenèse, la régulation des métabolismes lipidique et glucidique. De plus, le tissu musculaire est doté d'une plasticité qui lui permet de s'adapter aux changements physiologiques ou environnementaux, tels que la croissance et la stimulation mécanique.

Le tissu musculaire est constitué d'un assemblage de cellules possédant des capacités contractiles et métaboliques importantes. Nous retrouvons ainsi des fibres musculaires rapides au métabolisme glycolytique et des fibres musculaires lentes au métabolisme oxydatif. Le maintien d'une masse musculaire adéquate est primordial pour la survie et l'équilibre de l'individu. Deux phases importantes régissent ce maintien. En premier lieu, la différenciation myogénique qui se déroule aux stades embryonnaire et post-natal. Cette différentiation peut se réactiver à l'âge adulte pour la régénération musculaire suite à une lésion du tissu. En second lieu, nous retrouvons le contrôle de la taille de la fibre musculaire qui peut dépendre de plusieurs facteurs notamment l'alimentation, l'âge, ou encore l'état pathologique de l'individu.

Le muscle squelettique strié est constitué de trois type de cellules : Les cellules *extra fusales* ou myotubes, qui sont majoritaires, les cellules satellites, et les cellules du fuseau neuromusculaire dites *intra fusales*. Les cellules *extra fusale*s sont considérées comme l'unité structurelle et fonctionnelle du fuseau musculaire. Elles présentent un intérêt particulier pour notre travail, et plus particulièrement les étapes de développement de celles-ci, et ce dans un contexte de glycosylation, mécanisme sur lequel nous reviendrons en détail dans le prochain chapitre.

Les myotubes dérivent des cellules progénitrices musculaires appelées MPCs pour « Muscle Progenitor Cells » qui ont elles-mêmes pour origine les cellules somitiques. En effet, durant le développement embryonnaire, les cellules souches mésodermiques s'engagent dans un des multiples lignages cellulaires possibles, notamment dans le lignage musculaire.

Pour donner naissance aux myotubes, les MPCs subissent une première étape de détermination qui conduit à leur conversion en myoblastes. L'expression des facteurs de transcription *Pax3* et *Pax7* (Paired box protein) dans les cellules progénitrices contribue à l'expansion myogénique. Après l'induction des facteurs *MyoD* et *Myf5 (respectivement : Myoblast determination protein, et Myogenic factor 5)*, les cellules progénitrices mésodermiques sont engagées dans le lignage musculaire. Plus tard, l'activation des facteurs myogéniques secondaires (MYOG, et MYF6) (respectivement : Myogénine et Myogenic factor 6) induit la différenciation musculaire terminale des myoblastes en myocytes. Nous reviendrons sur ces notions dans la partie myogenèse.

Ces myocytes ne sont dès lors plus multipotentes. Ils possèdent la capacité de se diviser pour donner naissance à une population suffisante de cellules déterminées. Sous l'influence de nouveaux signaux, notamment la protéine P21, les myocytes quittent de manière irréversible le cycle cellulaire et commencent à migrer et à s'aligner les uns par rapport aux autres. Leur fusion donne ainsi naissance à des myotubes multi-nucléés. Ces cellules, sous l'influence d'autres facteurs, expriment des protéines spécifiques comme la Créatine Kinase Musculaire (MCK) ou encore les chaines lourdes de la myosine (MyHC «Myosine Heavy Chain»).

Pendant la phase plus tardive de la myogenèse embryonnaire, une population cellulaire distincte de myoblaste, dérivée des cellules satellites du muscle, fusionne avec les fibres musculaires existantes permettant à celles-ci de croître. Cependant, certaines cellules satellites restent associées aux myofibres sous une forme quiescente et dans un état indifférencié (Charge, 2004).

Enfin, les myotubes vont subir une dernière étape de maturation avec l'établissement de leur innervation par le motoneurone, pour donner des myofibres musculaires striées. Chaque fibre individuelle représente une unité de base du système musculaire. Elle contient environ une centaine de noyaux situés en périphérie. La plus grande partie du cytoplasme de ces cellules (appelé également sarcoplasme ou myoplasme) est constituée de milliers de myofibrilles organisées en faisceaux ***(Figure 1)***. Une myofibrille est constituée d'une succession de cylindres allongés dans le sens de la cellule, les sarcomères, qui donnent son aspect strié à la cellule musculaire squelettique.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le processus de différenciation musculaire terminale, il est fréquent d'utiliser des cellules en culture, soit *ex vivo* avec l'utilisation de cellules isolées à partir de tissus musculaires (culture primaire) ou encore *in vitro* avec l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. Les lignées cellulaires myoblastiques les plus utilisées sont les lignées murines C2C12 et les lignées de rat L6 et L8. Il est à noter que l'utilisation d'autres lignées cellulaires pour l'étude de la première phase de développement et de détermination est aussi possible, avec notamment la lignée 10T1/2 qui est capable de donner d'autres types cellulaires outre les myoblastes.

Dans le cadre de ce travail, je m'attacherai à décrire la lignée C2C12, qui a été utilisée pour la réalisation de l'essentiel des manipulations. Cette lignée myoblastique murine a été isolée et caractérisée par l'équipe de Saxel en 1977 (Yaffe and Saxel, 1977). Il s'agit d'un sous clone de la lignée C2, obtenue à partir du muscle squelettique des membres postérieurs d'une souris C3H adulte.

Les cellules C2C12 représentent actuellement un modèle de référence quant à l'étude de l'équilibre prolifération/différenciation du muscle squelettique strié. En effet, cette lignée est capable, dans des conditions appropriées de culture, de mimer les phases de prolifération et de différenciation myogénique.

De façon générale, l'utilisation des lignées cellulaires présente un intérêt majeur pour l'étude des processus myogéniques dans un environnement extrêmement contrôlé (pas d'influence des cellules non musculaires ni du microenvironnement caractéristique de l'*in vivo*). Les résultats obtenus sont ainsi fiables et comparables. De plus, l'utilisation de lignées nous permet de nous affranchir des questions de bioéthique posées par l'expérimentation animale, lesquelles peuvent être très limitantes. Enfin, les lignées simplifient l'étude de processus souvent trop complexes pour être étudiés dans leur globalité.

Cependant, l'utilisation de ces lignées introduit forcément un biais dans les résultats et dans l'interprétation des données du fait que ces cellules immortalisées s'éloignent quelque peu du processus *in vivo*. Etant donné la complexité des phénomènes étudiés, l'utilisation de lignées paraît incontournable. Evidemment l'inconvénient inhérent à ces pratiques concerne les résultats expérimentaux qui, étant donné le cadre simplifié dans lequel ils ont été obtenus, peuvent difficilement être transposables dans leur globalité à la réalité de l'organisme.

Dans ce chapitre, j'introduirai le muscle squelettique strié et son développement chez les vertébrés, en commençant par le développement embryonnaire. Par la suite, je m'attarderai sur les facteurs qui régissent ce développement chez les mammifères, aux stades embryonnaire et adulte.

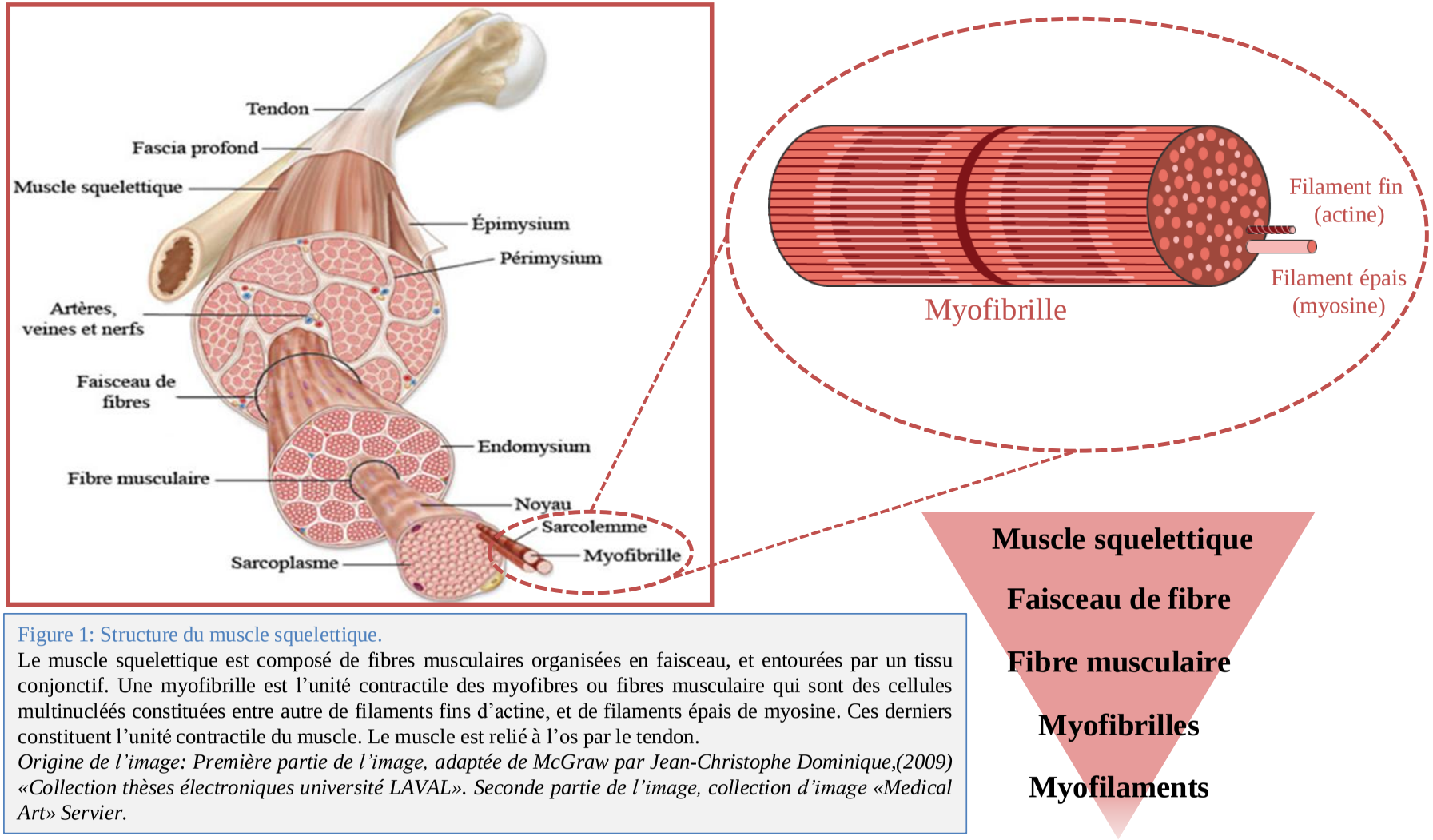


Figure 1: Structure du muscle squelettique.
Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires organisées en faisceau, et entourées par un tissu conjonctif. Une myofibrille est l'unité contractile des myofibres ou fibres musculaire qui sont des cellules multinucléés constituées entre autre de filaments fins d'actine, et de filaments épais de myosine. Ces derniers constituent l'unité contractile du muscle. Le muscle est relié à l'os par le tendon.
Origine de l'image: Première partie de l'image, adaptée de McGraw par Jean-Christophe Dominique,(2009) «Collection thèses électroniques université LAVAL». Seconde partie de l'image, collection d'image «Medical Art» Servier.

Partie 1 : Le muscle squelettique

Le muscle est un tissu contractile excitable. Le corps humain comprend plus de 640 muscles squelettiques dont la taille varie selon la fonction. Une majorité de muscles squelettiques sont liés directement au squelette par le biais des tendons ***(Figure 1)***.

L'unité de base du muscle squelettique est la fibre ou cellule musculaire striée. Ces fibres sont des cellules plurinucléées, de longueur très variable.

Elles mesurent de 10 à 100 µm de diamètre, et elles peuvent atteindre les 30 cm de longueur. Pour constituer les faisceaux, les fibres adoptent une disposition parallèle les unes par rapport aux autres, et s'organisent longitudinalement par rapport à l'axe du tissu.

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composants des muscles squelettiques. Trois types se distinguent : L'endomysium qui entoure chaque fibre individuellement; le périmysium qui permet l'assemblage de 10 à 100 fibres en faisceaux; enfin l'épimysium qui enveloppe l'ensemble du muscle. Le prolongement de ces conjonctifs au-delà du muscle constitue les tendons permettant l'attachement du muscle au périoste des os ***(Figure 1)***.

A l'intérieur des fibres, on retrouve les myofibrilles, elles même constituées de protéines contractiles organisées en sarcomères. Ces myofibrilles sont des structures alignées, entourées par le sarcolemme dans un réticulum appelé sarcoplasmique. Une série de bandes claires et sombres se succèdent transversalement le long de la myofibrille (Sanger *et al.*, 2010). Les propriétés contractiles des cellules musculaires découlent de la présence de ces bandes constituées de microfilaments de myosine dits épais et les microfilaments d'actine dits fins (Huxley, 1985, 2002) ***(Figure 2)***.

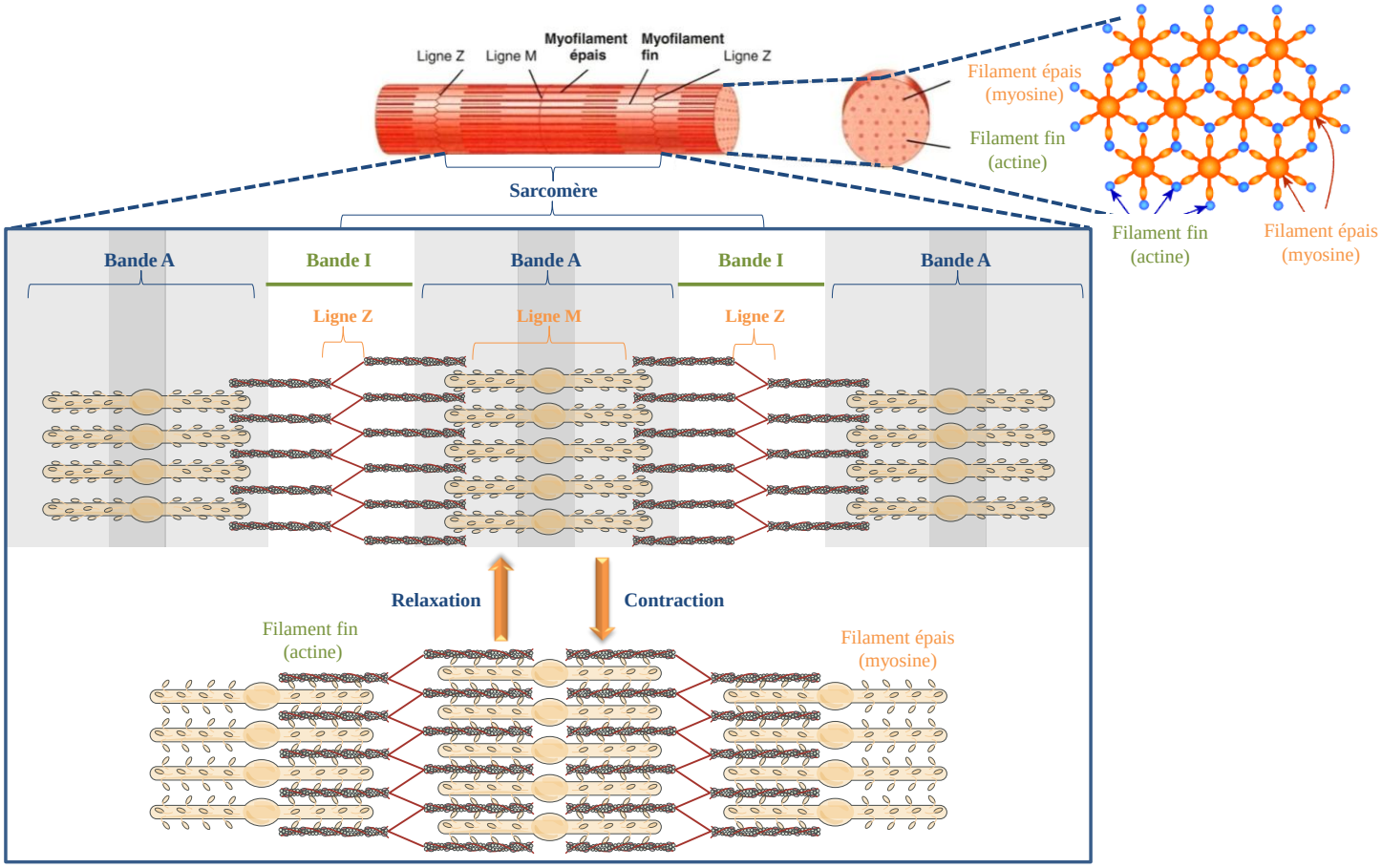


Figure 2 : Représentation schématique d'un sarcomère.

Le sarcomère regroupe des filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. Les filaments d'actine sont ancrés dans la zone Z ou la ligne Z, les filaments de myosine sont situés au centre du sarcomère et constituent la bande A. La ligne M correspond à la bande sombre qui représente la région centrale des filaments épais. La bande I est la région claire au niveau de laquelle les filaments fins ne sont pas recouverts par les filaments épais. *Origine de l'Image: Collection d'image «Medical Art» Servier. Adaptée en partie de* (Ottenheijm *et al.*, 2008)

a) Les filaments épais

Ils sont principalement constitués par la myosine. Deux sous-unités de myosine s'associent en une structure hélicoïdale présentant une partie C-terminale correspondant à la queue de la molécule et en N-terminal, les têtes globuleuses qui font saillie. Ces têtes forment des ponts entre les filaments épais et fins. Chaque pont possède deux sites fondamentaux dans le processus contractile : le site de la liaison de l'actine et le site de l'ATPase ***(Figure 3)***. En plus des chaines lourdes, la structure de ces filaments se caractérise par la présence de chaines légères ELC et RLC pour respectivement (Essential light chain et Regulatory light chain)

b) Les filaments fins

Ils sont constitués de trois type de protéines : L'actine, la troponine, et la tropomyosine. Le monomère « d'actine G » constitue la protéine de base. Elle présente une forme sphérique, et posséde un site de liaison à la myosine. Les molécules d'actine polymérisent pour former des filaments appelés « actine F ». Ces derniers sont composés de deux chaines linéaires qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice. La tropomyosine forme des filaments disposés au creux du sillon de la spirale d'actine. Dans cette position, la tropomyosine masque les sites de liaison de l'actine à la myosine et s'oppose à leur interaction. Enfin, la troponine est en réalité constituée de trois sous-unités : La tropinine I qui possède l'activité inhibitrice de l'ATPase de la myosine, la troponine T qui est responsable de la liaison du trimère de troponine à la tropomyosine et la troponine C qui fixe le calcium ***(Figure 3)***. Les filaments épais se positionnent au milieu du sarcomère, avec un arrangement parfaitement parallèle responsable de l'aspect sombre caractéristique de la bande A. Les filaments fins viennent recouvrir en partie les filaments épais, leur régulation conduit à l'amorçage de la contraction. Les frontières du sarcomère sont délimitées par deux bandes Z, constituées par un réseau protéique représentant le point d'ancrage des filaments fins. La bande claire, également nommée bande I, se situe entre deux bandes A de deux sarcomères adjacents. Finalement, nous retrouvons la région H qui est à la région étroite constituée uniquement par des filaments épais (Sanger *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

La contraction musculaire est dépendante du calcium qui se lie à la tropomyosine. Quand le calcium est absent, la tropomyosine est stabilisée en position bloquante et masque les sites de liaison de l'actine pour la myosine, empêchant les têtes des molécules de myosine d'entrer en contact avec les filaments d'actine.

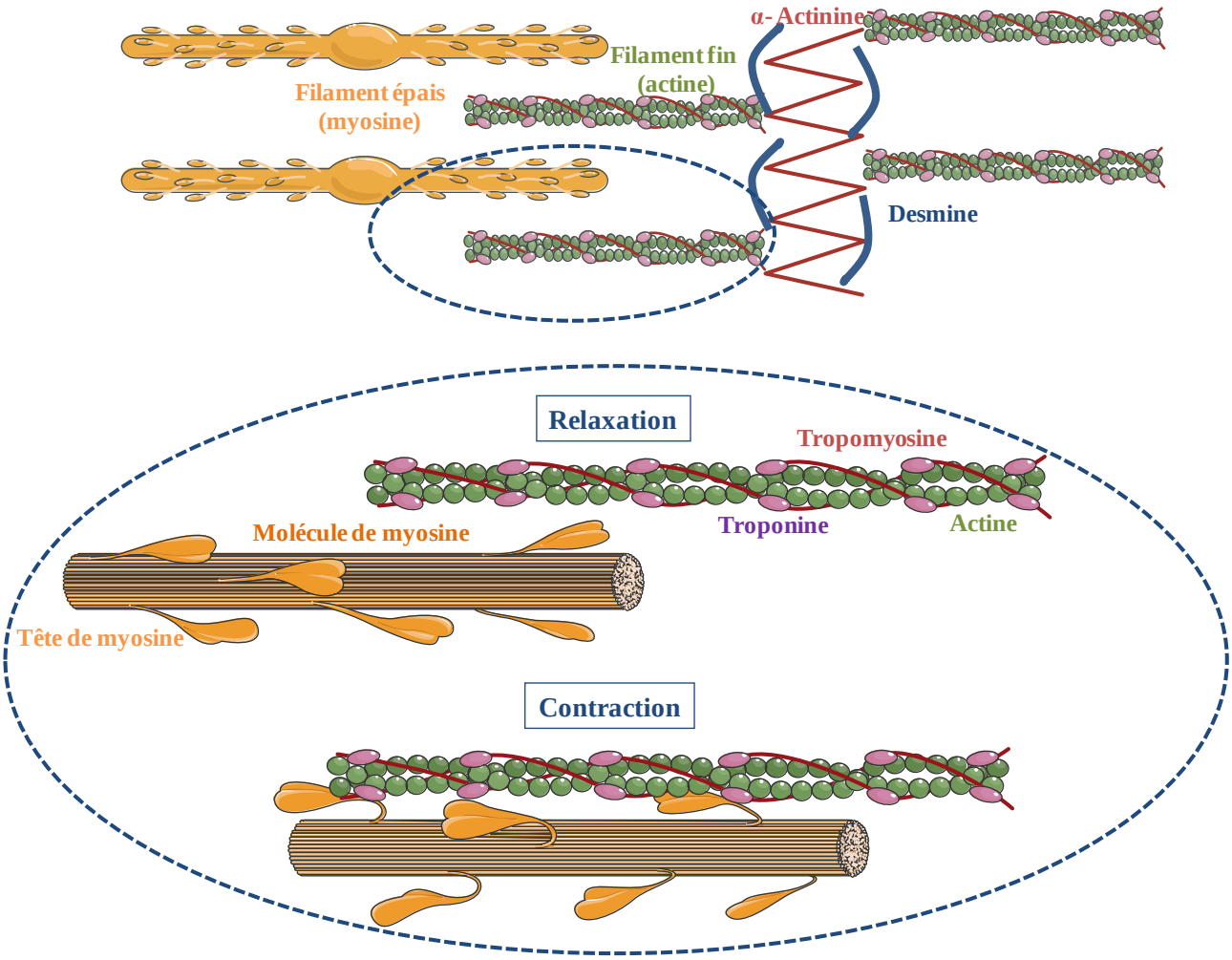


Figure 3 : Composition des filaments fins et épais.

Les filaments fins sont disposés en chaine de molécules d'actine entourées par la troponine et la tropomyosine. Les filaments épais sont constitués de la myosine qui possède des têtes à son extrémité. La contraction met en œuvre le contact direct entre l'actine et les têtes de myosine après liaison du calcium. *Origine de l'Image: Collection d'images «Medical Art» Servier*

En revanche, quand le calcium est lié à la tropomyosine, la conformation de la protéine se modifie, ce qui provoque un décalage permettant l'interaction entre l'actine et la myosine au niveau des ponts. La contraction se produit suite au raccourcissement des sarcomères induit par le glissement des filaments fins sur les filaments épais (Schiaffino and Reggiani, 2011).
Le calcium est stocké au niveau du REL (réticulum endoplasmique lisse) appelé réticulum sarcoplasmique. Le calcium est libéré suite à une stimulation électrique de la membrane des myofibres. Cette stimulation provient d'un potentiel d'action induit par les motoneurones au niveau de la jonction neuromusculaire, grâce à la libération de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine ou l'adrénaline (Hirsch, 2007; Huxley, 2002).

Métabolisme du muscle squelettique

L'ATP constitue la seule source d'énergie directement utilisable. L'approvisionnement en ATP doit être continu afin que les activités de contraction et de relaxation soient assurées. Nous trouvons classiquement trois sources d'ATP possibles qui peuvent être mises à contribution en cas de besoin.

- **Le système phosphagène**

Ce système constitue la première source d'énergie exploitable au tout début de l'activité contractile. En effet, la créatine phosphate possède un groupe phosphate riche en énergie qui est transféré à l'ADP pour former l'ATP. Cette source d'énergie est très rapidement mobilisable, et très vite épuisée.

- **La respiration cellulaire anaérobie**

A l'origine, la glycolyse aboutit à des produits destinés à alimenter la voie de phosphorylation oxydative. Ainsi, la molécule de glucose, lors de la glycolyse est scindée en deux molécules d'acide pyruvique avec la production nette de deux molécules d'ATP. En absence, ou en présence de faibles quantités d'oxygène, le pyruvate est converti en lactate pour régénérer le NAD+ ***(Figure 4)***.

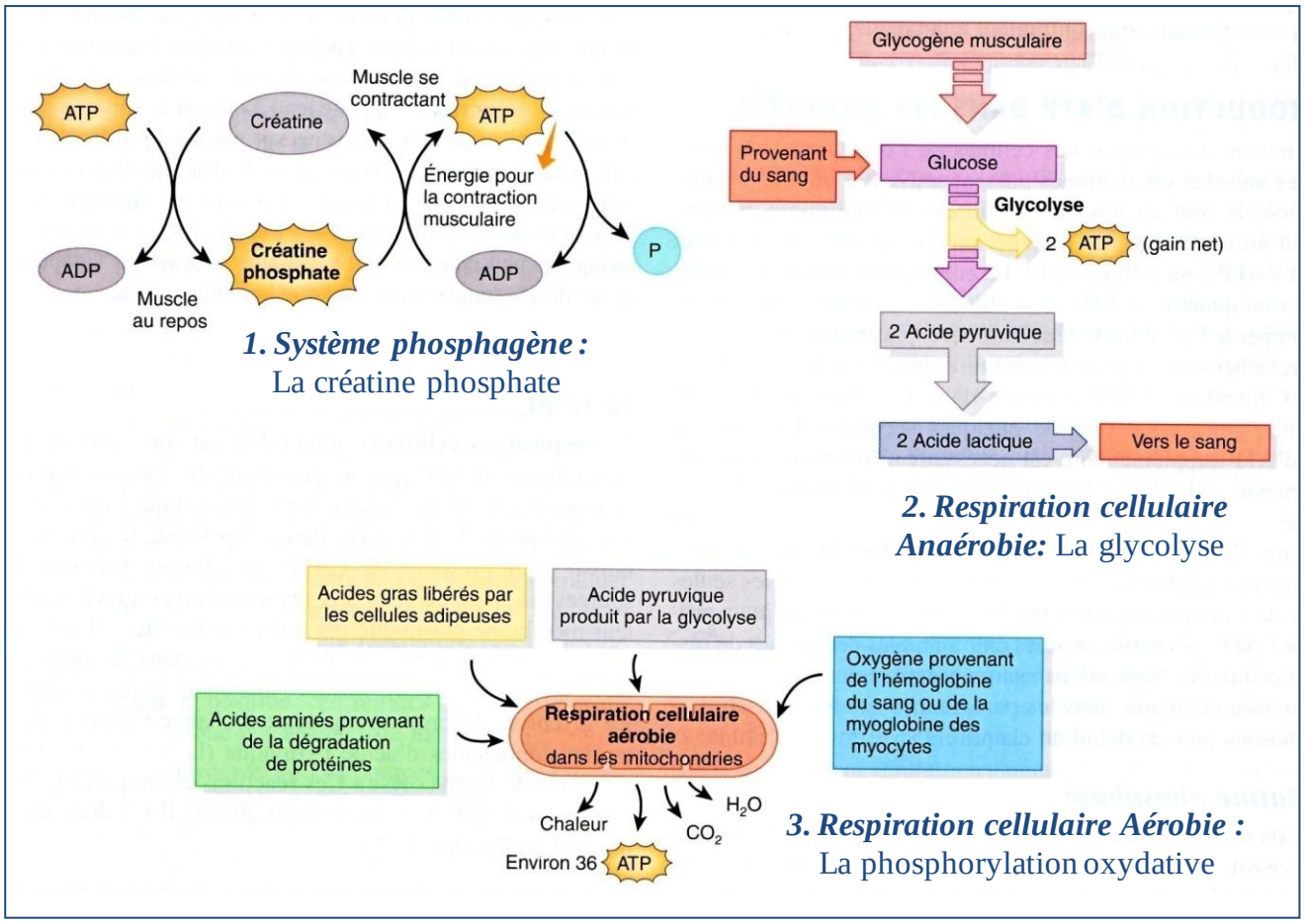


Figure 4: Prise en charge du glucose dans la cellule.

La molécule de glucose est transformé en deux molécules de pyruvate, en présence d'oxygène le pyruvate rejoint la mitochondrie pour entrer dans la chaine de phosphorylation oxydative, et finit par donner une somme de 36 molécules d'ATPs. En revanche, en absence d'oxygène, la transformation du glucose donne uniquement 2ATPs.

- **La respiration cellulaire aérobie**

Dans cette voie de production d'énergie, le glucose est converti en pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl Co-A. A ce niveau, l'acétyl Co-A est totalement oxydé et les coenzymes réduits formés sont réoxydés dans la chaine de transport d'électrons.

Cette phosphorylation a lieu dans la mitochondrie, en présence d'une quantité suffisante d'oxygène. Cette voie métabolique fournit une grande quantité d'ATP cependant ce mécanisme demeure relativement lent du fait du nombre conséquent d'étapes dont il est constitué ***(Figure 4)***.

Types de fibres musculaires

En fonction des différences dans les modes de production et d'hydrolyse de l'ATP, les fibres musculaires sont classées en trois types. Ces fibres sont adaptées aux différentes fonctions assurées par les muscles squelettiques, telles que la posture, la locomotion et la respiration.

En plus de la classification des fibres selon la voie métabolique utilisée pour produire de l'ATP, celles-ci sont aussi classées en fonction de leur vitesse maximale de raccourcissement lors de la contraction (rapide ou lente) (Schiaffino and Reggiani, 2011). La vitesse de contraction est dépendante de l'isoforme de la chaine lourde de myosine (MyHC) et de l'activité ATPasique qu'elle porte. Les trois types de fibres existantes sont ***(Figure 5)*** :

- **Fibres de type I**

Ce sont des fibres oxydatives à contraction lente et résistantes à la fatigue. Elles possèdent l'isoforme β cardiaque codé par le gène *MyH7* de la myosine, et présentent une faible activité ATPasique. Ces fibres, aussi appelées les fibres rouges ***(Figure 5)***, sont très riches en myoglobine, en mitochondries, et en capillaires sanguins. Elles métabolisent l'ATP lentement et sont caractérisées par leur faible diamètre. Ces fibres sont prépondérantes dans les muscles posturaux, elles sont aussi généralement sollicitées pour les mouvements réguliers et prolongés (Westerblad *et al.*, 2010).

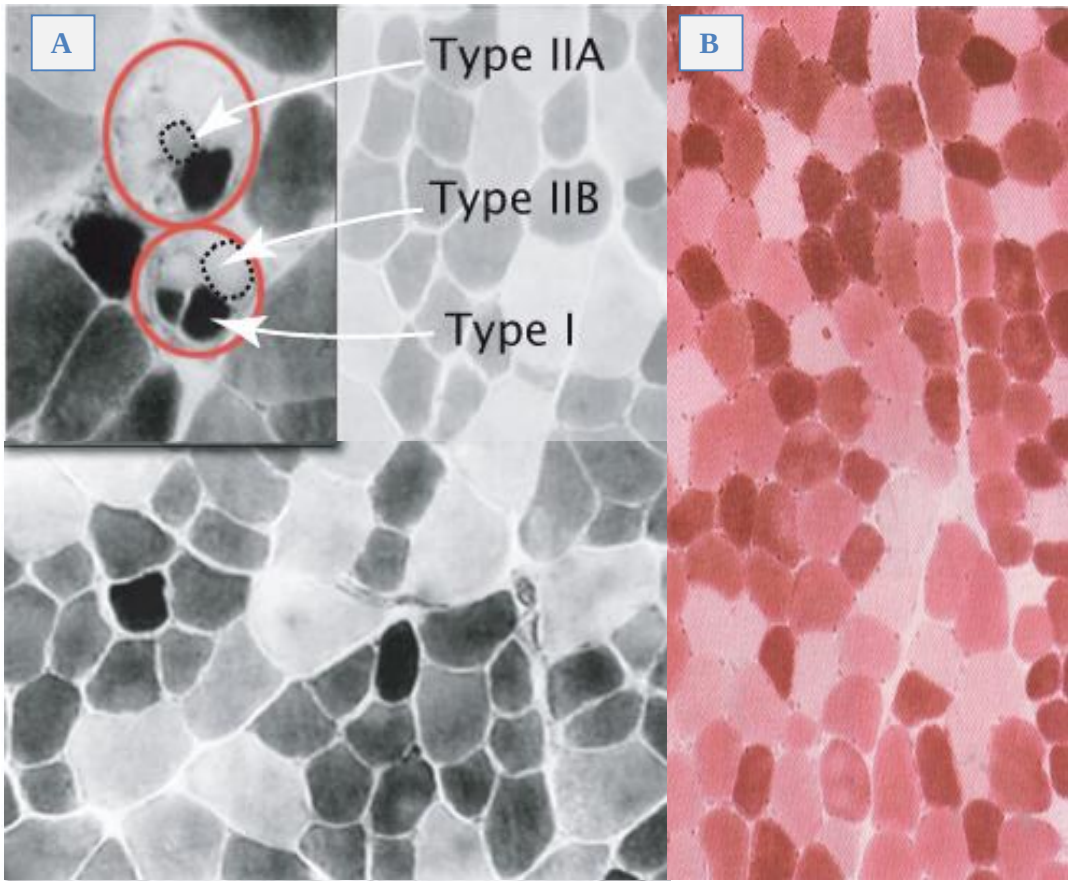


Figure 5 : Différents types de fibres.

a. Photos en nuances de gris, représentant une coupe transversale d'un fuseau musculaire. Les différents types de fibres musculaires sont reconnus par notamment leur taille, et leur couleur. En effet les fibres foncées légendées « type I » sont en réalité de couleur rouge plus foncé que les autres (photos B). Les fibres légendées « Type IIA », aussi appelées intermédiaires, notamment pour leur couleur rosâtre qui est intermédiaire entre les type I et IIB (photos B). Ces derniers sont de couleur blanchâtre très claire

b. Photos en couleur des fibres.

- **Fibres de type IIA**

Ces fibres sont dites rapides et résistantes. Elles sont constituées par une isoforme de myosine avec une forte activité ATPasique. Ces fibres contiennent aussi beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires, mais se caractérisent par une coloration intermédiaire et une forte capacité glycolytique. L'isoforme de myosine retrouvée dans ces fibres est la « MyHC2a » qui est codée par le gène *MyH2*. Ces fibres sont sollicitées pour les activités prolongées à contraction rapide. Elles sont donc retrouvées en grand nombre dans les muscles des jambes des athlètes notamment.

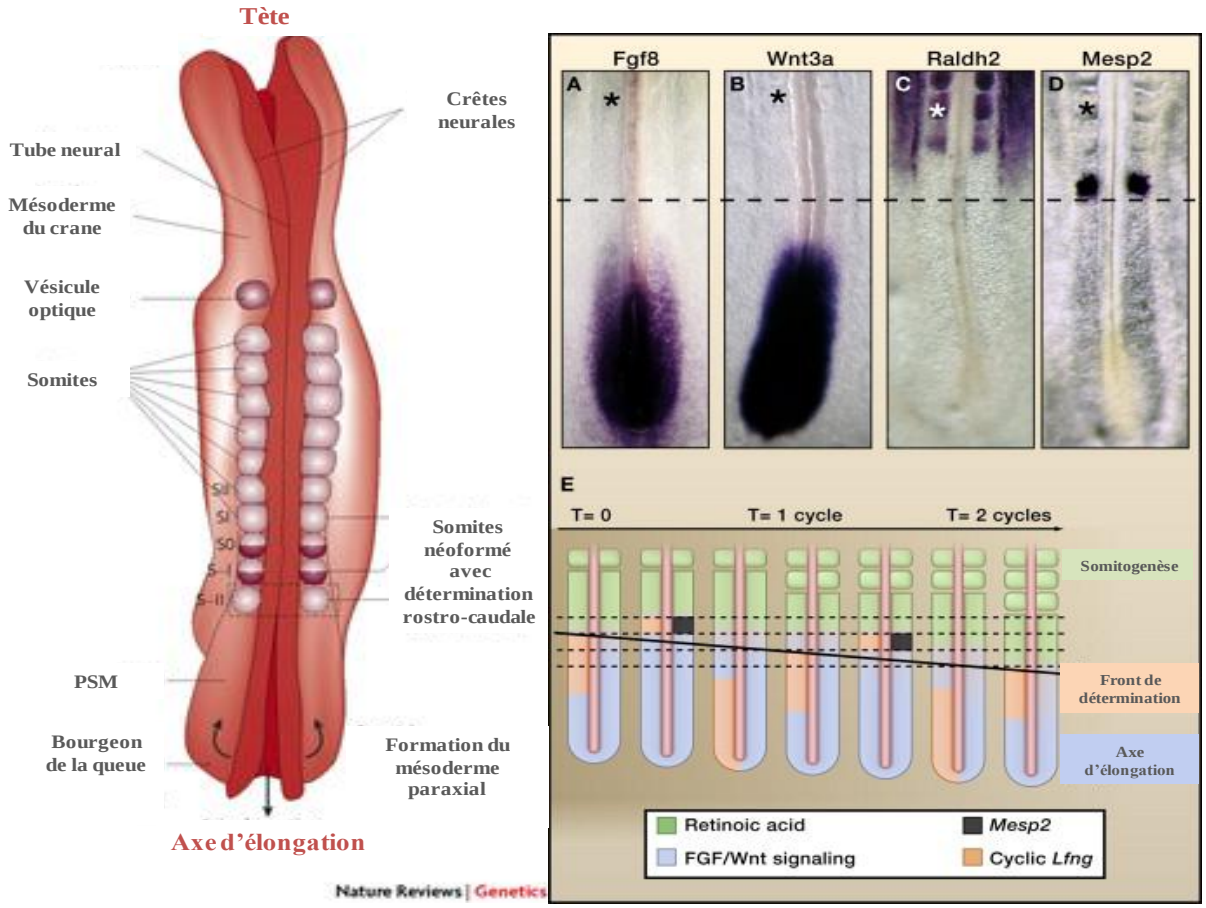
- **Fibres de type IIX/IIB**

Ces fibres sont aussi classées dans les fibres rapides mais fatigables pour leur part. La différence réside dans le fait que ces fibres utilisent un métabolisme glycolytique qui repose sur la combustion du glycogène stocké. Par conséquent, elles présentent peu de mitochondries, et un environnement sanguin appauvri, ce qui leur donne une couleur caractéristique blanchâtre. Ces fibres ont une très faible capacité oxydative, la contraction est donc rapide mais sensible à la fatigue et complètement dépendante des réserves de glycogène.
Les isoformes de myosine que l'on trouve dans ces fibres correspondent à « MyHC2x », codé par le gène MyH1 pour les fibres IIX présent chez l'Homme et le rongeur, et à « MyHC2b » codé par MyH4 (absent chez l'Homme). Ces fibres sont particulièrement adaptées aux actions rapides mais intenses, retrouvées majoritairement dans le muscle tibial antérieur *(tibialis anterior)* et dans les muscles des bras.
Nous l'aurons compris dans cette partie, le muscle squelettique est un tissu extrêmement structuré et complexe qui assure des fonctions vitales et primordiales pour le corps. Le processus de développement musculaire, ou myogenèse, est un processus tout autant complexe et très régulé dans l'espace et dans le temps.

Partie 2 : Myogenèse et origine des muscles squelettiques chez les vertébrés - De la somitogenèse à la cellule migratrice

Les myoblastes précurseurs du muscle dérivent du mésoderme paraxial (bandes du mésoderme situées de part et d'autre de la notochorde et du tube neural) de l'embryon. En évoluant, ce mésoderme appelé présomitique (PSM) se dispose de part et d'autre du tube neural et se segmente le long de l'axe antéropostérieur (A/P) en des structures épithéliales appelées somites (Krol *et al.*, 2011). Ce sont les premières structures métamérisées du mésoderme paraxial, des structures transitoires, sphériques et qui renferment une cavité appelée le somitocoele. Les somites sont à l'origine du muscle squelettique, du squelette axial et d'une partie du derme (Dequéant and Pourquié, 2008). La segmentation du mésoderme en somites est expliquée par le modèle de Cooke et Zeeman, qui ont proposé l'hypothèse « Clock and wave front », selon laquelle la segmentation obéit à une régulation spatio-temporelle très fine (Cooke and Zeeman, 1976). Cette régulation consiste en des vagues d'activation et d'inhibition successives des voies Notch et Wnt (Wingless-type MMTV integration site family member). A chaque vague, le mésoderme postérieur se segmente sur un axe antéro-postérieur, ce qui implique que le somite le plus précoce se trouve du côté de la tête de l'embryon.

Des gradients d'expression génique antagonistes aux voies de signalisation des FGF/Wnt/β-caténine (FGF : Fibroblast Growth Factor) sont établis en réponse à l'expression des ligands sécrétés tels que FGF8, Wnt3 et l'acide rétinoïque. La succession des voies antagonistes conduit à la définition d'une zone de segmentation entre le PSM et le futur somite appelé « le front de détermination » (Gomez and Pourquié, 2009; Palmeirim *et al.*, 1997). Les gènes *FGF8* et *Wnt3a* sont exprimés dans le mésoderme présomitique selon un gradient décroissant qui débute dans la partie caudale pour se terminer au front de détermination. En revanche, le gène gène *Aldh1a2* qui code l'enzyme RALDH2 responsable de la synthèse de l'acide rétinoïque est exprimé selon un gradient inverse de FGF8 (Diez del Corral *et al.*, 2003) ***(Figure 6)***.



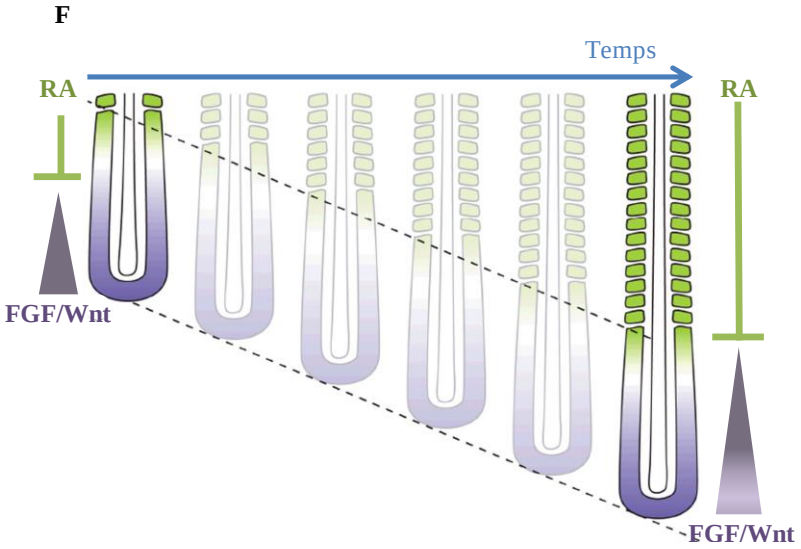


Figure 6 : Le modèle « Clock and wavefront » de somitogenèse chez les vertébrés

Image en haut à gauche : représentation schématique d'une vue dorsale d'un embryon sur un axe antéro-postérieur, avec les crêtes qui bordent le tube neural au centre, délimité par des somites de part et d'autre. Les flèches indiquent les mouvements cellulaires des bourgeons pour former le PSM.
Photographies en haut à droite : Hybridations *in situ* sur embryon de poule. (A) domaine d'expression de *Wnt3a*, (B) expression de *FGF8*, (C) expression de *Raldh2*, (D) expression de *Mesp2*.
Les astérisques correspondent aux somites néoformés. La ligne de séparation en pointillés correspond au PSM selon le modèle proposé (FGF8 - fibroblast growth factor 8), (Mesp2 - Mesoderm posterior protéin 2), (Raldh2 - Retinaldehyde dehydrogenase), (Wnt3a - Wingless 3a).
(E) Représentation schématique du modèle théorique « Clock and Wavefront ». Les gradients en violet représentent la signalisation FGF/Wnt, en vert l'expression de l'acide rétinoïque. L'horloge moléculaire est indiquée en orange. Indications : (Lnfg – Lunatic fringe).
(F) Représentation schématique du ratio entre la vitesse de somitogenèse, la croissance de l'axe et le contrôle du nombre de segments. La signalisation Wnt/FGF (violet) est progressivement sous régulée sur l'axe postéro-antérieur jusqu'à la limite du PSM. A l'inverse l'acide rétinoïque (RA) s'exprime de manière antagoniste du côté antérieur par rapport au PSM. Le PSM se situe entre les deux traits sous forme de pointillés.(Dequéant and Pourquié, 2008; Gomez and Pourquie, 2009; Pourquie, 2011)

Les cellules somitiques sont à ce stade encore multipotentes. Leur lignage est orienté par les signaux moléculaires émis par les structures environnantes que sont le tube neural, la notochorde, les ectodermes dorsal et latéral. Parmi ces signaux nous retrouvons notamment les protéines WNT qui agissent par le biais de la voie canonique liée à l'activation du complexe β-caténine/TCF (T-cell factor) (Dequéant *et al.*, 2006; Goldbeter and Pourquié, 2008). Les protéines WNT1, WNT3a ainsi que WNT4, WNT6 et WNT7, exprimées respectivement par le tube neural et l'ectoderme, permettent la détermination dorsale et la formation du dermomyotome (Abiola *et al.*, 2009; Diez del Corral *et al.*, 2003). La protéine SHH (Sonic hedgehog), exprimée par la notochorde et le plancher du tube neural, régule la spécification du dermomyotome épaxial et du sclérotome (Marcelle *et al.*, 1997). Dans les facteurs de régulation positive de la détermination cellulaire, nous retrouvons les IGFs (insulin-like growth factor) exprimés par la région dorsale du tube neural et le mésoderme paraxial (Mitchell *et al.*, 2002).

Inversement , les facteurs TGF-β et BMPs (respectivement : transforming growth factor β et Bone Morphogenetic Protein) issus du mésoderme latéral et les FGFs du tube neural ont un rôle inhibiteur, notamment sur l'expression des facteurs myogéniques précoces (Brand-Saberi *et al.*, 1996; Bryson-Richardson and Currie, 2008; Buckingham *et al.*, 2003). A ce stade, l'action inhibitrice du récepteur Notch est primordiale pour empêcher l'expression des facteurs myogéniques, afin de garder les cellules progénitrices dans un état indifférencié favorisant ainsi l'expansion clonale du pool de cellules souches (Buckingham *et al.*, 2003). Ces processus myogéniques sont sous le contrôle des facteurs de transcription Pax3 et Pax7 (Buckingham and Relaix, 2007; Goulding *et al.*, 1994). Nous reviendrons sur ces facteurs dans les prochains paragraphes ***(Figure 7)***.

Ces évènements conduisent à la régionalisation dorso-ventrale des somites qui vont se compartimenter en deux parties. La partie ventrale donnera le sclérotome (Yusuf and Brand-Saberi, 2006) à l'origine des vertèbres et des côtes (Kalcheim *et al.*, 1999). La partie dorsale, aussi appelée dermomyotome, est précurseur de la lignée dermique du dos (dermatome) et de la lignée myogénique (myotome) (Buckingham *et al.*, 2003; Charge, 2004; Williams and Ordahl, 1994). Le myotome est subdivisé en deux régions, médiane et latérale, et contient des précurseurs de deux lignées myogéniques (Charge, 2004; Ordahl and Douarin, 1992). Dans la moitié médiane, les cellules sont destinées à donner la musculature associée à la colonne vertébrale. Dans la moitié latérale, les précurseurs quitteront le zone des somites pour former la musculature des membres et de l'abdomen ***(Figure 8)*** (Brand-Saberi and Christ, 1999; Christ and Ordahl, 1995).

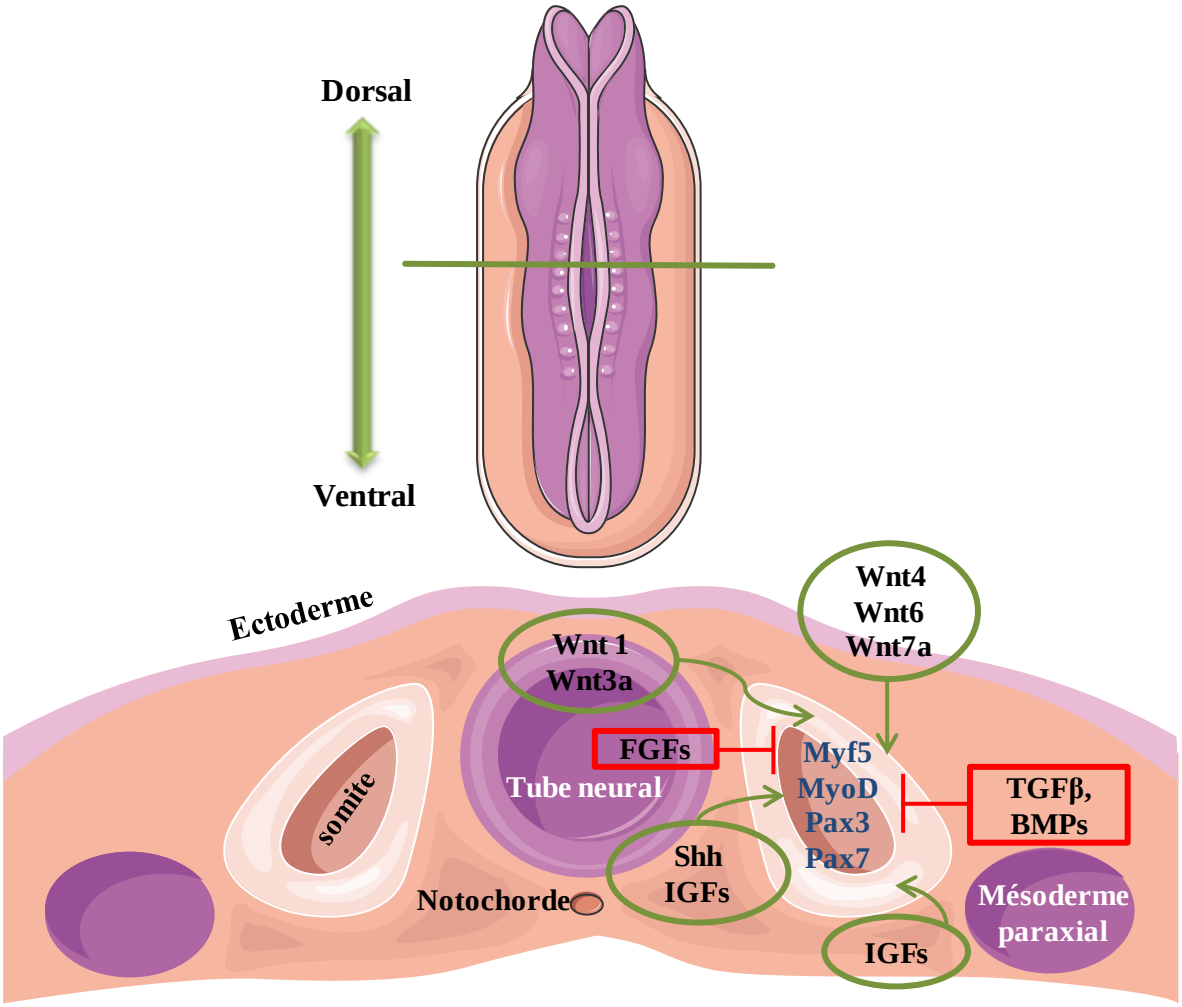


Figure 7 : Les signaux contrôlant la détermination des cellules somitiques en progéniteurs musculaires.

Les structures environnantes aux somites envoient des signaux régulateurs du devenir des cellules somitiques. La détermination de ces cellules en progéniteurs musculaires dépend d'un équilibre subtil entre des signaux activateurs en vert (WNT1, 3a, 4, 6,7a, SHH, IGF), et des signaux inhibiteurs en rouge (FGFs, TGFβ, BMPs). *Indications: (BMP) Bone Morphogenetic Protein, (MyoD) Myoblast Determination protein, (Myf5) Myogenic factor 5, (Pax3, Pax7) Paired box protein 3/7, (Shh) Sonic HedgeHog, (TGFβ) Transforming Growth Factorβ.*

Le processus de myogenèse commence lorsque les cellules du mésoderme s'engagent dans la lignée myogénique plutôt que dans la lignée fibroblastique ou chondroblastique sous l'action de facteurs de régulation tels que *Myf5*, *MyoD1* et *MyoG* (Hawke and Garry, 2001). Une fois engagées, les cellules souches myogéniques migrent sous l'influence de facteurs environnementaux et de la matrice extracellulaire (collagène et fibronectines) *(Brand-Saberi et al.,* 1993). Les cellules somitiques ne sont pas à l'origine de tous les muscles squelettiques, mais essentiellement des muscles des membres et du tronc et de quelques muscles du crâne. Les autres muscle crânio-faciaux qui regroupent les muscles extra-oculaires, axiaux, phayndo-lingual ont comme origine le mésoderme crânien (non segmenté), les somites pré-otiques et le mésoderme pré-chordal (Kuratani, 2008).

De ce fait, l'initiation du programme myogénique ainsi que les cascades de signalisation initiant le lignage myogénique sont différents selon l'origine des cellules progénitrices (Mootoosamy and Dietrich, 2002; Sambasivan *et al.*, 2009).

En 2011, Braun et Gautel (Braun and Gautel, 2011) ont répertorié les facteurs myogéniques précoces intervenant dans les deux lignages possibles ***(Figure 9)***. Bien que toutes les cellules musculaires expriment à terme les mêmes facteurs (*Myf5*, *Myf6*, *MyoD* et *MyoG*), d'autres facteurs plus précoces régissent l'initiation de la différentiation, tels que *Pax3* (paired box protein 3) pour les muscles des membres et du tronc, et *Pitx2* (pituitary homeobox 2) pour les muscles crâniens (Braun and Gautel, 2011; Sambasivan *et al.*, 2011; Shih *et al.*, 2008).

Les cellules engagées dans la voie myogénique forment ainsi le myotome localisé à la jonction du derme et du sclérotome *(Figure 8)*. Le devenir du myotome pose encore un certain nombre de questions. Il est bien établi que le myotome médian produit les muscles épaxiaux qui donneront les futurs muscles du dos (Kalcheim *et al.*, 1999; Parkyn *et al.*, 2002), alors que le myotome latéral et une partie du dermomyotome latéral donneront les muscles hypaxiaux, c'est-à-dire, la musculature squelettique abdominale (Parkyn *et al.*, 2002). En revanche les muscles des membres, qui sont aussi considérés comme hypaxiaux, dérivent uniquement du dermomyotome latéral (Buckingham *et al.*, 2003). Ce dernier va peu à peu se déstructurer pour libérer des cellules individualisées qui sont déterminées mais pas encore différenciées. Ces cellules migratrices, capables de proliférer le long de leur périple jusqu'aux bourgeons des membres (Buckingham *et al.*, 2003; Schienda *et al.*, 2006), expriment à ce stade *Pax3* qui est un facteur de transcription primordial dans le devenir du dermomyotome hypaxial. En effet, les souris *KO* pour ce gène sont dépourvues de muscle au niveau des membres et souffrent d'une perte de cellules musculaires précurseurs (Bober *et al.*, 1994).

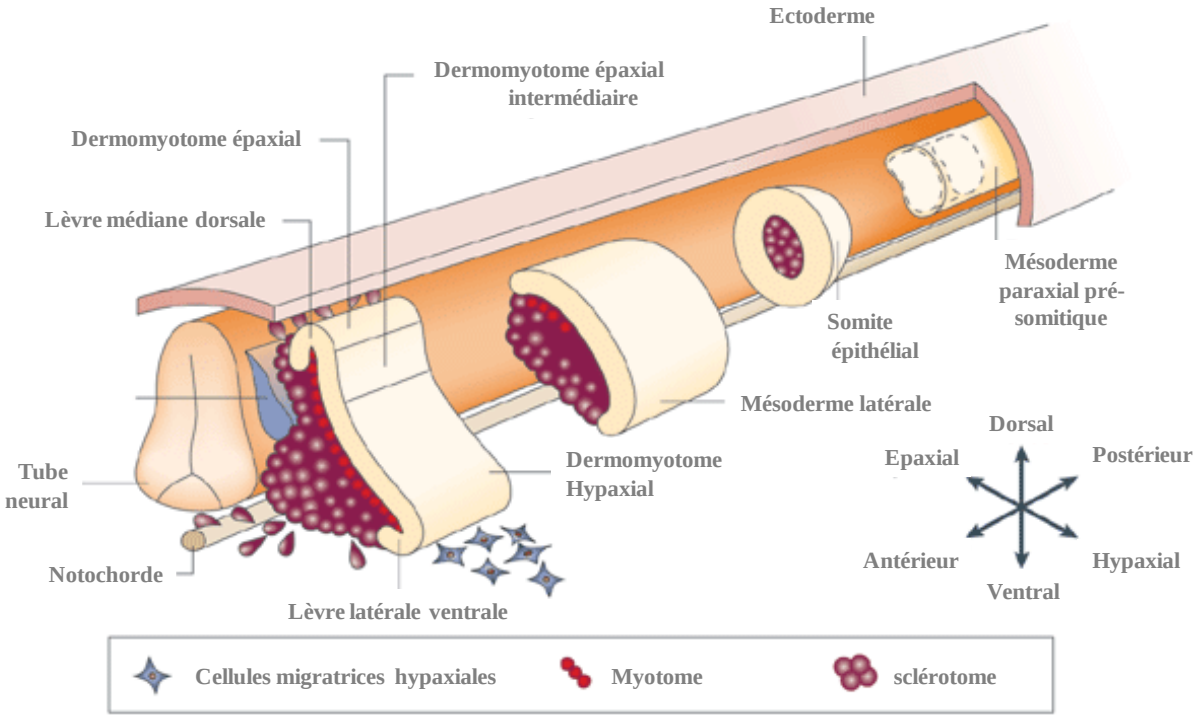


Figure 8 : formation des progéniteurs myoblastiques à partir des somites.

Chez les vertébrés, le muscle squelettique se forme à partir du mésoderme paraxial présomitique. Ce dernier se segmente pour donner naissance aux somites. Les somites subissent l'influence de leur environnement proche (la notochorde, le tube neural et l'ectoderme dorsal). La fraction ventrale des somites donne le sclérotome, alors que la fraction dorsale donne naissance au dermomyotome qui participe à la formation du derme et du myotome, lequel correspond à la première structure du muscle squelettique. Sous l'influence de nouveaux signaux, le dermomyotome se régionalise en deux parties : épaxial et hypaxial. Les cellules du dermomyotome hypaxial subissent alors une délamination qui permet leur détachement puis leur migration vers les bourgeons des membres. Le processus myogénique à proprement parler, est alors amorcé (Parker *et al.*, 2003).

D'autres facteurs sont directement impliqués dans la survie, le détachement et la migration de ces cellules. Des expériences d'invalidation des gènes chez la souris ont permis de récolter des informations sur le rôle éventuel de certains d'entre eux. Ces données ont été synthétisées dans la revue de Margaret Buckingham en 2003 (Buckingham *et al.*, 2003; Buckingham and Rigby, 2014).

En voici quelques exemples :

De même que pour les souris *KO Pax3*, les souris *KO* pour le gène codant le récepteur de la tyrosine kinase *C-met* et pour son ligand *l'HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor)*, ne peuvent pas assurer le détachement des cellules progénitrices.

Ces souris sont dépourvues de membres inférieurs et supérieurs, mais les cellules du dermomyotome hypaxial restent intactes et déterminées.

Il est à noter que, l'expression de *c-met* est sous l'influence de PAX 3 (Bladt *et al.*, 1995; Brand-Saberi *et al.*, 1996; Epstein *et al.*, 1996; Goulding *et al.*, 1994).

Les souris *Lbx1-/-* et les souris *Mox2-/-* présentent quant à elles, un détachement des cellules progénitrices mais la migration est incorrecte. Ceci induit une faiblesse musculaire et l'apparition de myopathies chez les souris *Mox2-/-* et une absence complète de certains muscles squelettiques chez les souris *Lbx1-/-* (Brohmann *et al.*, 2000; Buckingham *et al.*, 2003). Un phénotype semblable a été observé chez les souris *Gab1-/-* avec un détachement et une migration des cellules précurseurs altérées et l'atteinte de certains muscles squelettiques (Sachs *et al.*, 2000).

D'autres hypothèses ont été émises concernant des facteurs tels que *Msx1*, *Six1 et Six4* qui seraient exprimés dans le dermomyotome hypaxial et impliqués dans la détermination, la prolifération, et la migration des cellules progénitrices. *Six1*, en particulier, régirait la différenciation terminale des cellules musculaires (Buckingham *et al.*, 2003). En 2005, la preuve de l'implication de *Six1-/-* et *Six4-/-* a été apportée par l'équipe de *Pascal MAIRE* (Grifone *et al.*, 2005). Avec la création de souris *KO* pour ces gènes, ils ont observé une dérégulation de *Pax3* et l'absence de muscles dans les bourgeons des membres. Ce phénotype est directement lié à un défaut de délamination et de migration des progéniteurs, probablement dû à la dérégulation de Pax3. D'ailleurs, l'absence des membres, observée chez les souris *KO* pour *Six1-/-* et *Six4-/-* a aussi été constatée sur les souris *KO Pax3.* Ceci témoigne de l'importance de ces facteurs de transcription précoces dans l'établissement de la population de progéniteurs. D'autant plus que ces facteurs régulent directement les facteurs myogéniques, notamment ceux qui sont exprimés très précocement comme Myf5 (Myogenic Factor 5) et MyoD (Myoblast Determination protein1) (Braun *et al.*, 1992; Giordani *et al.*, 2007).

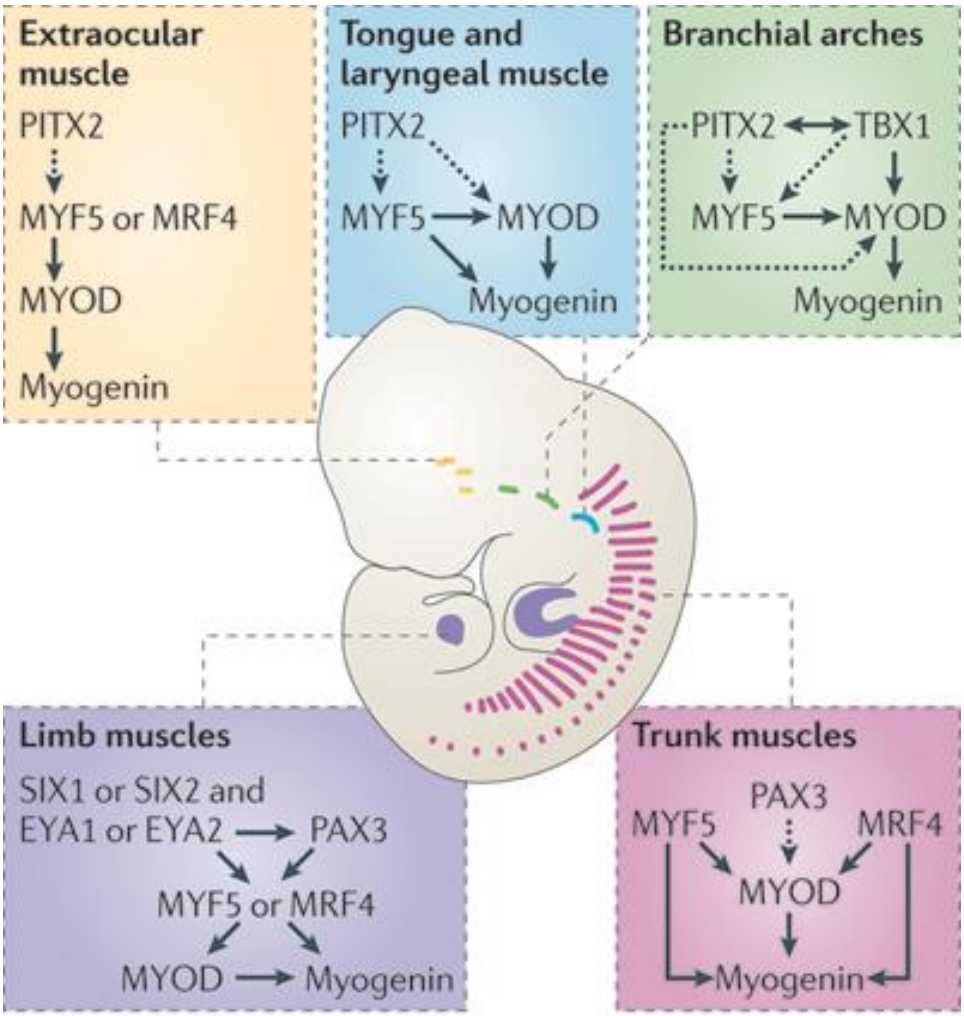


Figure 9 : Facteurs impliqués dans la détermination des progéniteurs de différents muscles squelettiques :

Toutes les cellules musculaires expriment le même jeu de facteurs myogéniques (*Myf5*, *Mrf4*, *MyoD*, *MyoG*). Cependant, ces facteurs sont eux même contrôlés par des facteurs initiaux qui diffèrent selon le muscle squelettique concerné. Indications: (Eya) eyes absent homolog protein; (Mrf4) Myogenic regulatory factor 4; (MyoD) Myoblast determination protein; (Myf5) Myogenic factor 5; (Pax3) Paired box protein 3; (Pitx2) Pituitary homeobox 2; (Six) Sine oculis homeobox homolog protein; (Tbx1) T-box transcription factor 1 (Braun and Gautel, 2011).

Les gènes *MyoD* et *Myf5* appartiennent à la famille des MRFs (myogenic regulatory factors), ils sont considérés comme les marqueurs de la détermination finale du lignage musculaire (Rudnicki and Jaenisch, 1995). En effet l'équipe de Rudnicki a montré en 1993, que des souris double *KO* pour ces deux facteurs *(Myf5-/-, MyoD-/-)* étaient dans l'incapacité de former les muscles des membres (Rudnicki *et al.*, 1993). D'autres études menées au préalable, notamment par l'équipe de Sassoon, avaient montré que les cellules engagées dans la voie myogénique au sein du myotome expriment fortement les facteurs à domaine bHLH, notamment *Myf5* et *MyoD* (Cinnamon *et al.*, 2001; Ordahl *et al.*, 2001; Sassoon *et al.*, 1989). Ces cellules sont à l'origine des muscles fœtaux et adultes du tronc (Gros *et al.*, 2005).

Après ce stade de migration, commence une autre étape de la myogenèse qui est l'étape de différenciation, se terminant par la formation d'une fibre musculaire mature et fonctionnelle.

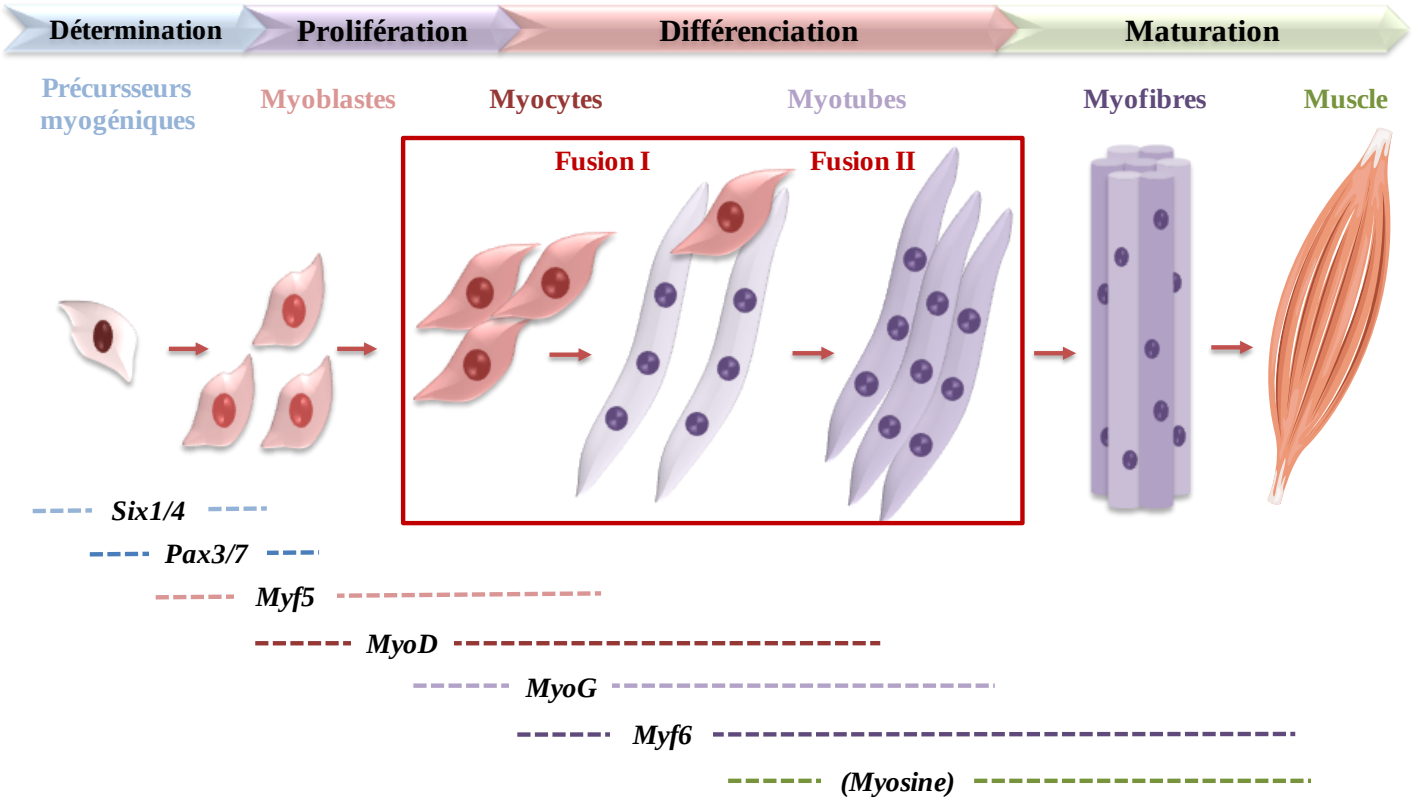


Figure 10 : Représentation schématique de la différenciation myogénique terminale avec la hiérarchie d'expression des facteurs impliqués

Les progéniteurs du muscle squelettique expriment tout le long de la migration Six1/4 et Pax3 ; Pax 7 est un marqueur exprimé par les cellules progénitrices, mais aussi par les cellules satellites adultes, il permet leur maintien dans un état de quiescence. Les MRFs (Myogenic Regulatory Factors) s'expriment à des moments bien précis dans la différenciation, *Myf 5* et *MyoD* en premier. Considérés comme des facteurs primaires de la différenciation myogénique, ils sont impliqués dans la détermination précoce des myoblastes et dans l'initiation du programme myogénique ; les myoblastes entament une étape de prolifération intense pour assurer un pool suffisant de myocytes. La Myogénine (*MyoG*), ainsi que *Myf6* (MRF4), sont quant à eux considérés comme des facteurs secondaires car ils interviennent au moment des étapes de fusion. La fusion I^{aire} consiste en la fusion des myocytes pour donner naissance aux myotubes multinucléés, et la fusion II^{aire} consiste en la fusion des myotubes néoformé avec les myocytes pour augmenter leur taille.

Indications images: *Six1/4*: Sine oculis homeobox homolog protein 1/4 ; *Pax3/7* : Paired box protein 3/7 ; *Myf5* : Myogenic Factor 5 ; *MyoD* : Myoblast Determination protein 1; *MyoG* : Myogenin ; *Myf6* (MRF4): myogenic regulatory factor 4.

Partie 3 : Différenciation terminale de la cellule musculaire - Des myoblastes à la fibre musculaire

Chez les vertébrés comme les oiseaux et les mammifères, la plupart des muscles squelettiques dérivent des cellules progénitrices d'origine mésodermique somitique. Chez les mammifères et plus particulièrement la souris, la régulation moléculaire de la myogenèse a été bien appréhendée (voir la revue de Buckingham *et al.*, 2003).

La différenciation des myoblastes en myotubes implique différentes étapes incluant la prolifération des myoblastes, leur différenciation en myocytes, la fusion des myocytes pour former les myotubes multinucléés, et enfin la maturation des myotubes pour former la fibre musculaire ***(Figure 10)***.

Le processus de différentiation myogénique terminale se déroule en deux temps distincts ; le premier concerne la fusion des myoblastes entre eux, pour former les myotubes multinucléés, on parle alors de fusion primaire. Le second implique la fusion des myoblastes avec les myotubes néoformées et on parle alors de fusion secondaire. Ces différentes étapes de fusion myogénique nécessitent une cascade d'évènements qui entraînent de profondes modifications de la cellule tant au niveau morphologique qu'au niveau moléculaire dans une fenêtre spatiotemporelle précise. Ce processus aboutit à l'inhibition de certains facteurs du cycle cellulaire, favorisant l'activation d'autres facteurs de transcription responsables de la différenciation terminale ***(Figure 10)***. Parmi eux, les membres de la famille des « Muscle Regulatory Factors (MRFs) », comme par exemple les facteurs *MyoD* et *Myf5* qui sont des facteurs précoces de la différenciation myoblastique, en plus d'être des facteurs terminaux de la détermination. En effet, l'expression de ces facteurs annonce la fin de la détermination myoblastique et le début de l'étape de différenciation terminale de la cellule musculaire. Pour exemple, l'absence de *Myf5* dans les cellules somitiques *(souris KO Myf5-/-)* conduit dans un premier temps à un devenir cellulaire de type derme ou cartilage, à défaut du déterminisme myoblastique, et dans un deuxième temps à une localisation aberrante de ces cellules par rapport à leur sites habituels (Tajbakhsh *et al.*, 1996), comme sous l'ectoderme ou dans les côtes (Braun *et al.*, 1992). De plus, l'expression ectopique de *MyoD* est capable de convertir plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes (Davis *et al.*, 1987; Weintraub *et al.*, 1989), les chondrocytes, ou encore les neurones, en myoblastes (Choi *et al.*, 1990; Weintraub *et al.*, 1989).

L'expression forcée de *MyoD* dans les cellules déterminées entraîne une sortie du cycle cellulaire, la synthèse de la desmine et des protéines myofibrillaires, ainsi que l'activation de

gènes spécifiques aux muscles comme la *myogénine (MyoG)* et *Myf5*. L'ensemble de ces données explique comment MYOD est capable d'induire cette reprogrammation génique (Choi *et al.*, 1990; Weintraub *et al.*, 1989).

Nous retrouvons l'expression de ces facteurs dans la primo formation de la fibre musculaire, mais aussi à l'âge adulte lors de la régénération du tissu musculaire suite à une lésion. Ce renouvellement est assuré par des cellules progénitrices quiescentes, nommées les cellules satellites. Situées entre la lame basale et la fibre musculaire, elles constituent un véritable réservoir de précurseurs myogéniques indifférenciés et mononuclées capables de s'activer en réponse aux dommages subis par le muscle (Encart1) (Seale and Rudnicki, 2000; Seale *et al.*, 2000).

La proportion des cellules satellites est très faible par rapport au nombre de noyaux dans une fibre musculaire, pourtant, elles ont des rôles multiples. Ainsi, elles interviennent aussi bien lors de l'hypertrophie musculaire liée à l'exercice, qu'au cours de la régénération musculaire nécessaire suite à une blessure, à une dénervation ou encore à l'absence de fonctionnement. En effet, bien que les cellules satellites soient quiescentes chez l'adulte, elles sont capables de retrouver leurs capacités proliferatives en réponse à un stress ou un traumatisme. D'ailleurs, on peut observer sur différentes catégories de patients atteints de dystrophie ou de myopathie, une tentative permanente de régénération musculaire laquelle essaie de contrebalancer le déséquilibre dû à la dégradation musculaire. (Encart1) (Seale and Rudnicki, 2000).

Lors du vieillissement, les cellules satellites peuvent aussi s'engager dans une voie de différenciation différente à savoir la voie adipogénique, grâce à leur multipotence, démontrée *in vitro* en 2001 (Asakura *et al.*, 2001a). Peu de temps après, d'autres études ont montré que les cellules issues des souris vieillissantes (24 mois) par rapport aux cellules issues des souris plus jeunes (8 mois) expriment plus fortement des marqueurs de différenciation adipogénique notamment AP2 (adipocyte fatty acid binding protein 2) (Caserta *et al.*, 2001) et Pparδ2 (Peroxisome proliferator activated receptor gamma2) (Gregoire *et al.*, 1998).

Le processus de vieillissement entrainerait dans les cellules satellites l'accumulation de triglycérides, par conséquent les cellules ne sont plus considérées comme multipotentes dans une voie myogénique, mais comme pré-adipocytaires. Cette capacité des cellules satellites à se transdifférencier et à adopter une voie différente à la voie myogénique a été exploitée en recherche, notamment dans l'étude des voies d'activation spécifiques à chaque devenir possible. Nous reviendrons sur cette notion de transdifférentiation plus loin dans le manuscrit dans la partie résultats.

Encart 1 : Croissance néo-natale et post-natale du muscle squelettique

Nous avons vu plus haut que le muscle squelettique est formé grâce à des vagues successives de fusion de cellules myoblastiques, au cours de la myogenèse primaire et secondaire. Par la suite, une croissance post-natale est toutefois possible en réponse à divers facteurs, comme l'exercice physique, ou tout simplement lors d'une régénération suite à une lésion. Cette croissance est assurée par une lignée particulière de cellules souches myoblastiques, qui sont les cellules satellites. Ces cellules ont été identifiées grâce à leur localisation très particulière, entre le sarcolemme et la lame basale qui entoure les fibres (Mauro and Adams, 1961). Dans le muscle squelettique adulte, les cellules satellites en état de quiescence expriment de façon spécifique le facteur *Pax7* (Seale *et al.*, 2000), mais aussi les facteurs *Pax3*, *Myf5*, les protéines d'adhésion NCAM, les M-cadhérines, les sous unités α7 et β1 des intégrines, les syndecanes 3 et 4 (Yin *et al.*, 2013). Il semblerait que les cellules satellites aient une origine embryonnaire. En effet, une grande proportion de ces cellules dérive du dermomyotome lors de l'engagement des cellules *Pax3+* et *Pax7+* dans la myogenèse embryonnaire. Une grande partie de ces cellules entament l'expression des MRFs, en revanche une petite partie de ces cellules continuent à proliférer jusqu'à tardivement au cours de la différenciation. Ces cellules se retrouvent ensuite piégées par l'enveloppe des fibres musculaires sous la lame basale (Buckingham, 2006; Gros *et al.*, 2005). Néanmoins, d'autres travaux stipulent que la totalité des cellules satellites ne proviendrait pas forcément du dermomyotome (*Pax3+/Pax7+*). En effet, ces travaux ont montré la participation des péricytes (des cellules contractiles en périphérie des capillaires) dans le développement des muscles des membres, ces cellules sont aussi capables de donner des cellules en position satellites *Pax7+* (Dellavalle *et al.*, 2011). L'activation des cellules satellites quiescentes se produit en réponse à de nombreux facteurs de croissance libérés par la dégradation de la lame basale, notamment les IGFs, les FGFs, et les HGF (Hepatocytes Growth Factor) ; en réponse à ces facteurs, les cellules satellites induisent l'expression des facteurs *Pax7*, *MyoD* et *Myf5*. Ces cellules activées quittent alors leur niche et migrent pour atteindre le lieu de lésion (Pallafacchina *et al.*, 2010a). Ces myoblastes entrent alors en prolifération, en réponse notamment aux facteurs SH/HGF qui induisent l'activation des protéines ERK1 et ERK2 (Extracellular signal Regulated Kinase 1/2), lesquelles induisent à leur tour l'expression de la cycline D1 (Kästner *et al.*, 2000). De plus, la réponse aux facteurs FGF1 correspond à une augmentation du potentiel prolifératif des cellules (Kästner *et al.*, 2000). Les facteurs IGF1 et 2 quant à eux, sont impliqués dans les étapes de prolifération, mais aussi dans l'induction de la différenciation en agissant sur l'expression de *MyoG* (Czifra *et al.*, 2006). La division des cellules satellites peut être symétrique, générant deux cellules engagées (*Pax7+/Myf5+*), ou asymétriques engendrant ainsi une cellule engagée (*Pax7+/Myf5+*) et l'autre non (*Pax7+/Myf5-*). Cette division asymétrique assure le renouvellement du pool de cellules satellites, ces cellules cessent d'exprimer *MyoD* et rentrent à nouveau dans un état de quiescence (Cossu and Tajbakhsh, 2007).

Les acteurs de la différenciation myogénique terminale

1- Les MRFs

Les MRFs font partie de la superfamille des facteurs de transcription bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) qui inclut également c-myc (Olson and Klein, 1994). La famille des MRFs comprend MYOD (ou Myf-3), MYF5, la Myogénine (ou Myf-1), et MRF4 (ou Myf-6/herculine) (Sabourin and Rudnicki, 2000). La caractéristique de ces facteurs myogéniques est la présence au niveau de leur structure d'une région conservée « basic DNA-binding domain » qui permet la liaison spécifique à des séquences d'ADN, mais aussi d'un motif « Helix-Loop-Helix » nécessaire pour l'hétérodimérisation de ces protéines (Sabourin and Rudnicki, 2000).
Les MRFs présentent la caractéristique de former des hétérodimères avec des E-protéines, connues pour reconnaitre des motifs au niveau de sites particuliers de l'ADN, les « E-box », dont la séquence est « CANNTG ». Ce motif est rencontré sur les promoteurs de plusieurs gènes spécifiques du muscle (Sabourin and Rudnicki, 2000).

Les souris *KO* pour *MyoD (MyoD-/-)* présentent une expression de *Myf5* supérieure, avec un phénotype musculaire normal (Rudnicki *et al.*, 1992), Par contre, les souris déficientes simultanément pour ces deux types de MRFs meurent à la naissance avec une absence complète de muscles squelettiques et de myoblastes, ce qui prouve le rôle de *MyoD* et *Myf5* dans la détermination des muscles squelettiques (Rudnicki *et al.*, 1993).
Les souris *KO* pour la myogénine (*MyoG-/-*) possèdent un nombre normal de myoblastes, mais pas de myofibres, ces souris meurent à la naissance. Ces éléments tendent à démontrer que *MyoG* intervient plus tardivement dans l'étape de différenciation myogénique proprement dite, et non pas dans la détermination. Son expression semble confirmer cette hypothèse, puisque elle s'exprime en aval de *MyoD* et de *Myf5* (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993).
Les souris *MRF4-/-* présentent un phénotype musculaire normal et une augmentation de l'expression de *MyoG* (Braun and Arnold, 1995).
L'ensemble de ces résultats permettent de distinguer deux classes de MRFs ; les primaires (*MyoD* et *Myf5*) qui sont impliqués dans la détermination myogénique, et les MRFs secondaires (*Myogénine* et *MRF4*) qui sont impliqués dans la différenciation myogénique (Sabourin and Rudnicki, 2000).

Les MRFs agissent sous forme d'hétérodimères avec les produits des gènes *E2-2* que l'on appelle ITF2, et ceux du gène *E2A* appelés E12, E47et ITF1. Ces hétérodimères agissent sur la transcription de gènes possédant dans leur région promotrice un motif E-box (Sabourin and Rudnicki, 2000).

L'activité des MRFs est très étroitement liée au cycle cellulaire. En premier lieu, la protéine Rb (Retinoblastoma protein), s'associe sous sa forme hypo-phosphorylée à MYOD pour la transactivation des promoteurs des gènes muscles-spécifiques contenant une E-box (Gu *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1994). En second lieu, l'induction de la différenciation myogénique est amorcée par une augmentation drastique de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire (P21 et P16). Durant le développement musculaire embryonnaire cette augmentation de l'expression de *p21* est corrélée à celle de la *Myogénine* (Guo *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1995). Par ailleurs, la régulation négative des MRFs est aussi fortement liée au cycle cellulaire, par exemple, les oncogènes impliqués dans ce cycle, tels que *C-myc*, *N-ras* et *Ha-ras*, inhibent la différenciation des myoblastes *in vitro*, ce qui suggère un effet régulateur négatif sur les MRFs (Sabourin and Rudnicki, 2000). De plus, au cours de la différenciation, l'expression de *C-Fos* diminue par rapport à l'expression de *MyoD*, qui se fixe sur son promoteur au niveau d'une E-box (Trouche *et al.*, 1993).

Ce lien antagoniste entre les MRFs et le cycle cellulaire a été également démontré par les travaux réalisés sur la cycline D1. La surexpression de cette cycline, qui est un activateur de Cdk4, inhibe l'activité de MYOD (Sabourin and Rudnicki, 2000).

Les MRFs sont régulés négativement par les protéines Id qui ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN (basic-DNA binding domain). Ces derniers sont codés par quatre gènes *(Id1-4)*, ils agissent en s'hétérodimérisant avec les protéines E, empêchant leur association avec les MRFs (Benezra *et al.*, 1990). D'autres protéines ont été reconnues comme régulateurs négatifs des MRFs. Ainsi, la protéine « Twist murine » (mTwist) est capable d'inhiber l'activité de MYOD *in vitro* (Spicer *et al.*, 1996). La protéine « MIST1» est un facteur bHLH dépourvu de domaine de transactivation et qui aurait aussi un rôle inhibiteur sur le facteur MyoD (Lemercier *et al.*, 1998).

D'autre part, l'activité des MRFs est également régulée par phosphorylation. Par exemple, la Myogénine peut être directement phosphorylée par la protéine kinase C (PKC) *in vitro* et *in vivo*. Le traitement avec FGF ou la surexpression de la PKC induisent une phosphorylation de la thréonine-87 au niveau du domaine de liaison à l'ADN, empêchant ainsi la fixation de l'hétérodimère MRF/ E-protéine (Li *et al.*, 1992).

2- Les facteurs Pax (Paired box protein)

Le rôle des facteurs de transcription *Pax3* et *Pax7* dans le développement musculaire est très précoce au cours du stade embryonnaire. Néanmoins, l'expression de ces facteurs est aussi constatée au stade adulte au niveau des cellules satellites. En effet, *Pax7* permet le maintien de ces cellules progénitrices dans un état non différencié, pour préserver le pool de cellules de réserve (Buckingham and Montarras, 2008; Lagha *et al.*, 2008a).

Au niveau embryonnaire, comme nous l'avons déjà vu, le facteur *Pax 3* est déterminant pour l'adressage des précurseurs myogéniques par son influence sur la migration des progéniteurs (Lagha *et al.*, 2008a, 2008b).

De plus, l'expression des facteurs *Pax3/7* au niveau embryonnaire est concomitante à celle de *Myf5* et *MyoD1*. Ces facteurs activant directement *Myf5*, ils sont donc à l'origine du déclenchement du programme myogénique. L'expression de *Pax7* est aussi bien observée dans les cellules satellites, que dans les cellules en prolifération. Le facteur *Pax7* représente d'ailleurs le marqueur canonique de choix pour la détection et le tri des cellules satellites (Montarras *et al.*, 2005).

La régulation du facteur *Pax7* a fait l'objet de nombreuses études, l'une d'entre elle concerne la régulation dépendante de Notch. En effet, des études effectuées en 2009 ont clairement montré par marquage histologique sur des muscles de souris, une co-localisation de Notch1 et de PAX7 (Akiho *et al.*, 2010). En 2012, un autre travail effectué sur des cellules issues des souris NICD^{oe} (Over expression of constitutively activated Notch1 intracellular), démontre que l'expression constitutive du domaine intra cellulaire de Notch, induit la répression de *MyoD* et l'expression de *Pax7*, en passant par la voie de signalisation Hes/Hey, et grâce à une hétérodimérisation avec le facteur RBP-jκ. De plus, en utilisant des myoblastes *MyoD-/-*, les auteurs ont montré que l'action de Notch peut aussi être indépendante de *MyoD*. Il semblerait que l'association de Notch avec le facteur RBP-jκ agisse directement sur l'expression de *Pax7* (Wen *et al.*, 2012). Ainsi, les cellules *Pax7+* engagées dans le processus myogénique, et qui expriment *MyoD* assez fortement (*Pax7+*, *MyoD+*), arrivent à exprimer *MyoG* et rentrent en différenciation. Néanmoins une fraction d'entre elles en synergie avec d'autres voies de signalisation (entre autres celles dépendantes de Notch), n'expriment pas *MyoG* et restent quiescentes.

D'autres voies de signalisation ont été mises en evidence dans la régulation de *Pax7*, notamment la voie de SHH et IGF-1. Des expérimentations réalisées sur les cellules satellites du poulet et sur la lignée myoblastique C2 ont montré l'implication des voies MAPK/ERK et

Pi3K/AKT dans l'expression de *Pax7* (Elia *et al.*, 2007; Madhala-Levy *et al.*, 2012). De même, d'autres études ont mis en évidence l'implication des facteurs TNFα (Tumor Necrosis Factor α) dans la régulation de *Pax7*, notamment lors d'une régénération suite à une lésion, en passant par la voie des P38 (Mozzetta *et al.*, 2011). De plus, en 2008 un autre travail a montré l'implication de Wnt et de la β-caténine dans l'expression de *Pax7* (Perez-Ruiz *et al.*, 2008).
La régulation du facteur *Pax7* est très complexe et passe par l'activation de différentes voies en fonction du stade et du contexte tissulaire. En plus de ces voies de signalisation, une autre considération doit être prise en compte : ce sont les *miRNA*. En effet, des études ont mis en relation directe des *miRNA* avec la régulation post-traductionnelle de PAX7, notamment les miRNA-1 -206 et -486 (Chen *et al.*, 2010; Dey *et al.*, 2011).

3- Les protéines MADS-box

Le motif MADS-box porté par certaines protéines incluant les facteurs MCM1, AG, DEFA, et SRF, est une région conservée de 56 résidus d'acides aminés trouvés au sein même de la séquence de liaison à l'ADN. Cette famille de protéines présente une activité de facteurs de transcription. Leur région N-terminale est hydrophile avec une proportion élevée de résidus basiques, alors que leur région C-terminale est plutôt hydrophobe (Shore and Sharrocks, 1995). Ces protéines sont capables de se lier aux MRFs et d'agir en coopération sur des cibles transcriptionnelles (Brand-Saberi and Christ, 1999). Les travaux effectués sur deux facteurs possédant le MADS-box sont détaillés ci-dessous.

➢ Les Myocyte Enhancer Factors 2 (MEF2)

Les protéines MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) ont été identifiées par leur fixation spécifique au niveau d'une région riche en A et T du promoteur des gènes myogéniques (Gossett *et al.*, 1989). Ces protéines possèdent un domaine MADS-box et, entre autres, un domaine MEF2 qui leur est spécifique.
Chez les mammifères, quatre isoformes ont été identifiés pour l'instant : MEF2A, B, C et D, codés par des gènes distincts (Breitbart *et al.*, 1993).
L'expression des protéines MEF2 dans les cellules du muscle squelettique se produit de manière concomitante avec l'activation du programme de différenciation myogénique

(Molkentin *et al.*, 1995; Potthoff and Olson, 2007). Tous les facteurs MEF2 identifiés possèdent la capacité de se lier spécifiquement sur un site consensus MEF2 (Gossett *et al.*, 1989) identifié au niveau des régions promotrices de la plupart des gènes musculaires (Molkentin *et al.*, 1995). De plus, MEF2 a la capacité de se fixer sur les promoteurs des gènes codant les protéines bHLH, telles que la Myogénine et MyoD (Edmondson and Olson, 1989; Edmondson *et al.*, 1992). Néanmoins, il a été observé que dans les cellules non musculaires, l'expression de MEF2 peut être induite suite à une surexpression de la *Myogénine* et/ou de *MyoD*, ce qui suggère une régulation réciproque entre MEF2 et les MRFs (Chambers *et al.*, 1994).

L'hypothèse proposée à l'heure actuelle, est que cette boucle de contrôle pourrait être impliquée dans le maintien du taux d'expression des facteurs de transcription essentiels le long de la différenciation myogénique (Edmondson *et al.*, 1992).

De nombreuses études ont clairement montré l'étroite collaboration entre les MRFs et les protéines MEF2 dans les cellules du muscle squelettique. Par exemple, la régulation du promoteur du gène codant la desmine est assurée par la présence de ces deux familles de facteurs au cours du développement (Kuisk *et al.*, 1996), et en aval de ce processus (Li and Capetanaki, 1994).

Le promoteur de MRF4 possède également un site MEF2 en plus de la traditionnelle E-Box. Des travaux ont montré que MEF2 est capable d'activer la transcription de *Myf6* en synergie avec MYOD ou MYOG (Black and Olson, 1998; Black *et al.*, 1995). MEF2 et MYOD activent également de manière synergique les gènes codant la créatine kinase, les chaines légères de la myosine 1 et 3, et la Myogénine (Kaushal *et al.*, 1994).

Etonnamment, des gènes ne possédant pas d'E-Box au sein de leur promoteur peuvent être induits par les MRFs. De même une mutation sur l'un des motifs MEF2 ou E-box sur le promoteur du gène de la desmine ou de MRF4 ne stoppe pas l'action synergique des MRFs et de MEF2 sur leur transcription. Ceci suggère que les MRFs et MEF2 peuvent donc agir quand un seul site de liaison pour l'un des deux facteurs est présent sur le promoteur des gènes cibles (Navankasattusas *et al.*, 1992). Pour exemple, la transactivation du promoteur du gène *MyoG* par sa propre protéine ou par MyoD, nécessite un site MEF2 mais pas forcément d'E-Box (Buchberger *et al.*, 1994; Edmondson *et al.*, 1992; Parmacek *et al.*, 1994). De même, Le promoteur du gène de la troponine C, dont l'activation dépend de MYOD et de MYOG, possède uniquement un site MEF2 et ne présente pas de E-box (Parmacek *et al.*, 1994).

MEF2, à l'inverse des MRFs, ne possède pas d'activité myogénique intrinsèque, bien qu'elle soit capable de convertir des fibroblastes en culture en myoblastes (Molkentin *et al.*, 1995).

Ce résultat montre l'étroite interaction entre MEF2 et les MRFs.

Par des expériences d'immuno-précipitation, il a été montré que MEF2C est capable de se lier à l'hétérodimère formé par la Myogénine et la protéine E-12, en revanche, il ne peut pas reconnaître l'un de ces deux facteurs de manière isolée (Molkentin *et al.*, 1995).

Les expressions des MRFs et de MEF2 sont intimement liées par une régulation réciproque. De ce fait, il est supposé que les facteurs MEF2 jouent plutôt un rôle d'amplification et de maintien de l'expression des MRFs au cours de la différenciation, et non pas un rôle d'initiation ou de détermination.

➢ Le facteur de Réponse au Sérum (SRF)

Le Facteur de Réponse au Sérum (SRF) est l'un des membres les plus étudiés de la famille MADS-box. Ce facteur de transcription se fixe en homodimère sur une séquence de dix nucléotides appelée « boîte CArG ». A l'heure actuelle, une trentaine de sites CArGs fonctionnels ont été décrits dans différents promoteurs de gènes cibles musculaires (Chai and Tarnawski, 2002), dont le gène *C-fos* (Treisman, 1986), les gènes d'α-actines squelettiques (Muscat *et al.*, 1992) et cardiaques (Miwa and Kedes, 1987), la troponine T (Wang *et al.*, 1994).

Les embryons SRF-/- se développent normalement jusqu'à E6.5, ensuite ils meurent *in utero*, suite à la perte de formation du mésoderme (Arsenian *et al.*, 1998). Des études fonctionnelles réalisées *in vitro* sur la protéine ont permis de distinguer deux fonctions principales de la protéine SRF: l'induction de gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (Gauthier-Rouviere *et al.*, 1996), et la régulation des processus de différenciation, notamment dans le tissu musculaire squelettique (Miano, 2003).

Le SRF est exprimé de façon constitutive dans les cellules musculaires en culture. Son niveau d'expression, et sa localisation nucléaire, ne varient pas en fonction de l'état de la cellule (état prolifératif ou de différenciation) (Vandromme *et al.*, 1992). L'inactivation de la protéine SRF par micro-injection d'anticorps inhibiteurs réprime la différenciation de la lignée musculaire C2 en empêchant l'étape de fusion des myoblastes en myotubes. D'un point de vue moléculaire, cette inhibition s'explique par l'absence de la troponine T (marqueur tardif de la différenciation) et de Myogénine (Gauthier-Rouviere *et al.*, 1996). Il a également été montré que l'extinction de SFR, toujours *in vitro*, sur les lignées myoblastiques C2, par sh RNA, conduit à la disparition de la protéine MYOD (Soulez *et al.*, 1996).

➢ Les facteurs de croissance IGFs

Les IGFs (Insulin Like Growth Factors) sont primordiaux pour le développement embryonnaire. Ils sont généralement sécrétés et peuvent être produits par une majorité de tissus. Ils agissent de façon autocrine ou paracrine.

Les deux membres de cette catégorie de molécules, IGF-I et IGF-II se caractérisent par une structure très semblable à l'insuline (Le Roith *et al.*, 2001).

A l'âge adulte, l'IGFI contribue à la croissance et à la réparation des tissus, notamment les muscles, les os, le cartilage, les reins, les poumons et le cerveau. Le rôle précis d'IGFII chez l'adulte est encore mal connu (Dai *et al.*, 2010).

Pour induire différents types de réponses cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, IGF-I passe par son récepteur membranaire IGF-IR (IGF-I Receptor) ***(Figure 11)***, constitué de deux sous-unités α et deux sous-unités β. Les sous-unités α contiennent un site riche en cystéines qui permet la liaison d'IGFI, alors que les sous-unités β sont caractérisées par leur activité tyrosine kinase pour transmettre le signal aux effecteurs (pour revue De Meyts and Whittaker, 2002). Les souris *KO*, pour l'un des deux IGFs (*IgfI -/-* ou *IgfII -/-*), présentent une taille plus petite par rapport aux sauvages et un poids 40% inférieur à la norme (Baker *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). En revanche, une surexpression de *l'IgfI*, augmente considérablement le poids des souris de près de 30% par rapport aux sauvages (Mathews *et al.*, 1988).

Plusieurs études ont clairement décrit une augmentation de l'expression de l'IGF II au cours de la myogenèse (Florini *et al.*, 1991, 1996). Des souris déficientes pour le récepteur de l'IGF présentent une hypoplasie musculaire et meurent après la naissance par asphyxie (Liu *et al.*, 1993). Au contraire, une surexpression d'IGF-I chez la souris induit une augmentation de la taille des fibres musculaires (Barton-Davis *et al.*, 1998). *In vitro*, l'extinction de l'*IgfII* par sh RNA inhibe complètement la différentiation de la lignée myoblastique C2 (Florini *et al.*, 1991). De même, la surexpression d'*IgfII*, ou l'addition d'IGF-I ou IGF-II exogènes, accélèrent la différenciation myogénique *in vitro* (Ren *et al.*, 2010).

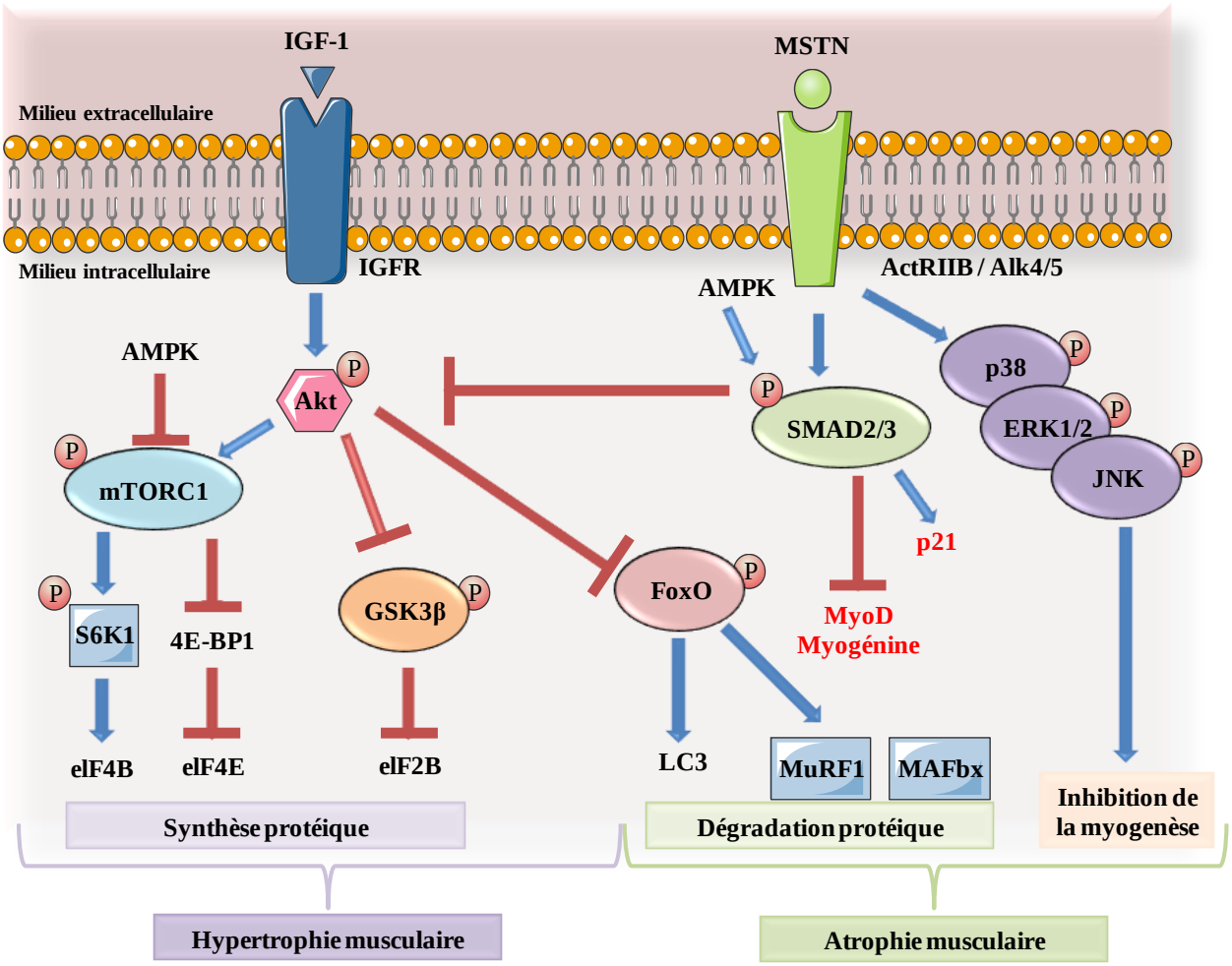


Figure 11 : Equilibre de la régulation de la masse musculaire : exemple de voies de signalisation antagonistes impliquant IGF1 et la myostatine dans la régulation de la masse musculaire.

La voie de signalisation IGF1, passe par le récepteur IGF-R, afin d'activer Akt par phosphorylation. A son tour, Akt active PI3k/AKT/mTOR et favorise ainsi les processus de synthèse protéique et par conséquent d'hypertrophie musculaire. L'activation de mTOR1 induit la phosphorylation de la Kinase S6K1, chargée de l'activation d'un nombre important de facteurs de transcription ; de plus mTOR active elF4E, en phosphorylant son inhibiteur 4E-BP1.
L'inhibition de GSK3-β conduit à l'activation des facteurs eIF2B et eIF2.
En parallèle, Akt inhibe la dégradation protéique en réprimant l'activation des facteurs de transcription de la famille FoxO. Ce dernier est nécessaire à la régulation des ubiquitine-ligases MuRF1 et MAFbx, qui sont capable d'induire la dégradation de protéines musculaires telle que la myosine en passant pas le protéasome. LC3, en revanche participe au processus d'autophagie lysosomale.
A l'inverse, la myostatine active sa voie de signalisation canonique des smads en passant par le récepteur ActRIIB, ainsi que les voies des MAPKs (ERK1/2, JNK, p38), l'ensemble aboutissant à l'inhibition des processus myogéniques. Les smads sont aussi capables d'inhiber les voies de la synthèse protéique activées par Akt.
Indications : ActRIIB : activin receptor type-IIB ; Akt : protein kinase ; AMPK : AMP-activated protein kinase; BAlk4/5 : activin-like kinase; ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1/2; eIF : translation initiation factor; FoxO: forkhead box proteinO ; GSK3 – β : glycogen synthase kinase 3 β; IGF-1: insulin-like growth factor1 ; IGF-R: insulin-like growth factor receptor ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; LC3: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain3, MAFbx: muscle atrophy F-box ; MSTN : myostatine; MyoD : myoblast determination protein 1 ; MuRF1, muscle RING- finger protein 1 ; NFκB, nuclear factor-κ-B ; SMAD: sma mothers against decapentaplegic homolog ; S6K1 : ribosomal protein S6 kinase1 ; mTOR : mammalian target of rapamycin.

Les facteurs répresseurs de la myogenèse

➢ Les facteurs de croissance TGF-β

Les membres de la superfamille des TGF-β ont d'abord été caractérisés comme étant impliqués dans la prolifération et la différenciation de types cellulaires d'origine mésenchymateuse (Ignotz and Massagué, 1985). Dans les lignées de cellules musculaires, ainsi que dans les cultures de myoblastes primaires (rat, caille), les TGF-βs ont la propriété d'inhiber d'une façon dose-dépendante la différenciation myogénique, et d'autre part ils induisent la prolifération cellulaire (Florini *et al.*, 1991).

Cette inhibition semble transitoire et spécifique car l'élimination progressive de ce facteur du milieu de culture conduit à la levée de la répression (Florini *et al.*, 1991).

Chez les mammifères, la superfamille des TGF-β comprend une cinquantaine de protéines: les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les GDFs (Growth and Differentiation Factors), les activines, et d'autres protéines telles que le MIS (Müllerian Inhibiting Substance) (Hinck, 2012). Toutes sont impliquées dans la régulation du développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte.

Le mécanisme par lequel les TGF-β inhibent la différenciation myogénique implique la phosphorylation des facteurs Smad2 et Smad3 ***(Figure 11)***, qui, en combinaison avec certains facteurs de transcription, régulent l'expression génique (Glass, 2010). TGF-β inhibe ainsi l'expression de *MyoD*. De plus, Smad3 interagit physiquement avec MYOD et MEF2C, et inhibe leur activité de transactivation (Kollias and McDermott, 2008).

Parmi les membres de cette famille, la myostatine aussi appelée GDF-8 (Growth and Differentiation factor 8), reste à ce jour l'inhibiteur le plus puissant de la différenciation et de la masse musculaire (Lee and McPherron, 1999). Ce facteur a été découvert lors de la recherche de nouveaux membres de la superfamille des TGF-β. Une mutation perte de fonction de GDF-8 induit le phénotype hyper musclé, observé la première fois chez la souris par McPherron en 1997 (McPherron *et al.*, 1997). Depuis, les recherches concernant ce facteur ne cessent de progresser chez l'homme, la souris, et le bovin. Récemment, la mutation causale de la Myostatine qui induit le phénotype hyper-musclé chez la vache blonde d'aquitaine a été mise en évidence par des membres de notre unité (Bouyer *et al.*, 2014).

La myostatine influence la différenciation musculaire, par le biais de la voie des Smads. Elle est capable de bloquer la différenciation musculaire et se traduit *in vitro* par une diminution de l'index de fusion (Langley *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007).

La myostatine est produite principalement dans le muscle squelettique. Elle est circulante dans le sang, et agit sur le muscle en se fixant sur le récepteur de type II de l'activine. Il s'en suit le recrutement et la phosphorylation du récepteur de type I, ALK4 ou 5. Ce dernier recrute les Smad2 et Smad3, qui après phosphorylation, sont transloqués dans le noyau pour agir sur l'activité transcriptionnelle de gènes cibles (Glass, 2010). D'un point de vue moléculaire, ces facteurs agissent sur l'expression des MRFs, notamment *MyoG* et *MyoD*, ainsi que sur l'activité de la créatine kinase, ce qui se traduit par une modulation du diamètre des myotubes (Glass, 2010).

Outre leur effet direct sur les MRFs, Smad2 et 3 inhibent les acteurs de la voie AKT, ce qui entraine une potentialisation de leur phosphorylation et de leurs effets anti-myogéniques (Trendelenburg *et al.*, 2009).

➢ Le facteur de croissance FGF

Le facteur de croissance FGF est connu pour être mitogène pour les cellules dérivées du mésoderme, mais surtout, c'est un puissant inhibiteur de la différenciation myogénique. En effet, il induit une signalisation qui inhibe directement l'expression des gènes qui codent pour les protéines bHLH.

De plus, le FGF active la phosphorylation de la thréonine 114 de la myogénine, ce qui induit la perte de son potentiel de liaison à l'ADN (Olson, 1993). Ce site de phosphorylation existe sur d'autres protéines bHLH, ce qui suggère que la phosphorylation des autres protéines de cette famille est possible, et participerait probablement à l'inhibition de la différenciation myogénique (Olson, 1993).

Les voies de signalisation impliquées dans la myogenèse

➢ La voie PI3k-Akt

Les IGFs et la voie PI3K-Akt sont impliqués dans la différenciation myogénique (Coolican *et al.*, 1997; Wilson and Rotwein, 2007; Wilson *et al.*, 2004). Des fibroblastes embryonnaires qui sur-expriment *MyoD*, engagent une différenciation myogénique complète. Cependant cette différenciation myogénique est inhibée par la surexpression d'un dominant négatif d'Akt1. Dans ce cas, l'expression de *MyoD* n'est pas affectée, mais son activité transcriptionnelle est bloquée (Rotwein and Wilson, 2009). De plus, des fibroblastes embryonnaires sur exprimant *MyoD*, mais provenant de souris transgéniques déficientes en Akt1, ne se différencient pas, n'expriment ni la myogénine ni la troponine, et ne fusionnent pas, contrairement aux cellules provenant de souris sauvages. En revanche, les cellules provenant des souris déficientes en Akt2 se différencient normalement (Rotwein and Wilson, 2009). Si l'on ajoute à ces données, d'autres études utilisant des *sh RNA* ciblant les deux isoformes d'Akt1et 2, il est possible de conclure au rôle important d'Akt1 dans la différenciation myogénique.

Le rôle d'Akt sur la myogenèse passe par le facteur MYOD, en permettant l'assemblage des acteurs du transcriptome muscles spécifiques, comprenant MYOD, les acétyl-transférases p300 et les p300/ CBP- associated factor. Le processus implique la phosphorylation directe de P300, qui renforce son action acétyltransférase envers MYOD et favorise le recrutement de pCAF responsable de l'acétylation des histones, permettant ainsi la stabilisation du complexe « MYOD/p300/pCAF » d'initiation de la transcription (Héron-Milhavet *et al.*, 2008).

➢ La voie p38 MAPK

La voie p38 MAP-kinase implique la protéine qui porte le même nom et qui est une sérine, thréonine kinase, impliquée dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire (Keren *et al.*, 2006).

Chez les vertébrés quatre isoformes de p38 ont été identifiées : α, β, γ et δ. Ces isoformes sont caractérisés par la présence d'un motif de phosphorylation Thr-Gly-Tyr (TGY). Une fois activée, p38 phosphoryle ses substrats cibles, comprenant plusieurs kinases et facteurs de

transcription, ce qui laisse supposer un rôle de p38 dans la régulation génique (Keren *et al.*, 2006).

Il est largement reconnu que les isoformes α et β de p38 sont activées lors de nombreux processus de différenciation cellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique des isoformes α et β de p38 bloque la différenciation myogénique en réduisant l'expression des MRFs, des protéines régulatrices du cycle cellulaire notamment P21, et des gènes codant des protéines structurales muscle spécifiques, telles que la myosine (Cuenda and Cohen, 1999; Zetser *et al.*, 1999).

L'implication des autres isoformes de p38 dans la différenciation myogénique n'est pas à l'heure actuelle bien établie bien que l'isoforme p38 γ semble contribuer à la différenciation de la lignée musculaire C2C12 (Lechner *et al.*, 1996).

Le rôle de p38 dans la différenciation myoblastique est lié à la phosphorylation des protéines de la famille MEF2 (Yang *et al.*, 2011) qui est essentielle pour leur activité transcriptionnelle (Zetser *et al.*, 1999).

La kinase p38 semble réguler négativement l'expression de MRF4 en phosphorylant des résidus sérines de son domaine de transactivation, ce qui réduit sa capacité à induire la transcription de ses gènes cibles (Suelves *et al.*, 2004). p38 agit sur MRF4 dans les premières étapes de fusion myoblastique, mais une fois que les myotubes sont formés, l'activité p38 décline et MRF4 est exprimé normalement pour maintenir le phénotype différencié des myotubes (Keren *et al.*, 2006).

La voie de signalisation p38/MAPK pourrait interagir avec d'autres voies déterminantes dans la différenciation myogénique, notamment la voie PI3K-Akt, et mTOR. La communauté scientifique est très partagée quant à cette supposition, car certaines études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs d'une des deux voies (mTOR ou p38MAPK), inhibe simultanément les deux voies de signalisation au cours de la différenciation myogénique. Une boucle de rétrocontrôle positive entre ces deux voies a été décrite à ce sujet, elle permettrait de finaliser la différenciation myogénique (Cuenda and Cohen, 1999). En revanche d'autres études ont montré que l'inhibition d'une voie n'affecte pas l'activation de l'autre (Li and Dalakas, 2000; Sarker and Lee, 2004; Tamir and Bengal, 2000).

- **La voie de la petite protéine G Rho**

Les petites protéines G Rho contrôlent une multitude de processus biologiques, comme l'organisation du cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire, le transport membranaire et l'activité des facteurs de transcription (Bryan *et al.*, 2005).

Parmi les nombreuses sous-familles qui constituent cette grande classe de molécules, la "RhoA-related subfamily", la "Rac1-related subfamily", ainsi que les "Cdc42-related subfamily" sont impliquées dans la différenciation myogénique (Bryan *et al.*, 2005).
RhoA semble induire l'expression de *MyoD, in vitro* dans la lignée myoblastique C2.7. L'inhibition de RhoA par un inhibiteur, ou la surexpression d'un dominant négatif perturbent l'expression de *MyoD* et des gènes sous le contrôle de MYOD (Carnac *et al.*, 1998). Enfin, l'expression d'un dominant négatif de RhoA inhibe la fusion myoblastique en diminuant l'expression de la myogénine et de la myosine (Wei *et al.*, 1998).

- **La voie de signalisation mTOR**

La voie de signalisation mTOR est impliquée dans la survie cellulaire, le métabolisme énergétique, la prolifération cellulaire, ainsi que dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Sarbassov *et al.*, 2004).
L'implication concrète de cette voie dans la myogenèse est évidente, mais elle reste pour le moins mal-connue. En effet, le traitement des lignés myoblastiques C2C12 à la rapamycine, un inhibiteur spécifique de la voie mTOR, inhibe l'expression du gène qui code l'IGFII qui est essentiel à la différenciation myogénique (Erbay *et al.*, 2003). L'expression d'une forme mutante de mTOR résistante à la rapamycine, permet de restaurer l'expression d'*IgfII* et la différenciation myogénique même en présence de rapamycine (Erbay *et al.*, 2003).

En revanche, il semble que l'activité kinase de mTOR ne soit pas nécessaire à l'initiation de la fusion myoblastique, mais seulement à la maturation des myotubes. MTOR serait impliqué de manière kinase-indépendante dans l'initiation de la différenciation, via l'expression d'*IgfII*. Par contre, l'activité kinase de mTOR n'est mise en jeu, que lors de la maturation des myotubes (Erbay and Chen, 2001).
Une autre étude portant sur des myoblastes primaires humains démontre également l'implication de mTOR, dans la signalisation myoblastique via la myostatine ***(Figure 11)***. Dans cette étude, les auteurs ont décrit que l'inhibition de mTORC1 amplifie la réponse induite par la myostatine et empêche la différenciation en bloquant la voie AkT. Le rôle de mTOR serait donc de contre balancer cet effet anti-myogénique piloté par les Smad (Trendelenburg *et al.*, 2009).

Chapitre II : La glycosylation

Parmi les différentes et nombreuses modifications post- et co-traductionnelles que peuvent subir les protéines, la glycosylation constitue le mécanisme le plus commun. Il s'agit d'un processus complexe au cours duquel des polymères glycanniques sont ajoutés aux protéines ou aux lipides lors de leur passage à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ces glycannes jouent un rôle essentiel dans la modulation de la stabilité des protéines (Kundra and Kornfeld, 1999), l'acquisition de leur conformation (Helenius and Aebi, 2001; Varki, 1993) et les interactions avec d'autres protéines impliquées notamment dans l'adhésion cellulaire (Haltiwanger and Lowe, 2004), la différenciation (Geyer and Geyer, 2006) et le développement (Haltiwanger and Lowe, 2004; Stanley and Okajima, 2010).

L'étude des glycannes s'est avérée longue et fastidieuse pour la communauté scientifique, et reste à ce jour un domaine à la frontière entre la biologie et la chimie. Bien que les glycannes fassent partie des quatre grandes familles de macromolécules qui constituent la cellule avec les protéines, les acides nucléiques et les lipides, la compréhension de leurs fonctions exactes dans la cellule reste parcellaire. De plus le nombre d'études centrées sur les glycannes en tant que molécules chimiques est très limité comparativement aux études s'intéressant aux acides nucléiques ou aux protéines (Lowe and Marth, 2003).

De nombreuses connaissances concernant les glycannes sont obtenues grâce à des approches d'étude de gènes codant pour les acteurs de la glycosylation, tels que les glycosyltransférases et les glycosidases. Dans ce contexte, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées pour des expérimentations *in vitro* (Lowe and Marth, 2003). Avec le développement croissant de la spectrométrie de masse, la communauté scientifique s'est tournée vers des stratégies plus biochimiques (Zhou *et al.*, 2014). Le terme « Glycobiologie » a ainsi été créé afin de décrire la science qui s'intéresse à l'étude de ces polymères glycanniques. Plus récemment, le terme « Glycomique » a émergé ; ce domaine vise à référencer le répertoire des structures glycanniques présentes dans les organismes et les types cellulaires (Wang *et al.*, 2014).

Les glycannes constituent les bio-polymères naturels les plus abondants et les plus diversifiés dans la nature (Ohtsubo and Marth, 2006). Cette diversité résulte de la richesse des structures possibles et des activités des enzymes impliquées dans la biosynthèse et l'agencement de ces structures. En effet, plus de 2-3% du génome est consacré aux processus de glycosylation (Lowe and Marth, 2003). Plus de la moitié des protéines cellulaires sont.

glycosylées, et environ 80% des protéines membranaires sont porteuses de sites potentiellement glycosylables (Apweiler *et al.*, 1999)

La grande diversité de fonctions des déterminants glycanniques repose en grande partie sur cette forte diversité structurale. En effet, les chaines oligosaccharidiques des glycoconjugués sont constituées à partir de douze monosaccharides de base ***(Tableau 1)***. Chez les mammifères, on trouve les oses neutres (galactose, glucose, mannose, fucose et xylose), les osamines (Exp : glucosamine, *N*-acétylglucosamine, *N*-acétylgalactosamine) et enfin les acides neuraminiques (Exp : acide *N*-acétyl neuraminique). De plus, la longueur des chaines peut être extrêmement variable et peut comprendre de un à une centaine de monosaccharides. Ces derniers sont transférés à partir de leur forme activée (nucléotide-sucre) par l'action catalytique de glycosyltransférases spécifiques du monosaccharide transféré, du substrat accepteur et du type de liaison formée (Yu and Chen, 2007).

Monosaccharides	Abréviations	Symboles
Xylose	Xyl	
Galactose	Gal	
Galactosamine	GalN	
N-acétylgalactosamine	GalNAc	
Glucose	Glc	
Glucosamine	GlcN	
N-acétylglucosamine	GlcNAc	
Mannose	Man	
Mannosamine	ManN	
N-acétylmannosamine	ManNAc	
Acide N-acétylneuraminique	Neu5Ac	
Acide N-Glycolylneuraminique	Neu5Gc	
Fucose	Fuc	
Acide Glucuronique	GlcUA	
Acide Galacturonique	GalUA	
Acide Mannuronique	ManUA	

Tableau 1 : Les monosaccharides les plus couramment observés dans les structures des glycannes.
La nomenclature des symboles a été établie par le « *Consortium for funtional Glycomics* »

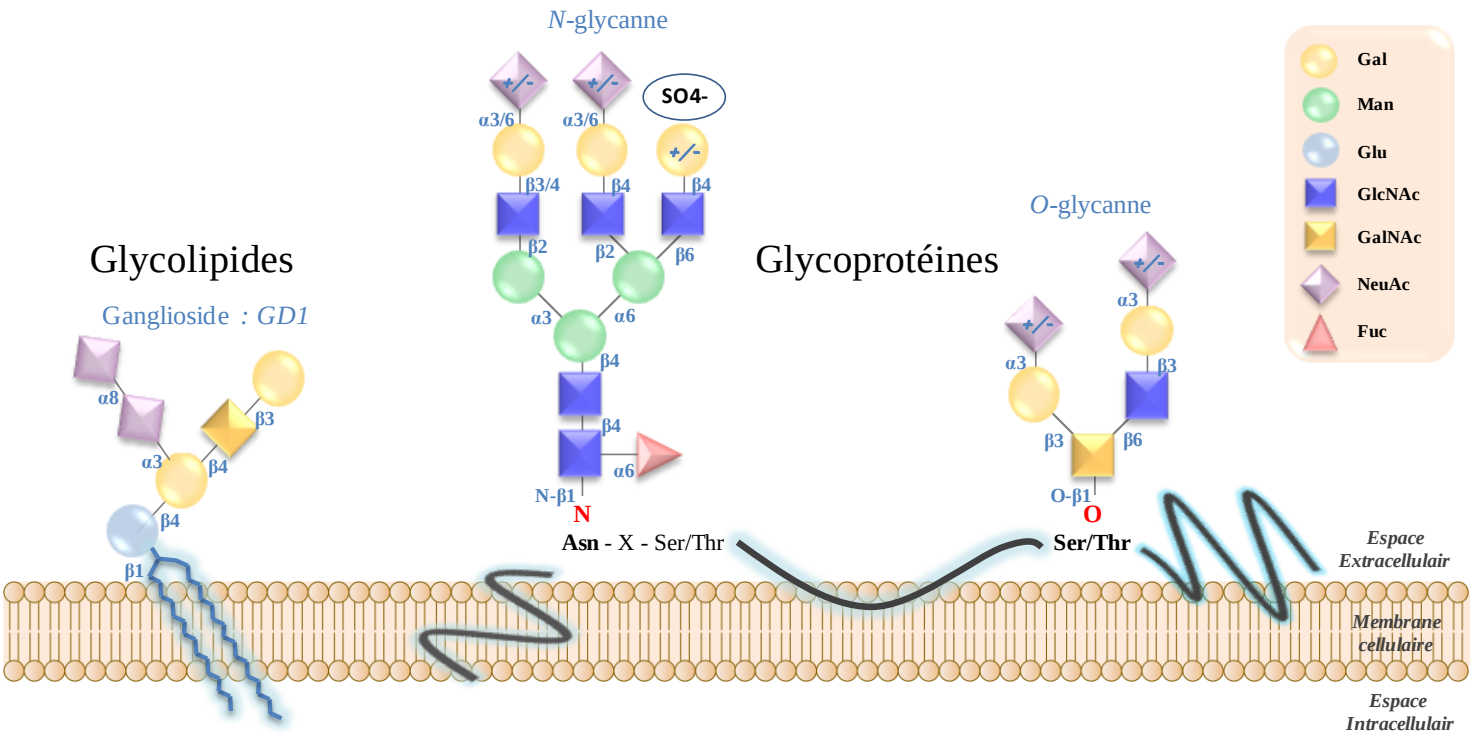


Figure 12 : Représentation schématique des structures glycanniques liées aux protéines et aux lipides.

Outre la différence de l'aglycone, les structures glycanniques diffèrent aussi par leur agencement, la nature des monosaccharides qu'ils portent et la nature des liaisons. Par exemple, la liaison avec l'aglycone peut être de type diffèrent selon la nature du glycanne (*N*- ou *O*- glycanne).

La liaison glycosidique est une liaison covalente entre deux monosaccharides, ou un monosaccharide et un oligosaccharide, ou un oligosaccharide et un aglycone qui peut être une protéine ou un lipide, donnant ainsi naissance à une glycoprotéine ou un glycolipide (Zhao et al., 2008). Dans ce manuscrit nous nous intéresserons particulièrement aux glycoprotéines ***(Figure 12)***.

Les glycoprotéines constituent une classe importante de biomolécules ubiquitaires, qu'elles soient cellulaires ou secrétées. Une même glycoprotéine peut présenter plusieurs sites de liaisons pour les glycannes, appelés sites de glycosylation. La structure de la cupule glucidique peut être divisée en trois parties : « Le noyau » représentant la région proximale invariante, qui se lie au corps protéique, cette partie peut être substituée par une ou plusieurs « antennes », constituant un squelette qui peut être rallongé par des sucres périphériques tels que les acides sialiques ou les fucoses pour former la « périphérie » du glycanne. *(Zhou et al.,* 2014).

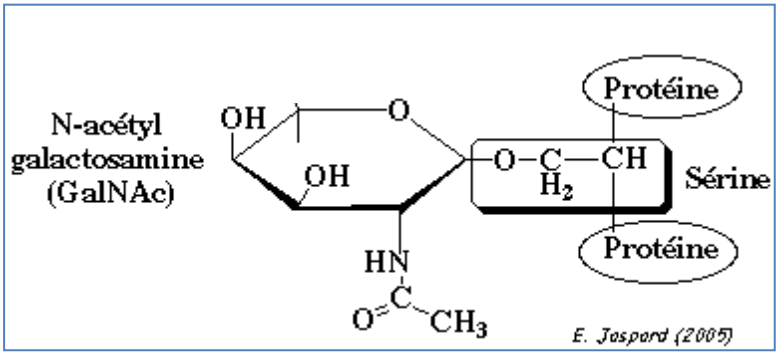
De plus, ces glycannes périphériques sont susceptibles d'être modifiés par phosphorylation, sulfatation, méthylation, et acétylation. Dans le cadre de modifications post-synthétiques, ces processus complexes sont notamment responsables de la très forte hétérogénéité glycannique (Yu and Chen, 2007). Les sucres périphériques sont souvent responsables des propriétés biologiques des glycannes grâce notamment aux charges qu'ils portent (Baycin-Hizal *et al.,* 2014) ***(Figure 12)*.**

Nous l'avons compris, la glycosylation apporte une diversité supplémentaire aux protéines. En effet, une glycoprotéine peut présenter de multiples glycoformes, possédant toutes la même séquence protéique, mais différentes par la structure des chaines glycanniques et la distribution de ces chaines sur les sites de glycosylation (Rademacher *et al.*, 1988).

Alors que la séquence primaire des protéines est codée et peut être prédite à partir d'une matrice ADN, la séquence des chaines glycanniques n'est pas prévisible et dépend de l'action concertée de glycosyltransférases et de glycosidases (Saito *et al.*, 2002). De plus, les protéines sont caractérisées par un enchainement linéaire d'acides aminés, alors que les chaines glycanniques se caractérisent par des structures branchées et dans certains cas multi-antennées. Les possibilités de liaison sont de ce fait plus importantes. A titre d'exemple, si l'on considère le type d'anomérie α ou β, la position de la fonction hydroxyle impliquée dans la liaison et le nombre de points de branchement, six hexoses différents conduisent à 10^{12} structures, alors que six acides aminés différents dans les mêmes conditions donnent "seulement" 10^{5} structures possibles (Laine, 1994).

Selon la nature de la liaison entre le monosaccharide et la protéine, nous pouvons distinguer deux grands types de glycosylation : La *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation ***(Figure 13)***. D'autres types de glycosylation existent, mais ils sont très rares et peu représentés ou juste spécifiques de certaines glycoprotéines telles que l'α-dystroglycanne. Un exemple sera abordé à la fin du manuscrit.

O-glycosylation



N-glycosylation

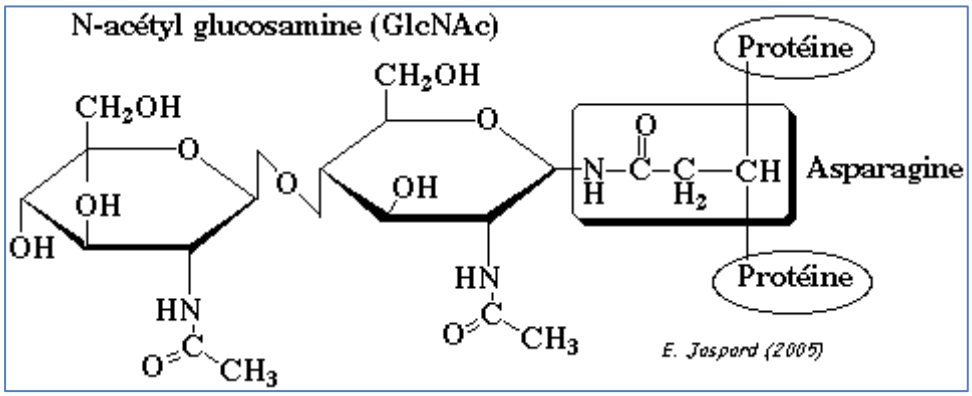


Figure 13 : Liaisons sucre-protéine pour les *O*- et *N*-glycannes.

La liaison dans les deux cas met en jeu une *N*-acétylglucosamine et une sérine ou thréonine dans le cas des *O*-glycannes (type mucine) et une asparagine dans la *N*-glycosylation.

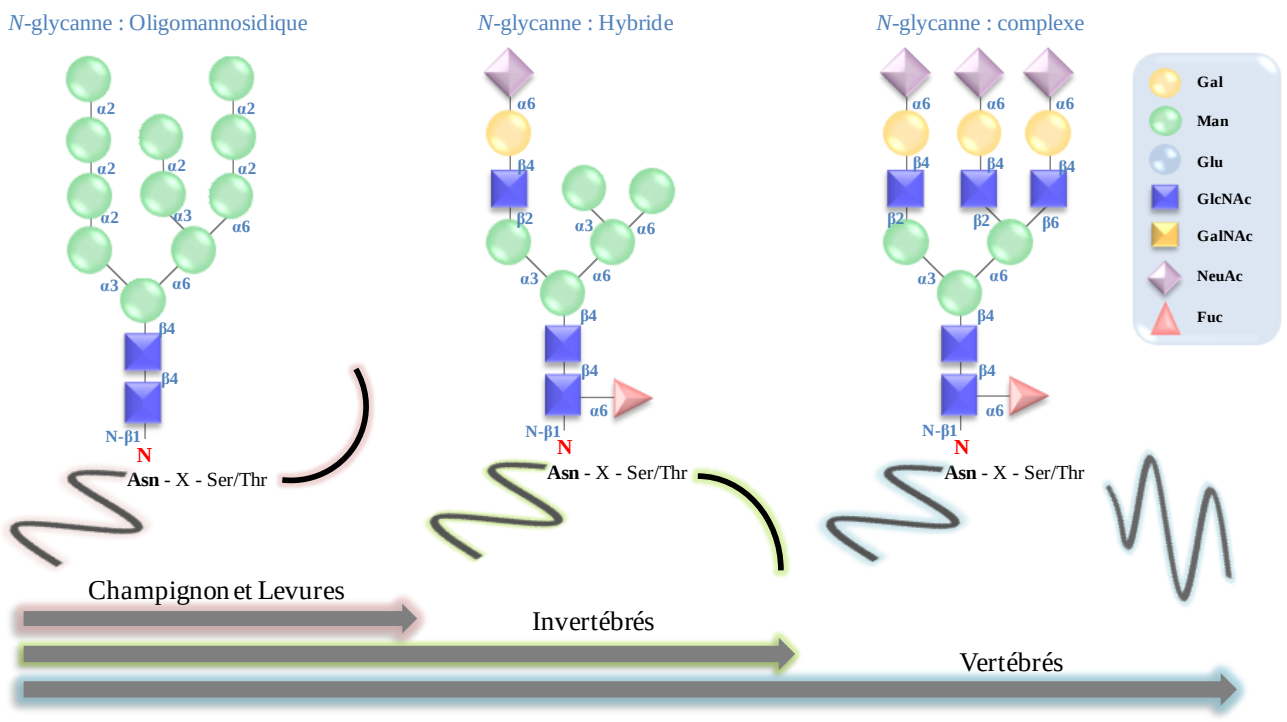


Figure 14 : Représentation schématique des structures glycanniques des trois principales classes de *N*-glycanne présents dans le règne eucaryote.

Le rectangle rouge représente le corps penta-saccharidique commun à toutes les classes de glycannes.
Image constitué à partir : des données de Kornfeld et Kornfeld, 1985 (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation concerne la plupart des glycoprotéines (Vijay, 1998). Elle résulte de l'attachement d'un résidu GlcNAc à l'azote du groupement amide de la chaine latérale d'un résidu asparagine (Asn) ***(Figure 14)*,** contenu dans une séquence consensus (Asn-X-Ser/Thr), X étant n'importe quel acide aminé excepté la proline et l'asparagine ***(Figure 14)*** (Gavel and von Heijne, 1990; Nilsson and von Heijne, 2000) .

La *N*-glycosylation est un processus co-traductionnel qui s'amorce dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) et se poursuit dans l'appareil de Golgi où le corps glycannique subit une maturation. La structure finale du *N*-glycanne ne dépend pas de la séquence de la protéine, mais d'autres facteurs, tels que la disponibilité des substrats (nucléotides-sucres) et des glycosyltransférases. Ces dernières varient quantitativement en fonction des conditions physiologiques (Geyer and Geyer, 2006).

Du fait de leur biosynthèse initiale commune, tous les *N*-glycannes partagent un noyau penta-saccharidique de type $Man_3GlcNAc_2$ ***(Figure 14)***. Les modifications apportées par la suite donnent naissance à trois grandes classes de *N*-glycannes : Les *N*-glycannes oligomannosidiques, les *N*-glycannes complexes et les *N*-glycannes hybrides ***(Figure 14)***. La *N*-glycosylation concerne un large panel de protéines : cytoplasmiques, lysosomales, endocrines, exocrines, sécrétées et membranaires. Elle intervient notamment dans le repliement et le contrôle de la qualité des glycoprotéines nouvellement synthétisées, ce qui explique le fait que la *N*-glycosylation se déroule co- traductionnellement dans le réticulum (Helenius and Aebi, 2001). La *N*-glycosylation intervient aussi dans la solubilité des glycoprotéines et les protège de la protéolyse. En effet, les sites de *N*-glycosylation sont souvent situés au niveau de régions peptidiques organisées en feuillets β, plus exposées aux protéases. Les *N*-glycannes, de par l'encombrement stérique qu'ils engendrent, protègent ces régions de la protéolyse (Kundra and Kornfeld, 1999). Nous reviendrons plus loin sur les mécanismes de biosynthèse impliqués dans la *N*-glycosylation.

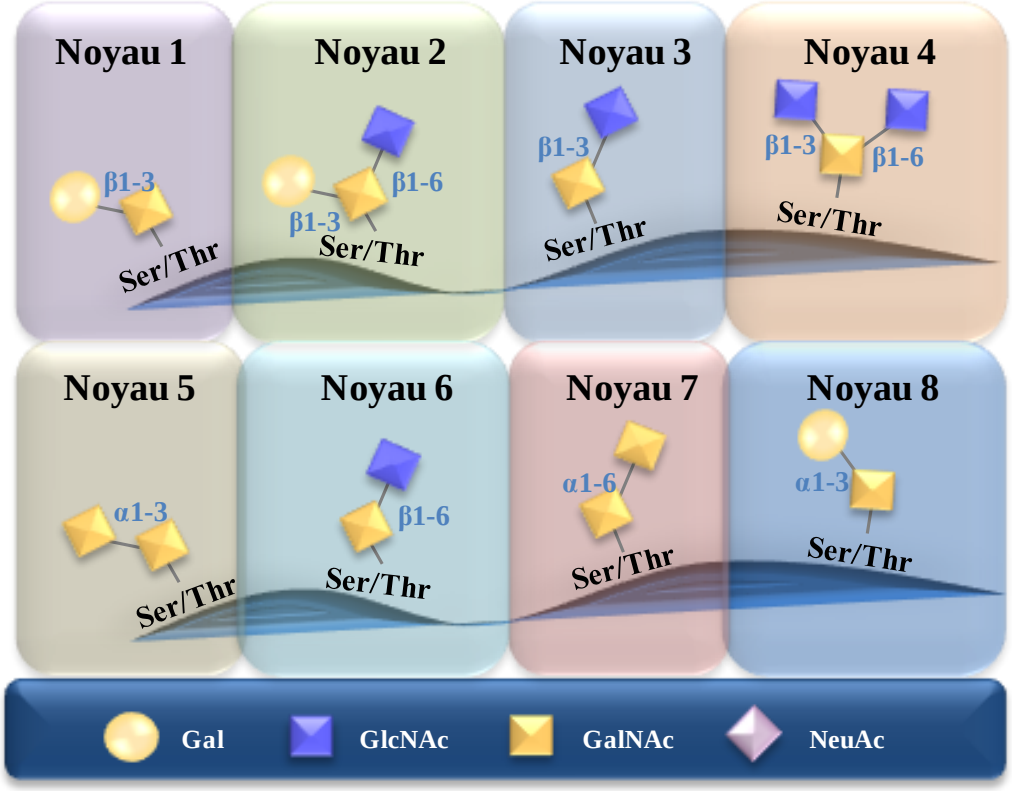


Figure 15 : Vue d'ensemble des différents noyaux *O*-glycanniques de type mucines.

La *O*-glycosylation

A inverse des *N*-glycannes, les *O*-glycannes ne possèdent pas de corps saccharidique commun. Ces structures résultent d'une addition séquentielle de monosaccharides sur un acide aminé hydroxylé. Ce type de glycosylation est exclusivement post-traductionnelle. La liaison entre le sucre et la protéine est de type acétalique et résulte de la condensation de la fonction hemiacétalique d'un monosaccharide avec la fonction alcool de l'acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) ***(Figure 15)***. La *O*-glycosylation est initiée dans la lumière du REG par le greffage d'un premier résidu sucré, et c'est en fonction du premier glycanne attaché à la chaine peptidique que les *O*-glycannes sont classés. Chez les mammifères, on compte essentiellement sept types de *O*-glycannes ***(Tableau 2)*** (Wopereis *et al.*, 2006). La suite du processus de la *O*-glycosylation se déroule dans l'appareil de Golgi par l'addition successive de monosaccharides activés.

Contrairement à la *N*-glycosylation, il n'existe pas de séquences consensus proprement dites pour la *O*-glycosylation, à l'exception de la *O*-fucosylation et la *O*-glucosylation.

Cependant pour certains motifs de type mucines par exemple, des études statistiques ont montré l'existence de sites de prédiction potentiellement favorables à l'établissement de ce type de glycosylation.

Type de *O*-glycanne	Structure et type de liaison au peptide	Glycoprotéine
Type Mucine	**Ser/Thr** - 1α GalNAc - (R)	Protéines sécrétées et membranaires
GAG	**Ser** -1β Xyl 4,1βGal3,1βGal3,1βGlc, (R)	Protéoglycanes
***O*- GlcNAc**	**Ser/Thr** - 1β GlcNAc	Protéines nucléaires et cytoplasmiques
***O*- Gal**	**Lys** - *O* - 1βGal2,1αGlc	Collagène
***O*- Man**	**Thr/Ser** - 1αMan2,1βGlcNAc4,1βGal3,2αNeuAc	α-Dystroglycanne
***O*- Glc**	**Ser**-1βGlc3,1αXyl3,1αXyl	Protéine à domaine EGF
***O*- Fuc**	**Thr/Ser** -1αFuc-3,1βGlcNAc4,1βGal6,2αNeuAC **Thr/Ser**-1αFuc3,1βGlc	Protéine à domaine EGF Protéine à domaine TSR

Tableau 2 : Les différents types de *O*-glycannes chez les mammifères.
(EGF) epidermal growth factor, (TSR) Thrombospondin Type 1 Repeat, (Fuc) Fucose, (GAG) glycosaminoglycane, (Gal) Galactose, (GalNAc) N-acétylgalactosamine, (Glc) glucose, (GlcNAc) N-acétylglucosamine, (Man) mannose, (Xyl) Xylose (Wopereis et al., 2006).

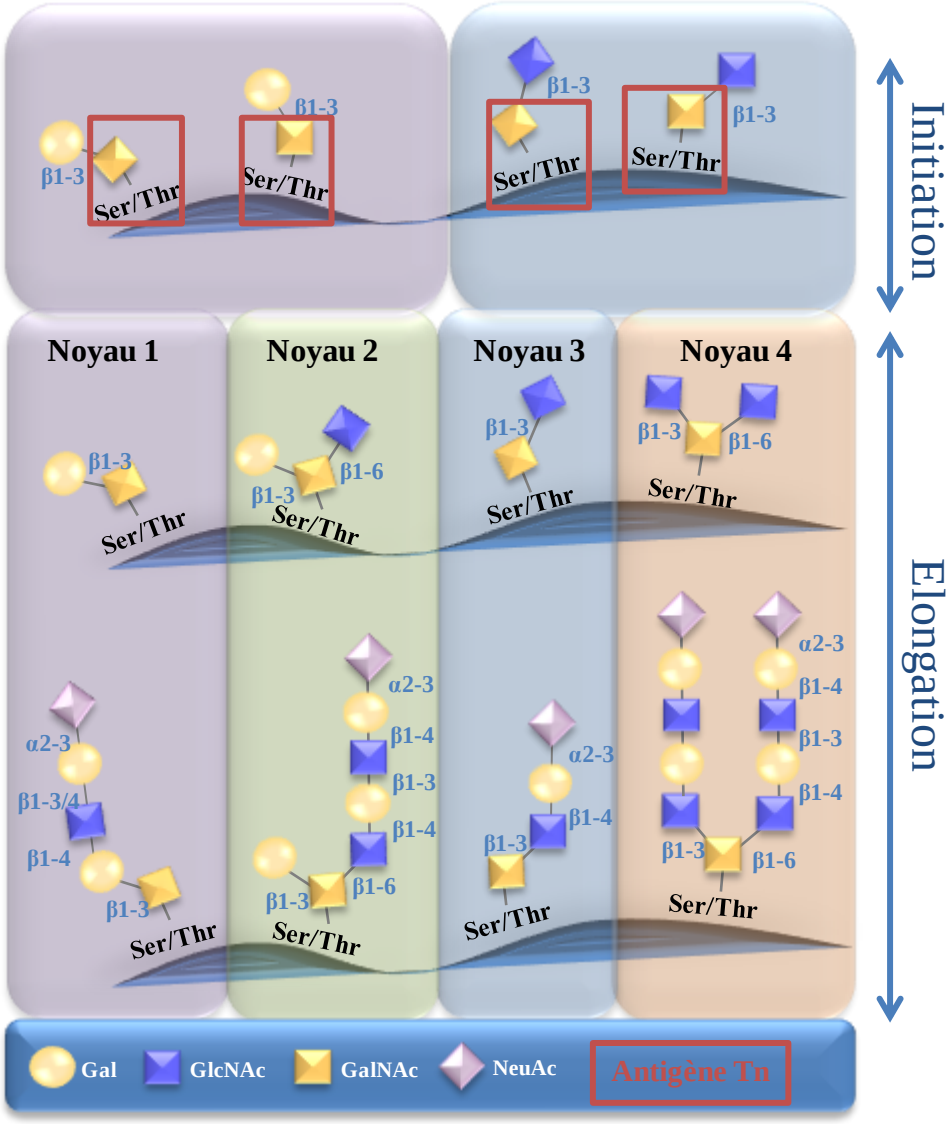


Figure 16 : Biosynthèse des *O*-glycannes de type mucines.

Exemple d'élongation des noyaux 1-4 avec les liaisons glycosidiques possibles. L'antigène Tn (cadre rouge), représente la *N*-acétylgalactosamine liée à une sérine ou une thréonine. Elle peut être sialylée ou allongée par la liaison de différents monosaccharides, afin de former les quatre principaux cœurs retrouvés dans les *O*-glycannes de type mucines.

La prédiction de ces sites repose sur d'importantes similitudes dans la composition en acides aminés entourant la position d'implantation du glycanne. L'ensemble de ces études a abouti à l'élaboration d'algorithmes capables de prédire les sites de *O*-glycosylation avec plus au moins de précision. Ces programmes sont disponibles en libre-service sur internet (exemple : http://www.cbs.dtu.dk/netOglyc/cbsnetOglyc.htm) (Calvete and Sanz, 2008).

Les chaines *O*-glycanniques peuvent être ramifiées jusqu'à une dizaine de résidus sucrés, tels que les *O*-glycannes de type mucine. Il semblerait d'ailleurs que la majorité des protéines sériques portent des *O*-glycannes pourvus de telles structures (Wopereis *et al.*, 2006). De plus, leur importance a été mise en évidence dans le cas des glycoprotéines des muqueuses qui confèrent à l'organisme une protection contre les infections et la déshydratation (Tan *et al.*, 2010). Les chaines *O*-glycanniques peuvent aussi être linéaires avec des longueurs variables allant de 1 à 4 résidus glucidiques pour la *O*-fucosylation jusqu'à plusieurs milliers dans le cas des protéoglycanees. Dans ce manuscrit, je passerai brièvement en revu les plus grandes classes de *O*-glycosylation retrouvée chez les mammifères :

1. Le type mucine (*O*-GalNAc)

Elle est très répandue et implique l'association d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) en anomérie α- sur le groupement OH- d'une sérine ou thréonine par une liaison acétylique. Ce type de glycosylation est rencontré dans de nombreuses glycoprotéines membranaires et circulantes. C'est surtout le cas chez les mucines qui sont des glycoprotéines de haute masse moléculaire présentes dans des sécrétions épithéliales exocrines (Brockhausen, 1999; Van den Steen *et al.*, 1998). La *O*-glycosylation de type mucine débute dans l'appareil de Golgi. Le résidu GalNAc initiateur peut être allongé par un résidu galactose, *N*-acétylglucosamine et/ou un acide sialique ***(Figure 16)***. La chaine glycannique peut être divisée en trois régions distinctes : Le noyau qui constitue le point d'ancrage à la protéine, le squelette glycannique qui peut comporter des résidus lactosamine ou néolactosamine (détailler plus loin dans la partie biosynthèse), et finalement la partie terminale, avec le rajout de sucres périphériques tels que du fucose et des acides sialiques.

Dans la nature, il existe huit noyaux différents ***(Figure 15)*** ayant la même origine à savoir l'antigène Tn qui représente la liaison α-*O*-glycosidique entre le GalNAc et l'aglycone [GalNAc (α1-*O*) Ser/Thr].

Chez les mammifères, les noyaux 1 à 4 sont plus représentés. Le noyau 1, qui constitue le déterminant antigénique de « Thomsen-friedenreich antigen », dit antigène T et le noyau 2, ont une distribution ubiquitaire au niveau des glycoprotéines membranaires et sécrétées *(Figure 16)*. Le noyau 1 est essentiellement retrouvé sous forme mono- ou bi-sialylée, fréquemment en α (2,3). Le noyau 7 est le seul qui n'ait jamais été décrit chez l'homme. Les noyaux 3 et 8 sont exclusivement retrouvés au niveau des tractus gastro-intestinaux, respiratoires et génitaux (Brockhausen, 1999; Van den Steen *et al.*, 1998).

Les chaines *O*-glycanniques de type mucines remplissent de nombreux rôles. Elles interviennent notamment dans la protection des tissus épithéliaux sous-jacents contre les agressions physiques comme les variations du pH, ou biologique comme les agents pathogènes (Hanisch *et al.*, 2001; Tian and Ten Hagen, 2009).

2. Le type *O*-GlcNAc

Ce type de glycosylation est essentiellement retrouvée au niveau des protéines cytosoliques et nucléaires. Il met en jeu une liaison de type *O*-*β*-glycosidique entre un résidu GlcNAc et un résidu Ser/Thr. Cette modification est tout à fait particulière car, d'une part, la partie glucidique n'est constituée que d'un monosaccharide (GlcNAc), et d'autre part, la liaison glycosidique avec la protéine est transitoire et réversible. Le glycanne en question est en équilibre avec un phosphate. Largement retrouvée dans des processus de translocation de glycoprotéines dans le noyau, ce type de modification est mis en jeu, notamment, dans la modulation de la signalisation, elle influe sur l'expression, la dégradation et le trafic protéique. Le rôle de cette *O*-glycosylation a été décrit dans de nombreux processus pathologiques, notamment le diabète et la neuro-dégénérescence (Hart *et al.*, 2007).

3. Le type protéoglycannes (*O*-xyl)

Cette glycosylation concerne des chaines polysaccharidiques longues, linéaires et généralement poly-chargées, appelées les glycosaminoglycanes (GAGs). Elles sont portées par le squelette peptidique des protéoglycannes. Ces glycoprotéines sont retrouvées essentiellement dans la matrice extracellulaire et la lame basale de la plupart des tissus conjonctifs (Bülow and Hobert, 2006). Cette association implique une liaison *O*-*β*-glycosidique entre un xylose (Xyl) et un résidu Ser. Les chaines de GAG sont constituées d'un noyau tétra saccharidique linéaire conservé : [GalNAcβ1,4GlcUAβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Xyl-*O*-Ser/Thr] prolongé par un nombre variable d'unités di-saccharidiques agencées linéairement HexUA-HexNH-R (R=H/Ac). Ces structures peuvent être sulfatées. Cette classe de glycannes compte quatre familles qui diffèrent notamment par la nature des résidus saccharidiques, l'isomérie de liaison et des unités di-saccharidiques répétitives. Nous retrouvons les chondroïtines-sulfates, les dermatanes-sulfates, les héparanes-sulfates et enfin les kératanes-sulfates. Seules les trois premières familles respectent le motif de liaison au Xyl décrit précédemment. Les kératanes-sulfates quant à eux sont liés à l'axe protéique via un *N*-glycanne ou un *O*-glycanne de type *O*-GalNAc ou *O*-Man. Les GAGs confèrent aux protéoglycannes de nombreuses propriétés biologiques, telles que la régulation des activités enzymatiques, la régulation de la croissance et la migration cellulaire. Ces résidus jouent aussi un rôle primordial lors du développement (Bülow and Hobert, 2006; Bülow *et al.*, 2008).

4. Le type collagène (*O*-Gal)

Cette glycosylation est portée par des glycoprotéines fibreuses, et des collagènes de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Ce type de glycosylation résulte de la liaison covalente d'un résidu Gal avec un acide aminé particulier (l'hydroxy-lysine) par une liaison *O*-*β*-glycosidique. La cupule glucidique est constituée d'un résidu Gal unique, ou d'un résidu Gal associé au glucose par une liaison α(1,2) (Spiro *et al.*, 1971).

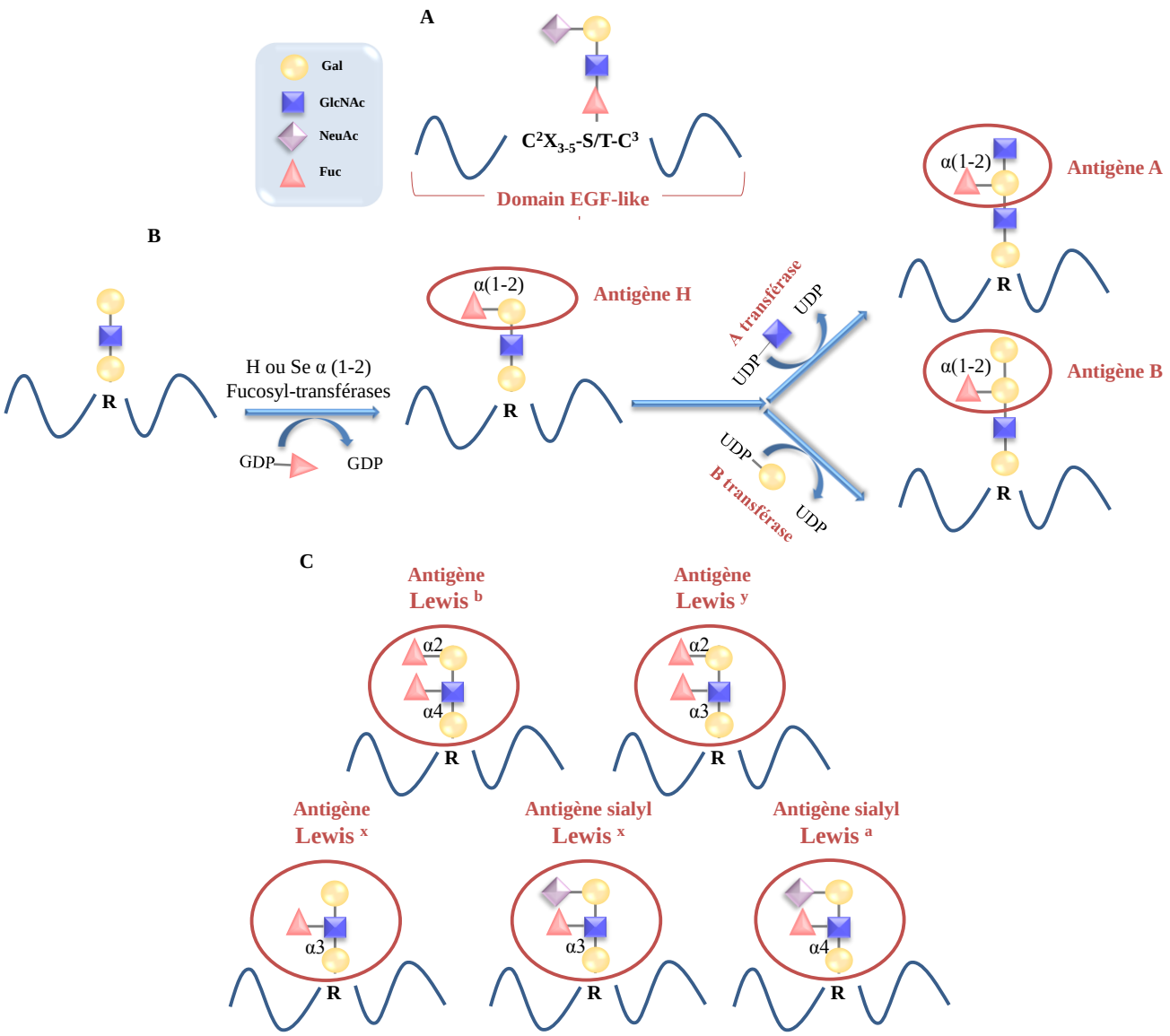


Figure 17 : Structure des glycannes fucosylés les plus communs

A-Représentation schématique d'un *O*-fucosylglycanne. La *N*-acétylglucosamine est liée en β(1-3) au fucose grâce à l'action d'une β3GlcNAc-transférase de la famille Fringe. Le galactose est lié en β(1-4) par l'action d'une β4Gal-transférase et enfin l'acide sialique est en α(2-3/6), grâce à l'action d'une sialyl-transférase de la famille des St6gal ou St3gal.
B- Synthèse du système de groupe sanguin ABO. H et Se transférases constituent une paire de α(1-2)-fucosyltransférases responsables de la synthèse de l'antigène H dans les tissus. Le *locus ABO* code une glycosyltransférase qui modifie l'antigéne H. L'allèle *A* code une *N*-acétylgalacosamine-transférase, alors que l'allèle *B* code une galactosyltransférase. En revanche l'allèle *O* code une enzyme tronquée inactive.
C- Les différents antigènes Lewis. Le cercle indique la partie immunogénique de chaque antigène.
Les monosaccharides (Fuc, Gal et GalNAc) sont séquentiellement ajoutés au précurseur et le type de liaison dépend de la glycosyltransférase impliquée. Par exemple, l'enzyme FUT3 catalyse l'addition de résidus fucose aux précurseurs type 1 et 2 en α(1-4) ou en α(1-3), aboutissant respectivement à la synthèse des tri-saccharides Lewis^{a} (*Lea*) ou Lewis^{x} (*Lex*). L'addition d'un fucose en α(1-2), catalysée par l'enzyme FUT2, sur ces deux précurseurs, conduit à la production respectivement des Lewis^{b} (*Leb*) et Lewis^{y} (*Ley*).
Origine de l'image: Figure reconstituer d'après les données de la revue Becker et Lowe, 2003

5. Le type *O*-Mannosylation (*O*-Man)

Retrouvée de façon limitée chez les mammifères, généralement au niveau du système nerveux (Chai *et al.*, 1999) et du muscle squelettique, cette glycosylation est aussi connue du fait de sa présence sur l'α-dystroglycanne, un récepteur incriminé dans de nombreuses dystrophies musculaires (Manya and Endo, 2004). L'*O*-mannosylation résulte de l'association covalente par une liaison *O*-*α*-glycosidique d'un résidu Man avec un résidu Ser/Thr. Nous reviendrons sur ce type glycosylation avec plus de détail dans le chapitre glycosylation et myogenèse.

6. Le type *O*-Fucosylation (*O*-Fuc)

Cette glycosylation est retrouvée sur des sites bien déterminés localisés au niveau des domaines répétés EGF (Epidermal Growth Factor) (Harris and Spellman, 1993) et TSR (Thrombospondine 1-repeats) (Shao and Haltiwanger, 2003). A l'heure actuelle, la *O*-fucosylation est particulièrement connue chez quelques glycoprotéines fibrinolytiques comme l'activateur du plasminogène tissulaire ou encore certains facteurs de coagulation (Harris *et al.*, 1992) et certains récepteurs membranaires ubiquitaires de la famille Notch (Rampal *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2003; Stanley and Okajima, 2010). Nous reviendrons plus en détail sur cette partie glycosylation du récepteur Notch à la fin du manuscrit dans le chapitre glycosylation et myogenèse.

La liaison *O*-fucosidique se fait entre un fucose et un résidu Ser/Thr par une liaison *O*-*α*-glycosidique sur des sites consensus EGF-like [$C^2X_{4\text{-}5}$(S/T) C^3 (C^2 et C^3 correspondent respectivement à la deuxième et la troisième cystéine du domaine EGF-like)] (Harris and Spellman, 1993; Luo *et al.*, 2006a) et TSR [$WX_5C^1X_{2\text{-}3}$(S/T)C^2X_2G (C^1 et C^2 représentent la première et la deuxième cystéine conservées du domaine TSR)] (Hofsteenge *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2006b) ***(Figure 17)***.

Le fucose chez les mammiféres est retrouvé sur les chaines glycaniques essentiellement en position terminale, ce qui lui confère des propriétés fonctionnelles très importantes (Becker and Lowe, 2003). Le rôle le plus connu du fucose et des motifs fucosylés qui lui sont associés correspond aux antigènes tissulaires des groupes sanguins ABH. Ces groupes sont présents dans de nombreux organes et tissus, notamment sur les érythrocytes et également dans les liquides biologiques comme la salive, le lait, ainsi que sur les cellules épithéliales des muqueuses et en particulier sur les cellules du tractus intestinal (Marionneau *et al.*, 2001) ***(Figure 17)***.

7. Le type *O*-glucosylation (*O*-Glc)

Elle est très semblable à la *O*-fucosylation et lie entre eux un résidu de glucose et un résidu Ser/Thr. Ce type de glycosylation est retrouvé sur les mêmes sites que la *O*-fucosylation (domaines répétés EGF des glycoprotéines fibrolytiques et les motifs TSR) (Shao *et al.*, 2002). Ce motif se rencontre donc sur le même type de protéines que la *O*-fucosylation, à savoir les facteurs de coagulation (facteurs VII et IX) (Bjoern *et al.*, 1991) et les glycoprotéines impliquées dans les processus développementaux, comme le récepteur Notch1et son ligand Delta (Moloney *et al.*, 2000a; Shao *et al.*, 2002). Ce type de glycosylation est aussi retrouvé sur d'autres glycoprotéines telles que la protéine humaine Z impliquée dans la fécondation (Nishimura *et al.*, 1989) et les protéines impliquées dans la biosynthèse du glycogène au niveau desquelles la liaison est réalisée entre un résidu de glucose et une tyrosine (Tyr) grâce à une attache *O*-*α*-glycosidique. Dans tous les autres cas, la liaison est de type *O*-*β*-glycosidique entre un résidu glucose et un résidu Ser/Thr. Cette glycosylation est très rare et sa mise en évidence, en 2001 par l'équipe de Shao, est tardive par rapport aux autres types de glycosylation. En effet, c'est en réalisant des tests d'activité glucosyltransférases sur des motifs EGF-like comme accepteurs que les auteurs avaient mis en exergue l'existence de ce type d'enzymes dans plusieurs types de lignées cellulaires, mais aussi dans plusieurs tissus (Shao *et al.*, 2002). Ce n'est qu'en 2008 que Acar a décrit l'identification du gène *Rumi* chez la drosophile (Acar *et al.*, 2008). Ce gène code une protéine ayant une activité glucosyltransférase sur les motifs EGF-like du récepteur Notch. La drosophile mutante pour ce gène présente un phénotype qui se rapproche du mutant Notch, les auteurs en ont déduit que ce type de glycosylation était primordiale pour l'activité du récepteur Notch (Acar *et al.*, 2008).

Les autres types de glycosylation - La *C*-mannosylation

Ce type de glycosylation concerne un nombre limité de glycoprotéines. Elle a été décrite pour la première fois par l'équipe de Hofsteenge en 1994 (Hofsteenge *et al.*, 1994), et met en jeu une liaison entre deux carbones. Le premier est le carbone en position 1 du résidu Man et le second est le carbone en position 2 du tryptophane. De ce fait, la liaison n'est pas une liaison glycosidique à proprement parler (de Beer *et al.*, 1995; Hofsteenge *et al.*, 1994). Cette glycosylation, aussi appelée *C*-mannosylation, a généralement lieu sur une séquence consensus de type (Trp-X-X-Trp) (Krieg *et al.*, 1998) en sachant que le X peut désigner n'importe lequel des acides aminés, le résidu Trp N-terminale est celui qui porte le mannose (Hofsteenge *et al.*, 1999). Depuis la découverte de ce type de glycosylation sur la glycoprotéine RNase2 (Hofsteenge *et al.*, 1994; Löffler *et al.*, 1996), d'autres études ont démontré sa présence sur des glycoprotéines telles que l'interleukine 12 (IL-12) (Doucey *et al.*, 1999), la thrombospondine de type1 (qui porte des domaines répétés TSR, et qui est aussi *O*-fucosylée) (Hofsteenge *et al.*, 2001) et certains facteurs du complément (Hofsteenge *et al.*, 1999). Cette glycosylation semble préférentiellement portée par des glycoprotéines circulantes. La nature préférentielle des résidus X (de la séquence consensus) reste inconnue à l'heure actuelle.

La biosynthèse des glycoprotéines

La glycosylation des protéines dépend de plusieurs facteurs, notamment, la nature de l'organisme vivant, le stade de développement, le type cellulaire et son statut fonctionnel (activation, différenciation), qu'il soit normal ou pathologique.

Les processus de biosynthèse des glycoconjugués se déroulent dans le RE et l'appareil de Golgi qui jouent un rôle primordial dans l'adressage, la maturation et la sécrétion des glycoprotéines (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Warren and Malhotra, 1998). La seule exception à cette règle reste la *O*-glycosylation de type *O*-GlcNAc qui, comme évoqué précédemment, se déroule dans le cytosol et le noyau et qui concerne une famille particulière de glycoprotéines (Hart *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2013). Les protéines nouvellement synthétisées sont co- et/ou post-traductionnellement glycosylées. Excepté les glycoprotéines résidant dans le RE ou l'appareil de Golgi, le reste des glycoprotéines est généralement adressé soit à la surface de la membrane plasmique, soit adressées au lysosome comme par exemple les hydrolases acides, ou encore sécrétées dans le milieu extracellulaire. L'ensemble de ces mécanismes se déroule grâce à divers récepteurs de type lectine intracellulaires (Yamashita *et al.*, 1999).

La glycosylation est assurée essentiellement par des glycosyltransférases et des glycosidases qui sont des enzymes membranaires dont plusieurs sont de type II. Les glycosyltransferases, constituent une large famille responsable de la biosynthèse d'oligosaccharides, de polysaccharides et de glycoconjugués (Breton *et al.*, 2006). La plupart des glycosyltransférases catalysent le transfert d'un sucre, généralement sous forme d'un nucléotide sucre activé, sur une molécule accepteur spécifique, qui peut être un autre sucre, un lipide, une protéine, un acide nucléique…(Breton *et al.*, 2006; Lairson *et al.*, 2008).

Les glycosyltransférases possèdent une spécificité très étroite pour le donneur du sucre activé, pour l'accepteur et pour le type de liaison. L'activité catalytique de ces enzymes est influencée par la séquence peptidique, ces enzymes étant capables de reconnaitre les motifs glycosylables (Gomez-Casati *et al.*, 2013).

Les mécanismes qui ont une influence sur l'état de glycosylation d'une cellule, passent par la régulation de la transcription des gènes codant les acteurs de la glycosylation (les glycosyltransférases, les glycosydases de maturation, les transporteurs des nucléotides sucres…).

En outre, la compartimentation des acteurs, les cofacteurs, et la formation de complexes supramoléculaires (homo- et hétéro- domaines) sont aussi importants dans la régulation de la glycosylation.

Ces mécanismes sont régis à la fois par le type et par l'état de la cellule (développement, différenciation, quiescence et cancérisation) (Biol *et al.*, 1992; Stanley and Okajima, 2010), mais également par le micro-environnement glycannique (disponibilité du substrat : nucléotide-sucre, PH, ions) durant la maturation de la chaine glycannique, et qui dépend à son tour de l'expression des transporteurs et des enzymes de synthèse des nucléotides-sucre. Ce microenvironnement est aussi régi par la compétition des glycosyltransférases pour l'accepteur et la compartimentation de celles-ci (Gagneux and Varki, 1999).

Dans ce manuscrit, nous verrons un exemple concret de régulation d'une glycosyltransférase responsable de l'élongation finale des *N*-glycannes durant différentes étapes de différenciation musculaire (chapitre III : La sialylation – sialylation et myogenèse).

Par conséquent, pour la suite nous nous intéressons plus particulièrement à la biosynthèse des *N*-glycannes et à leur maturation.

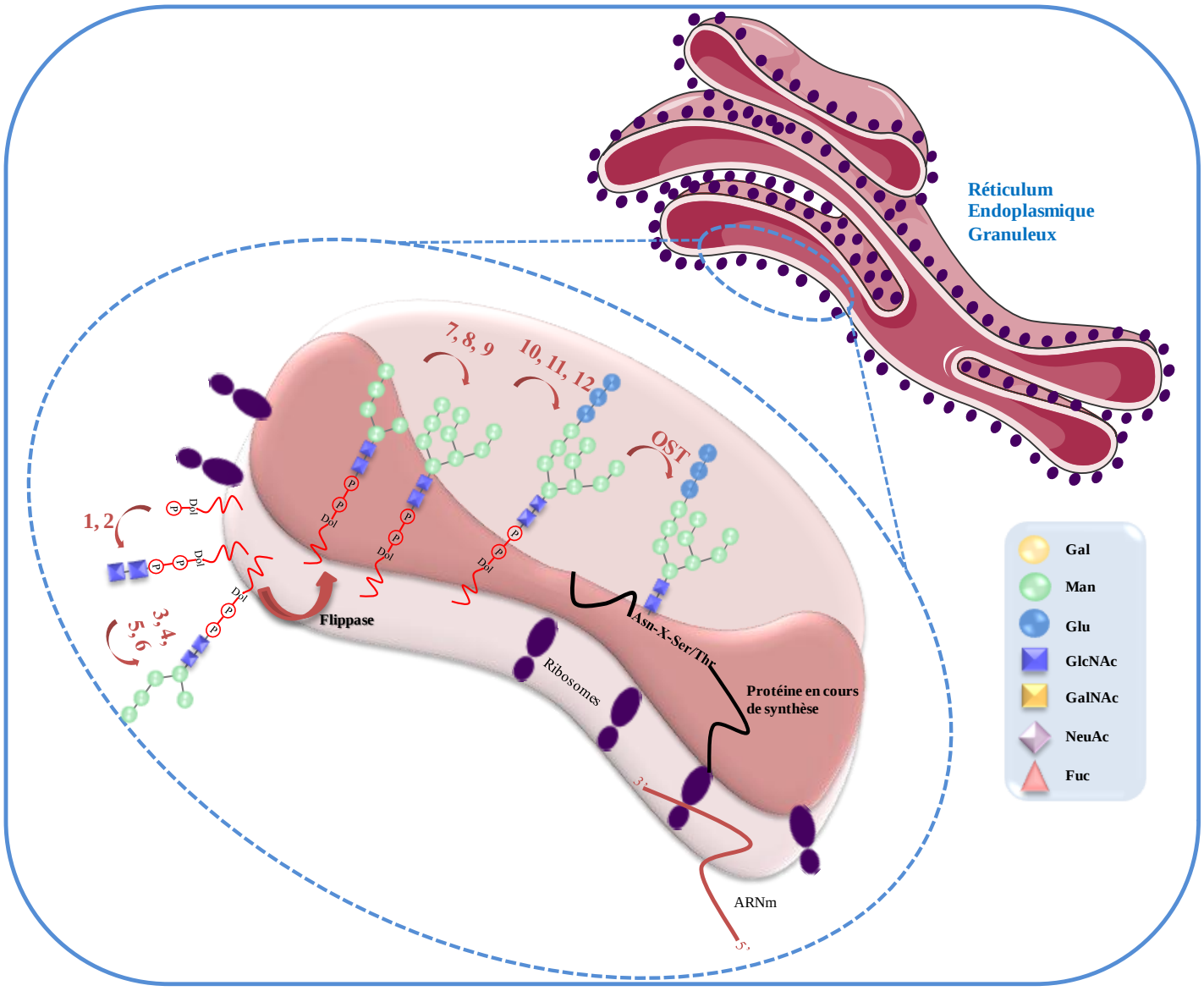


Figure 18 .A : Synthèse et maturation des *N*-glycannes.

A- Dans le réticulum endoplasmique rugueux, les enzymes impliquées sont: *(1)* N-acétylglucosaminyl-1-P-transférase, *(2)* N-acétylglucosaminyl-transférase, *(3)*, *(4)*, *(5)* et *(6)* quatre mannosyltranférases, *(7)* Man-P-Dol synthétase, *(8)* et *(9)* deux types de mannosyltransférases, *(10)* Glc-P-Dol synthétase, *(11)* et *(12)* deux glucosyltransférases, *(OST)* Oligosaccharidyltransférases.

Biosynthèse des *N*-glycannes

La biosynthèse des *N*-glycannes débute dans le réticulum endoplasmique rugueux (REG), avec l'assemblage d'un oligosaccharide précurseur. Le processus débute sur la partie cytosolique du REG avec le greffage d'un résidu GlcNAc-1-P apporté par l'UDP-GlcNAc sur un dolichol-phosphate (Dol-P). Ceci donne naissance à un « GlcNAc-P-P-Dol » ***(Figure 18-A : étapes 1 et 2)***. Ce dernier est enrichi par un second GlcNAc, avant que viennent s'ajouter cinq résidus Man apportés sous forme de GDP-Man. La structure intermédiaire obtenue est « Man5-GlcNac2-P-P-Dol » » ***(Figure 18-A : étapes 3, 4, 5 et 6)***. Ce précurseur glycannique subi l'action d'une flippase, qui va permettre son internalisation. La suite du processus de greffage et de maturation se déroule donc dans la lumière du RE. A ce niveau, quatre nouveaux Man et trois Glc sont greffés sur le résidu intermédiaire, apportés respectivement par un Dol-P-Man, et Dol-P-Glc pour donner « Glc3-Man9-GlcNAc2-P-P-Dol » ***(Figure18-A : étapes 7-12)***. Cette structure est le précurseur commun de tous les *N*-glycannes. Elle est alors transférée en bloc sur un résidu Asparagine (comprise dans une séquence consensus) d'une glycoprotéine en cours de synthèse. Le précurseur *N*-glycannique est greffé en bloc grâce à l'action d'oligosaccharyltransferase (OST). Les actions successives des glucosidases I et II et de la mannosidase du REG vont permettre d'obtenir une structure « Man8-GlcNAc2-(Asn)-protéine » qui sera transférée dans la partie cis de l'appareil de Golgi (Burda and Aebi, 1999) ***(Figure18- B : première partie)***.

Dans les premiers saccules du cis-Golgi, la maturation du *N*-glycanne est amorcée par l'action d'α-mannosidases spécifiques et de la *N*-acétyl-glucosaminyltransférase I pour donner un résidu « GlcNAc-Man5-GlcNAc2-(Asn)-protéine » ***(Figure 18-B)***.

Dans le cas des *N*-glycannes de type oligomannosidique, les mannoses de la structure « Man5-GlcNAc2-(Asn)-protéine » demeurent non modifiés. Dans le cas des *N*-glycannes de type hybride et complexe, le composé glycannique va subir l'action séquentielle de toute une série de glycosyltransférases spécifiques telles que les *N*-acétylglucosaminyl-, galactosyl-, *N*-acétylgalactosaminyl-, fucosyl- et les sialyl-transférases. Concernant la localisation, les GlcNAc-transférases et les mannosidases sont rencontrées dans le cis- et le médian-Golgi. Les Fuc-, Gal- et GalNAc- transférases sont localisées dans le médian- et trans-Golgi. Les sialyl-transférases sont, quant à elles, retrouvées dans le trans-Golgi et le réseau trans-golgien (Freeze and Aebi, 2005a).

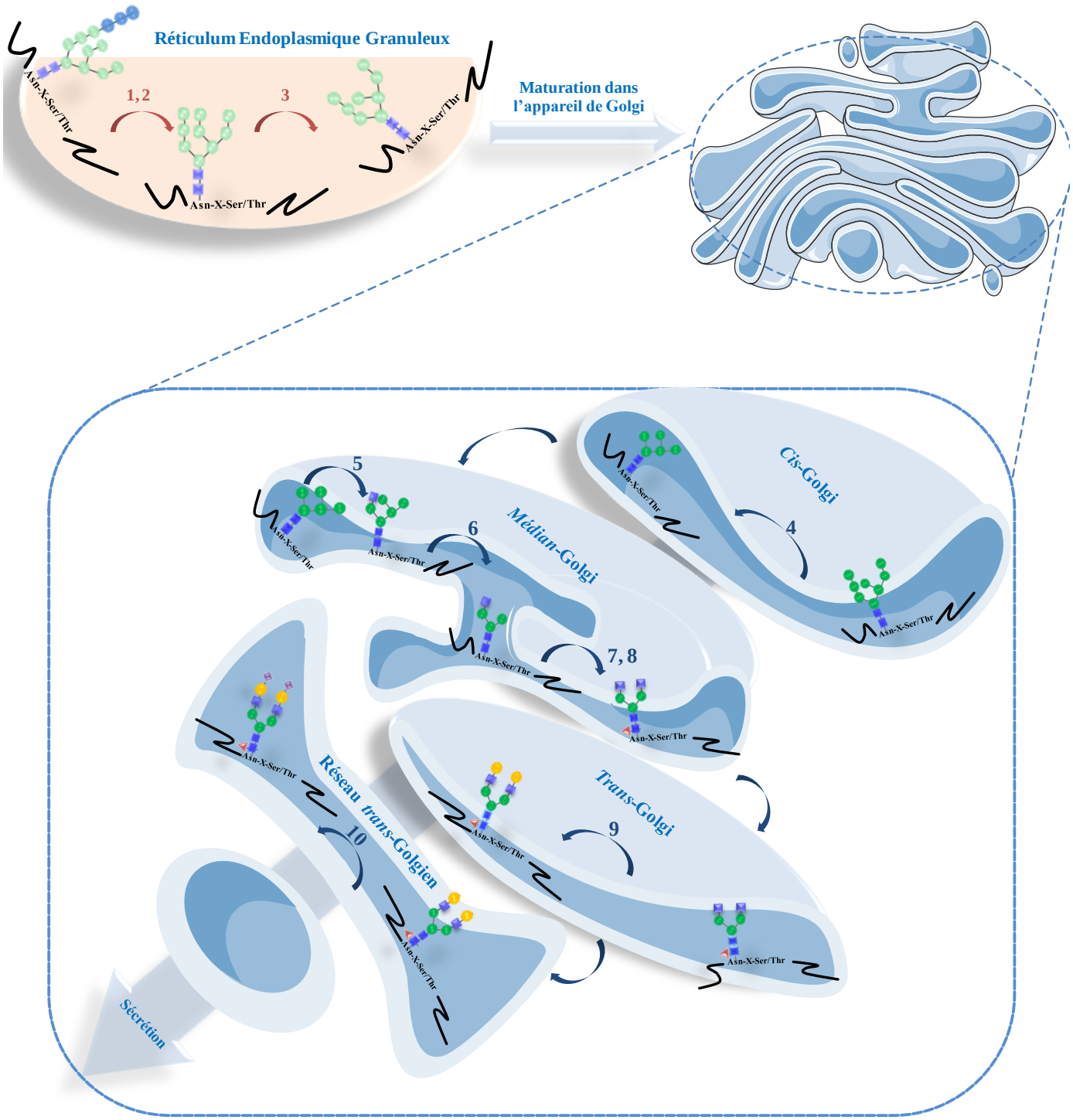


Figure 18.B : Synthèse et maturation des *N*-glycannes.

B- Première partie de l'image: les dernières étapes de la maturation dans le RE : *(1)* α1-2-glucosidase I, *(2)* α1-2-glucosidase III, *(3)* α1-2-mannosidase I.
-Deuxième partie de l'image, dans l'appareil de Golgi : *(4)* α-mannosidase I, *(5)* β1-2-N-acétylglucosaminyltransférase I, *(6)* α-mannosidase II, *(7)* β1-2-N-acétylglucosaminyltransférase II, *(8)* α1-6- fucosyltransférase, *(9)* β1-4-galactosyltransférase, *(10)* α2-3/6-sialyltransférase.

Du fait que tous les *N*-glycannes, quel que soit leur groupe, débutent leur synthèse dans le même compartiment suite à l'action des mêmes enzymes, tous les *N*-glycannes portent un noyau penta-saccharidique commun, nommé le noyau « trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose » (Man3GlcNAc2) ***(Figure 14)***. Dans ce noyau, le premier résidu de mannose (β-Man) est substitué en α(1,3) et en α(1,6) par les deux autres résidus de mannose, ce qui donne une structure à deux branches mannosidiques (Kornfeld and Kornfeld, 1985). C'est en fonction de l'extension de ces branches et de la nature des sucres ultérieurement greffés, que les *N*-glycannes se subdivisent en 3 grands groupes déjà évoqués préalablement.

Extension des branches dans les *N*-glycannes de type complexe

Les antennes des *N*-glycannes de type complexe ne renferment que trois résidus mannose (ceux du trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose). Sur deux de ces trois Man, des résidus GlcNAc sont ajoutés suite à l'activité d'enzymes de la famille des Mgat. Le nombre de résidus GlcNAc ajoutés varie de deux à quatre, pour donner respectivement des structures dites bi-, tri-, ou tétra-antennées ***(Figure 19)***.

Dans les structures complexes, ainsi que les structures hybrides, les GlcNAc sont ensuite majoritairement allongés par un galactose branché en β(1,4) pour former une structure de type 2 appelée LacNAc (Galβ1,4GlcNAc). Les antennes obtenues peuvent continuer à être allongées par l'addition séquentielle de structures LacNAc, ce qui aboutira aux structures poly-lactosaminiques. Les GlcNAc peuvent également être allongés par un galactose en β(1,3) et former un motif de type 1 appelé NéoLacNAc (Galβ1,3GlcNAc). Une autre possibilité est la liaison d'un résidu GalNAc en β(1,4) pour former le LacdiNAc (GalNAcβ1-4GlcNAc) (Bakker *et al.*, 1997). L'extension de ces antennes s'effectue au niveau trans-Golgi par les Gal-, GalNAc- et GlcNAc-transférases et se poursuit principalement toujours dans le réseau trans-golgien par la sulfatation et la sialylation. La sialylation représente une des dernières étapes de maturation des glycannes. En effet, le résidu Gal distal des antennes LacNAc est souvent substitué en α2,3/6 par des acides sialiques (NeuAc), ou plus rarement par des acides poly sialiques [NeuAc α(2,8)]$_{8\text{-}12}$. L'exemple le plus connu de polysialylation concerne les molécules d'adhésion NCAM dans le système nerveux, les acides sialiques peuvent subir d'autres modifications tels que la méthylation ou l'acétylation (Finne, 1982).

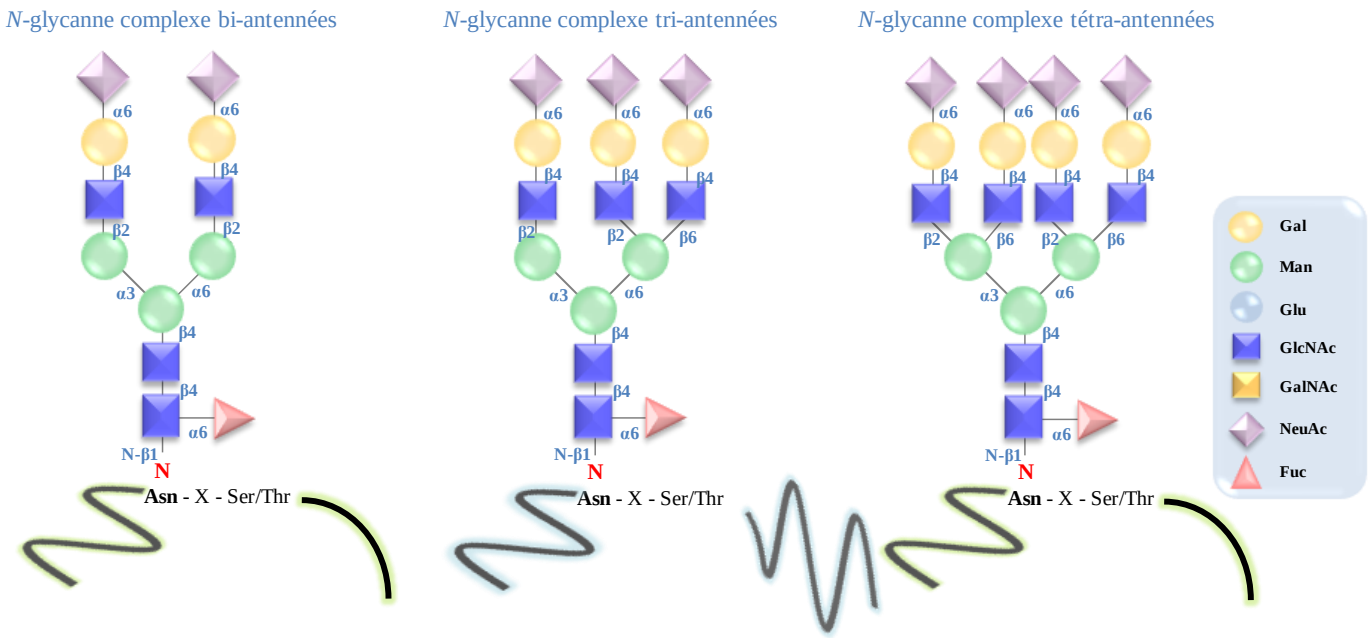


Figure 19 : Représentation schématique des structures *N*-glycanniques et des anténnages possibles.

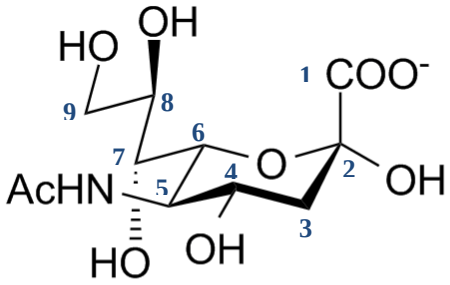
Les *N*-glycannes peuvent être prolongés par un acide sialique, par une polysialylation, ou ne pas être prolongés.

Chapitre III : La sialylation

Les acides sialiques et leurs rôles biologiques

Le nom d'acide sialique a pour origine le mot grec « sialos » signifiant salive. Effectivement les mucines de la salive contiennent une quantité importante de ce composé glycannique. Blix et Klenk ont découvert l'acide sialique il y a plus de soixante-dix ans, en tant que substitut libéré par hydrolyse acide des glycolipides du cerveau ou des mucines salivaires (Klenk 1941; Blix, Gottschalk *et al.*, 1957)*. Les acides sialiques sont des monosaccharides à neuf atomes de carbone qui constituent une vaste famille de plus de 40 membres (Schauer, 1991; Bergwerff *et al.*, 1992). Ce sont des dérivés de l'acide neuraminique (5-Amino-3,5-didésoxy-D-glycéro-D-galacto-non-2-ulopyranosoïque) comprenant des groupements *N*-acétyl ou *N*-glycolyl combinés à des résidus *O*-acétyl, ou moins fréquemment à des groupes *O*-lactyle, *O*-méthyle ou *O*-sulfate.

Parmi tous les acides sialiques, seuls quelques-uns sont présents dans toutes les espèces animales. Ainsi, chez l'Homme, l'acide sialique majeur est la forme acétyl, l'acide 5-*N*-acétyl-neuraminique (5-acétamido-3,5-didésoxy-D-glycéro-D-galacto-non-2-ulopyranoïque) ***(Figure 20)*** (Angata and Varki, 2002).



N-Acetylneuraminic acid
Neu5Ac

Figure 20 : L'acide *N*-acétylneuraminique (NANA) est un constituant caractéristique des sucres aminés. Il est un dérivé de sucre (ose) à onze atomes de carbone. Ce sont des molécules qui proviennent de la condensation de l'acide pyruvique et d'un *N*-acetyl-D-mannosamine.

*Klenk E. Neuraminsaure das spaltprodukteines neuen Gehirnlipoids. Hoppe-Seyler's Z physiol Chem 1941; 268:50-8.
*Blix, G; Gottschalk, A & Klenk, E. (1957).Nature, Lond, 179, 1088.

L'acide *N*-glycolyl-neuraminique (5-hydroxyacétamido-3,5-didésoxy-D-glycéro-D-galacto-non-2-ulopyranoïque ou Neu5GC) est absent chez l'Homme, à cause de la mutation qui touche le gène *CMAH*(Angata and Varki, 2002). Par contre, on le retrouve chez beaucoup d'animaux notamment la souris, ou il est considéré comme substrat donneur majoritaire (95%). Ceci tient à l'importante activité hydroxylase chez la souris (Lepers *et al.,1990*; Shaw and Schauer, *1989*)

L'existence des acides sialiques chez les champignons reste soumise à controverse. En effet, la communauté scientifique postulait que les acides sialiques étaient retrouvés uniquement des Deutérostomiens (échinoderme) jusqu'aux Hominidés (Varki and Schauer, 2009).

Les acides sialiques sont impliqués dans plusieurs processus biologiques. Grâce à la fonction carboxyle, ils portent des charges fortement électronégatives à pH physiologique, qui, en association avec les chaines oligosaccharidiques qui les portent, jouent un rôle primordial dans la régulation des mécanismes de reconnaissance moléculaire.

D'un point de vue physico-chimique, en plus des forces répulsives exercées par les charges électronégatives, les acides sialiques participent à la stabilisation de la structure des glycoprotéines (Varki, 1992). Pour exemple, la perte d'acide sialique observée à la surface des cellules apoptotiques est soupçonnée comme induisant une diminution des forces de répulsion, favorisant ainsi les contacts avec les cellules susceptibles de les phagocyter. Ces charges négatives empêchent également l'agrégation des érythrocytes (Izumida, 1991). De surcroit, de par leur charge à caractère hydrophile et leur taille, les acides sialiques influencent les interactions entre protéines en limitant l'accès à la partie peptidique (Varki and Schauer, 2009).

D'un point de vue moléculaire, les acides sialiques sont susceptibles d'être reconnus par des lectines endogènes, seuls ou en association à d'autres motifs glycanniques tels que les « motifs Lewis ». Ces interactions ont été décrites dans plusieurs mécanismes biologiques, notamment la reconnaissance, l'adhésion et la transduction du signal (Varki, 1992).

D'un point de vue physiologique, l'importance des acides sialiques a été reconnue dans les fonctions de lubrification et de protection des mucines salivaires et des cellules épithéliales. Néanmoins, la fonction la plus connue des acides sialiques est le masquage des structures galactosylées. Chez l'homme par exemple, il existe une homéostasie du galactose qui vise à éliminer les cellules dont les glycoconjugués présentent une densité importante de β-galactoses terminaux (Thotakura *et al.*, 1994; Weigel, 1993; Weigel and Yik, 2002),

Cette caractéristique de masquage des sites est également utilisée par les bactéries et les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire (Marino *et al.*, 2004). Un exemple concret traitant de la sialylation dans les cancers sera abordé plus loin.

Concernant les agents pathogènes, une panoplie de bactéries *(ex. Escherichia coli Helicobacter pylori*), de virus (*ex. Influenza*), de toxines (*ex. toxine du choléra*) et de protozoaires (*ex. Trypanosoma cruzi*)) se lient aux cellules de l'hôte via les acides sialiques situés sur les glycoconjugués portés par des récepteurs (Parkkinen *et al.*, 1986; Rogers *et al.*, 1986; Schengrund and Ringler, 1989; Schenkman *et al.*, 1993; Angström *et al.*, 1994; Hirmo *et al.*, 1996).

Chez les mammifères et la plupart des cellules eucaryotes, le substrat donneur d'acide sialique est le CMP-NeuAc. La synthèse des acides sialiques activés commence avec l'UDP-GlcNAc qui est épimérisé en *N*-acétylmannosamine (ManNAc) grâce à l'enzyme UDP-GlcNAc 2-épimérase. Le ManNAc est ensuite phosphorylé en *N*-acétylmannosamine-6-phosphate (ManNAc-6P) par la même enzyme qui joue le rôle d'une kinase. Des mutations de cette enzyme sont à l'origine d'une maladie neuromusculaire (une partie traitant de cette maladie est abordée dans le chapitre glycosylation et myogenèse). Le ManNAc phosphorylé est pris en charge par l'acide *N*-acétylneuraminique synthase pour donner naissance à l'acide *N*-acétylneuraminique (NeuAc)-9-phosphate qui est déphosphorylé en NeuAc (Roseman *et al.*, 1961; Warren and Felsenfeld, 1961a, 1961b). L'utilisation de l'acide sialique par les glycosyltransférases golgiennes nécessite son activation par un nucléotide, l'acide sialique est le seul glycanne qui subisse cette étape dans le noyau par la CMP-NeuAc synthétase (Creek *et al.*, 1980). Après activation, l'acide sialique est transféré vers le cytosol pour intégrer l'appareil de Golgi et participer aux processus de glycosylation.

Tableau 3 : Liste des sialyltransférases (Homme et Souris) *(Harduin-Lepers 2010)*

Sialyltransférase	Référence « Gen Bank »	Localisation chromosomique	Symbole	Expression tissulaire
ST3Gal I *H. sapiens* *M. musculus*	L29555 X73523	8q24.22 15D2	*ST3GAL1* *st3gal1* SIAT4, SIAT4A	Placenta, poumon, muscle squelettique, tissu fœtal
ST3Gal II *H. sapiens* *M. musculus*	X96667 X76989	16q22.1 8E1	*ST3GAL2* *st3gal2* SIAT5, SIAT4B	Muscle squelettique, cœur
ST3Gal III *H. sapiens* *M. musculus*	L23768 X84234	1p34.1 4D2.1	*ST3GAL3* *st3gal3* SIAT6	Cœur, cerveau, muscle squelettique, testicules, ovaires, tissu fœtal
ST3Gal IV *H. sapiens* *M. musculus*	L23767 X95809	11q24.2 9A4	*ST3GAL4* *st3gal4* SIAT4C	Cœur, placenta, peau, rate, testicules, ovaires, tissu fœtal
ST3Gal V- G_{M3}synthase *H. sapiens* *M. musculus*	AB018356 Y15003	2p11.2 6C1	*ST3GAL5* *st3gal5* SIAT9	Cerveau, placenta, poumon, muscle squelettique, testicules, rate
ST3Gal VI *H. sapiens* *M. musculus*	AF119391 AK082566	3q12.1 16C1.2	*ST3GAL6* *st3gal6* SIAT10	Cœur, placenta, foie
ST6Gal I *H. sapiens* *M. musculus*	X17247 D16106	3q27-q28 16B1	*ST6GAL1* *St6gal1* SIAT1	placenta, lymphocytes, foie, reins, cerveau, hippocampe, thymus, trachée, rate, peau,
ST6Gal 2 *H. sapiens* *M. musculus*	AB059555 AK082506	2q11.2-q12.1 17C	*ST6GAL2* *St6gal2* SIAT2	Cerveau, testicules, thymus, intestin grêle, colon
ST6Gal NAc I *H. sapiens* *M. musculus*	Y11339 Y11274	17q25.1 11E2	*ST6GALNAC1* *St6galnac1* SIAT7A	Glandes salivaires, rate
ST6Gal NAc II *H. sapiens* *M. musculus*	AJ251053 X93999	17q25.1 11E2	*ST6GALNAC2* *St6galnac2* SIAT7B	Cœur, muscle squelettique, foie, intestin grêle, testicules, glandes mammaires, reins, thymus, poumon, glandes salivaires, cerveau
ST6Gal NAc III *H. sapiens* *M. musculus*	AJ507291 Y11342	1P31.1 3H3	*ST6GALNAC3* *St6galnac3* SIAT7C	reins, cerveau, cœur, poumon, thymus, testicules, glandes mammaires
ST6Gal NAc IV *H. sapiens* *M. musculus*	AJ271734 Y19057	9q34 2B	*ST6GALNAC4* *St6galnac4* SIAT7D	foie, reins, placenta, poumon, intestin, rate, colon, thymus, cœur,
ST6Gal NAc V *H. sapiens* *M. musculus*	AJ507292 BC055737	1q31.1 3H3	*ST6GALNAC5* *St6galnac5* SIAT7E	Cerveau, rate
ST6Gal NAc VI *H. sapiens* *M. musculus*	AJ507293 AB035123	9q34.11 2B	*ST6GALNAC6* *St6galnac6* SIAT7F	Cerveau, rate, colon, fois, testicules, cœur

ST8Sia I-G_{D3} synthase-SAT-II *H. sapiens* *M. musculus*	D26360 X84235	12p12.1 6G3	*ST8SIA1* *St8sia1* *SIAT8A*	Cerveau, embryon, rétine, ovaire
ST8Sia II-STX *H. sapiens* *M. musculus*	U33551 X83562	15q26 7D2	*ST8SIA2* *St8sia2* *SIAT8B*	Cerveau (fœtal, embryonnaire), reins (fœtal), cœur, thymus
ST8Sia III *H. sapiens* *M. musculus*	AF004668 X80502	18q21.31 18E1	*ST8SIA3* *St8sia3* *SIAT8C*	Cerveau (fœtal), cerveau, fois (fœtal), testicules
ST8Sia IV-PST *H. sapiens* *M. musculus*	L41680 X86000	5q21 1D	*ST8SIA4* *St8sia4* *SIAT8D*	Cerveau (fœtal), rate, moelle épinière, lymphocytes
ST8Sia V-G_{T3} synthase-SAT-V *H. sapiens* *M. musculus*	U91641 X98014	18q12.3 18E3	*ST8SIA5* *St8sia5* *SIAT8E*	Cerveau (fœtal), cerveau, muscle squelettique, cœur
ST8Sia VI *H. sapiens* *M. musculus*	AJ621583 AB059554	10p13 2A1	*ST8SIA6* *St8sia6* *SIAT8F*	Reins, cœur, rate,

Les sialyltransférases

La biosynthèse des oligosaccharides sialylés est catalysée par une famille d'enzymes dénommées sialyltransférases (ST) (Tsuji *et al.*,1996). Ces glycosyltransférases, protéines transmembranaires de type II, constituent chez l'homme une famille d'au moins 20 membres répartis en quatre grandes sous-familles : les ST3Gal; les ST6Gal; ST6GalNAc et les ST8SIAT ***(Tableau 3)***(Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

La sialylation est portée sur l'extrémité du glycoconjugué, en α (2,3) ou en α (2,6) sur un résidu β-D-galactopyranosyl (Gal), ou en α(2,6) sur un résidu β-D-N-acétylgalactosaminyl (GalNAc), ou en α(2,8) sur un autre acide sialique. Les familles ST3Gal, ST6GalNAc et les ST8SIAT comptent chacune six membres, alors que la famille des St6Gal compte uniquement deux membres (Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

Bien que les sialyltransférases partagent très peu d'identité entre elles (Harduin-Lepers *et al.*, 2005), une analyse comparative des séquences de ces enzymes révèle qu'il existe quatre régions hautement conservées localisées dans le domaine catalytique, les sialylmotifs L (Large) ou I, le sialylmotif S (Small) ou II, le motif III et le VS (Very Small) ou IV (Livingston and Paulson, 1993; Jeanneau *et al.*, 2004) ***(Figure 21)***.

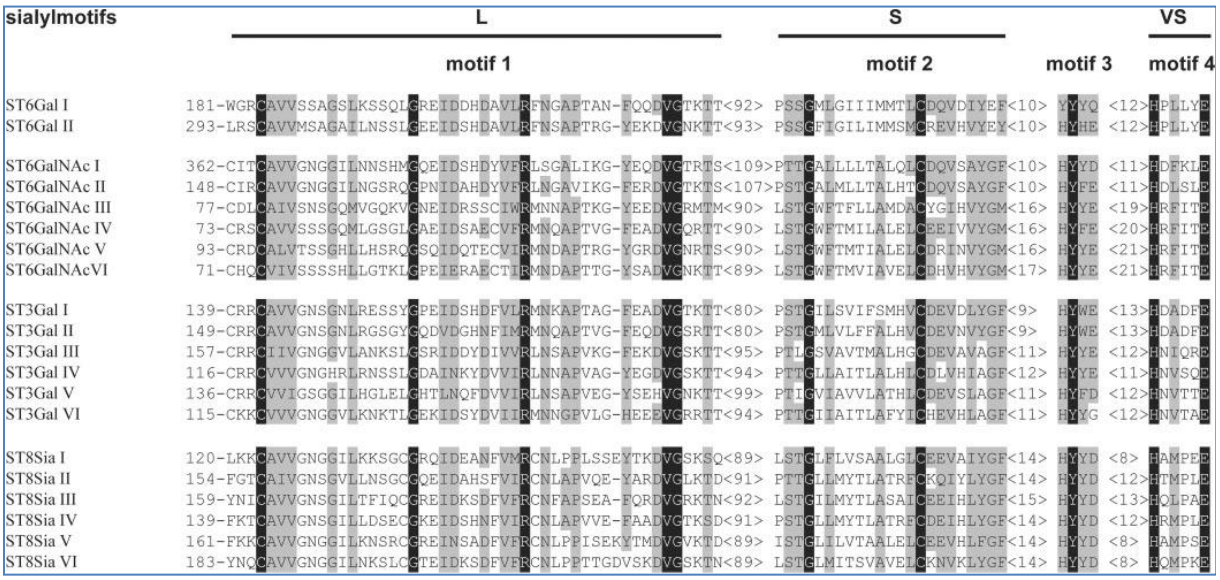


Figure 21 : Les motifs conservés de sialyltransférases.

Alignement des séquences des régions conservées présentes chez les sialyltransférases. Les résidus strictement invariants entre toutes les séquences sont indiqués en blanc sur un fond noir. Les autres positions conservées sont en gris. Les motifs sont numérotés (1-4) et la correspondance avec les noms des sialylmotifs (L, S et VS) est affichée. Toutes les séquences sont d'origine humaine (Jeanneau *et al.*, 2004).

L'activité de ces transférases est contrôlée par plusieurs facteurs, comme les hormones stéroïdiennes (Coughlan *et al.*, 1996), et l'état de la cellule (cancer, différenciation, développement) (Delannoy *et al.*, 1993).

La famille des α(2,3) sialyltransférases

Ces transférases catalysent l'addition d'un acide sialique en α2, sur le carbone 3 d'un résidu galactose porté par une glycoprotéine ou un glycolipide. Les ST3Gal présentent deux régions spécifiques situées entre les sialylmotifs L et S et qui semblent avoir un rôle dans l'établissement de la liaison en α(2,3) (Patel and Balaji, 2007). Chez les mammiféres, cette famille compte six membres (de *ST3GalI* à *VI*) (Petit *et al.*, 2014). ST3Gal I, II, et III ont comme substrat préférentiel le motif de type1 «Galβ1,3GlcNAc» porté par les *O*-glycoprotéines ou les glycolipides (Giordanengo *et al.*, 1997; Kitagawa and Paulson, 1994a, 1994b). La ST3Gal I et III sont aussi actives sur les substrats accepteurs de type 3 «Galβ1,3GalNAc» retrouvés sur les *O*-glycannes et les glycolipides.

ST3GalI présente une préférence pour le motif de type I lorsqu'il est porté par les *O*-glycannes. En revanche, ST3GalII préfère les substrats de nature glycolipidiques (asialo-GM1 et GM1a). Les souris *KO ST3Gal1* présentent de graves anomalies immunitaires, qui concernent en particulier l'engagement des lymphocytes T-CD8, T4 dépendant. En effet, cette enzyme est responsable de la sialylation du core 1 des *O*-glycannes des lymphocytes T-CD4, un glycoconjugué important dans les interactions lymphocytaires (Priatel *et al.*, 2000). *St3Gal I* et *II* ont été classées dans le même groupe du fait de la proximité de leurs séquences codantes (47.1% d'identité chez la souris). Les deux gènes présentent un cadre ouvert de lecture constitué de six exons de tailles comparables (Takashima, 2008). ST3Gal III est aussi capable de transférer un acide sialique sur des motifs de type 2 «Galβ1,4GlcNAc», et de type 3 «Galβ1,3GalNAc», mais avec une moindre efficacité (Kitagawa and Paulson, 1994a). Cette enzyme est candidate pour la synthèse de l'épitope sialyl-Le^a *in vivo* (Kitagawa *et al.*, 1993). Elle est classée dans un second groupe comprenant aussi les ST3Gal IV, V, et VI. Ces enzymes présentent entre 35% et 41% d'identité entre elles (*Kono et al.*, 1997). ST3Gal IV est aussi susceptible de reconnaitre des oligosaccharides de type 2 avec une affinité particulièrement marquée et permet la synthèse de l'épitope sialyl-Le^x. Chez les souris *KO* pour ce gène, des défauts de liaison entre les sélectines et leur ligand sont observés (Ellies *et al.*, 2002). ST3GalVI présente également des préférences pour les substrats accepteurs de type 2, portés par les glycoprotéines (Okajima *et al.*, 1999a), mais aussi par les glycolipides

(Okajima *et al.*, 1999a). Entre les différents accepteurs de glycolipides, cette enzyme préfère la chaîne de type 2 polylactosamine pour générer des glycolipides contenant du Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAc incluant le sialyl-paragloboside, un précurseur de sialyl-Le^x du céramide (Okajima *et al.*, 1999a).

ST3Gal-V quant à elle, est spécialisée dans le transfert de l'acide sialique sur le lactosyl-céramide (Sasaki *et al.*, 1993; Kitagawa and Paulson, 1994a). Elle utilise le précurseur de type 5 lactosylcéramide (Galβ1,4Glcβ-Cer) comme substrat pour générer le glycolipide GM3 (Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-Cer). De ce fait, elle est appelée GM3 synthase (Boccuto *et al.*, 2014).

La famille des α(2,6) sialyltransférases

1. Les St6galNAc

Cette famille de sialyltransférases regroupe six enzymes qui participent au transfert du résidu d'acide sialique sur les *N*-acétylgalactosamines des glycoconjugués par une liaison en α(2,6). La nature de la molécule portant la chaîne oligosaccharidique semble très importante puisque les ST6GalNAc-I, -II et -IV utilisent comme substrats accepteurs les *O*-glycoprotéines contrairement aux ST6GalNAc III, V et VI qui sont actives sur les chaînes glycanniques portées par des lipides (Harduin-Lepers *et al.*, 2001). Les ST6GalNAc V et VI sont aussi capables de sialyler en α(2,6) à moindre mesure des résidus GlcNAc dans les disaccharides de type 2 « Galβ1, 4GlcNAc » porté par les N-glycannes.

ST6GalNAc-I agit sur GalNAcα-*O*-Ser/Thr, Galβ1,3GalNAcα-*O*-Ser/Thr et Neu5Acα2, 3Galβ1,3GalNAcα-*O*-Ser/Thr portés par des glycoprotéines (Ikehara *et al.*, 1999). La transfection des lignées cancéreuses avec ST6GalNAcI provoque l'expression de l'antigène sialyl-Tn (STn), un antigène surexprimé dans plusieurs cancers et associé à un mauvais pronostic (Julien *et al.*, 2001).

ST6GalNAc-II agit sur Galβ1,3GalNAc-Ser/Thr et Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcα-*O*-Ser/Thr (Samyn-Petit *et al.*, 2000).

La spécificité des enzymes ST6GalNAc III, IV, V et VI vis-à-vis de leurs structures acceptrices est beaucoup plus restrictive puisqu'elles n'acceptent comme substrat accepteur que la séquence trisaccharidique Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAc portée par des glycolipides (tel que le GM1b pour ST6GalNAc III, V et VI) ou des glycoprotéines (pour ST6GalNAc IV), ce

qui suggère qu'elles ne discriminent pas un résidu GalNAc lié en α ou en β (Okajima *et al.*, 1999b). ST6GalNAc-VI parait être spécifique du transfert d'acide sialique en α2,6 non seulement sur GalNAc du GM1b, mais aussi sur GalNAc du GT1b et du GD1a, induisant la synthèse de GQ1bα et GT1α, respectivement (Okajima *et al.*, 2000).

La séquence primaire des 6 enzymes renferme les caractéristiques générales des sialyltransférases à savoir la présence des quatre sialylmotifs L, S, III et VS. Néanmoins des disparités existent entre les membres de cette famille, que ce soit d'un point de vue phylogénétique (Harduin-Lepers *et al.*, 2005) ou en se basant sur l'identification de séquences spécifiques des ST6GalNAc. Les disparités conduisent à la subdivision de cette famille de sialyltransférases en deux groupes distinguées par leur spécificité de substrat et par la présence de motifs spécifiques (Patel and Balaji, 2006). Le premier groupe comporte ST6GalNAc I et II. Ces enzymes contiennent 3 motifs spécifiques dont 2 sont situés entre les sialylmotifs L et S et le dernier en position C-terminale juste derrière le sialylmotif VS. Le second groupe comprend les ST6GalNAc III, IV, V et VI chez lesquelles seules 2 séquences spécifiques situées entre les sialylmotifs L et S ont été identifiées. La comparaison des séquences des motifs entre les deux sous-familles révèle très peu d'identité. Cette observation est d'ailleurs valable pour la globalité des séquences. En effet, l'alignement des séquences murines de ST6GalNAc-I et -II avec celles des autres ST6GalNAc murines montre qu'il y a moins de 27% d'identité.

L'analyse de l'organisation des régions codantes permet d'argumenter plus encore en faveur de cette classification en deux groupes. En effet, chez l'homme et la souris, les séquences codantes de *ST6GalNAc-I* et *-II* sont morcelées et présentent une forte ressemblance dans leur découpage exon/intron. De plus, ces deux gènes ont une localisation chromosomique très proche (Patel and Balaji, 2006).

Dans l'autre sous-famille, les séquences codantes sont moins morcelées que précédemment, et la taille des différents exons est bien conservée. Les premiers exons de chaque ORF ne codent que pour un nombre très limité d'acides aminés. De même que pour le premier groupe, que ce soit chez l'homme ou la souris, la localisation chromosomique de *ST6GalNAc-III*, *-IV*, *-V* et *-VI* est proche. En effet, *ST6GalNAc-III* et *-V* sont localisées sur le même chromosome (Chromosome 1 chez l'homme et 3 chez la souris) (Lee *et al.*, 1999), et très proches l'une de l'autre. Cette situation est également observée pour *ST6GalNAc-IV* et *-VI* qui sont aussi localisées sur le même chromosome (chromosome 9 chez l'homme et 2 chez la souris). Le fait que les gènes des *ST6GalNAc* de la même sous-famille se retrouvent associés par paires dans

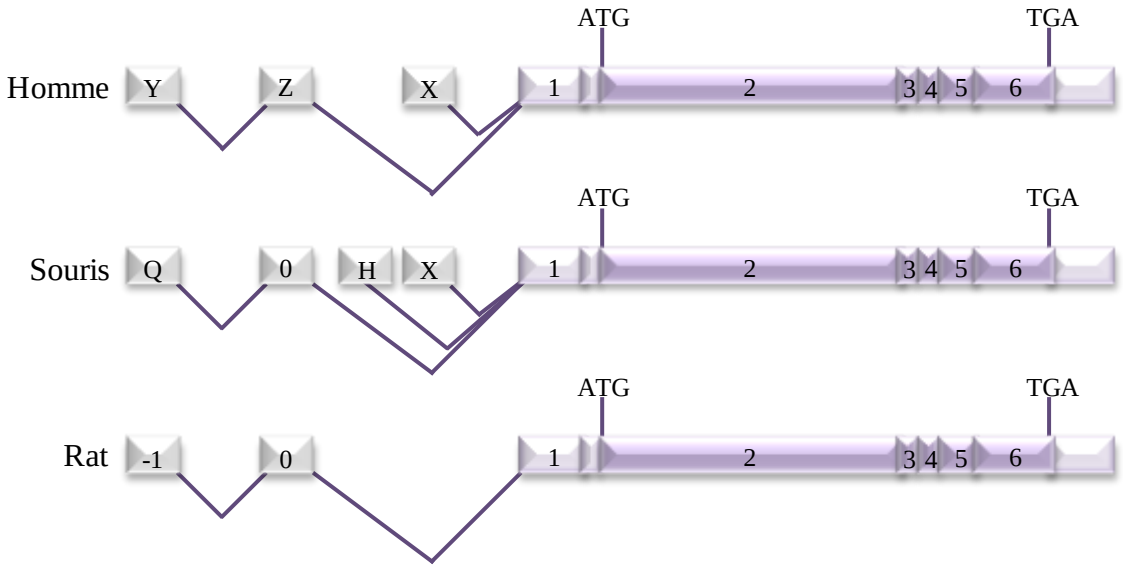


Figure 22 : Représentation schématique des transcrits majoritaires de *ST6Gal I*

Chez l'homme, la souris, et le rat ; les différents ARNm sont obtenus par la jonction des différents exons 5' non codants à l'exon 1. Les exons homologues sont alignés verticalement. La région en violet représente le cadre ouvert de lecture du gène. D'après (Dall'Olio *et al.*, 2006).

les génomes humain et murin suggère qu'ils proviennent d'une duplication en tandem au cours de l'évolution (Harduin-Lepers *et al.*, 2005).

2. Les St6gal

Cette famille compte seulement deux membres, présents chez de nombreux vertébrés (Petit *et al.*, 2010). Seules ST6Gal-I (Weinstein *et al.*, 1987; Grundmann *et al.*, 1990) et ST6Gal-II (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003) catalysent le transfert d'un acide sialique sur le carbone 6 d'un résidu de galactose appartenant à un oligosaccharide de type 2 « lactosaminique » (Galβ1,4GlcNAc) pour former le motif Siaα2,6LacNAc trouvé sous forme de disaccharide libre ou de *N*-acétyllactosamine terminale majoritairement porté par des *N*-glycannes.

ST6Gal-I montre une préférence pour la forme liée à une protéine, alors que ST6Gal-II présente une préférence pour le disaccharide libre (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003).

Les résidus Gal des précurseurs de type 1 ou de type 3 ne sont pas des substrats pour ces enzymes (Takashima *et al.*, 2002a).

En 2006, une étude a apporté la preuve que le substrat préférentiel de la ST6Gal-II humaine n'était pas le motif LacNAc (Galβ1,4GlcNAc), mais le motif LacdiNAc (GalNAcβ1,4GlcNAc), une structure oligosaccharidique rare chez les mammifères et sur laquelle ST6Gal-I n'a qu'une faible activité chez l'homme (Rohfritsch *et al.*, 2006).

Le gène humain de *ST6Gal* est localisé sur le bras long (q21-28) du chromosome 3 et l'ensemble des transcrits identifiés jusqu'à aujourd'hui ont tous en commun la présence des exons E1 à E6.

ST6Gal-I est un gène finement régulé, grâce à la présence de régions promotrices associées à des phénomènes d'épissage alternatif permettant la transcription de 3 types majeurs d'ARNm (Paulson and Colley, 1989). Le premier transcrit, majoritaire et ubiquitaire, se compose des exons E1 à E6 ***(Figure 22)***. Le deuxième type de transcrit est exprimé exclusivement dans le foie. Il se caractérise par l'absence des exons E0 et E1, équivalents aux exons X et Z chez l'homme (Aas-Eng *et al.*, 1995). Le troisième transcrit, qui est uniquement composé des exons E4 à E6, a été décrit au niveau des reins et ne code pas une protéine fonctionnelle (Wen *et al.*, 1992).

Chez la souris, *ST6Gal-I* se situe au niveau du chromosome 16. Les transcrits murins présentent aussi une structure basique à 6 exons. On retrouve chez la souris le transcrit majoritaire et ubiquitaire qui présente une extrémité 5' non traduite provenant de l'association des exons Q et O ***(Figure 22)***, respectivement homologues des exons Y et Z humains. Dans les lymphocytes B, nous retrouvons un transcrit spécifique dont la partie 5' UTR résulte de la

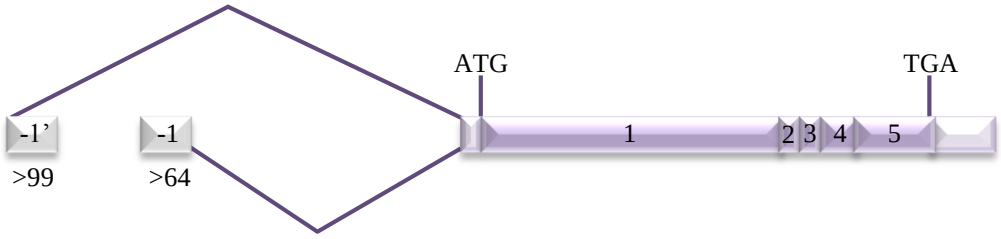


Figure 23 : Représentation schématique des transcrits connus de ST6GAL II humaine

Localisé sur le chromosome 2 ; la région codante est représentée en violet (E1, E2, E3, E5 représentent les exons), les exons 5' non traduits sont représentés en gris.

jonction de l'exon X avec l'exon 1 (Wuensch *et al.*, 2000). Nous retrouvons également un transcrit hépatique, mais de structure différente de celle décrite chez le rat et l'homme.

En effet, alors que dans ces deux dernières espèces le transcrit hépatique n'était constitué que des exons E1 à E6, la région 5' du transcrit murin possède un exon supplémentaire, l'exon H positionné sur le gène entre les exons X et 0 (Hu *et al.*, 1997) ***(Figure22)*.**

La structure du gène codant ST6Gal-II n'a été décrite que chez l'homme et la souris (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003; Takashima *et al.*, 2002a, 2003). La région codante du gène s'organise en 5 exons ***(Figure 23)***. Le gène humain est localisé sur le chromosome 2 (2q11.2-q12.1) et le gène murin sur le chromosome 17.

Que ce soit pour l'une ou l'autre des espèces, ST6Gal-II présente un profil d'expression tissulaire assez restreint. Elle est principalement exprimée dans le cerveau et le colon chez l'homme et dans le cerveau et à certains stades embryonnaires chez la souris. Concernant les ARNm et dans l'état actuel des connaissances, un seul type de transcrit a été mis en évidence pour la souris (Takashima *et al.*, 2003) et une analyse des banques d'EST a révélé qu'il existerait chez l'homme deux transcrits ne différant qu'au niveau de leurs régions 5'-UTR ***(Figure 23)***. Enfin, la présence d'un variant transcriptionnel plus court, dépourvu des séquences codant les sialylmotifs S, III et VS, dont la traduction conduit à la production d'une enzyme inactive a été mise en évidence (Takashima *et al.*, 2002a).

L'analyse comparative des gènes humain, murin (rat et souris) et bovin met en évidence de fortes similitudes dans l'organisation structurale au niveau de la région codante ***(Figure 22)***.

Alors que les séquences des ST6Gal-I et II ne présentent que 48% d'homologie entre elles (Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003), l'analyse des séquences des différentes ST6Gal-I entre mammifères révèle un pourcentage important d'identité. Par exemple, la protéine bovine présente respectivement 83 et 75% d'identité avec les protéines humaine et murine (Mercier *et al.*, 1999). En revanche, d'un point de vue structural, ST6Gal-I et II partagent la structure caractéristique des sialyltransférases golgiennes. Ces deux enzymes se caractérisent par un court domaine *N*-terminal cytoplasmique, une région transmembranaire prolongée par un domaine luminal, lui-même constitué d'une région tige et d'un domaine C-terminal catalytique renfermant les sialylmotifs.

En plus des traditionnels sialylmotifs L, S, III et VS, les enzymes ST6Gal présentent trois motifs spécifiques. Le premier est situé en amont du sialylmotif L, le second en aval du sialylmotif S et enfin le dernier est retrouvé entre les sialylmotifs III et VS (Patel and Balaji, 2006). Ils pourraient avoir un rôle dans la reconnaissance des substrats accepteurs, mais la preuve directe de cette fonction n'a pas été apportée à ce jour.

Ces enzymes renferment dans leurs séquences primaires des sites potentiels de *N*-glycosylation. L'occupation des deux sites de ST6Gal-I a déjà été montrée chez l'homme.
Cette glycosylation semble jouer un rôle dans l'adressage de la protéine vers l'appareil de Golgi (Chen and Colley, 2000). L'occupation des 3 sites potentiels de glycosylation de ST6Gal-II humaine n'a pas encore été déterminée.
ST6Gal-I et II utilisent le même substrat accepteur que des enzymes de la famille des ST3Gal telles que ST3Gal III, IV et VI. Ceci suggère que ces différentes sialyltransférases entrent en compétition les unes avec les autres dans le Golgi, au niveau des structures acceptrices.
Le niveau d'expression d'épitopes sialyl-α2,6- et sialyl-α2,3-lactosamine sur les glycoprotéines dépend du niveau d'expression des différentes sialyltransférases ainsi que de leur demi-vie. De plus, au cours de certains processus physiologiques, le rapport quantitatif entre ces deux structures glycanniques semble important, d'où la nécessité d'une régulation très fine de ces motifs de sialylation.
De nombreuses études se sont intéressées au rôle du motif sialyl-α2,6-lactosamine. En effet, des études menées sur les glycoprotéines circulantes ont montré l'importance de ce motif dans la clairance des glycoprotéines sériques. Ces dernières, qui sont dégradées par le foie, doivent être captées par des récepteurs à asialoglycoprotéines, l'ASGP-R, présents au niveau des surfaces des cellules hépatiques. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement les résidus galactose ou *N*-acétylgalactosamine terminaux (Park *et al.*, 2012) . Les protéines porteuses de l'épitope sialyl-α2,6-lactosamine (Sia6LacNAc) sont donc protégées de la dégradation.
Le motif Sia6LacNAc joue également un rôle très important dans les cancers. Une augmentation de la transcription de *ST6Gal-I* a été mise en évidence dans différents types de cancers, incluant le cancer du côlon (Dall'Olio *et al.*, 1992), du sein (Recchi *et al.*, 1998) et du col de l'utérus (Wang *et al.*, 2001a). Ceci est généralement associé à un mauvais pronostic vital, car la présence de ce motif est corrélée au pouvoir métastatique des tumeurs. De nombreuses protéines intervenant dans les interactions cellulaires, telles que l'intégrine β1 et l'E-sélectine, sont connues pour être des substrats de ST6Gal-I. De ce fait, toute modification de l'expression de la sialyltransférase peut entraîner des changements de la glycosylation de ces protéines d'adhésion et ainsi modifier leurs interactions. En effet, un niveau élevé de transcription de *ST6Gal-I* dans des cellules cancéreuses mammaires a pu être corrélé à une diminution des interactions des cellules entre elles, associée à une augmentation de l'adhérence au collagène IV (Lin *et al.*, 2002), ceci favorisant fortement le pouvoir métastasique des tumeurs. Une partie plus importante est consacré à ce sujet dans le chapitre glycosylation et cancer.

La compréhension du rôle exact du motif Sia6LacNAc nécessite d'étudier ses interactions avec ses ligands. C'est le cas du récepteur CD22, qui appartient à la famille des Siglecs (Poe and Tedder, 2012). Ce récepteur, présent à la surface des lymphocytes B matures, reconnaît spécifiquement les motifs sialylés des glycoprotéines de surface. Le CD22 joue un rôle primordial dans la répression des voies de signalisation du BCR (B Cell Receptor). Le mécanisme de régulation négative du BCR par le CD22 se fait en *cis* grâce à l'interaction du CD22 avec les *N*-glycannes du BCR. Dans l'état actuel des connaissances, il semble que la liaison CD22-BCR induise le recrutement de toute une série de partenaires, tel que la tyrosine phosphatase SHP-1 (Jin *et al.*, 2002), qui permettent d'atténuer la sensibilité du BCR et de limiter son activation par des éléments stimulateurs. Cette régulation est primordiale pour maintenir l'homéostasie et assurer l'intégrité de l'organisme. En effet, l'étude de lymphocytes de souris *KO* pour CD22 a montré qu'ils présentent une propension à produire des anticorps auto-immuns de forte affinité (O'Keefe *et al.*, 1999). De plus, lors du processus inflammatoire, l'expression des structures Sia6LacNAc augmente au niveau des surfaces des cellules endothéliales. L'apparition de ces structures favoriserait l'adressage du lymphocyte B au site inflammatoire par une interaction en *trans* du CD22 (Hanasaki *et al.*, 1994).

D'autres études effectuées chez le rat (Kaplan *et al.*, 1983) et la souris (Dalziel *et al.*, 1999; Appenheimer *et al.*, 2003) ont confirmé l'augmentation de la transcription et de la traduction de *ST6Gal-I* dans le foie au cours de la phase aigüe de l'inflammation. De plus, une sécrétion de ST6Gal-I sous une forme tronquée de ses régions cytosoliques et transmembranaires est observée au niveau des cellules hépatiques (Jamieson *et al.*, 1993). L'importance des motifs Sia6LacNA dans l'inflammation est également étayée par la préférence que possèdent la majorité des pathogènes pour le motif Sialyl-α2,3-lactosamine en tant que structure acceptrice (Angata and Varki, 2002). L'augmentation de l'expression et de la traduction de ST6Gal-I augmente la compétition avec les ST3Gal, ce qui limite le nombre de motifs Sia3LacNAc exposés à la surface cellulaire. L'augmentation des motifs Sia6LacNA réduit l'interaction des pathogènes avec la cellule et minimise le risque d'infection et de propagation du pathogène (Gagneux and Varki, 1999; Gagneux *et al.*, 2003).

La famille des α(2,8) sialyltransférases

Les ST8Sia constituent une famille de sialyltransférases qui catalysent la liaison α(2,8) entre deux acides sialiques. Cette famille comprend six membres chez les mammifères.
Outre les sialylmotifs L, S, III et VS, des motifs spécifiques à cette famille de sialyltransférases sont également retrouvés. Le premier motif spécifique est constitué de 10 acides aminés et se situe juste avant le sialyl motif L (Patel and Balaji, 2006). Le second motif se situe en position C-terminale (motif C-term), il est aussi composé de 10 acides aminés dont une cystéine retrouvée sur toutes les enzymes de la famille (Harduin-Lepers *et al.*, 2008).
La cystéine conservée forme avec une autre cystéine conservée du sialylmotif L un pont disulfure intra-moléculaire qui est essentiel au repliement tridimensionnel et à l'activité des ST8Sia (Angata *et al.*, 2001).
Cette famille de sialyltransférases se subdivise en trois groupes, les mono-, les oligo- et les poly-sialyltransférases (Harduin-Lepers *et al.*, 2008). La classification que je présente est basée sur la comparaison des structures géniques et protéiques des différents membres, ainsi que sur la spécificité pour le substrat.

La première sous-famille regroupe ST8Sia-I, -V et -VI qui présentent près de 38 à 44% d'identités entre elles. Les ST8Sia-I et -V interviennent dans la biosynthèse des gangliosides. La ST8Sia-I, également appelée la GD3 synthase, catalyse la synthèse du GD3 (Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ1-O-Cer) (Nara *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994; Yamashiro *et al.*, 1995), le précurseur des gangliosides des séries b et c dont beaucoup sont impliqués dans des processus biologiques comme l'adhésion cellulaire ou l'apoptose (Okada *et al.*, 2002). La ST8Sia-I catalyse également la synthèse du GT3 (Neu5Acα2,8Neu5Ac2,8 Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ1-O-Cer (Kono *et al.*, 1996). La ST8Sia-V murine est active vis-à-vis des gangliosides GM1b, GD1a, GT1b et GD3 (Kono *et al.*, 1996), et des gangliosides de type GD1c, GT3 GQ1b et GT1a (Kono *et al.*, 1996). La ST8Sia-VI a été identifiée chez l'homme (Teintenier-Lelièvre *et al.*, 2005) et la souris (Takashima *et al.*, 2002b). Elle n'a qu'une très faible activité sur les glycolipides, par contre, elle est très active sur les accepteurs de type III (Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcα1-O-Ser/Thr) (Teintenier-Lelièvre *et al.*, 2005).
Les gènes *ST8Sia-I, -V et -VI* ont une structure morcelée où la séquence correspondant au sialylmotif L se situe à cheval sur 2 exons (Takashima, 2008).

L'autre sous famille est composée de ST8Sia-II, -III et -IV. Ces enzymes sont capables d'effectuer de l'oligo- ou de la poly-sialylation, c'est-à-dire de constituer des chaînes plus ou moins longues d'acides sialiques (PSA « PolySialicAcids ») en position terminale des

glycannes. Chez les mammifères, l'exemple le plus connu de protéines présentant ces PSA sont les NCAMs, c'est aussi le cas de rares autres protéines comme la sous unité α du canal sodique voltage dépendant (Zuber *et al.*, 1992).

Les ST8Sia-II et -IV présentent une homologie de 67% au niveau protéique. Elles sont toutes deux impliquées dans la poly-sialylation des glycoprotéines (Angata *et al.*, 2002). Les souris *KO* pour l'un ou l'autre des gènes codant ces enzymes, présentent des phénotypes neurologiques et cognitifs.

La ST8Sia-III « sialyl α2,3Galβ1,4GlcNAc-R α2,8-sialyltransférase » est exprimée dans le cerveau et les testicules, uniquement au cours du développement (Yoshida *et al.*, 1995). Elle est active sur la fétuine chez l'homme et capable de réaliser, chez la souris, des PSA à partir de structures NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc. Elle possède également, une activité d'autopolysialylation sur ses propres antennes glycanniques (Angata *et al.*, 2000).

En plus des deux motifs spécifiques des ST8Sia, les trois sialyltransférases de cette deuxième sous famille présentent dans leurs séquences des motifs spécifiques supplémentaires. On retrouve en amont du sialylmotif S des ST8Sia-II et -IV, un motif de 32 acides aminés dénommé domaine de polysialylation (PSTD), qui est impliqué dans l'élongation des chaînes linéaires d'acides sialiques (Nakata *et al.*, 2006). Ce motif n'est pas retrouvé sur ST8Sia-III mais la comparaison des séquences de différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés a permis d'identifier un motif similaire pour 52 acides aminés (motif III-2), situé juste en amont du sialylmotif S. Cette enzyme possède également un motif de 10 acides aminés (motif III-1) positionné en amont du sialylmotif L (Harduin-Lepers *et al.*, 2008).

Un exemple bien étudié de polysialylation correspond à la NCAM (molécule d'adhésion des cellules neurales), qui appartient à la superfamille des molécules d'adhésion immunoglobuline-like. Elle est médiatrice des interactions homo- et hétéro-phylliques. Cette molécule possède de l'acide polysialique (PSA) qui gère les propriétés de déstabilisation des contacts cellulaires caractéristiques des molécules NCAM. L'addition de PSA sur la NCAM s'effectue généralement au cours du développement. Chez l'adulte, seules les zones du cerveau qui présentent une neurogénèse persistante, une migration cellulaire (Hu *et al.*, 1996), une croissance axonale (Doherty *et al.*, 1990) et/ou une plasticité synaptique (Goridis and Brunet, 1992; Theodosis *et al.*, 1999) sont susceptibles de présenter ces PSA. Des tumeurs neuro-endocrines avec un haut potentiel métastatique, comme le cancer à petites cellules du poumon (Lantuejoul *et al.*, 1998), le neuroblastome (Glüer *et al.*, 1998) et les tumeurs de Wilms (*Roth et al.*, 1988), ré-expriment le PSA à de fortes concentrations. Les PSA contrôlent la croissance

tumorale à travers la signalisation NCAM dans les contacts cellule-cellule (Seidenfaden *et al.*, 2003).

La synthèse de PSA chez les mammifères est réalisée par les ST8Sia-II et ST8Sia-IV. (Nakayama *et al.*, 1995; Mühlenhoff *et al.*, 1996) sur une structure Neu5Ac-α2,3Galβ1,4GlcNAc-R portée par la molécule d'adhésion neurale (NCAM) (Scheidegger *et al.*, 1995).

Les ST8Sia-II et ST8Sia-IV diffèrent entre elles par la longueur des chaînes d'acides poly-sialiques réalisées, par la nature de leur liaison à l'oligosaccharide porteur (Angata *et al.*, 2000, 2002) et par les affinités pour le substrat accepteur (Horstkorte *et al.*, 2004).

Les sialidases

Les sialidases (neuraminidase, N-acétylneuraminosyl-glycohydrolase, SA) sont des enzymes clé du catabolisme de l'acide sialique. Elles hydrolysent les liaisons entre l'acide sialique et le sucre auquel il est attaché. Elles ont été décrites chez les Echinodermes et au sein de plusieurs taxons de Deuterostomiens, y compris l'Homme. Elles ont également été décrites chez des virus, des protozoaires, des bactéries et des champignons, alors même que ces organismes ne présentent pas d'acide sialique. Le rôle des sialidases comme « facteurs pathogéniques » est controversé. Bien qu'elles soient soupçonnées d'augmenter l'impact de certaines espèces microbiennes en accentuant leur capacité de propagation et d'invasion des tissus, comme cela a été démontré chez *Clostridium perfringens* et *Bacteroides fragilis* (Corfield, 1992).

Les SA donneraient aux bactéries la capacité de cliver l'acide sialique terminal des cellules hôtes, afin de démasquer les structures sub-terminales des récepteurs, les rendant plus réceptifs aux toxines, comme cela a été montré pour la toxine du choléra (Galen *et al.*, 1992). Les SA à la surface des virus *Influenza A* et *B*, clivent également les acides sialiques de la couche de mucus protectrice de l'appareil respiratoire, ce qui permet la dispersion du virus (Colman and Ward, 1985).

Chez l'homme et la souris, 4 types de sialidases sont décrites, la Neu1 lysosomale, la Neu2 cytosolique, la Neu3 membranaire et la Neu4 retrouvée généralement associée à la membrane du RE ou à la mitochondrie (Miyagi and Yamaguchi, 2012). Deux maladies humaines, la sialidose et la galactosialidose, sont associées à un défaut ou à une déficience de la SA lysosomale. Une partie conséquente est consacrée au rôle des sialidases dans le développement musculaire à la fin de la revue bibliographique.

Les altérations de la sialylation dans les désordres métaboliques

Divers désordres génétiques sont à l'origine de désordres innés du métabolisme de l'acide sialique, comme la maladie de Salla, la maladie infantile de surcharge d'acide sialique, la sialurémie, la sialidose et la galactosialidose.

La maladie de Salla (OMIM 604369) se distingue par une surcharge en acide sialique (SSD) à l'âge adulte. Une forme infantile de stockage d'acide sialique (OMIM 269920) existe, mais se distingue de la forme adulte (Strehle, 2003). Ces désordres sont causés par un déficit dans les mécanismes de transport d'acide sialique, ce qui entraîne son accumulation dans les lysosomes (Schneider *et al.*, 1995). Une mutation dans le gène *SLC17A5* serait la cause de la maladie. Ce gène est localisé sur le chromosome 6p14q15. Il code la sialine, une protéine impliquée dans le transfert intra et extracellulaire de métabolites (Verheijen *et al.*, 1999).

La forme infantile est déjà présente *in utero*. Dès leur naissance, les enfants sont atteints d'hypotonie et d'hépatosplénomégalie. De plus apparaissent des anomalies osseuses, une atteinte motrice très grave, un retard mental et des convulsions. Les formes sévères sont fatales dans la petite enfance. La forme modérée débute dans la première année par l'hypotonie suivie de spasticité, d'ataxie et de retard psychomoteur.

La sialurémie (OMIM 269921) quant à elle, est due à la perte d'inhibition de l'enzyme limitante du métabolisme de l'acide sialique, l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine 2-

épimérase (UDP-GlcNAc 2-épimérase). Trois mutations hétérozygotes dans ce gène ont été identifiées, ce qui suggère une transmission génétique dominante (Seppala *et al.*, 1999).
Les patients présentent des anomalies osseuses, un retard du développement, une épilepsie, une hépatomégalie. Par chromatographie, on révèle dans leurs urines un excès d'acide sialique libre (Seppala *et al.*, 1999).

La sialidose (OMIM 256550) est une maladie due au déficit en α-D-neuraminidase. La dégradation des glycoprotéines est altérée, ce qui entraîne une surcharge tissulaire en sialyloligosaccharides. La transmission est autosomale récessive. La sialidose peut présenter des dysmorphies faciales ou non, selon ce critère, deux cas de figure se présentent:

- La sialidose de type 1, associée à une rétinopathie et à des troubles du fonctionnement musculaire (contraction musculaire rapide, involontaire, de faible amplitude).
- La sialidose de type 2 ou sialidose dysmorphique infantile. Nous retrouvons la dysmorphie faciale associée à un retard mental et une atteinte rénale (néphrosialidose). Le gène responsable a été localisé en 6p21, ainsi plusieurs mutations ont été décrites *(Bonten et al.*, 1996).

Enfin, la galactosialidose (OMIM 256540) est une maladie de surcharge lysosomale rare. Elle est due à un déficit en neuraminidase et en β-galactosidase (Zhou *et al.*, 1995), résultant du déficit primitif d'une troisième protéine lysosomale bifonctionnelle: la protéine Protectrice/Cathepsine A ou PPCA, qui se lie à la β−galactosidase et à la neuraminidase dans un complexe multienzymatique, leur assurant un bon fonctionnement et la stabilité dans les lysosomes. La transmission est autosomale récessive. Il existe trois phénotypes cliniques :

La forme congénitale ou infantile précoce qui se caractérise par une atteinte neurologique, insuffisance rénale, dysmorphie faciale, anomalies squelettiques et oculaires.

La forme infantile tardive est caractérisée par l'absence de détérioration mentale ou une détérioration mineure.

La forme juvénile/adulte, présente pratiquement les mêmes caractéristiques que la forme infantile, avec une atteinte neurologique lente progressive.

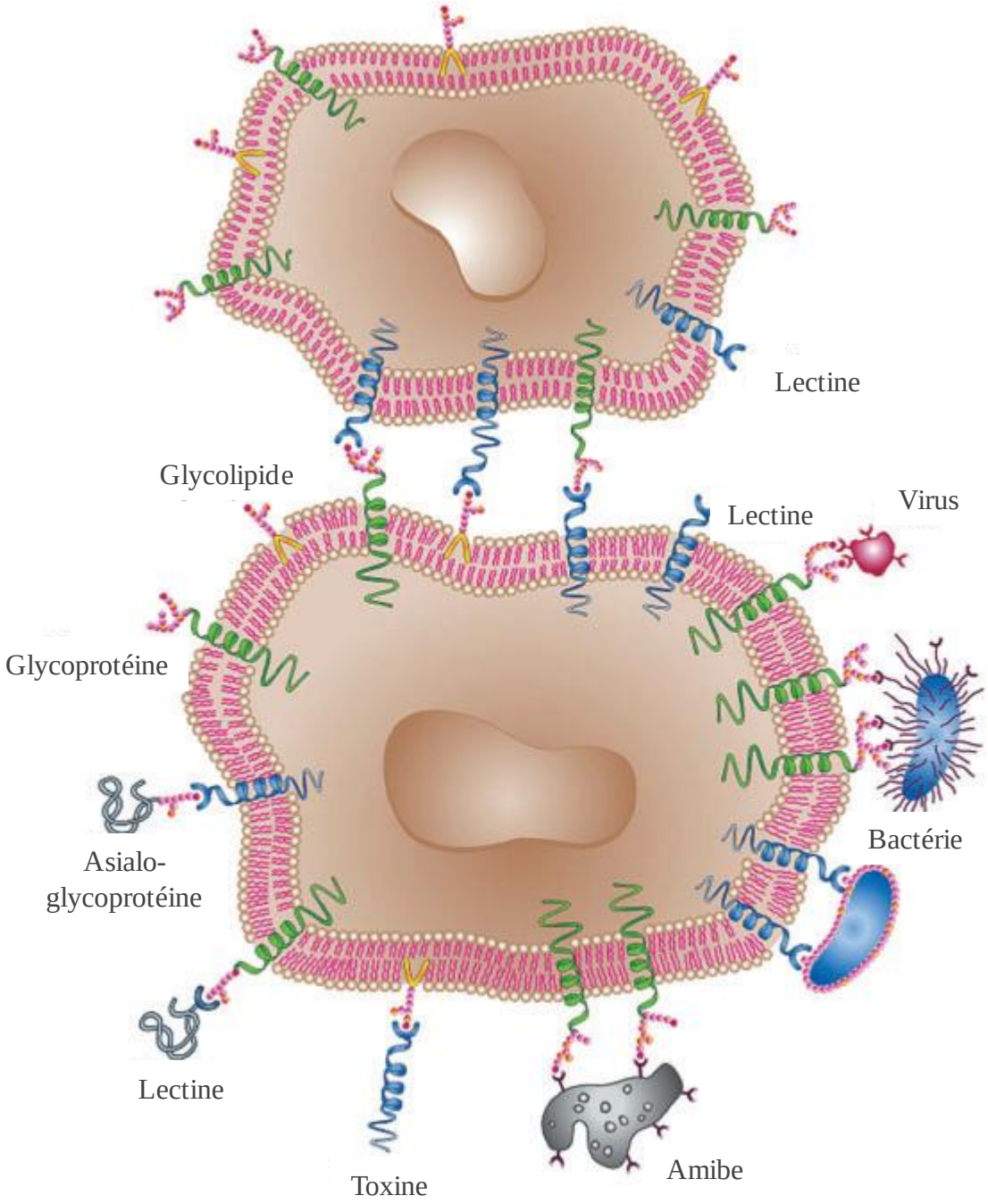


Figure 24 : Interactions entre Lectines et glycannes

Les lectines servent de moyens de fixation pour différents types de cellules ainsi que pour les bactéries et les virus par l'intermédiaire des sucres de surface. Dans certains cas, les lectines de surface se lient particulièrement aux glycoprotéines, par exemple les asialoglycoprotéines ; alors que dans d'autres cas, les glycoconjugués liés aux protéines ou aux lipides servent de sites de fixation pour les molécules biologiquement actives qui sont elles-mêmes des lectines. Par exemple, des glucides spécifiques de végétaux, des toxines ou des galectines,

Origine de l'image: La revue de Nathan Sharon et Halina Lis 2004 « History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules ».

Chapitre IV : **Fonctions des glycannes**

Il existe à la surface des cellules un grand nombre de glycannes constituant une couverture glycannique plus au moins épaisse nommée « glycolcalyx ». La structure variable et extrêmement complexe des sucres leur confère des propriétés physico-chimiques très particulières. De plus, leur capacité à être reconnus de manière spécifique par des récepteurs tels que les lectines de surface, les anticorps, les pathogènes ou encore par d'autres glycoprotéines portées par les cellules voisines, leur permet de remplir différents rôles de signalisation, de reconnaissance et d'adhérence (Lis and Sharon, 1993; Sharon and Lis, 1993; Yarema and Bertozzi, 1998) ***(Figure 24)***.

La reconnaissance des glycannes par les lectines participe activement aux interactions entres cellules. De nombreuses glycosyltransférases sont impliquées dans la synthèse de glycannes reconnus par ces lectines particulières notamment les sélectines et les SIGLECs. Ces dernières reconnaissent les fucoses et les acides sialiques (démontrant encore une fois l'importance de ces sucres périphériques) présents au niveau de la surface. L'interaction de la sélectine avec les glycannes permet le recrutement, l'adhésion, la mobilité des cellules tel qu' observé au niveau des cellules immunitaires lors de leur recrutement sur le site inflammatoire (McEver and Cummings, 1997; Sperandio *et al.*, 2009).

Ces dernières années, le rôle des motifs glycosylés est étudié avec une application toute particulière dans les secteurs thérapeutique et biotechnologique. Par exemple, il est aujourd'hui reconnu que les motifs glycosylées portés par les immunoglobulines (généralement sur la partie Fc) peuvent moduler l'intensité de la force de liaison de l'anticorps à son épitope. Le "rituximab", un anticorps anti-CD20 utilisé dans le traitement de la leucémie CLL « Chronic lymphocytic leukaemia » illustre parfaitement l'intérêt qui doit être porté aux motifs glycosylés dans les relations antigènes anticorps. Une équipe française a ainsi mis en évidence qu'un anticorps dirigé contre le même épitope mais avec une structure *N*-glycannique différente présente une variation d'affinité pour le récepteur CD20, et de ce fait, augmente son efficacité contre les cellules tumorales (de Romeuf *et al.*, 2008).

L'importance de la glycosylation au niveau métabolique et fonctionnel apparaît tout à fait incontestable à la lecture des travaux qui vont suivre qui ont été en partie réalisées sur les lignées cellulaires mutantes de levures et de mammifères, ou encore sur des modèles souris

KO porteuses d'erreurs métaboliques de glycosylation (Lowe and Marth, 2003; Schachter, 2001; Vogt *et al.*, 2007). Pour ne pas s'éloigner du sujet, l'accent sera mis sur la *N*-glycosylation et particulièrement la sialylation.

De nombreuses études ont montré qu'une défaillance dans l'établissement de la *N*-glycosylation était dans la majorité des cas létale. Par exemple, l'invalidation du gène *MgatI*, codant pour une GlcNAc transférase I, une des premières enzymes impliquées dans la biosynthèse des *N*-glycannes complexes et hybrides, entraine la mort des embryons à 9 jours de gestation, suite à des anomalies de fermeture du tube neural (Ioffe and Stanley, 1994; Ioffe *et al.*, 1997). De même, le *KO* de la GlcNAc transférase II, appartenant également à la famille des *Mgat* et impliquée de façon similaire dans la maturation des *N*-glycannes, entraine 100% de mortalité des souriceaux une semaine après la naissance (Wang *et al.*, 2001b).

D'autre part, des études réalisées par mutagénèse dirigée contre des sites de *N*-glycosylation de certaines glycoprotéines particulières apportent des éléments importants concernant le rôle que peuvent jouer les glycannes (Sharon and Lis, 2004).

Les glycoconjugués, grâce à leurs propriétés physicochimiques, interviennent notamment dans le repliement, la solubilité, la stabilité et la résistance des glycoprotéines (Lis and Sharon, 1993; Mitra *et al.*, 2006). Les glycannes ont de plus un rôle primordial dans la modulation des interactions moléculaires de par l'encombrement stérique qu'ils confèrent. Aussi, ils constituent des signaux de reconnaissance dans les phénomènes d'adhésions et de communication cellulaires ce qui explique leur grande implication dans l'embryogenèse et les processus de différenciation (Ohtsubo and Marth, 2006; Taylor and Drickamer, 2003).

Dans la suite de ce manuscrit, je détaillerai uniquement quelques aspects de l'implication des glycannes dans les processus biologiques, pour finir avec le sujet qui à constitué le cœur de mon travail « l'implication de la glycosylation dans la myogenèse».

Modulation des propriétés biologiques

1. Glycosylation et activité enzymatique des glycoprotéines

Il semble plus que probable que les sucres influent directement ou indirectement l'activité enzymatique des protéines. L'exemple le plus connu concerne les intégrines. Ces dernières sont des molécules d'adhésion qui forment des jonctions entre la cellule et la matrice extracellulaire. En effet, la partie *N*-terminale de ces protéines dimériques (deux sous-unités α et β) se lie à la fibronectine, une protéine soluble de la matrice extracellulaire, alors que la partie *C*-terminale des intégrines est en relation directe avec des molécules de signalisation intracellulaires. L'intégrine forme ainsi une plateforme d'échange et de transduction du signal pour la cellule. La *N*-glycosylation portée par la sous-unité α_5 de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est essentielle à sa dimérisation avec la sous unité β, ainsi qu'à l'adressage de la protéine à la surface cellulaire (Isaji *et al.*, 2006). De plus, la déglycosylation de cette intégrine empêche sa liaison avec la fibronectine, induisant la perte de la fonction d'adhésion de la protéine (Zheng *et al.*, 1994). D'autres études de mutagénèse dirigée contre des sites de *N*-glycosylation, effectuées sur l'enzyme Fut-IV (Baboval *et al.*, 2000) et la β1,4 GalNAc transférase (Haraguchi *et al.*, 1995), ont montré que la perte d'activité catalytique pouvait atteindre 95%. De même, la désialylation du facteur de coagulation IX se solde par une perte totale de l'activité protéique (Chavin and Weidner, 1984).

A l'inverse, la présence de *N*-glycannes peut aussi avoir une activité inhibitrice ou modulatrice, comme le montre l'exemple de l'activateur du plasminogène tissulaire, au niveau duquel la désialylation ou la déglycosylation partielle sont capables d'induire une augmentation de son activité enzymatique (Wilhelm *et al.*, 1990).

2. Glycosylation et transduction du signal

La glycosylation peut intervenir sur plusieurs aspects dans la transduction du signal.

En premier lieu, la glycosylation peut influer l'intensité du signal, comme démontré pour l'activateur du plasmagène urinaire, lequel présente une perte d'activation de son récepteur si la *O*-glycosylation de ses domaines EGF n'est pas effective (Rabbani *et al.*, 1992).

Au niveau des intégrines, le fucose proximal lié au GlcNAc du cœur pentasaccharidique est impliqué dans la transduction du signal. En effet, les fibroblastes embryonnaires Fut8$^{-/-}$ sont caractérisés par une réduction de la signalisation relayée par l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ (Zhao *et al.*, 2006).

A contrario, la présence d'acide sialique sur certaines hormones glycosylées comme l'EPO, influe négativement sur la liaison avec son récepteur et par conséquent sur la signalisation plus en aval. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les charges négatives apportées par les acides sialiques, interfèrent avec la liaison de l'hormone à son récepteur (EPO-R) (Darling *et al.*, 2002).

En second lieu, la glycosylation peut jouer sur la nature du signal, sans pour autant affecter la liaison au récepteur. Ainsi, la sialylation portée par les *N*-glycannes semble importante dans le cas de la HCG (β-human chronic gonadotrophine) au niveau de laquelle l'absence d'acide sialique empêche la transduction du signal (Nemansky *et al.*, 1995).

La signalisation peut aussi être modulée au niveau du récepteur comme le montrent de nombreuses études. Les *N*-glycannes ont un rôle privilégié dans le repliement et la conformation des glycoprotéines, alors que les *O*-glycannes ont un rôle particulier dans la modulation du signal. Cela est démontré pour le récepteur Notch et les protéines de la famille des TGFβ (Transforming growth factorsβ) qui voient leurs activités modulées par, notamment, la *O*-fucosylation (Haltiwanger, 2002). Je reviendrai sur cette partie en détail dans la partie consacré à Notch, un peu plus loin.

3. *N*-glycosylation et les désordres congénitaux de la glycosylation

Les CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) ou (Carbohydrates Deficient Glycoproteines) sont des maladies associées à un défaut du métabolisme glycannique, souvent liée à la *N*-glycosylation chez l'homme (Freeze and Aebi, 2005b).

Ces maladies sont classées en fonction de l'étape de biosynthèse atteinte par l'anomalie. De ce fait, on parle de CDG de type I, quand la mutation touche un gène qui code pour un acteur de la glycosylation impliqué dans la biosynthèse et /ou le transfert des précurseurs oligosaccharidiques. On parle de CDG de type II lorsque les produits touchés assurent la maturation des *N*-glycannes.

Les CDG sont souvent caractérisés pas des atteintes neurologiques auxquelles peuvent être associées des atteintes multi-viscérales. Ils sont liés à différents déficits enzymatiques dont le plus fréquent est le déficit en phosphomannomutase (PMM) causé par une mutation du gène *PMM2* situé en 16p13. Un retard psychomoteur est un signe fréquemment observé pour cette pathologie. D'autres effets peuvent être associés à ce déficit, mais à différents degrés, tels que l'atrophie cérébelleuse, des anomalies squelettiques et des troubles de la coagulation

(Stibler *et al.*, 1996), ainsi que la cytolyse et les fibroses hépatiques (Jaeken and Matthijs, 2007; Jaeken *et al.*, 1997; Van Schaftingen and Jaeken, 1995).

A l'heure actuelle, 12 CDG de type I et 6 CDG de type II ont été répertoriés (Freeze and Aebi, 2005b). Ils sont classés par ordre alphabétique. Pour les CDG de type I nous retrouvons (CDG-I, Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, Ih, Ii, Ij, Il), les CDG-Ih, i, j, et l sont les maladies les plus récemment découverts et présentent un nombre très limité de cas diagnostiqués. Un des exemples de ce groupe est le CDG Ic qui est associé à une mutation du gène *hALG6* qui entraine un déficit en dolichyl-P-Glc : $Man_9GlcNAc_2$-PP-dolichyl α1,3 glucosyl-transférase réticulaire (de Zegher and Jaeken, 1995).

Quant aux CDG de type II, de même que les précédents, ils sont classés par ordre de découverte (CDG-II, IIa, IIb, IIc, IId, et IIx), les CDG-IIx sont les maladies ou la glycosyltransférase incriminée n'a pas encore était clairement identifiée (Freeze and Aebi, 2005b). Un exemple connu, est celui du CDG-IIc anciennement appelé « Leucocyte Adhésion Deficiency II, LAD II). Il s'agit d'un déficit au niveau du transporteur du fucose depuis le compartiment cytosolique vers la lumière de l'appareil de Golgi. Cette maladie peut être traité par l'administration du fucose *per* os (Lübke *et al.*, 2001).

4. Glycosylation et cancer

Voilà déjà plusieurs décennies que la modification des structures glycanniques de surface a été démontrée dans les états pathologiques tel que les cancers ou les infections (Meezan *et al.*, 1969). L'avènement des lectines en tant qu'outil de biologie moléculaire a permis d'aller plus avant dans la compréhension de ces mécanismes. En effet, il a été démontré que les marquages lectines obtenus sur des tissus sains étaient différents de ceux obtenus sur des tissus cancéreux (Laack *et al.*, 2002). A partir des années 70, l'utilisation d'anticorps radio-marqués a permis de mettre en évidence l'existence d'antigènes spécifiques des tissus cancéreux (Gorsky *et al.*, 1976). Depuis, nombre d'études se sont focalisées sur la caractérisation de ces antigènes glycanniques associés aux cancers, via l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Matsushita *et al.*, 1990; Pancino *et al.*, 1991). Les antigènes glucidiques sont soit légèrement modifiés, soit surexprimés ou sous-exprimés à la surface des cellules cancéreuse, mais ils restent non antigéniques ce qui constitue un obstacle majeur dans leur détection par le système immunitaire. En effet, ce dernier, les considère comme faisant partie du soi, alors que ces motifs ont un rôle actif dans la dissémination et la propagation du cancer.

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 25 : Les motifs de glycosylation altérés sont une caractéristique du phénotype de la tumeur.

Ils comprennent à la fois la sur- et la sous-expression de glycannes (par exemple, le sialyl Lewis x (sLex)), ainsi que la présence de glycannes à expression restreinte naturellement au développement embryonnaire (par exemple, l'acide sialique (PSA)).
Les épitopes oligosaccharidiques représentés ici sont un exemple de groupe de glycannes que l'on trouve sur les cellules malignes. Les glycannes présentés sur la surface d'une cellule représentent une signature pour la transmission des informations sur l'état physiologique de la cellule. Par exemple, des niveaux élevés d'acide sialique au niveau des motifs glycanniques indiquent un mauvais pronostic (haute capacité métastatique) dans de nombreux types de cancers (Dube and Bertozzi, 2005).

La présence de certains motifs glycanniques a clairement été mise en exergue dans les processus de cancérisation ***(Tableau 4 et Figure 25)***. Nombre d'entre eux sont soit tronqués ou au contraire allongés ou ramifiés, comme pour le cas des *N*-glycannes. Nous retrouvons encore une fois l'implication des sucres périphériques, avec un rôle tout particulier pour la sialylation et la fucosylation. En effet, de nombreux motifs associés au cancer présentent des structures terminales modifiées. Ainsi, l'élévation du taux de sialylation est souvent associée à des tumeurs hautement prolifératives et métastasiques (Ren *et al.*, 2014; dos-Santos *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Néanmoins, les mécanismes moléculaires intimes de cette augmentation ne sont pas toujours compris (Harduin-Lepers *et al.*, 2012) bien, que l'origine de toutes les modifications du motif glycannique dans les cellules cancéreuses soit très souvent induite par une modification en amont de l'expression des glycosyltransférases responsables de l'élaboration du motif en question (Dennis *et al.*, 1999).

A titre d'exemple, des lignées de cancer du sein présentent une surexpression de l'α3 sialyltransférase, ce qui augmente le nombre d'épitopes *O*-glycanniques sialylés dans ces lignées ***(Tableau 4)*** (Brockhausen, 1999).

Un autre exemple connu est l'augmentation de l'antennage des *N*-glycannes observé dans de nombreux cancers et induite par l'augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme MGAT5 qui est responsable de la fixation du GlcNAc sur le mannose du core pentasaccharidique (Liu *et al.*, 2013; dos-Santos *et al.*, 2014). Un autre exemple est celui de l'ajout d'un acide sialique qui bloque l'allongement des *O*-glycannes en empêchant l'action des GlcNAc- et des Gal-transférases. De ce fait, les chaines *O*-glycanniques rencontrées dans les cellules cancéreuses sont souvent plus courtes (Zhao *et al.*, 2014).

Les changements au niveau des motifs glycanniques et au niveau de la sialylation affectent également les glycolipides ***(Tableau 4)*** (Hakomori and Zhang, 1997), notamement les gangliosides complexes de type GD3 et GD2, dont l'expression est fortement augmentée dans certains types de cancers. Ces gangliosides semblent avoir un rôle important dans la prolifération, la migration, l'adhésion et l'angiogenèse (Cazet *et al.*, 2009). Dans le tissu normal, les gangliosides complexes sont absents ou très faiblement exprimés à la surface de la cellule. Par contre, ces gangliosides sont très fortement présents dans certains types de cancers ***(Tableau 4)***, notamment le cancer de sein. En effet, des études cliniques ont montré qu'une augmentation de l'expression de *ST8SIA1*, qui code la GD3 synthase est associé au cancer de sein négatif pour le récepteur à l'œstrogène (ER-). Ce type de cancer ne réagit pas aux hormonothérapies classiquement utilisées comme traitement. Dans ce type de cancer, une accumulation des gangliosides GD3 et les GD2 est observée et associée à un mauvai

Antigènes tumoraux	Structure	Tissus cancéreux	références
Tn , Sialyl Tn	GalNAcα1-Ser/Thr Neu5Acα2,6GalNAcα1-Ser/Thr	Colon Utérus Poumon Sein Pancréas Ovaire Estomac	(Barrow *et al.*, 2013; Ogata *et al.*, 2001) (Numa *et al.*, 1995; Terasawa *et al.*, 1996) (Laack *et al.*, 2002) (Babino *et al.*, 2000; Fernández Madrid *et al.*, 2005) (Nanashima *et al.*, 1999) (Akita *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 1992) (Kakeji *et al.*, 1995; Nakagoe *et al.*, 2002a)
Thomsen Friedenreich (TF)	Galβ1,3GalNAcα1-Ser/Thr	Colon Vessie Prostate Sein Foie Ovaires Estomac	(Baldus *et al.*, 2000; Kumagai *et al.*, 2013) (Coon *et al.*, 1982; Nishiyama *et al.*, 1987) (Zhang *et al.*, 1997) (Kumar *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1998) (Cao *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2004) (Ghazizadeh *et al.*, 1990, 1997) (Baldus *et al.*, 2001; Kodar *et al.*, 2013)
Sialyl Lawis^{x} (sLe^{x})	Neu5Acα2,3Galβ1-4(Fuc α1,3GlcNAc-Ser/Thr	Sein Vessie Estomac Colon Poumon	(Nakagoe *et al.*, 2002b) (Ohyama, 2008) (Nakagoe *et al.*, 2002c) (Matsushita *et al.*, 1990; Nakagoe *et al.*, 2002d) (Zhang *et al.*, 1997)
GM2	GalNAcβ1,4 (Neu5Ac2,3)Galβ1,4Glc β1-1Cer	Sein Poumon Colon Ovaires Prostate Estomac Mélanome	(Fukumoto *et al.*, 1999; Nohara *et al.*, 1998) (Fukumoto *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2011) (Handa and Hakomori, 2012; Zhang *et al.*, 1997) (Handa and Hakomori, 2012; Zhang *et al.*, 1997) (Handa and Hakomori, 2012; Zhang *et al.*, 1997) (Handa and Hakomori, 2012; Zhang *et al.*, 1997) (Bubka *et al.*, 2014; Yamashiro *et al.*, 1995)
GM3	Neu5Ac2,3Galβ1,4 Glcβ1-1Cer	Mélanome Sein Colon Poumon Prostate	(Hamilton *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 2013) (Ma *et al.*, 2009; Mulens *et al.*, 2010) (Handa and Hakomori, 2012; Ogata *et al.*, 1995) (Alonso *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2008) (Ravindranath *et al.*, 2005)

Tableau 4 : Exemples de quelques motifs antigéniques avec les tissus cancéreux au sein desquels ils sont exprimés.
Données répertoriées et compulsées pas Sabrina POUILLY, Thèse Université d'Orléans, 2010

pronostique (Cazet *et al.*, 2009, 2010a). GD2 induit un phénotype prolifératif des tumeurs suite à une activation constitutive du récepteur à la tyrosine kinase (c-Met) et par conséquent l'activation des voies Erk/MapKinases et PI3Kinases/AKT. Ces études ont été réalisées *in vivo* sur une lignée tumorale du sein (ER-) (Cazet *et al.*, 2010b, 2012).
En parallèle, des études réalisées *in vitro* ont montré que l'augmentation d'expression du gène *ST8SIA1* est dépendante de la signalisation de NFKB, un facteur de transcription qui agit en inhibant la translocation nucléaire de p50 et p65. Les mêmes travaux ont aussi montré que la liaison de l'estradiol sur son récepteur baisse l'expression de *ST8SIA1* dans une ligné de cancer de sein ER-positive (MESIAF-7) (Bobowski *et al.*, 2013).

A l'inverse de ST8SIA1, d'autres glycosyltransférases sont sous exprimées dans les cancers. C'est le cas de la β(1,6)-GlcNAc-transférase qui catalyse la liaison du GlcNAc sur le GalNAc dans la formation du noyau 2 des *O*-glycannes ***(Réf. Figure 15)***. On observe alors une augmentation de l'antigène de Thomsen Friedenreich (TF : Galβ1,3 GalNAcα1-ser/thr) dans certains cancers du sein (Kumar *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1998).

Cet antigène TF s'associe avec les galectines 3 et permet l'agrégation des cellules cancéreuses (Barrow *et al.*, 2013) et la traversée des parois des vaisseaux sanguins pour se disséminer et former des métastases. L'antigène sialyl-Lewis^{a} participe à l'adhérence des cellules cancéreuses du colon et du pancréas au niveau endothélial (Nakagoe *et al.*, 2002a). De même l'antigène sialyl-Lewis^{x} intervient dans l'adhérence des cellules tumorales du sein et de l'ovaire. Pour rappel, les motifs sialyl-Lewis$^{x/a}$ utilisent les E-sélectines présentes naturellement sur les parois endothéliales (Nakagoe *et al.*, 2002a).

Glycosylation et myogenèse

L'importance de la glycosylation dans le développement est maintenant admise, mais les études se succèdent pour comprendre les mécanismes moléculaires intimes de cette implication. Par exemple une défaillance de la *O*-glycosylation peut empêcher la sécrétion de la laminine et du collagène IV, qui sont des éléments essentiels à la fois de la matrice extracellulaire et de la transduction du signal dépendante des intégrines et des facteurs de croissance tels que le FGF (Tian *et al.*, 2012).

Le développement et la régulation de la masse du muscle squelettique sont très finement contrôlés dans le temps et dans l'espace par divers facteurs de croissance extracellulaires (Buckingham and Relaix, 2007). Ces derniers agissent via la transduction de signaux à travers des récepteurs qui stimulent ou inhibent la croissance musculaire. L'étude de la myogenèse est nécessaire pour la compréhension des mécanismes régulateurs de la régénération, l'hypertrophie et l'atrophie musculaires.

Au cours du développement musculaire, les mécanismes de reconnaissance et de fusion cellulaire sont cruciaux, et passent par la régulation de l'expression et de la glycosylation de glycoprotéines et de glycolipides à la surface des cellules. Ainsi, toute la carte moléculaire des glycannes de surface des myoblastes sera modifiée pour favoriser le rapprochement et le contact cellulaire (Janot *et al.*, 2009).

La majorité des facteurs myogéniques, leurs partenaires, les récepteurs impliqués, ou encore les protéines qui interviennent dans divers mécanismes fonctionnels et énergétiques du muscle squelettique, sont glycosylés. Néanmoins, le rôle de la glycosylation dans la myogenèse constitue un sujet assez méconnu. En effet, des études réalisées *in vitro* sur les *N*-glycannes complexes ont montré qu'ils étaient capables d'influencer la sensibilité de réponse de certains facteurs à l'environnement et aux composants de la matrice extracellulaire (Lau *et al.*, 2007a).

Le nombre et le degré d'antennage des *N*-glycannes assurent un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Lau *et al.*, 2007a). Parmi les molécules étudiées se trouvent les récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, IGFR, FGFR, PDGFR), impliqués dans l'activation des cellules satellites. Ces molécules portent de nombreux *N*-glycannes qui leur confèrent une plus grande sensibilité et une réponse amplifiée (Lau *et al.*, 2007a).

D'autre part, en 2004, l'équipe de Cieniewski a mis en évidence que les protéines contractiles ainsi que les protéines qui interviennent dans le métabolisme énergétique portent pour la plupart une *N*-acétylglucosamine *O*-liée (*O*-GlcNAc)(Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004). La même équipe a conclu en 2006 que le changement du profil de glycosylation au niveau du motif *O*-GlcNAc est associé à une atrophie musculaire (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2006). Ce type de glycosylation régule les protéines concernées grâce à un phénomène actif d'alternance entre glycosylation et phosphorylation sur les mêmes sites (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2006).

Le facteur de transcription Mef2D semble être régulé par *O*-GlcNAc puisqu'une diminution de cette glycosylation est nécessaire au recrutement du facteur Mef2D sur le promoteur du gène codant la myogénine, activant ainsi sa transcription (Ogawa *et al.*, 2013).

En 1997, l'équipe d'Endo a décrit pour la première fois chez les mammifères, la *O*-mannosylation de l'α-dystroglycanne (α-DG) dans des cellules de Schwann bovines. L'α-DG est un récepteur membranaire complexe très important pour la liaison de la cellule musculaire à la matrice extracellulaire (Chiba *et al.*, 1997). Les auteurs rapportent que le mannose lié à l'α-DG est essentiel pour la liaison de l'α-dystroglycanne à la laminine.

L'équipe de Josef Voglmeit a effectué des tests de génotypage des gènes codant pour des glycosyltransférases sur des patients atteints de dystrophie musculaire congénitale *(Voglmeir et al.*, 2011). Ces tests ont révélé six mutations, qui induisent une hypo-glycosylation du récepteur α-dystroglycanne, aboutissant à une perte de fonction totale ou partielle, selon le glycanne impliqué. La forme hypo-glycosylée du récepteur ne présente plus les mêmes caractéristiques de liaison vis-à-vis de ses ligands, ce qui déstabilise les interactions entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Moore and Hewitt, 2009; Voglmeir *et al.*, 2011). En effet, l'α-dystroglycanne joue un rôle important dans le complexe glycoprotéine/dystrophine du muscle squelettique car il assure la liaison entre la dystrophine et la matrice extracellulaire. l'α-dystroglycanne, du fait de ces glycosylations nombreuses et diversifiées, est sensible aux changements les plus mineurs de l'activité d'une glycosyltransférase (Ervasti and Campbell, 1993). Une déficience dans au moins l'une des sous-unités du complexe dystroglycanne entraine une forme plus au moins grave de dystrophie musculaire (Blake *et al.*, 2002).

D'autres études effectuées sur la drosophile ont établi le lien entre le dystroglycanne et les *O*-mannosyltransférases-1 et -2 dans le développement et le maintien de l'intégrité du muscle au cours de la myogenèse (Blake *et al.*, 2002). Une partie plus importante est consacrée à ce sujet ultérieurement.

En parallèle, des études menées sur des souris déficientes pour une *N*-acétyl-glucosaminyl-transférase (GlcNAc transférase) ont révélé de sévères anomalies au cours de l'embryogénèse

au niveau de la jonction neuromusculaire, qui conduisent à un développement aberrant du système nerveux central et une dystrophie musculaire congénitale progressive (Herbst *et al.*, 2009).

Les études *in vivo* ou *in vitro* portant sur l'impact de la glycosylation sur la myogenèse sont généralement conduites via la modification de l'expression des gènes liés à la glycosylation. Par exemple, la sur-expression d'une galactosyl-transférase au sein d'embryons de souris, abouti à une atrophie musculaire due à une sur-expression de la myostatine (Feldman *et al.*, 2006). Cette sur-expression résulte de la diminution de la durée de vie de la follistatine (un inhibiteur de la myostatine) induite par le changement de son environnement glycannique.

Au niveau cellulaire, les glycoprotéines ne sont pas les seuls glycoconjugués à jouer un rôle primordial dans la fusion myoblastique ; les glycolipides sont aussi d'une importance capitale. Il y a une vingtaine d'années, l'émergence d'études montrant l'association entre les glycosphingolipides et les phénomènes de reconnaissance et de signalisation cellulaire, a attiré l'attention de la communauté scientifique. Les premières études ont ainsi montré l'implication des gangliosides GM_1 et GM_3 dans la transduction du signal et la phosphorylation des tyrosines de certains récepteurs de facteurs de croissance (Zhou *et al.*, 1994). Par exemple, le GM_1 agit comme un inhibiteur du récepteur à l'EGF (EGFR) alors que le GM_3 est décrit comme activateur du neural-EGFR (Zhou *et al.*, 1994; Mutoh *et al.*, 1995).

Outre les gangliosides, les sphingolipides sont également importants pour le processus de myogenèse. Ces lipides sont impliqués dans la formation des rafts lipidiques, ces structures membranaires très riches en cholestérol et sphingolipides et qui contiennent également de nombreuses glycoprotéines dont certaines sont impliquées dans l'adhésion cellulaire. Parmis celle-ci nous retrouvons les M-cadhérines qui sont fortement rencontreés au niveau des rafts des cellules musculaires murines (Mukai and Hashimoto, 2013). Dans la myogénese, il a été montré que l'association de ces glycoprotéines de la famille des cadhérines avec leurs partenaires nécessite leur présence au niveau des rafts lipidiques (Taulet *et al.*, 2009).

Les rafts lipidiques sont aussi requis dans la séquestration de certains facteurs. Ainsi FGF2 est piégé par le glypicane (un protéoglycanne héparane sulfate), ce qui permet de lever l'inhibition sur la différenciation des myocytes (Gutiérrez and Brandan, 2010).

En plus de l'implication directe des glycolipides dans le processus de différenciation myogénique, les modifications chimiques que ces glycolipides subissent le sont aussi.

Ainsi, la sulfatation peut apporter des charges négatives aux glycolipides, ce qui influence leur structure et leurs interactions (Rath *et al.*, 2004). La sulfatation est assurée par des

sulfotransférases dont on connaît une quinzaine aujourd'hui (CHST1-CHST15) (Rath *et al.*, 2004). Chez le poisson zèbre, le *KO* du gène *Chst11* (ou *C4ST-1*; chondroïtine 4-*O*-sulfotransférases-1), qui catalyse la sulfatation des résidus GlcNAc portés par les chondroïtines, perturbe l'expression de MyoD-1 et cause une réduction du nombre de somites. De même, l'inactivation du gène codant HS6ST (héparane sulfate 6-*O*-sulfotransférase), également chez le poisson zèbre, change le profil d'expression de MyoD1 et conduit à la formation de fibres musculaires destructurées (Bink *et al.*, 2003).

1. La voie de Notch

Le récepteur Notch, un des acteurs primordiaux du développement, est un élément clé au cours de la myogenèse (Stanley and Okajima, 2010). C'est un élément essentiel de l'horloge moléculaire qui règle la formation des somites et qui contrôle ainsi, à son origine, le muscle squelettique. Le récepteur Notch est aussi nécessaire au maintien dans un état indifférencié des cellules progénitrices du muscle car une différenciation précoce et intensive de certains précurseurs myogéniques entraine une déficience en myoblastes, et donc un faible développement du muscle squelettique.

Notch est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui porte plusieurs motifs glycosylés sur son domaine extracellulaire NECD « Notch extracellular domain ». La nature de ces motifs de glycosylation (*O*-fucosylation) a un effet majeur sur l'activité du récepteur et en particulier sur ses interactions avec les ligands (Stanley, 2007).

La partie intracellulaire de ce récepteur (NICD) « Notch intracellular domain » constitue l'unité fonctionnelle (il s'agit d'un facteur de transcription). Ces deux parties extra- et intra-cellulaires sont hétéro-dimérisées grâce à une liaison non covalente calcium dépendante (Gordon *et al.*, 2007).

La partie extracellulaire du récepteur Notch contient 36 répétitions du motif EGF-Like. Ce sont les mêmes motifs qui sont ciblés par la *O*-glycosylation comme vu précédemment. Chaque motif EGF-like est composé d'une trentaine d'acides aminés dont 6 cystéines très caractéristiques (Sparrow *et al.*, 2006) ***(Figure26 et 27)***.

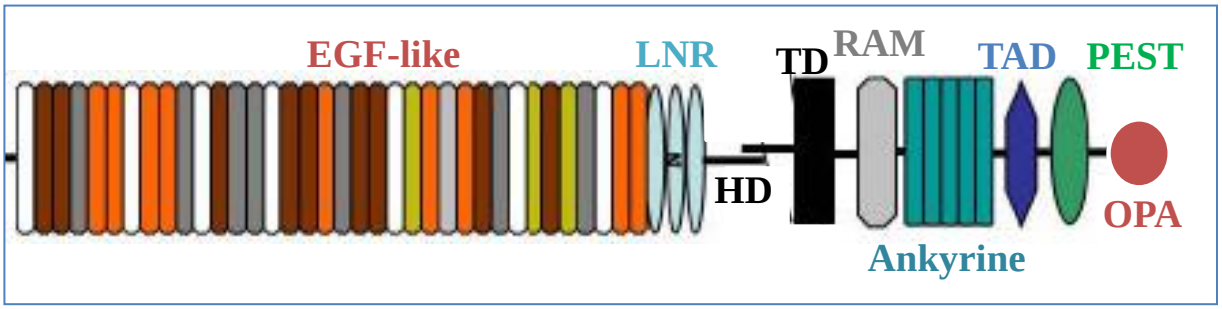


Figure 26 : Représentation schématique de la protéine Notch 1.

La partie extracellulaire est constituée essentiellement des motifs EGF-like (36 au total, les codes couleurs représentant les différentes combinaisons des sites de glycosylation, suivis par la région LNR qui est riche en cystéines. Au milieu, nous retrouvons le domaine d'hétérodimérisation (HD) où les deux parties extra- et intra-cellulaires sont liées de façon non covalente.
Le NICD représente toute la partie intra-cellulaire. On retrouve la région RAM suivie par des répétitions ankyrines (nécessaires aux interactions du récepteur), les domaines TAD et PEST sont impliqués dans le renouvellement du récepteur Notch, et enfin la séquence OPA est capable d'amplifier l'activité transcriptionnelle de Notch (Stanley, 2007).

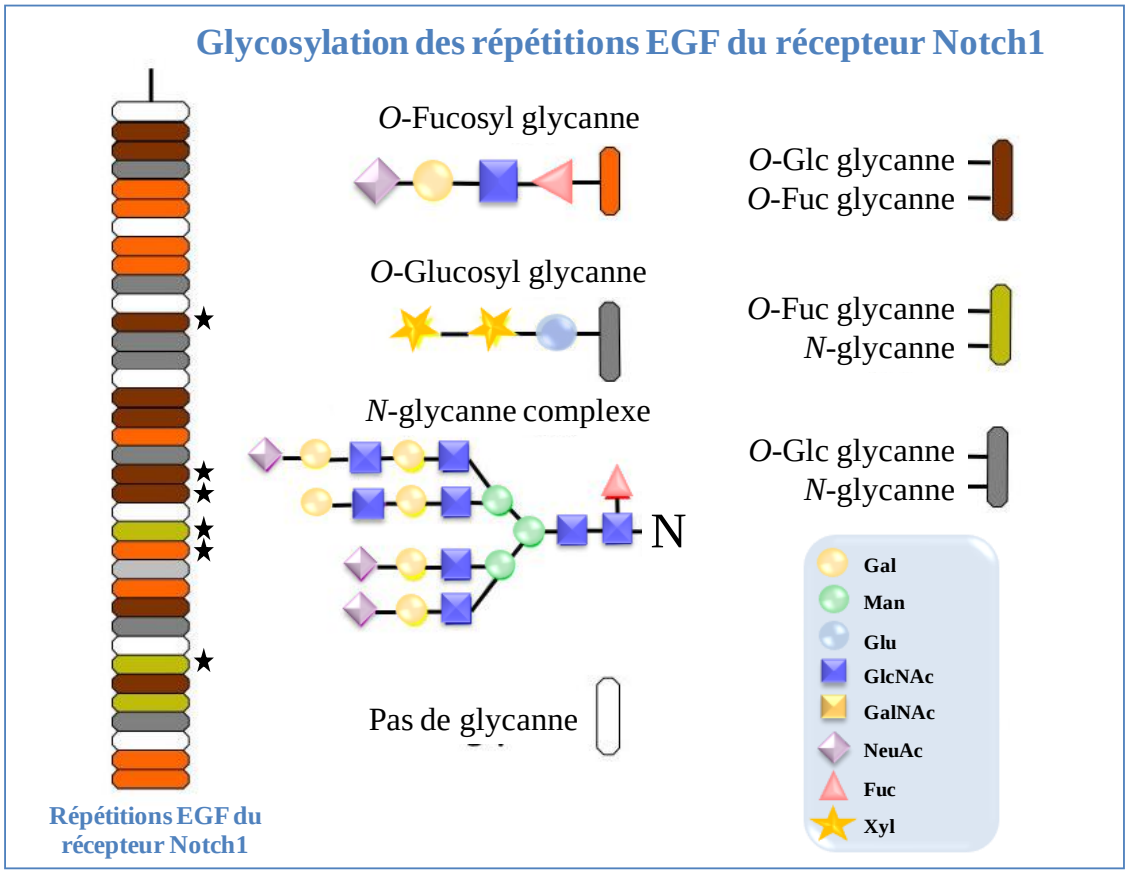


Figure 27 : Les glycannes portés par Notch1 chez la souris.

Les domaines EGF-like du récepteur Notch1 peuvent comporter des sites consensus de *O*-fucosylation et/ou de *O*-glucosylation. Des *N*-glycannes sont aussi présents sur certains sites consensus de *N*-glycosylation, les domaines EGF-like marqués par une étoile ont déjà été observés comme porteurs d'un *O*-fucosyl-glycanne (Haltiwanger and Lowe, 2004; Stanley, 2007).

L'interaction de Notch avec un de ses ligands a pour conséquence un changement de sa conformation, ce qui induit le clivage du site S2, qui jusque-là n'était pas accessible au clivage. Ceci libère la partie intracellulaire du récepteur (NICD), qui active la voie de signalisation en aval (Gordon *et al.*, 2007). Ces interactions peuvent se produire en *cis*, lorsque le ligand et le récepteur sont portés par la même cellule, ou en *trans*, lorsqu'ils sont portés par des cellules voisines (Glittenberg *et al.*, 2006) ***(Figure28)***.

Les ligands du récepteur Notch sont aussi des protéines transmembranaires qui sont caractérisées par la présence d'un domaine DSL (Delta, Serrate, Lag-2) de 45 acides aminés, (Muskavitch, 1994). Ce domaine porte aussi un nombre variable de répétitions EGF-like (Bettenhausen *et al.*, 1995; Lindsell *et al.*, 1995). Certains motifs EGF-like portent des *O*-glycannes, mais l'influence de cette glycosylation n'est pas encore clairement établie (Panin *et al.*, 2002). Les ligands Delta et Serrate ont d'abord été décrits chez la drosophile, leurs orthologues chez les mammifères sont Delta-like (Dll) et Jagged (Bray, 2006). Pour l'instant, trois Delta-like (Dll1, 3 et 4) et deux Jagged (Jagged1 et 2) ont été décrits. Tous, mis à part le Dll3, sont capables d'interagir avec le récepteur Notch et transduire un signal (Fiúza and Arias, 2007). Delta-like3 semble avoir un rôle modulateur, en rentrant en compétition avec les autres ligands (Ladi *et al.*, 2005).

Il est aujourd'hui établi que la protéine Lfng (lunatic fringe), une glycosyltransférase de la famille des Fringe, module l'expression de Notch (Yang *et al.*, 2005). Cette protéine est impliquée dans la prolongation du motif fucose de certains domaines EGF-like portés, notamment, par Notch1 (Brückner *et al.*, 2000; Moloney *et al.*, 2000b) et Notch2 (Shimizu *et al.*, 2001). L'activité de Fringe est capable de moduler la réponse de Notch en potentialisant la signalisation induite par Delta et en inhibant celle induite par Serrate/Jagged (Panin *et al.*, 1997).

D'autres études ont clairement élucidé le rôle de Notch dans le maintien des progéniteurs cellulaires des muscles dans un stade indifférencié. En effet, pour passer outre la létalité due aux mutations touchant les composants de la voie de signalisation de Notch, un allèle Delta1 (Dll1) hypomorphe a été analysé chez la souris (Schuster-Gossler *et al.*, 2007).

Les souris portant cet allèle présentent une différenciation intense et incontrôlée des progéniteurs myogéniques, conduisant à l'augmentation des myocytes différenciés (MyoD+, Myog+) au détriment des progéniteurs (Pax3+). Cette différenciation prématurée entraine une absence des progéniteurs cellulaires à l'origine des cellules satellites (Biressi *et al.*, 2007).

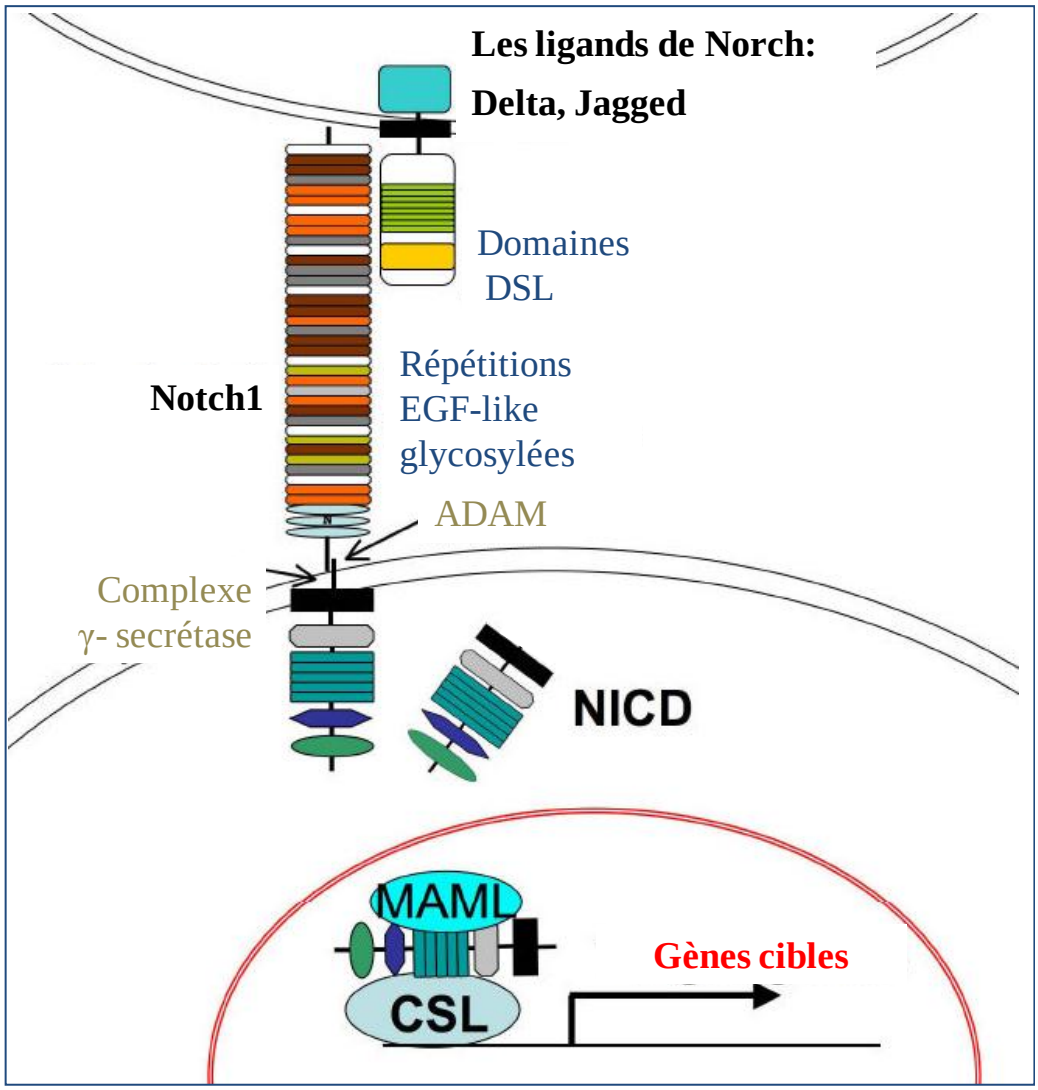


Figure 28 : Les voies canoniques de transduction du signal Notch1.

Le récepteurs Notch est clivé par la furine dans le compartiment de Golgi pour former des hétéro-dimères qui vont rejoindre la membrane plasmique. Les répétitions de type EGF de Notch1 sont colorées selon qu'ils portent un *O*-fucose, un *O*-glucose et/ou un *N*-glycanne complexe, comme décrit dans la figure *29*.
Les ligands de Notch portent également des répétitions EGF mais à ce jour, aucun effet fonctionnel n'a été observé en l'absence du *O*-fucose. Les ligands ont besoin de leur DSL (Delta / Serrate / Lag-2 domaine) N-terminal qui se lie aux récepteurs Notch. La liaison de Notch avec son ligand est suivie par le clivage du récepteur par une protéase ADAM sur un site juxta membranaire, suivi d'un clivage par un complexe contenant la γ-sécrétase dans la région transmembranaire. Le NICD libéré est transloqué dans le noyau où il se lie au répresseur de la transcription CSL présent au niveau des régions consensus (GCTGATAG) retrouvée sur les promoteurs des gènes. Le co-activateur MAML est ainsi recruté, et les gènes cibles sont activés (Stanley, 2007).

La myogenèse post-natale ou la régénération du muscle suite à une lésion, dépendent de l'activation des cellules satellites. Ces dernières prolifèrent et les cellules satellites filles ne subissent pas toutes la détermination. En effet, il est essentiel de maintenir un pool de cellules de réserve dans un état indifférencié. Le nombre total de cellules de réserve reste relativement constant même suite à une activation. Des expériences qui miment la lésion du muscle *in vivo* réalisées chez la souris, montrent que 24h après la stimulation de la blessure, on observe une augmentation de *Dll1* accompagnée de l'activation de la voie de Notch. Dans un premier temps, la signalisation Notch permet la prolifération et l'extension des cellules activées. Néanmoins, dans un second temps, une inhibition de la voie de Notch est nécessaire pour que les cellules puissent entamer la différenciation. Ceci est assuré par Numb, un inhibiteur de Notch (Conboy and Rando, 2002). Une des hypothèses qui explique le renouvellement de la sous-population des cellules satellites est le modèle de division asymétrique (Conboy and Rando, 2002) dans lequel la protéine Numb est répartie de façon inégale entre les cellules filles. La cellule qui hérite de l'inhibiteur de Notch active son processus de différenciation tandis que celle ou la protéine Numb est absente prolifère. Cette inhibition de Notch s'accompagne d'une activation de la voie de signalisation Wnts qui conduit à la transition de l'état prolifératif vers la phase de différentiation.

Vu l'implication du récepteur Notch dans la myogenèse, des modifications post-traductionnelles de Notch, par exemple par la glycosylation, sont susceptibles de moduler la différenciation myogénique. Chez la drosophile, des expériences d'agrégation de cellules S2 *in vitro* ont clairement montré que les domaines EGF-like 11 et 12 sont impliqués dans la liaison de Notch avec ses ligands (Fehon *et al.*, 1991; Rebay *et al.*, 1991). Des souris ayant les domaines EGF-like 8 à 12 du récepteur Notch1 mutés, présentent un phénotype similaire à celui du *KO* pour Notch1. Les embryons de souris portant la mutation présentent de graves anomalies de de fermeture du tube neural et de formation des somites ce qui induit une mort embryonnaire précoce (Ge *et al.*, 2008). De plus, les mutations Abruptex (Ax) chez la drosophile ont mis en exergue l'importance d'un autre domaine EGF-like compris entre les EGF-like 24 et 29 (de Celis and Bray, 2000). Ce sont des mutations faux-sens qui se traduisent par une hyper-activation du récepteur Notch et donc un phénotype totalement contraire à ce qu'on peut observer lors d'une baisse de l'activité du récepteur Notch (Xu *et al.*, 2005).

La majorité des études effectuées sur la glycosylation du récepteur Notch ont été réalisées sur la protéine Notch1 *in vitro*. Beaucoup de travaux se sont focalisés sur la O-fucosylation. Les motifs EGF-like du récepteur Notch1 portent plusieurs types de glycannes, tels que des O-fucosylglycannes, des O-glucosylglycannes, des O-GlcNAc, et des N-glycannes complexes

(Figure 27) (Stanley, 2007). L'analyse de mutations a aussi aidé à l'étude de la glycosylation du récepteur Notch, par exemple, la mutation Split (spl) qui a été identifiée sur l'EGF-like 1, il s'agit d'une substitution I578T qui induit l'apparition d'un site de O-fucosylation, la glycosylation de ce site entrainant l'augmentation de l'activité du récepteur (Li *et al.*, 2003) Une autre mutation, la mutation 12f, a été décrite dans le domaine 12, le plus conservé (Xu *et al.*, 2005). Chez la drosophile cette mutation induit l'élimination d'un site de *O*-fucosylation, ce qui entraine une hyperactivité du récepteur Notch. Le *O*-fucose à cette position semble être impliqué dans la modulation négative de l'activité du récepteur Notch, probablement en réduisant l'interaction entre Notch et ses ligands (Lei *et al.*, 2003). Chez les mammifères, cette mutation entraine l'effet contraire: une inhibition de la voie de Notch en réponse à ses ligands. Ces observations ont été effectuées grâce à la création d'un mutant de souris dont la séquence consensus de la *O*-fucosylation au niveau de l'EGF-like 12 du récepteur Notch 1, a été modifiée. Les souris homozygotes pour la mutation sont viables mais présentent de nombreux défauts liés à la baisse de la signalisation de Notch, induite par une liaison amoindrie de Notch1 à ses ligands Jagged1 et Delta1. On observe chez les souris mutantes un retard de croissance et des problèmes liés à l'immunité dépendante des lymphocytes T. D'autres études *in vitro* portant aussi sur la *O*-fucosylation du récepteur Notch, ont aussi montré que l'absence du O-fucosyl-glycanne porté sur les EGF-like 23 et 32 entraine une baisse de l'interaction entre le récepteur Notch et ses ligand (Xu *et al.*, 2005). De même, des études *in vitro* réalisées sur Notch1 dans les cellules CHO, ont montré que l'absence du *O*-fucosyl-glycanne sur l'EGF-like 26 induit l'augmentation de la signalisation dépendante de la liaison de Notch à ses ligands (Delta et Jagged). La même étude s'est aussi intéressée à l'impact de la *O*-fucosylation du EGF-like 27. Le résultat montre qu'à l'inverse du *O*-fucose porté par l'EGF 26, la perte de la *O*-fucosylation sur l'EGF 27 entraine une baisse de l'activité de Notch 1 en réponse à ses ligands (Rampal *et al.*, 2005).

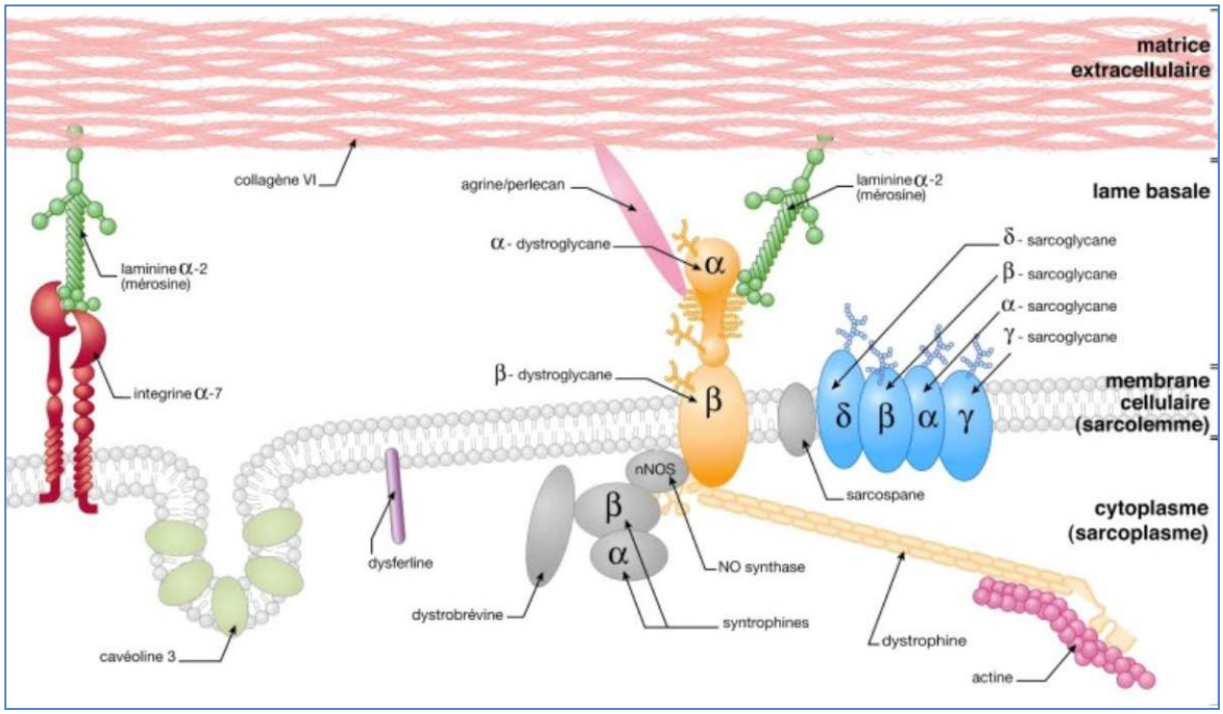


Figure 29 : Représentation schématique du complexe glycoprotéine/dystrophine (DGC).
Le dystroglycanne est constitué de deux sous unités (α-) et (β-) : L'α-dystroglycanne est une glycoprotéine fortement glycosylée, reliée à la matrice extracellulaire par la laminine 2 (vert).
Le β-dystroglycanne est relié aux microfilaments d'actine grâce notamment à la dystrophine (stalnaker et al 2011).
Origine de l'image : site officiel de l'AFM « Dystroglycanopathies»

2. Le dystroglycanne et les dystroglycanopathies

Les dystroglycannes forment un noyau essentiel du DGC (Dystrophine Glycoprotein Complex), car ils relient les composants cytosquelettiques du DGC à la matrice extracellulaire (Henry and Campbell, 1999). Un déficit dans la plupart des protéines du complexe DGC entraine une forme plus au moins grave de dystrophie musculaire (Blake *et al.*, 2002). Le dystroglycanne est codé par un seul gène, cette protéine est ensuite clivée post traductionnellement en deux sous unités α- et β-dystroglycanne. Le β-dystroglycanne (β-DG) est la protéine transmembranaire du complexe DGC, avec une extrémité carboxy-terminale qui interagit avec le domaine riche en cystéine de la dystrophine, elle-même reliée au filament d'actine. L'α-dystroglycanne (α-DG) constitue un lien important avec la matrice extracellulaire à travers ses interactions avec la chaine α2 de la laminine 2 (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992) ***(Figure29)***. L'α-DG porte de nombreux sites de *N*- et de *O*-glycosylation occupés pour la plupart par des *O*-glycannes de type mucines et par des *O*-mannosylglycannes. La glycosylation de α-DG est très importante et elle peut augmenter la taille de la protéine de façon considérable. Par exemple, la taille prédite de la sous unité α de α-DG est de 72 kDa, alors que la version glycosylée est de 165kDa dans le muscle squelettique (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992; Leschziner *et al.*, 2000) et de 120 kDa dans le cerveau (Leschziner *et al.*, 2000).

De nombreuses équipes se sont intéressées à l'α-DG et à sa glycosylation complexe, du fait de son incrimination dans les dystrophies musculaires congénitales, dont la forme la plus sévère est le syndrome de Walker-Warburg (Kirschner, 2013). Les dystrophies musculaires congénitales (DMC) représentent des formes particulières de myopathies dans lesquelles l'examen du muscle au microscope montre une dégénérescence de la cellule musculaire accompagnée par la présence de cellules en régénération pour contre balancer la perte cellulaire due à la dégénérescence (Kirschner, 2013). Au dernier rapport de l'AFM (Association française contre les myopathies) sur les dystroglycannopathies publié en 2008, le répertoire des gènes connus comme étant impliqués dans ces maladies a été établi et 3 groupes de dystrophies ressortent :

- Le premier groupe comprend les dystrophies causées par des mutations qui touchent les gènes codant des protéines liées à la matrice extracellulaire comme la mérosine, la chaine du collagène VI ou encore l'intégrine α-7.

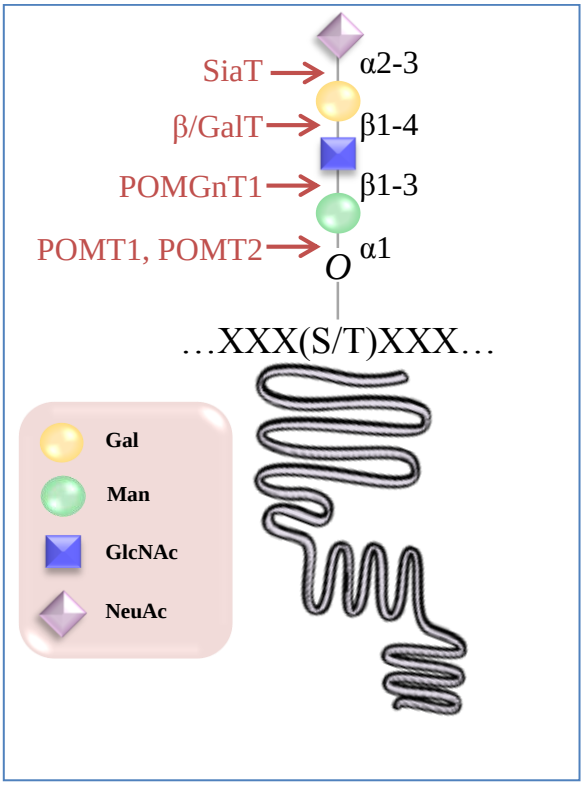


Figure 30 : Représentation schématique du *O*-mannosylglycanne.

Caractéristique, retrouvé au niveau de la sous-unité α-dystroglycanne. POMT1 et POMT2 sont des mannosyltransférases qui catalysent l'ajout du mannose sur une sérine ou une thréonine. Aucune séquence consensus n'a été établie pour cette glycosylation. POMGnT1 catalyse l'addition d'une N-acétylglucosamine sur le mannose.
La transférase qui catalyse l'ajout du galactose n'est pas encore déterminée, néanmoins la protéine LARGE présente des homologies de séquence avec les galactosyltransférases. Aucune preuve directe n'a été apportée quant à son implication.
L'addition de l'acide sialique est catalysée par une sialyltransférase qui n'est pas encore identifiée (Moore and Hewitt, 2009).

- Le deuxième groupe concerne les gènes impliqués dans le bon fonctionnement de l'α-DG, tels que FKRP (Fukutin related protein), fukutine, POMT1, POMT2, POMGnT1 et LARGE (Muntoni, 2004).

- Le dernier groupe qui recense une seule mutation touchant le gène SEPN codant pour une sélénoprotéine (SePN) (protéine musculaire contenant du sélénium).

Le deuxième groupe de dystroglycannopathies sont causées par des mutations dans les gènes responsables de l'élaboration du *O*-mannosylglycanne ***(Figure 29)***. Malgré la richesse de la glycosylation de l'α-DG, c'est le mannosylglycanne de type « NeuAcα(2,3)Galβ(1,4)GlcNAcβ(1,2)Manα1-*O*-Ser/Thr » ***(Figure 30)*** qui a attiré l'attention de la communauté scientifique. Ce *O*-mannosylglycanne a été identifié par spectrométrie de masse depuis plusieurs années (Chiba *et al.*, 1997), mais c'est l'incrimination de POMT1, POMT2 et POMGnT1 dans les dystroglycannopathies qui a mis la lumière sur l'implication de ce glyco-conjugué (Moore and Hewitt, 2009). Les enzymes POMT1 et POMT2 sont responsables de l'ajout du *O*-mannose (Patnaik and Stanley, 2005), les enzymes responsables de l'ajout du galactose et de l'acide sialique ne sont toujours pas identifiées bien que l'enzyme LARGE semble être un sérieux candidat en tant que galactosyltransférase (Wallace *et al.*, 2014).

Les fonctions des gènes fukutines et FKRP ne sont pas encore connues à l'heure actuelle, mais des mutations touchant ces gènes induisent chez les patients le syndrome de Walker-Warburg (Puckett *et al.*, 2009; Kirschner, 2013).

D'autres gènes, dont le rôle n'est pas connu, sont susceptibles de participer à la glycosylation de l'α-DG, car des mutations touchant ces gènes ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de Walker-warburg, par exemple les gènes *GTDC2* (Glycosyltransferase-like Domaine Containing 2) (Kirschner, 2013) et le gène *ISPD* (Isoprenoid Synthase Domaine Containing) (Willer *et al.*, 2012; Kirschner, 2013). Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'apparition des dystrophies est associé à l'hypo-glycosylation de l'α-DG. La forme hypo-glycosylée présente des pertes ou des perturbations de liaison entre l'α-DG et ses partenaires notamment de laminine. Cette interaction est essentielle pour assurer la jonction entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, ce qui conduit à une perte de l'intégrité du tissu. L'α-DG constitue un exemple fort qui met en avant l'importance de la glycosylation dans l'intégrité du muscle squelettique.

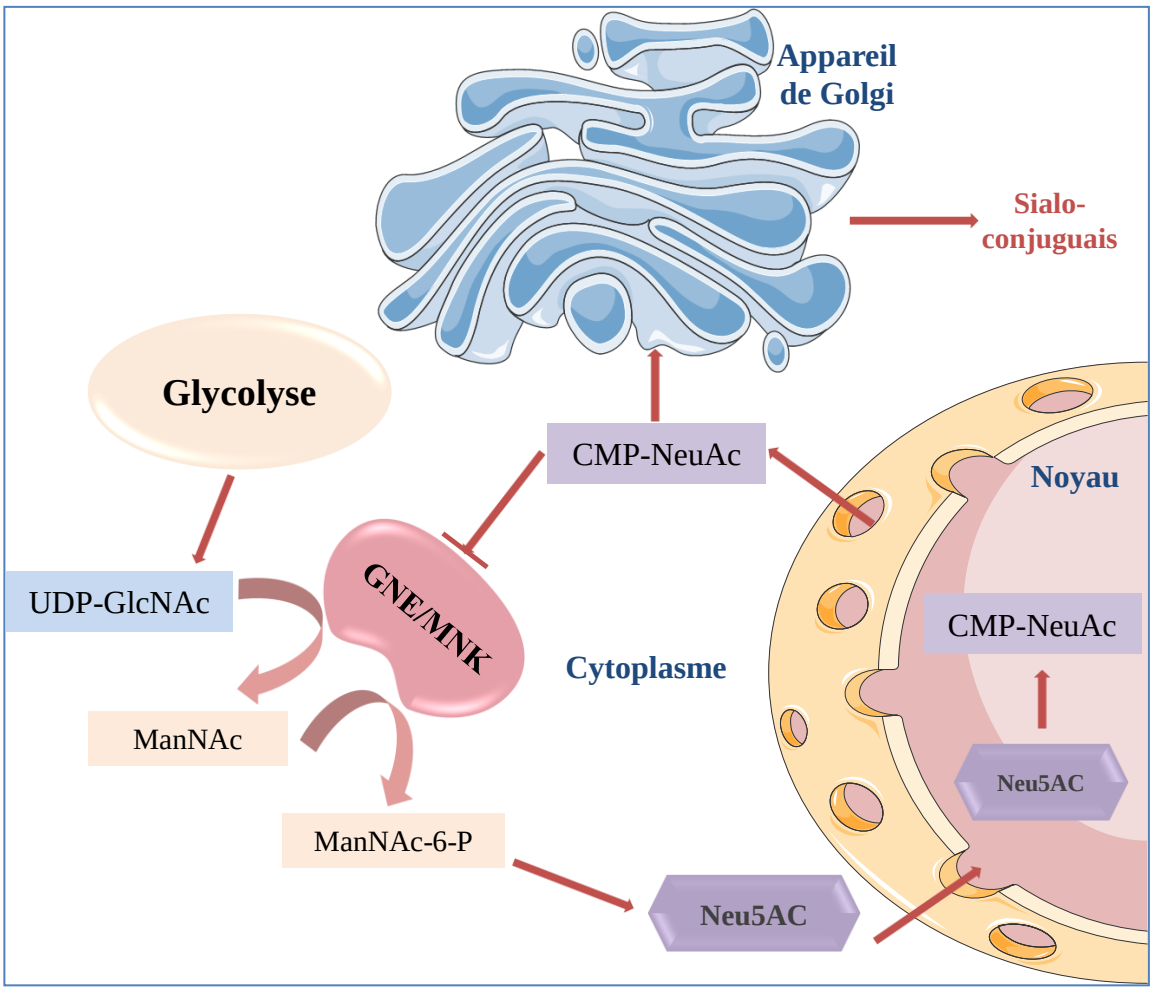


Figure 31 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du CMP-NeuAc.

La GNA/MNK intervient comme une épimérase pour convertir l'UDP-GlcNAc en Man NAc, ensuite comme une kinase pour phosphoryler le ManNAc en 6. La GNE/MNK subit une boucle de rétrocontrôle négative par le CMP-NeuAc.

La sialylation et la myogenèse

La première implication concrète de la sialylation dans la myogenèse est apparue avec la description de la myopathie héréditaire des corps d'inclusion en 1984 (HIBM2 : Hereditary Inclusion Body Myopathy). Cette maladie est un désordre neuromusculaire exprimé à l'âge adulte. Elle est caractérisée par une faiblesse musculaire progressive, lente, distale et proximale et une pathologie musculaire typique présentant des vacuoles cytoplasmiques caractéristiques. De point de vue histologique, les fibres musculaires sont atrophiées et présentent des inclusions cytosoliques ou nucléaires composées de filaments tubulaires. Même dans les cas les plus avancés, aucune atteinte du muscle quadriceps n'a été rapportée (Argov and Yarom, 1984).

D'un point de vue moléculaire, une hypo-sialylation globale de la cellule musculaire est observée (Hinderlich *et al.*, 2004). Une seule mutation faux-sens à l'état homozygote du gène codant la UDP-N-acétylglucosamine 2- épimérase/N-acétylmannosamine kinase (GNE/MNK) (Substitution M712T) a été isolée dans les populations juive, perse et du moyen orient (Darvish *et al.*, 2002). Depuis, de nouvelles mutations (D176V (Exon 3) et V572L (Exon 9)) ont été isolées dans le même gène chez des patients japonais (Hinderlich *et al.*, 2004). Cette enzyme (GNE/MNK) à double fonction épimérase/kinase catalyse les deux premières réactions de synthèse de l'acide sialique ***(Figure31)***. Néanmoins, la mutation de cette enzyme ne semble pas expliquer à elle seule l'hypo-sialylation globale de la cellule musculaire. Il existe probablement d'autres mécanismes enzymatiques qui pourraient être impliqués (Hinderlich *et al.*, 2004).

Concernant la myopathie, les auteurs décrivent une dégénérescence progressive de la myofibre avec une incapacité de régénérescence musculaire accompagnée par une perte progressive de l'intégrité et de la fonction musculaire. Les premières hypothèses pour expliquer ce phénotype ont porté sur l'importance de l'acide sialique présent sur les glycoconjugués de surface et leur importance dans l'adhésion cellulaire et la transduction du signal.

De plus, une baisse de l'activité de l'UDP-GlcNAc2-epimérase, mimée grâce à un blocage chimique des voies de synthèse de l'acide sialique, montre une augmentation accrue de la perméabilité au calcium. Par contre, aucune perturbation de la perméabilité au potassium n'a été observée (Bennett *et al.*, 1997a; Bennett, 2002; Hinderlich *et al.*, 2004). Les auteurs ont avancé une hypothèse selon laquelle les acides sialiques, via leurs charges négatives, contribuent au

captage des cations à la surface cellulaire. Pour rappel le Ca^{++} est primordial dans le bon déroulement de la contraction. Un équilibre entre le Ca^{++} libre, vacuolaire et extracellulaire est strictement contrôlé par la cellule musculaire. De ce fait, l'intégrité du glycocalyx apparait nécessaire pour prévenir l'entrée incontrôlée du Ca^{++} à l'intérieur de la cellule (Bennett *et al.*, 1997b).

En effet, la plupart des protéines transmembranaires constitutives des canaux à *sodium voltage dépendant* sont glycosylées. Les glycannes qui sont à 40% - 45% des acides sialiques, représentent 40% du poids moléculaire de ces canaux. Il a été démontré que quand cette protéine est déglycosylée, l'activité du canal est modifiée. Le canal est actif suite à une dépolarisation de la membrane, dans le cas où il est hypo-glycosylé, il perd de sa réactivité, pour assurer la dépolarisation de la membrane de la cellule musculaire (Bennett, 2002).

Il a aussi été clairement démontré que la perturbation de la sialylation du canal sodium voltage dépendant, due à la perte de l'activité du gène *GNE* chez les patients HIBM2, induit le maintien des cellules dans un état de dépolarisation permanente (Johnson *et al.*, 2004; Recio-Pinto *et al.*, 1990). Cet état est délétère pour garder un niveau optimal de sodium à l'extérieur de la cellule et conduit à une perturbation de la propagation du potentiel d'action transmis par le nerf, et par conséquent la contraction du muscle (Abriel *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1995). Ces résultats corroborent bien un autre travail où les auteurs ont observé une dépolarisation de la membrane après traitement à la neuraminidase pour libérer les acides sialiques sur des cellules musculaires. Le traitement induit une perte de la contraction suite à une stimulation (Bennett *et al.*, 1997b).

En plus des aspects fonctionnels du muscle, des altérations de la sialylation peuvent induire une dégénérescence résultant de la perte de l'intégrité du muscle suite à l'atteinte des molécules d'adhésion, comme la molécule NCAM (Neural Cell Adhésion Molécule), qui est connue pour avoir un rôle primordial dans le développement, notamment du système nerveux (Ricci *et al.*, 2006). La molécule NCAM est une protéine polysialylée qui chez des patients HIBM2 s'avère être hypo-sialylée (Ricci *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2003a). La NCAM musculaire porte un site spécifique MSD pour « Muscle Specific Domain » qui contient un site de *O*-glycosylation de type mucine. En utilisant la lignée myoblastique C2C12, les auteurs ont monté que les NCAM contenant le domaine MSD sont fortement exprimés durant la fusion myoblastique et dans les myotubes. La transformation de cellules C2C12, avec un gène *NCAM* sauvage ou muté au niveau de ce domaine, montre que les NCAM contenants le domaine MSD facilitent la fusion myoblastique et que la mutation qui touche le site de *O*-glycosylation de type mucine diminue la fusion myoblastique (Suzuki *et al.*, 2003a).

A l'opposé, augmenter le niveau de la poly-sialylation dans les étapes précoces de la différenciation myoblastique, réduit la formation de myotubes alors que l'inhibition de la poly-sialylation induit la différenciation des cellules C2C12 (Suzuki *et al.*, 2003a).

Ceci corrobore tout à fait nos résultats (Chapitre résultats), ou la baisse de la sialylation périphérique due au knockdown d'une sialyltransférase induit la fusion myoblastique sur le même modèle de cellules C2C12. Ces travaux vont dans le même sens que les travaux de Fanzani, sur l'implication des sialidases dans la fusion myoblastique (Fanzani *et al.*, 2003).

En 2003, leurs travaux réalisés sur des C2C12 ont montré que la neuraminidase cytosolique Neu2 est fortement surexprimée pendant les étapes de fusion myoblastique (Fanzani *et al.*, 2003, 2012). Par la suite, il a été montré qu'une surexpression de *Neu2* dans les cellules C2C12 baisse la capacité proliférative des cellules, celle-ci ayant tendance à rentrer spontanément en différenciation même dans des conditions de culture favorisant la prolifération. Cette observation est accompagnée par une formation de myotubes précoces positifs à la myogénine, ainsi que la baisse du niveau de la protéine cycline D1, mise en jeu dans la prolifération cellulaire (Fanzani *et al.*, 2003). Les mêmes résultats ont été obtenus sur la lignée myoblastique L6 du rat (Sato and Miyagi, 1996). La même équipe a publiée en 2008 une analyse comparative de l'expression et de l'activité enzymatique de Neu2 en cas d'hypertrophie et d'atrophie de la fibre musculaire. Dans le cas de l'hypertrophie musculaire, le gène de la neuraminidase est surexprimé, ainsi que l'activité enzymatique Neu2. Cette régulation de l'expression passe par la signalisation PI3K/AKT dans les C2C12 (Fanzani *et al.*, 2006, 2008). Au contraire, une atrophie des myofibres obtenue par un traitement à la descamethasone (une hormone glucocorticoïde, connue pour favoriser la synthèse protéique, en diminuant le taux de lipides, utilisée comme dopant par les sportifs) est accompagnée par une perte de l'activité de Neu2 avec une baisse du niveau des transcrits (Fanzani *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que dans les cellules C2C12, la neuraminidase Neu2 était dégradée par autophagie lors d'une atrophie (Fanzani *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2009).

Dans une étude réalisée sur Neu1, une neuraminidase lysosomale, il a été montré que celle-ci est directement régulée pas MyoD, grâce à la présence de nombreuses E-box au niveau de son promoteur. Les auteurs concluent que Neu1 est positivement régulée par MyoD et réprimée par MEK, mais à des périodes bien déterminées lors de la fusion musculaire (24h de différenciation) (Champigny *et al.*, 2005).

Les souris *KO Neu1* ont été créées et d'une façon surprenante l'action la plus importante de la neuraminidase 1 réside dans son rôle de régulateur négatif de l'exocytose lysosomale calcium dépendante (Yogalingam *et al.*, 2008). Il a été montré dans le muscle squelettique des souris

Neu1$^{-/-}$ que l'exocytose du contenu lysosomal, riche en cathepsines et en métalloprotéinase, facilite la prolifération et l'infiltration des fibroblastes entourant la fibre musculaire, ce qui induit l'inflammation et la dégradation du muscle squelettique (Zanoteli *et al.*, 2010).

La neuraminidase 3 (Neu3), a aussi été sujette à des études dans un contexte myogénique. Neu3 est une neuraminidase membranaire surtout connue pour son rôle dans la désialylation des gangliosides. En 2008, une équipe a mis en évidence le rôle de Neu3 dans la modulation du niveau de GM3 au sein de la membrane plasmique des C2C12, et l'importance de cette régulation aussi bien au cours de la différenciation des myoblastes que dans leur protection contre l'apoptose. La sous-expression de *Neu3* dans les C2C12 inhibe complètement leur capacité de fusion, et ce à cause d'une augmentation critique du niveau des GM3 au sein de la membrane. Cet effet conduit à une inhibition de la voie de signalisation qui passe par le récepteur à l'EGF. C'est pour cette raison que les C2C12 deviennent très sensibles aux signaux d'apoptose (Anastasia *et al.*, 2008). Il a également été montré que la sur-expression de *Neu3* dans les cellules C2C12 était délétère dans les premières étapes de fusion car les cellules entament le processus de différenciation plus tardivement. En revanche, elles l'achèvent plus rapidement en comparaison aux contrôles. Les myoblastes sur-exprimant *Neu3* finissent par développer des myotubes hypertrophiques, où l'analyse des voies de signalisation ERK/MAPK, a montré une augmentation de la phosphorylation d'ERK 1,2 dans ces clones. L'hypothèse avancée par les auteurs, concerne une diminution du contenu membranaire en GM3, avec une affection des voies liées au récepteur à l'EGF. En outre, Neu3 semble améliorer la fusion des myoblastes probablement par la désialylation des molécules d'adhésion NCAM (Papini *et al.*, 2012).

Projet de thèse

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'études fondamentales menées par mon équipe de recherche sur les aspects de glycosylation au cours de la différenciation musculaire. S'intéresser aux mécanismes régissant la myogenèse est important pour la compréhension des processus par lesquels la régénération, l'hypertrophie et l'atrophie musculaires se produisent en réponse à divers facteurs.

Ainsi, le développement du muscle squelettique est complexe et se caractérise par un enchainement d'événements cellulaires incluant la prolifération des cellules progénitrices suivie par une étape de différenciation très finement régulée dans le temps et dans l'espace. Parmi les diverses régulations, la glycosylation présente un intérêt de premier ordre. En effet une majorité de protéines membranaires directement impliquées dans le processus de fusion myoblastique sont glycosylées. Néanmoins les mécanismes intimes de leur implication sont encore à ce jour peu connus.

Dans notre équipe, une analyse du glycotranscriptome (transcrits des gènes codant les acteurs de la glycosylation), au cours de la différenciation de la lignée myoblastique C2C12, a été réalisée (Janot *et al.*, 2009). Ce crible a permis d'établir une liste de 95 gènes dont l'expression transcriptionnelle varie au cours de la différenciation des cellules C2C12. Parmi ces gènes, 29 (essentiellement impliqués dans la biosynthèse des glycolipides) n'ont jamais été décrits comme acteurs du processus de myogenèse. Les autres gènes seraient plutôt impliqués dans l'adhésion, les interactions cellulaires, la transduction du signal, le transport des nucléotides sucres et la biosynthèse des *O*- et *N*- glycannes (Janot *et al.*, 2009).

Cette étude témoigne d'un réel remaniement des glycoconjugués périphériques, mais ne désigne ni les glycoconjugués modifiés, ni les variations des motifs glycanniques portés par les glycoconjugués. Mes travaux de thèse se sont justement intéressés à l'étude de l'évolution des motifs glycosylés au cours de la différenciation myogénique. Pour ce faire, dans un premier temps, une analyse globale des structures glycanniques de surface durant les étapes de fusion myoblastique a été effectuée. Nous avons utilisé des lectines spécifiques pour apprécier les niveaux de sialylation en α2,3 et en α2,6 à la surface des cellules C2C12 en différenciation. Cette analyse est complétée par une quantification des transcrits des gènes de sialyltrasférases et de neuraminidases afin de corréler l'expression des gènes et l'état de sialylation des glycoconjugués. Cette première phase de ma thèse m'a permis de mettre en évidence une hyposialylation en α2,6 au cours de la différenciation myogénique des cellules C2C12. Ce résultat m'a conduit dans un second temps, à réaliser une étude fonctionnelle en

explorant les capacités de différenciation de cellules C2C12 dérégulées pour l'expression du gène *St6gal1*, principal responsable de l'α2,6 sialylation dans ces cellules. A différents stades de différenciation de ces cellules modifiées, des analyses phénotypiques et d'expression de gènes ont été conduites.

Dans la présentation de mes résultats de thèse, deux parties seront traitées :

Dans la premier partie, intitulée «Glycosylation périphérique et fusion myoblastique», je vous présente une grande partie de mes résultats de thèse, d'abord sous forme d'un article qui a été soumis à « Glycobiology». Cette partie est suivie d'un chapitre «Résultats complémentaires », où j'apporte des données additionnelles qui contribuent à la compréhension du projet.

Dans la second partie, intitulée «Glycosylation et adipogenèse», je vous présente un travail, effectué en collaboration avec un post-doctorant, qui vise à examiner de manière plus large l'expression d'un grand nombre de gènes (375 gènes) quand les cellules satellites murines sont induites dans deux voies de différenciation différentes (myogenèse *versus* adipogenèse). L'objectif de cette étude est de distinguer parmi tous les gènes analysés ceux qui sont spécifiquement sollicités par la différenciation musculaire. Ce travail est présenté sous la forme d'un projet de publication.

Une discussion générale réintègre l'ensemble des résultats et permet de dresser les principales conclusions suivies de perspectives.

Résultats

Partie 1 : Glycosylation périphérique et fusion myoblastique

Article 1- Modification of alpha 2,6 sialylation mediates the differentiation of C2C12 myoblast cell line

Amel Bouchatal[1,2], Vincent Grassot[1,2], Emilie Pinault[1,2], Fabienne Baraige[1,2], Nathalie Duprat[1,2], Yann Guerardel[3,4], Jean-Michel Petit[1,2], Abderrahman Maftah[1,2], Paul-François Gallet[1,2]

1: Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Unité de Génétique Moléculaire Animale, UGMA, F-87060 Limoges, France

2: INRA, UMR 1061, F-87060 Limoges, France

3: Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d′Ascq, France

4: CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d′Ascq, France

To whom correspondence should be addressed: Paul-François Gallet, UMR 1061 Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France, Tel.: (0033) 555-457-654; Fax: (0033) 555-457-653; E-mail: francois.gallet@unilim.fr

Abstract

The structural variety of glycans provides them a wide range of biological properties ranging from protein folding to a large number of recognition events. According to the "glyco-code" concept, cell surface glycans and particularly terminal fucose and/or sialic acids act as biochemical signals specifically recognized by a large number of glycan-binding proteins (GBP).

Herein, we investigated the role of α2,6-linked sialic acids on C2C12 mouse myoblast cell line differentiation. We demonstrate that the differentiation of C2C12 cells is associated to a decrease of α2,6-linked sialic acid. We also show that the knockdown of *St6gal1*, which encodes for an α2,6 sialyltransferase, promotes the differentiation of cells and generates large myotubes containing a higher number of nuclei. Furthermore, we evidence that the decrease of *St6gal1* expression is associated to changes in the expression of myogenic regulatory factors expression and to a down regulation of *Pax7* transcription factor.

Key words: C2C12 cells/ differentiation/ alpha-2,6 sialylation/ St6gal1/ Myogenesis/ MRF expression

Introduction

Glycans present at the cell surface contribute to numerous biological functions (Varki 1993) mainly due to oligosaccharide structure and more particularly to specific sugars as fucose and sialic acids. Modifications of oligosaccharides affect protein folding and stability, which in turn regulates many physiological and pathological events such as cell growth, differentiation and tumor metastasis (Zhang et al. 2013). Sialic acids are acidic sugars typically terminating the outer ends of cell surface glycan chains commonly found at the periphery of glycoconjugate glycans (Varki 2007). Due to their negative charge, sialic acids directly or indirectly contribute to diverse cellular events, and their functions may be divided into two groups (Schauer 2009). In the first group, they act as anti-recognition agents, and in the second group, they operate as biological recognition sites for various molecules (Schauer 2009). The addition of sialic acids to glycans results from the activity of sialyltransferases mainly located in the Golgi apparatus. In human and mouse, twenty sialyltransferases and polysialyltransferases have been identified and classified into four groups according to the type of linkage and the nature of the acceptor. These include six beta-galactoside α2-3 sialyltransferases (ST3Gal-I to VI), two beta-galactoside α2-6 sialyltransferases (ST6Gal-I and II), six GalNAc α2-6 sialyltransferases (ST6GalNAc-I to VI), and six α2-8 sialyltransferases (ST8Sia-I to VI, among them ST8Sia-II and ST8Sia-IV are polysialyltransferases) (Li and Chen 2012; Takashima 2008; Harduin-Lepers et al. 2001). *An enhanced expression of* α2-6 linked sialic acids on *N*-glycans often correlated with cancer progression and metastatic spread (Hedlund at al.2008; Zhang et al. 2013; Swindall et al. 2013).

Myogenesis is a complex and tightly regulated process, which involved cell-cell interactions and results in the formation of a multinucleated myofiber with contractile ability. Typically, myogenic progenitor cells enter the myogenic program in response to signaling molecules. They exit from the cell cycle, differentiate into myocytes and fuse into multinucleated myotubes (Pownall et al. 2002). The signaling molecules are responsible for the expression of Myogenic Regulatory Factors (MRFs) (Parker et al. 2003). The primary MRFs - Myf5 and MyoD - are required for the determination, propagation and survival of myoblasts while the secondary MRFs - myogenin and MRF4 (also called Myf6) - act later in the program as differentiation factors. In addition to the MRFs, upstream transcription regulators of myogenesis such as Pax3, Pax7, Six1,

Six4, or Pitx2 have been identified. They contribute to gene regulatory networks at different steps of skeletal muscle formation (Buckingham and Rigby 2014).

In addition to signaling molecules, muscle precursor cells are subjected to a community effect phenomenon (Gurdon et al. 1993; Cossu et al. 1995). In this process, muscle precursor cells must contact a sufficient number of like neighbor cells to undergo coordinated differentiation in developing tissue. This observation indicates that cell-cell communication plays an important role in myogenic differentiation. The factors mediating the community effect are thought to be either associated with the cell surface (cadherin and cell adhesion molecules) or are secreted (embryonic fibroblast growth factor) (Tanaka et al. 2011).

As the involvement of α2-6 linked sialic acids during myogenesis remains unclear, we have investigated the role of α(2-6) sialylation associated to St6galI enzyme during C2C12 cells (a primary line of murine myoblasts) differentiation. For the first time, we have evidenced a decrease in the expression of *St6gal1* gene and in the amount of α(2-6) sialylated glycoconjugates during cell differentiation. The involvement of α(2-6) sialylation in muscle cell differentiation was also addressed by the knockdown of *St6gal1* gene using shRNA, which promoted the differentiation of C2C12 cells probably by modifying *MRF* and *Pax7* expressions.

Results

The C2C12 cell line differentiation is associated with a diminution of sialylation—The murine C2C12 myoblast cell line is a widely used model to study *ex vivo* myogenesis. Changing of pre-confluent C2C12 cultures from high-serum to low-serum conditions induces cell cycle exit, commitment to myogenic differentiation and fusion of myoblasts to form multinucleated myotubes (Yaffe and Saxel 1977). One of the most widely method to appreciate the myoblast differentiation is to measure the fusion index of C2C12 cells when cultured in low-serum conditions (Brustis et al. 1994) in which proliferating cells began to fuse after 24 hours of culture (Figure 1A). The fusion index rapidly increased and reached 55% at 168 hours. For longer differentiation times, the fusion index slowly increased and reached a maximum of 65% at 336 hours.

In order to appreciate the global sialylation changes at the C2C12 cell surface during myogenic differentiation, we measured the binding amounts of two lectins. We used *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) for the recognition of α(2-3) linked sialic acids to galactose, and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) for the recognition of α(2-6) sialic acids terminally linked to galactose or to *N*-acetylgalactosamine. First, we performed experiments with or without neuraminidase treatment to ensure the specificity of lectins in binding and cell surface labelling assays (See Supplemental data 1). The results confirmed the lectin specificity and the cell surface labelling. According to these controls, we measured changes in lectin binding. As cells do not proliferate in the differentiation medium, changes in lectin binding were attributed to modifications of glycan sialylation levels rather than to modifications of the cell number.

The curves of both lectins binding were similar (Figures 1B and C respectively). Rapidly after the induction of differentiation, the lectin binding rapidly decreased. This change occurred during the first 120 hours and is concomitant to the increase of the fusion index. After 120 hours, always for both lectins, the binding amounts more slowly decreased until the end of the analysis (336 hours). At this time, the lectin bindings were 20% lower than those measured at time 0 hour (proliferation). This first results clearly evidence the correlation between the amount of cell surface α(2-3) and α(2-6) linked sialic acids and the cell fusion associated to myoblast differentiation.

The expression of sialyltransferases and sialidases is correlated to SNA binding—We evidenced a decrease of both α(2-3) and α(2-6) linked sialic acids. Alpha (2-3) linked sialic acids are added by a family of six beta-galactoside α2-3 sialyltransferases (St3gal-I to VI), while α(2-6) linked sialic acids are added by two beta-galactoside α2-6 sialyltransferases (St6gal-I and II). Moreover, α(2-3) sialic acids are mainly associated to gangliosides on the cell surface. The modulation of the ganglioside content of adjacent cells, with a special regard to GM3 during C2C12 cells differentiation was already studied by Anastasia et al. (2008).

As previously specified, alpha (2-6) linked sialic acids terminating the outer ends of cell surface glycan chains, results from the activities of sialyltransferases St6gal1 and St6gal2 (Weinstein et al. 1982). Nevertheless, among the two enzymes, only St6gal1 is really expressed in skeletal muscle and exhibits broad substrate specificity towards glycoproteins, glycolipids and oligosaccharides (Takashima et al. 2003). These observations led us to specifically analyze alpha (2-6) linked sialic acids and the associated enzymes, with a particular attention to St6gal1 sialyltransferase.

In a first approach, we measured the gene expression levels of both sialyltransferases and of neuraminidases *1, 2, 3* and *4* at various stages of C2C12 cell differentiation. Rapidly after the induction of differentiation, the *St6gal1* transcript amount decreased. At 168 hours of differentiation, it became -3.6 fold lower than which at time 0 hours (Figure 2A). It should be noted that this phase was concomitant with the pronounced increase of the fusion index (Figure 1A). After 168 hours, the *St6gal1* mRNA level increased and reached its initial value at 240 hours. After this time, the *St6gal1* expression did not change and remained similar to that observed before differentiation. As the global regulation of cellular glycosylation results in a large part from variations in gene expression encoding the corresponding enzymes and in a lesser extent from post-transcriptional regulation (Nairn et al. 2008), we have also followed St6gal1 protein by western-blot analysis during differentiation. The variation of St6gal1 quantity detected at some differentiation stages (Figure 2B) correlate with *St6gal1* transcript amounts. By densitometric analysis, we showed that the protein signal was 6 fold lower in differentiating cells at 192 hours comparatively to proliferating cells (0 hour) (2.32 and 0.37 at times 0 and 192 hours respectively). The decrease reached 8 fold at 240 hours of differentiation. For longer differentiation times, the protein amount gradually increased and was only two fold lower at 336

hours of differentiation than before differentiation (0 hour). As expected, *St6gal2* expression was not detected during differentiation of C2C12 myoblast cells (data not shown).

The *Neu1* expression remained unchanged during the first 96 hours following the induction of differentiation (Figure 2C). For times between 100 and 240 hours of differentiation, *Neu1* expression progressively increased and reached a value twice than that measured at 0 hour. For longer differentiation times, the transcript amount still remained relatively constant. The anti-Neu1 western-blot corroborated the transcript profile observed (Figure 2D). The protein quantity increased beyond 144 hours of differentiation comparatively to proliferating cells (0 hour). Surprisingly, the variations of the NeuI protein amounts were higher than that of transcript amounts. For example, at 192 hours of differentiation, the *Neu1* transcript amount was 2.2 fold that of C2C12 at time 0 hours (Figure 2C). For the same time, the neuraminidase 1 amount was 18 fold (0.05 and 1.64 at times 0 and 192 hours respectively) that of C2C12 at time 0 hour (Figure 2D). Such a result suggests that the amount of Neu1 protein was regulated at both transcriptional and translational levels.

Neu2 transcript level increased by 20 fold between 24 and 192 hours of C2C12 differentiation (Figure 2E), and then rapidly decreased between 192 and 264 hours, to reach its initial value at 264 hours. For longer differentiation times, the transcript amounts remained unchanged. The up-regulation of *Neu2* expression correlate with the increase of the fusion index (Figure 1A), while the decreasing phase corresponded to the weak increase of the fusion index rate.

Neu3 transcript was detected during C2C12 differentiation (Figure 2F). The overall curve showed an increased transcript amount during the differentiation process, but the changes measured during differentiation remained low (in a range of 1.5 fold change) conversely to those previously reported (Anastasia et al. 2008).

In contrast to the previous neuraminidases, no *Neu4* gene expression was detected in C2C12 cells both during proliferation and differentiation stages (data not shown).

Knockdown of St6gal1 increased the differentiation of C2C12 cells—To better evaluate the role of α(2,6) sialylation during the myogenic differentiation of C2C12, we used the RNAi technology to knockdown *St6gal1* expression. To this purpose, a shRNA targeting the *St6gal1*

transcript was introduced in the pSIREN retroviral vector, which contains a puromycin-resistance gene for positive selection of infected cells. As a control, a pSIREN construct containing a non-specific shRNA sequence (mock shRNA) was used. After puromycin selection, two clonal populations were created, in which the *St6gal1* mRNA levels were 9 and 6 fold lower (clones C2C12-sh-Cl1 and C2C12-sh-Cl2 respectively) compared to control cells (Figure 3A). A C2C12-sh-pool population (all the puromycin resistant cells of a culture plate) was also collected to overcome bias associated to shRNA insertion into the C2C12 genome. In such a cell culture, the *St6gal1* expression was 10.6 fold lower than in control C2C12 (Figure 3 A). The western-blot analysis from total St6galI cell proteins confirmed the knockdown of *St6gal1* (Figure 3B). We looked for the α(2,6) linked terminal sialic acid on cells by immunocytochemistry with SNA lectin coupled to FITC (Figure 3C). We showed that in *St6gal1* shRNA treated cells, the SNA binding decreased, compared to mock shRNA treated cells. To exclude the possibility that the reduction of the α(2,6) sialylation could be related to a decrease in the amount of sialic acid in cells, we measured the total sialic acid amounts in C2C12 and *St6gal1* shRNA treated cells (Figure 3D). The total sialic acids were slightly but significantly lower in C2C12-sh-Cl1 cells only. The NeuGc amount was mainly affected but its decreased could not explain the glycoprotein hypo-sialylation.

As the various data presented above showed a specific effect of shRNA, we analyzed the ability of the created clones to differentiate in myotubes. Kinetics of cell fusion for the *St6gal1*-shRNA treated cells were similar to each other but differed from those of control cells (untreated or treated cells with mock shRNA) (Figure 4A). During the first 72 hours of differentiation, the fusion rate was similar in *St6gal1*-shRNA treated and in control cells. At this time, the fusion rate of control cells decreased while it remained faster in *St6gal1*-shRNA treated cells. At 96 hours of differentiation, the fusion indexes were 38% for control cells and about 50% for *St6gal1*-shRNA treated cells. For longer differentiation times, the fusion indexes similarly increased in control and *St6gal1*-shRNA treated cells and reached approximately 80% at 240 hours in sh-treated clones, and 60% in control cells.

Phenotypic observations showed that myotubes derived from *St6gal1* shRNA treated cells were longer than those from control cells (Figure 4B). This observation correlated with the more important fusion index in *St6gal1* knock-down cells. To confirm this observation, we counted nuclei in myotubes (Figure 4C). At 168 and 240 hours, the number of myotubes containing 2 to 5

nuclei was significantly lower for *St6gal1* shRNA treated cells, which presented a higher number of myotubes containing more than 10 nuclei. Furthermore, the proportion of myotubes containing 2 to 5 nuclei increased between 168 and 240 hours as the proportion of myotubes containing more than 10 nuclei. This observation indicated that myotubes with more than 10 nuclei observed at 240 hours in *St6gal1* shRNA treated cells were generated by a fusion of myoblasts to myotubes rather than a fusion between myotubes (Figure 4C).

To provide an initial response to the above observation, and to better understand the phenotype of *St6gal1* knockdown cells, we measured the expression levels of (i) the myogenic regulatory factors (*MyoD*, *MyoG*, *Myf5*, *Myf6*), (ii) *Pax7*, a transcription factor that plays critical roles during satellite cell activation, proliferation and differentiation, and (iii) *St6gal1* during C2C12 differentiation. For this purpose, total RNAs were isolated from C2C12-sh-Cl1, C2C12-sh-Cl2, C2C12-sh-pool and C2C12 at various times of differentiation and over a period of 240 hours. The transcript amounts were quantified by semi-quantitative real-time PCR and presented as a fold change comparatively to proliferating C2C12 (time 0 hour) (Figure 5A and B). Even if the *MyoD* transcript amounts remained globally unchanged during the extent of cell fusion (Figure 5A), two small transcriptional waves were observed at 48 and 168 hours after induction of C2C12 differentiation. They were attributed to a transient expression of other transcription factors (Delgado et al. 2002) and corresponded to the initiation of cell fusions. *MyoG* (myogenin) was highly induced from 24 hours (Figure 5B), as it has been previously reported (Delgado et al. 2002). It reached a maximum (35 fold) at 144 hours of differentiation. For longer times, *MyoG* transcript amounts progressively decreased but remained sufficiently high at 240 hours (fold-change of 14). *Myf6* (also called *Mrf4*) expression progressively increased until 144 hours of differentiation and then highly increased to reach a plateau at 192 hours where a 50 fold overexpression was observed (Figure 5A). *Myf5* mRNA amount progressively decreased during C2C12 differentiation (Figure 5B).

During the C2C12 differentiation, the decrease of *Pax7* transcription (Figure 5A) could be attributed to the progressive differentiation of reserve cells.

Finally, the expression profile of *St6gal1* (Figure 5B) was similar to those previously observed in figure 2A.

To characterize the *St6gal1*-sh treated cells, we measured the transcription levels of MRF in C2C12-sh-Cl1, C2C12-sh-Cl2 and C2C12-sh-pool cells at various times of differentiation and expressed them as a fold-change comparatively to that in C2C12 cells at the same differentiation time (Figures 5C to H). During the proliferating stage (time 0 hour), the *MyoD* transcript amount was lower in *St6gal1*-sh treated cells comparatively to C2C12 (Figure 5C). It rapidly increased after induction of differentiation but remained lower to those measured in C2C12. A similar observation was obtained for *MyoG* transcription (Figure 5D). It was lower in proliferating *St6gal1*-sh treated cells comparatively to C2C12 cells, and rapidly increased after differentiation induction. However in this case, at 24h of differentiation, MyoG transcripts amount in *St6gal1*-sh treated cells were significantly higher than in C2C12, indicating an earlier initiation of the myogenic differentiation than in C2C12. For longer differentiation times, the transcript amounts were consistently lower than in C2C12 cells.

The *Myf6* transcript amount was punctually increased (between 96 and 144 hours according to the clone), in *St6gal1*-sh treated cells comparatively to C2C12 cells (Figure 5E). It signify the initiation of the secondary fusion (Sabourin and Rudnicki, 2000).

Myf5 was more expressed in proliferating *St6gal1*-sh treated cells comparatively to control C2C12 (Figure 5F). This higher amount may explain the more rapid appearance of multinucleated cells after 48 hours of differentiation. Progressively, from 48 to 72 hours of differentiation, the transcript amounts decreased in *St6gal1*-sh treated cells to reach a minimum at around 120 hours of differentiation. For longer differentiation times, the transcript amounts progressively increased.

On the whole, the MRF expression profiles of *St6gal1*-sh treated cells seems indicate that these cells more sorely engage in the myogenic differentiation pathway. To better characterize this more elevated commitment of *St6gal1*-sh treated cells, the Pax7 expression levels were measured (Figure 5G). *Pax7* is highly repressed (from 1 000 to 3 000 fold lower) in proliferating *St6gal1*-sh treated cells compared to C2C12 cells. After initiation of differentiation, *Pax7* expression increased but remained lower than in C2C12.

During the proliferation phase, the *St6gal1* transcript amount was lower in *St6gal1*-sh treated cells comparatively to control C2C12 showing the shRNA efficiency (Figure 5H). After the induction of differentiation, the relative transcript amount increased in sh-treated C2C12 but remained lower than in C2C12. This apparent increase may be explained by the relative

decreased transcript amount measured in C2C12 at the same time of the differentiation. After 72h of induction, the relative *St6gal1* transcript amount progressively decreased in sh-treated C2C12 compared to control cells due to the enhancement of *St6gal1* transcription in C2C12.

The more important gene expression difference between sh-treated C2C12 and C2C12 cells was the expression pattern of *Pax7*. This analysis was confirmed by western-blotting of Pax7 protein. The western blot shows the presence of Pax7 in proliferating and differentiating C2C12 and C2C12-sh-mock cells (Figures 6A and B). On the other side, no Pax7 was detected in sh-*St6gal1* treated C2C12 cells, both during proliferation and differentiation (Figures 6A and B). This result may be explained by a decrease of *Pax7* expression in all C2C12 sh-treated cells or by a reduced number of cells expressing *Pax7*. To address this question, we analyzed Pax7 and laminin expression by immunostaining in proliferating *St6gal1* knockdown cells (Figure 6C). Pax7 was detected in the nucleus of numerous C2C12 and C2C12-sh-mock cells. In contrast, Pax7 was only detected in few sh-*St6gal1* treated cells. This observation was confirmed by the fact that Pax7+ cells represented around 35% in proliferating C2C12 and C2C12-sh-mock cells, while their proportion diminished to 11, 17 and 16% in C2C12-sh-Cl1, C2C12-sh-Cl2 and C2C12-sh-pool respectively (Figure 6D).

DISCUSSION

In this study we investigated the possible correlation between α(2,6) linked sialic acids modification and the myogenic differentiation of the myoblastic cell line C2C12. Sialic acids are mainly found on *N*-glycoproteins, and to a lesser extent, on *O*-glycoproteins, glycolipids and free oligosaccharides (Varki and Varki, 2007). The functions of sialic acids are versatile in the fact that they may have both recognition and anti-recognition effects (Schauer, 2009). Nevertheless the role of sialylation in muscle or during muscle development is poorly documented. During myogenesis, polysialylation of *N*-glycans attached to NCAM prevents myoblast fusion (Suzuki et al. 2003). More recently, Milman-Krentsis et al reported that the GNE enzyme (UDP-N-acetylglucosamine 2 epimerase/N-acetylmannosamime kinase) is involved in the early development of skeletal and cardiac muscles (Milman-Krentsis et al. 2011). Analysis of alpha (2,6) linked sialic acids on *N*-glycans during cancer development is well documented (for a review see Park et Lee. 2012), but less is known about these sialic acids during the myogenic differentiation.

It has been shown that *in vitro* inhibition of N-glycan processing by tunicamycin treatment disrupts normal cell adhesion and reduces the tumorigenic and metastatic capacity of S4MH cells (Calle et al. 2000). In the present study, the SNA lectin binding approach showed a diminution of α (2,6) linked sialic acids upon induction of myogenesis in C2C12 cell line. This result agrees with data obtained with metastatic tumor cells in that myogenesis results from positively regulated interactions of sialylated surface molecules as can be evidenced when cells are treated by sialidases (Lee et al. 2001).

To better understand the decrease of α (2,6) linked sialic acids, we analyzed the expression pattern of neuraminidases and St6gal1 sialyltransferase during C2C12 differentiation over a long period of 336 hours of differentiation. The transcriptomic analyses of neuraminidases 1, 2 and 3 (neuraminidase 4 was not detected) associated to *St6gal1* gave an interesting chronology of the molecular processes occurring during C2C12 differentiation. After the induction of differentiation, *Neu2* is highly expressed while *St6gal1* is down-regulated. This dual regulation results in the diminution of α(2,6) linked sialic acids and the rapid fusion of C2C12. Overexpression of *Neu2* was described as inducing myoblast differentiation *in vitro* (Fanzani et al. 2003) and its up-regulation was already observed during differentiation of C2C12 myoblasts

(Fanzani et al. 2004). The increased expression of *Neu2* associated with *St6gal1* dowm-regulation may explain the fast phase of myoblast fusion we observed after the switch of C2C12 cells in the differentiation medium. The Neu2 up-regulation was associated to PI3K/AKT signaling activation induced by IGF1 (Fanzani et al. 2006). Moreover, *St6gal1* was recently described as responsible for the development of MDR in human leukemia cells by mediating the activity of PI3K/Akt signaling and the expression of P-gp and MRP1 (Ma et al., 2014). These results suggest that in C2C12, the two genes (*Neu2* and *St6gal1*) may be related through the PI3K/AKT signaling.

The analysis of *Neu1* expression over the period of 336 hours showed an expression pattern slightly different from that already described by Champigny et al. (2005) who observed a slight increased expression immediately after induction of C2C12 cells differentiation. In the present study we really observed a *Neu1* up-regulation from time 120 hours of differentiation. *Neu1* overexpression was described as inhibiting myogenesis in C2C12 cells (Champigny et al. 2005). Thus, in our study, the up-regulation of *Neu1* and the increased amount of Neu1 protein correlate well with the concomitant fusion phase of C2C12 cells.

Through RNAi technology, we realized the knockdown of *St6gal1* in C2C12, which increases the fusion of mononucleated C2C12 myoblasts in multinucleated mature myotubes that contained more than 5 nuclei. This process is orchestrated by the myogenic regulatory factors: Myf5, MyoD, Myf6 and MyoG (or myogenin). Myf5 and MyoD are responsible for regulating the determination, proliferation, and longevity of myoblasts whereas MRF4 and MyoD play a critical role in the regulation of the final stage of differentiation (Bentzinger et al. 2012). In proliferating C2C12-sh-treated cells, *MyoD*, *MyoG* and *Pax7* are down-regulated comparatively to control C2C12 cells. MyoD and MyoG regulate muscle cell differentiation by inducing cell cycle arrest (Guo et al. 1995; Parker et al.1995). The increasing expression of MRF from times 0 to 48 hours of differentiation are a prerequisite for myogenic initiation. Between 96 and 144 hours of differentiation (according to the considered clone), an overexpression wave of *Myf6 (MRF4)* was observed. As this MRF is associated to the secondary fusion (Sabourin and Rudnicki 2000), it’s up-regulation may explain the more elevated fusion observed in C2C12-sh-treated cells. Nevertheless, the *Myf6* up-regulation alone cannot explain the more important fusion index (80%) observed in clones at 240 hours. Effectively, in that way no more than 65% fusion (similar to controls) can be obtained because of the amount of satellite cells (*Pax7*+) present in our cell

culture. The 15% of difference in fusion index observed at 240 hours of differentiation, between control and sh-treated cells, is associated to an increased fusion between myotubes and additional myoblasts which are *Pax7*+ depleted. Effectively, Pax7 acts by promoting cell commitment to the skeletal muscle lineage while preventing terminal differentiation (Olguín and Pisconti 2012). The ectopic expression of Pax7 efficiently represses myogenic progression in C2C12 (McFarlane et al. 2008). Here, we showed that the expression level and profile of *Pax7* changed following *St6gal1* knockdown. In *St6gal1*-sh treated C2C12, the number of Pax7+ cells was low and thus favor the fusion of myoblasts with myotubes containing a high number of nuclei. The control of Pax7 level during myogenic progression is complex and may be regulated at the post-transcriptional level by microRNA (miR-1, miR-206 and miR-486) and at the post-translational level as reported (or suggested) by Olguin and Pisconti (2012). The relationship between the amount of peripheral α(2,6) linked sialic acids and *Pax7* expression remains to be establish.

In conclusion, we demonstrated that when proliferating C2C12 myoblasts are induced to differentiate in myotubes, the α(2,6) linked sialic acid amount decreased and correlated to a down-regulation of *St6gal1* associated to up-regulations of *Neu1* and *2* sialidase genes. We demonstrated that the knockdown of *St6gal1* induce a repression of *Pax7* expression and enhanced the fusion level of C2C12 cells. The high fusion could be explained by modifications of *N*-glycan structures present at cell surface, which loss their ability to transduce proliferation signals in cells or to maintain cells as reserve cells. The analysis of signal transduction pathways associated to *Pax7* gene regulation in *St6gal1* down-regulated clones are under investigation

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture – Cultivation of HEK-293T cells has been previously described (Pichavant and Tremblay 2012). C2C12 cells were grown to confluence under 5% CO_2 at 37°C in growth medium: DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Eurobio) and penicillin-streptomycin (100 µg/ml-100 units/ml) (Gibco). For differentiation, cells were switched to differentiation medium: DMEM supplemented with 2% horse serum (v/v) (Gibco), and penicillin-streptomycin (100 µg/ml-100 units/ml).
For measurement of myoblast fusion, C2C12 infected or not with *St6gal1*-shRNA or with mock-shRNA were seeded into a 12-well plate. At different differentiation stages, cultured cells were rinsed twice with PBS and fixed in 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature. Cells were then washed three times with PBS before being dehydrated overnight at 4°C in 70% (v/v) ethanol. Dehydrated cells were Jenner–Giemsa stained and fusion index scoring was made as described (Veliça and Bunce 2011). Nuclei were counted in twelve randomly chosen microscope fields at a magnification of x 400. Fusion (%) = (number of nuclei in myotubes)/ (total number of nuclei in myoblasts and myotubes) x 100.

Quantification of glycan motifs using lectins – For measurement of glycan motifs, cells were seeded into a 12-well plate. At different differentiation stages, cells were rinsed twice with PBS and fixed in 4% formaldehyde as previously. After two washes with PBS, glycan motifs were quantified using two digoxigenin labelled lectins (DIG glycan differentiation Kit, Roche). Cells were blocked using 1X blocking reagent (Roche) for 30 min at room temperature, then washed twice with 1 mL of lectin buffer 1 (1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ in TBS solution, pH 7.5). Cells were then incubated with 200 µL lectins for 1 hour at room temperature. After three washings with TBS, anti-digoxigenin-alkaline phosphatase antibody was added and incubated for 1 hour at room temperature. Cells were then washed twice with 1 mL of lectin buffer 2 (0.1 M Tris, 0.05 mM $MgCl_2$, 0.1 mM NaCl, pH 9.5) and alkaline phosphatase activity revealed with 50 µL/well of NBT/BCIP solution (Roche) (1:50 in lectin buffer 2) for 30 min at room temperature. The reaction was stopped with 200 µL DMSO and the absorbance was measured at 550nm. The digoxigenin labelled lectins used were MAA (0.125 mg/ml) and SNA (0.125mg/ml). The anti-digoxigenin-alkaline phosphatase antibody was used at 1:1,000.

Two controls of lectins labelling specificity were also realized (see supplemental data 1). In the first control, we estimated the specificity of lectin binding. To do so, we first

submitted fixed cells to sialidases-A treatment (Prozyme) (5U/mL) in sodium phosphate buffer (250 mM, pH6) at 37°C and overnight before labelling with lectins as described above. In the second control, we estimated the cell surface binding of lectins. To do so, fixed cells were permeabilized in HEPES-Triton buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl2, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH7.4) for at least 30 min at 4°C and washed twice in 1 X PBS before labelling with lectins as described above.

Protein preparation and western blotting – Total cell extracts were prepared by solubilizing cell pellets in lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4 supplemented with 1% (v/v) triton X-100, 0.5% (w/v) sodium desoxycholate and cocktail of protease inhibitors (Roche)). Protein concentration was determined using the Bradford procedure (Bradford 1976). Equal amounts of proteins were resolved on 10% SDS–PAGE. The proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare), and western blots were performed as described in the BM Chemiluminescence Blotting Substrate protocol (Roche Diagnostics, Meylan, France). The primary and HRP-conjugated antibodies were used in 0.5% blocking reagent solution. The incubation time was overnight at 4°C for the primary antibody and 30 min at 20°C for the secondary one (HRP-labeled). Reactive proteins were visualized with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) kit. The primary antibodies used are against: St6gal1 (1:1 000, sc-20926, Santa Cruz Biotechnology), Neu1 (1:1 000, AV44286, Sigma-Aldrich), Pax7 (1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). Actin (sc-1615 HRP, Santa Cruz Biotechnology) was used as a standard at a 1:2 000 dilution.

Lentivirus production and St6gal1 knockdown in C2C12 cells – A mouse *St6gal1* shRNA lentiviral transfer vector was produced by annealing the primers sh1-*St6gal1*-UP 5'-GATCCGCGGAACTATCTGAACATGAATAAAGTTCTCTTATTCATGTTCAGATAGTTCCTCTTTTTTACGCGTG-3' and sh1-*St6gal1*-DN 5'-AATTCACGCGTAAAAAAGAGGAACTATCTGAACATGAATAAGAGAACTTTATTCATGTTCAGATAGTTCCGCG-3'. A control shRNA was also created by annealing the primers sh-mock-UP 5'-GATCCGGGAATCTCATTCGATGCATACAAGTTCTCTGTATGCATCGAATGAGATTCTCTTTTTTACGCGTG-3' and sh-mock-DN 5'-AATTCACGCGTAAAAAAGAGAATCTCATTCGATGCATACAGAGAACTTGTATGCATCGAATGAGATTCCCG-3'. The annealed products were cloned into the *EcoR*1 and *BamH*1 sites of RNAi Ready pSIREN (BD Biosciences) and lentiviral particles were produced in HEK-293T cells according to the manufacturer's instructions. After 48 hours, the culture

medium containing particles was recovered, filtered and immediately used for C2C12 infection according to the protocol of Le Cam *et al.* (2006). C2C12 were incubated for 24 hours with the retrovirus, and recombinant cells were selected with puromycin at a concentration of 10 µg/mL. The clonal populations were recovered and cultured separately in the same medium as C2C12 cells, except that puromycin was maintained at a final concentration of 3 µg/mL. Two clonal populations were created with the sh1 RNA. They were named C2C12-sh-Cl1 and C2C12-sh-Cl2. To bypass the phenotypic and molecular variations associated to sh insertion site into the C2C12 genome, a C2C12-sh-pool population was also created. This was realized as previously except that all the puromycin resistant cells present in the culture dish were recovered and combined. The same protocol was applied to create the C2C12-sh-mock population.

RNA isolation and quantification – After 72 hours of transduction, RNA were isolated from cells with the RNasy mini kit (Qiagen Inc, Hilden,Garmany). The integrity and quantity of RNA were measured using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). cDNA were synthesized using the high capacity cDNA archive Kit (Applied Biosystems, CA, USA) from 2 µg of total RNA. Level of transcripts for specific genes were performed in triplicate using 50 ng of cDNA for each sample, by TaqMan qRT-PCR using gene specific primers for mouse transcripts encoding *St6gal1* (Mm00486119_m1), *Neu1* (Mm00456846_m1), *Neu2* (Mm00479238_m1), *Neu3* (Mm00479379_m1), *Neu4* (Mm00520597_m1), *MyoD* (Mm00440387_m1), *MyoG* (Mm00446194_m1), *Myf6* (Mm00435126_m1), *Myf5* (Mm00435125_m1), *Pax7* (Mm03053796_m1). *18S* (Mm03928990_m1) and *Gapdh* (Mm99999915_m1) were used as reference genes. All probes and primers were purchased by Applied Biosystems.

Changes in the fluorescence of the TaqMan probe were monitored on the ABI PRISM 7900HT sequence detector system and quantified by the SDS 2.2 software (Applied Biosystems) according to the ΔΔCt method. Briefly, ΔCt corresponds to the threshold cycle (Ct) for each gene minus that of the endogenous 18S RNA internal control. Comparative gene expression ΔΔCt represents the ΔCt for each gene in a given condition (*St6gal1*-sh treated C2C12 cells) minus ΔCt value of the same gene in the exogenous control condition (C2C12) serving as calibrator. Relative quantification (RQ) of the genes in a sample was determined according to the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$, a relative quantity of one being assigned to the genes in C2C12 exogenous control samples.

Immunocytochemistry – C2C12 infected or not with *St6gal1*-shRNA or mock-shRNA were seeded into a 12-well plate (X-well tissue Culture chambers - SARSTEDT). After 48 hours, wells were washed three times in 1 ml 1X PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. For Pax7 and laminin staining, cells were washed twice in 1X PBS, permeabilized in HEPES-Triton buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH7.4) for at least 30 min at 4°C and washed twice in 1 X PBS. Cells were blocked using 10% goat serum (Sigma-Aldrich) in PBS solution containing 1% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Triton X-100 for 1 hour at room temperature. When necessary following blocking, cells were washed three times with 1 mL of PBS-0.2% BSA solution. Cells were incubated with primary antibody overnight, at 4°C then washed three times with 1 mL of 1X PBS-0.2% BSA solution. Appropriate secondary antibody was then added and incubated for 15 min in the dark at 37°C. Cells were then stained with DAPI (1:1 000, D1306, Thermo Fisher), mounted with Mowiol solution and photographed using a LEICA inverted epifluorescence microscope (DMI 6000B) using identical exposure settings with the MetaMorph software (Molecular devices, Sunnyvale, USA). Individual images were taken and assembled with MetaMorph software. Primary antibodies used were against: Pax 7 (100µg/mL, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), laminin (1:500, L9393, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies were goat anti-mouse, Alexa Fluor® 488 (1:1,000, A11017, Invitrogen) and goat-anti-rabbit, Alexa Fluor® 546 (1:1 000, A11071, Invitrogen) for Pax7 and laminin respectively. A fluorescent labelling with SNA lectin was also realized. The lectin labelling was realized as described below except that the digoxygenin-labelled lectin was used at 50 µg/mL and that it was detected with DyLight 488 Anti-DIG (green) (1:1,000, Vector Laboratories).

Sialic acid quantification – Proliferating cells infected or not with *St6gal1*-shRNA were scrapped from Petri dishes; washed with PBS and centrifuged at 400×g for 2 min. Cellular pellets were dried and lyophilized for further analysis. Dry cells (2 mg) were resuspended in 200 µl of 20 mM trifluoroacetic acid containing 200 nmoles of KDN (Sigma Aldrich) as internal standard. Samples were hydrolyzed for 2 hours at 80°C. Fifty µl of the resulting soluble fraction were derivatized with 50 µl of DMB-reaction buffer containing 7 mM DMB (Sigma Aldrich), 1.4 M acetic acid, 750 mM 2-mercaptoethanol and 18 mM sodium hydrosulfite. The mixture was incubated for 2 hours in the dark at 50°C. Reactions were stopped by freezing at -80°C. Standard curves were prepared from serial dilutions of KDN derivated Neu5Ac and Neu5Gc. Five µL of derivatized essays and standards were submitted to chromatographic separation on an Atlantis T3 column (5µm 150 x 2.1 mm i.d.;

Waters). The flow rate was 0.2 mL/min. The mobile phase was a gradient of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) programmed as follows: initial, 1% B, increased to 50% in 8 min, to 95% in 1 min, maintained at 95% for 2 min, and finally, decreased to 1% B in the last 8 min. Detection was carried out with a 4000 QTRAP hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (Applied Biosystems, USA) equipped with a Turbo Ion Spray electrospray ionization (ESI) source and controlled by the Analyst software version 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ionization was achieved with electrospray in the negative ionization mode. The MRM transitions of m/z 426 → 408, 426 → 313 and 426 → 283 for Neu5Ac, 442 → 424, 442 → 313 and 442 → 283 for Neu5Gc and 385 → 367, 385 → 313 and 385 → 283 for KDN were simultaneously monitored. The concentrations of Neu5Ac and Neu5Gc were determined by calculating their corresponding peak area ratio to that of the IS using a linear fit weighting to the calibration curves. Means, standard deviations and statistical tests were calculated after three biological replicates.

Funding

This work was supported by grants from the Limoges University, the Conseil Regional of Limousin, the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

Acknowledgments

The authors thank Eric Julien (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), UMR 5535 CNRS, Montpellier, France) for providing the shRNA extinction plasmids.

REFERENCES

Anastasia L, Papini N, Colazzo F, Palazzolo G, Tringali C, Dileo L, Piccoli M, Conforti E, Sitzia C, Monti E, Sampaolesi M, Tettamanti G, Venerando B. 2008. NEU3 sialidase strictly modulates GM3 levels in skeletal myoblasts C2C12 thus favoring their differentiation and protecting them from apoptosis. *J. Biol. Chem*. 283:36265–36271.

Bentzinger CF, Wang, YX, Rudnicki MA. 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a008342.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brustis JJ, Elamrani N, Balcerzak D, Safwate A, Soriano M, Poussard S, Cottin P. Ducastaing, A. 1994. Rat myoblast fusion requires exteriorized m-calpain activity. *Eur. J. Cell Biol.* 64:320-327.

Buckingham M, Rigby P. 2014. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Developmental Cell* 28:225-238.

Calle Y, Palomares T, Castro B, del Olmo M, Bilbao P, Alonso-Varona A. 2000. Tunicamycin treatment reduces intracellular glutathione levels: effect on the metastatic potential of the rhabdomyosarcoma cell line S4MH. *Chemotherapy* 46:408-428.

Champigny MJ, Perry R, Rudnicki M, Igdoura SA. 2005. Overexpression of MyoD-inducible lysosomal sialidase (neu1) inhibits myogenesis in C2C12 cells. *Exp.Cell Res*. 311:157-66.

Champigny MJ, Perry R, Rudnicki M, Igdoura SA. 2005. Overexpression of MyoD-inducible lysosomal sialidase (neu1) inhibits myogenesis in C2C12 cells. *Exp. Cell Res.* 311:157-166.

Cossu G, Kelly R, Di Donna S, Vivarelli E, Buckingham M. 1995. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2254–2258.

Delgado I, Huang X, Jones S, Zhang L, Hatcher R, Gao B, Zhang P. 2002. Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics* 82:109-121.

Fanzani A, Colombo F, Giuliani R, Preti A, Marchesini S. 2004. Cytosolic sialidase Neu2 upregulation during PC12 cells differentiation. *FEBS Lett*. 566:178-182.

Fanzani A, Giuliani R, Colombo F, Zizioli D, Presta M, Preti A, Marchesini S. 2003. Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells, *FEBS Lett*. 547:183–188.

Fanzani A, Colombo F, Giuliani R, Preti A, Marchesini S. 2006. Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy. *FEBS J*. 273:3709-3721.

Fanzani A, Giuliani R, Colombo F, Zizioli D, Presta M, Preti A, Marchesini S. 2003. Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells. *FEBS Lett.* 547:183-188.

Guo K, Wang J, Andres V, Smith RC, Walsh K. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15:3823–3829.

Gurdon JB, Tiller E, Roberts J, Kato K. 1993. A community effect in muscle development. *Curr. Biol.* 3:1–11.

Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83:727-737.

Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM. 2008. Alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res*. 68:388-394.

Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, Triboulet R, Bossis G, Shmueli A, Rodriguez MS, Coux O, Sardet C. 2006. E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 127:775-788.

Lee YN, Kang JS, Krauss RS. 2001. Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21:7696-7706.

Li Y, Chen X. 2012. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:887-905.

Ma, H., Cheng, L., Hao, K., Li, Y., Song, X., Zhou, H. and Jia, L. (2014) Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. *PLoS One* 9: e85113.

McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R. 2008. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp. Cell Res.* 314:317-329.

Milman Krentsis I, Sela I, Eiges R, Blanchard V, Berger M, Becker Cohen M, Mitrani-Rosenbaum S. 2011 GNE is involved in the early development of skeletal and cardiac muscle. *PLoS One*. 6:e21389.

Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM. Moremen KW. 2008. Regulation of glycan structures in animal tissues. Transcript profiling of glycan-related genes. *J. Biol. Chem.* 283:17298–17313.

Olguín HC, Pisconti A. 2012. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J. Cell. Mol. Med.* 16:1013-1025.

Park JJ, Lee M. 2013. Increasing the α2,6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. *Gut Liver*. 7:629-641.

Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 4:497-507.

Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. 1995. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267:1024–1027.

Pichavant C, Tremblay JP. 2012. Generation of lentiviral vectors for use in skeletal muscle research. *Methods Mol. Biol*. 798-285-295.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP. 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology.* 18:747-783.

Sabourin LA, Rudnicki MA. 2000. The molecular regulation of Myogenesis. *Clin. Genet.* 57:16-25.

Sato K, Miyagi T. 1996. Involvement of an endogenous sialidase in skeletal muscle cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 221:826–830.

Schauer R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19:507-514.

Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M. 2003. Polysialic acid and mucin type O-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* 278:49459-49468.

Swindall AF, Londoño-Joshi AI, Schultz MJ, Fineberg N, Buchsbaum DJ, Bellis SL. 2013. ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. *Cancer Res*. 73:2368-2378.

Takashima S, Tsuji S, Tsujimoto M. 2003. Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. *J. Biochem.* 134:287-296.

Takashima S. 2008. Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1155-1167.

Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, Shirao T, Yanagawa T, Watanabe H. 2011. Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. *Muscle Nerve.* 44:968-977.

Vanbeselaere J, Chang LY, Harduin-Lepers A, Fabre E, Yamakawa N, Slomianny C, Biot C, Khoo KH, Guerardel Y. 2012. Mapping the expressed glycome and glycosyltransferases of zebrafish liver cells as a relevant model system for glycosylation studies. *J. Proteome Res.* 11:2164-2177.

Varki A. 2007. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature.* 446:1023-1029.

Varki A. 1993, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 3:97-130.

Varki NM. Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest.* 87:851-857.

Veliça P, Bunce CM. 2011. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Nerve.* 44:366-370.

Yaffe D, Saxel O. 1977. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 3:159-166.

Zhang Z, Sun J, Hao L, Liu C, Ma H, Jia L. 2013. Modification of glycosylation mediates the invasive properties of murine hepatocarcinoma cell lines to lymph nodes. *PLoS One*. 8:e65218.

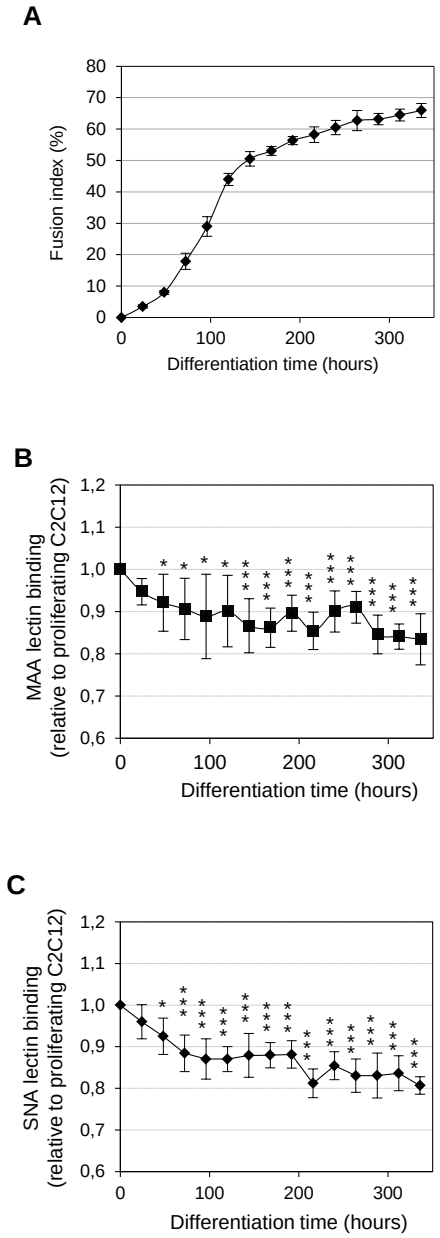


Figure 1

Figure 1. Alpha 2,6 sialylation decreases during C2C12 differentiation.

(A) C2C12 myoblast fusion during induced myogenesis. Proliferating C2C12 at 70% confluence were transferred to the differentiation medium. Myoblast fusion was measured at various times after Jenner–Giemsa staining and expressed as fusion index (%). (B) Cell surface α(2-3) linked sialic acid during C2C12 differentiation. Proliferating and differentiating C2C12 myoblasts at various times were fixed with paraformaldehyde and stained with MAA (0.125 mg/ml) for 1 hour. After washings, the MAA binding amount was measured using anti-digoxigenin-AP antibody. Data were expressed as a ratio between signals intensities measured in differentiating myoblasts *versus* proliferating myoblasts. (C) Cell surface α(2-6) linked sialic acid during C2C12 differentiation measured as previously using

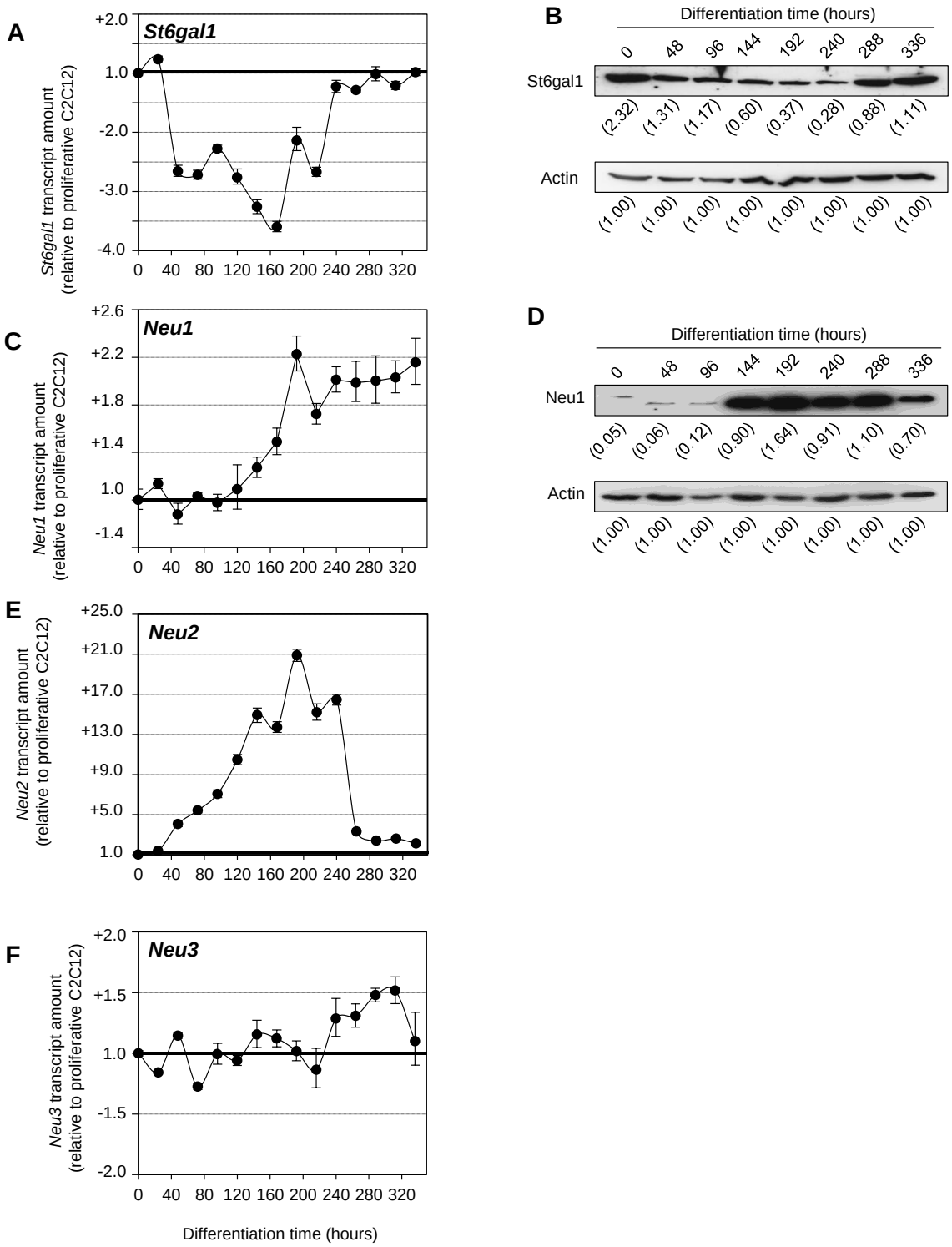


Figure 2

the SNA lectin. Vertical bars denote standard errors of the mean (SEM) for at least three different sets of independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 2. The expression of terminal sialylation actors was modified during C2C12 differentiation. (A) qRT-PCR of *St6gal1* transcripts isolated from C2C12 at various hours after induction of differentiation. Data are were expressed as relative transcript amounts corresponding to the difference between threshold cycle (Ct) values for differentiating C2C12 cells and Ct values for proliferating C2C12 cells ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and normalized against the expression of 18S transcript (see material and methods for a detailed description). RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR for each condition were performed on three independent cell culture preparations. A positive value on the graph means an increase in the transcript level. (B) St6gal1 levels were examined by western-blot using total cell proteins isolated from C2C12 cells in proliferation or at various differentiation times. Actin was used as a loading control. Protein expression levels presented in parentheses below each band, were determined in comparison to actin loading control and normalized against actin at time 0 hours. (C), (E) and (F) qRT-PCR of *Neu1*, *Neu2* and *Neu3* transcripts respectively. The experiments were similarly performed and data are expressed as in A. (D) Western-blot of Neu1 performed as described in B. Protein expression levels presented in parentheses below each band, were determined as in B. Vertical bars denote SEM for at least three different sets of measures.

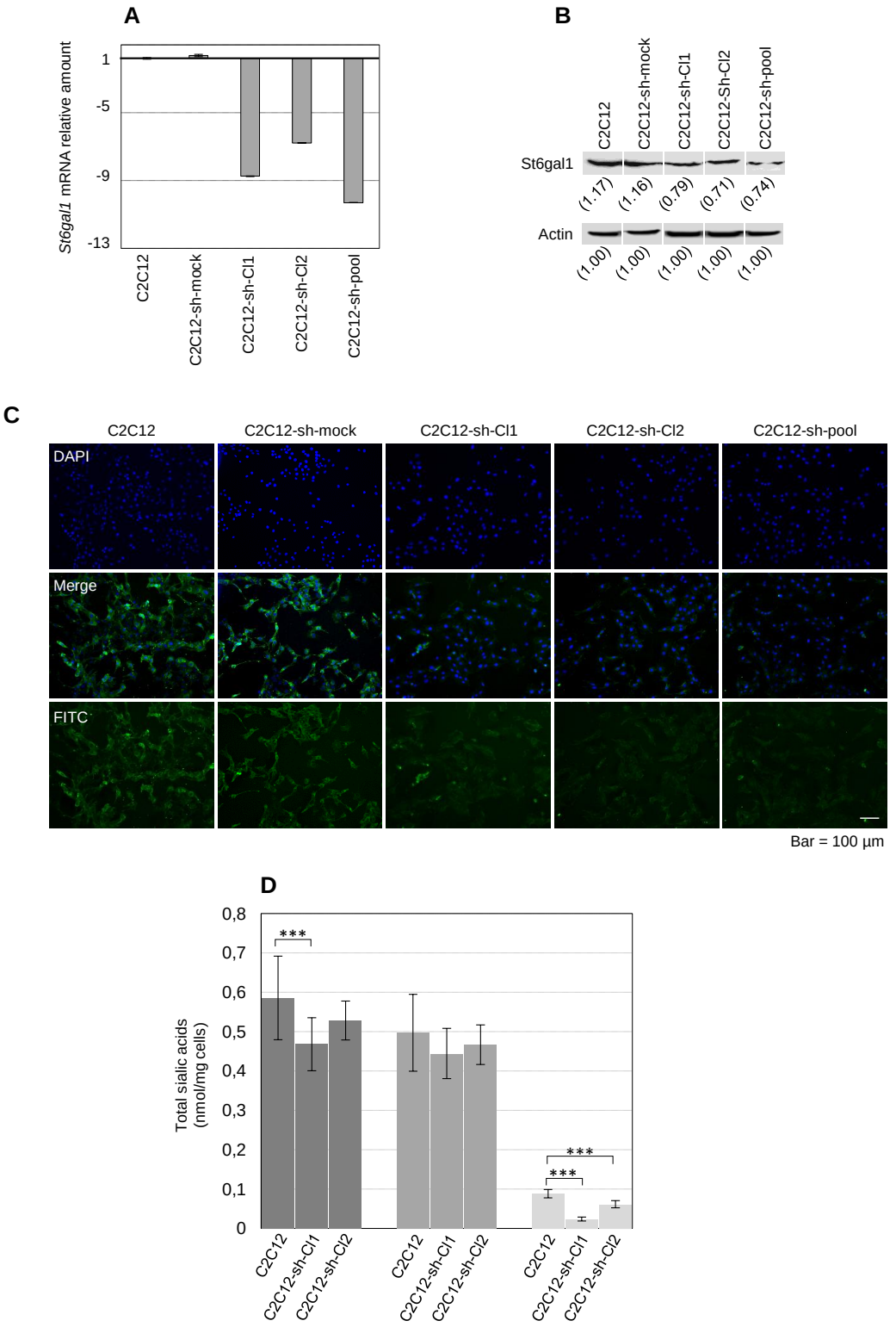

A
St6gal1 mRNA relative amount
1
-5
-9
-13
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool
B
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-Sh-Cl2
C2C12-sh-pool
St6gal1
(1.17)
(1.16)
(0.79)
(0.71)
(0.74)
Actin
(1.00)
(1.00)
(1.00)
(1.00)
(1.00)
C
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool
DAPI
Merge
FITC
Bar = 100 µm
D
Total sialic acids
(nmol/mg cells)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
***
***
***
C2C12
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2

Figure 3

Figure 3. Knockdown of *St6gal1* in C2C12 cells induced induces changes in cell surface α(2,6) sialylation.

(A) qRT-PCR of RNA transcripts isolated from proliferating cells. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the difference between threshold cycle (Ct) values for proliferating sh-treated cells and Ct values for proliferating C2C12 cells (2−ΔΔCt) and normalized against the expression of 18S transcript. RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR for each condition were performed on three independent cell culture preparations. (B) St6gal1 was revealed by western-blot using total cell proteins from cells in proliferation or in differentiation Protein expression levels presented in parentheses under each band, were estimated against a corresponding actin loading control and normalized against actin of C2C12 cells. To associate the actin control to the corresponding St6gal1 sample, lanes have been cut and reordered. (C) Immunocytochemistry of α(2,6) sialylation in proliferating C2C12 with or without *St6gal1* knockdown. Cells of clones were seeded into 8-well plates for immunocytochemistry with SNA. Photographs are arranged from top to bottom as: nuclear staining with DAPI, DAPI and SNA (merge) and SNA staining for proliferating C2C12 cells. (D) Sialic acids quantification in control C2C12 and *St6gal1* shRNA clones (C2C12-sh-Cl1; C2C12-sh-Cl2). Sialic acids were quantified from 2 mg of lyophilized cells after DMB derivation. Dark gray: total amounts of sialic acids; gray: NeuAc amounts; light gray: NeuGc amounts. Vertical bars denote SEM for at least three different sets of measures. ***P<0.01.

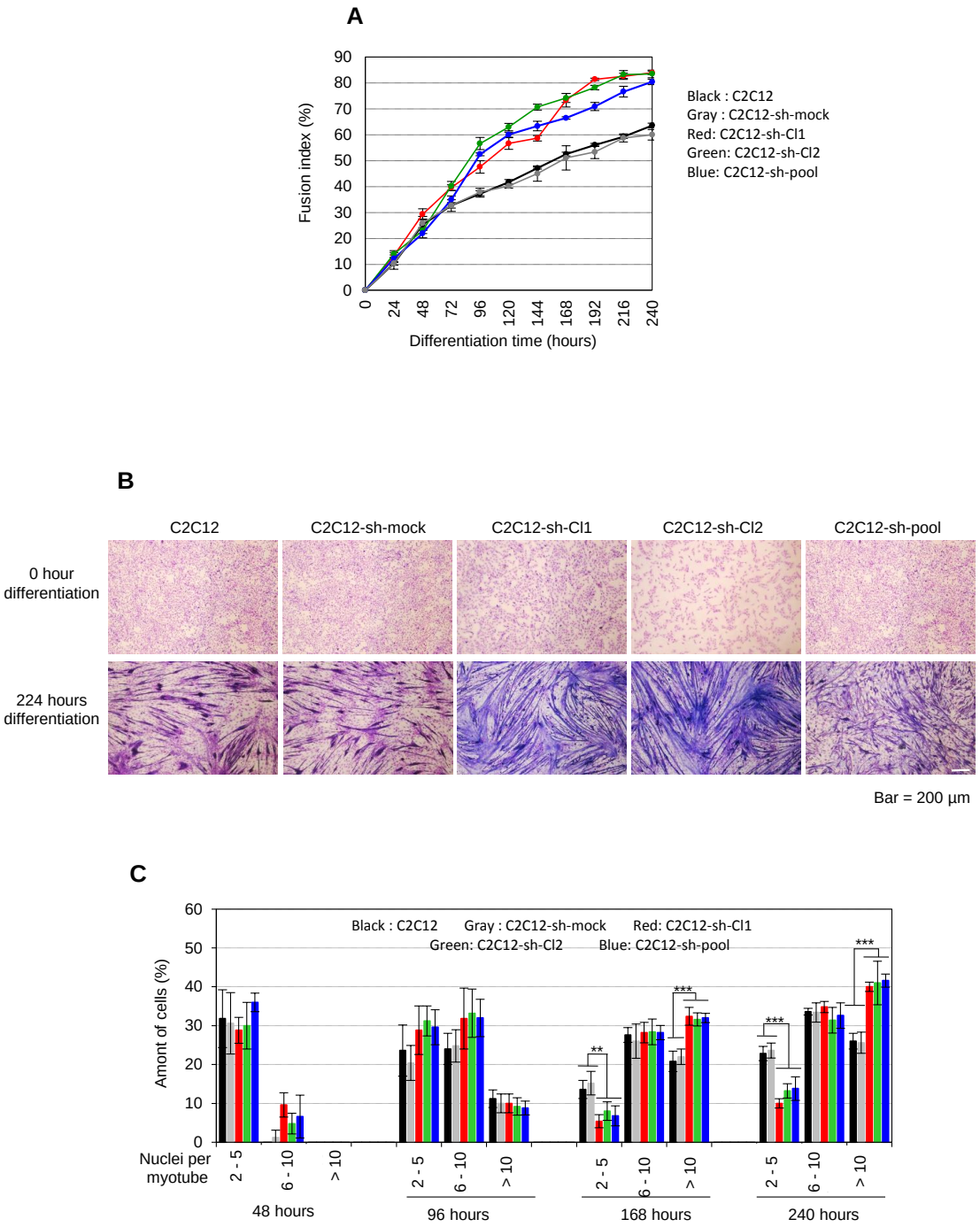

A
Fusion index (%)
Differentiation time (hours)
Black : C2C12
Gray : C2C12-sh-mock
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
B
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool
0 hour differentiation
224 hours differentiation
Bar = 200 µm
C
Amont of cells (%)
Black : C2C12
Gray : C2C12-sh-mock
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Nuclei per myotube
2 - 5
6 - 10
> 10
48 hours
96 hours
168 hours
240 hours

Figure 4

Figure 4. Knockdown of *St6gal1* increases C2C12 myoblast fusion.

(A) Proliferating C2C12 or sh-treated C2C12 grown at 70% confluence were shifted to serum free medium to induce myogenic differentiation. C2C12 fusion was measured at various times after Jenner–Giemsa staining and expressed as fusion index (%). (B) Photomicrographs of C2C12 not infected or infected with mock shRNA (C2C12-sh-mock) and *St6gal1*-shRNA (C2C12-sh-Cl1; C2C12-sh-Cl2; C2C12-sh-pool). Photomicrographs were taken after Jenner–Giemsa staining at 0 and 120 hours of differentiation. (C) Amount of nuclei per myotubes measured at various times of differentiation. Black: C2C12 cells; gray: C2C12-sh-mock; red: C2C12-sh-Cl1; green: C2C12-sh-Cl2 and blue: C2C12-sh-pool. **P<0.01, ***P<0.001.

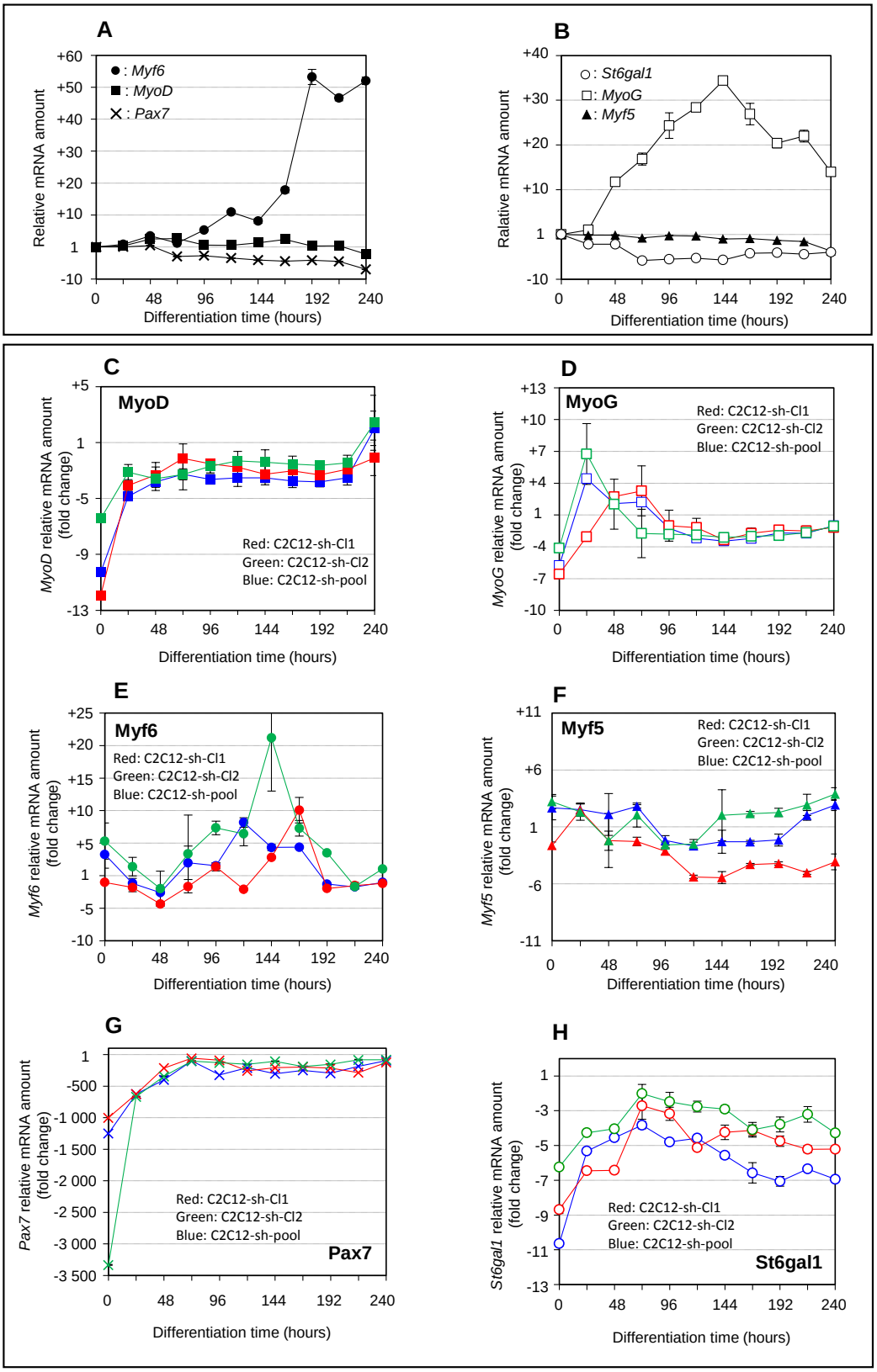

A
Relative mRNA amount
●: Myf6
■: MyoD
×: Pax7
Differentiation time (hours)
B
Ralative mRNA amount
○: St6gal1
□: MyoG
▲: Myf5
Differentiation time (hours)
C
MyoD
MyoD relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)
D
MyoG
MyoG relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)
E
Myf6
Myf6 relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)
F
Myf5
Myf5 relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)
G
Pax7
Pax7 relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)
H
St6gal1
St6gal1 relative mRNA amount (fold change)
Red: C2C12-sh-Cl1
Green: C2C12-sh-Cl2
Blue: C2C12-sh-pool
Differentiation time (hours)

Figure 5

Figure 5. Knockdown of *St6gal1* induced modifications of MRFs expression.

(A and B) Gene expression profiles during the myogenic differentiation of C2C12. Proliferating C2C12 cells grown at 70% confluence were transferred in a serum free medium to induce myogenic differentiation. At various times of differentiation, RNA was extracted and quantified using qRT-PCR. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the difference between threshold cycle (Ct) values for differentiating C2C12 cells and Ct values for proliferating C2C12 cells ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and normalized against the expression of 18S transcript. RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR for each condition were performed on three independent cell culture preparations. (A) Full circle: *Myf6*; full square: *MyoD*; Cross: *Pax7*. (B) Open circle: *St6gal1*; open square: *MyoG*; full triangles: *Myf5*. (C to H) Gene expression profiles during the myogenic differentiation of sh-treated cells comparatively to differentiating C2C12 cells at the same time. Data are expressed as relative transcript amounts corresponding to the difference between threshold cycle (Ct) values for differentiating sh-treated C2C12 cells and Ct values for differentiating C2C12 cells ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) at the same time, and normalized against the expression of 18S transcript. (C) (D), (E), (F), (G) and (H) qRT-PCR of RNA transcripts *MyoD*, *MyoG*, *Myf6*, *Myf5*, *Pax7* and *St6gal1* respectively. Black curve: C2C12 cells; red curve: C2C12-sh-Cl1; green curve: C2C12-sh-Cl2 and blue curve: C2C12-sh-pool. Vertical bars denote SEM for at least three different sets of measures.

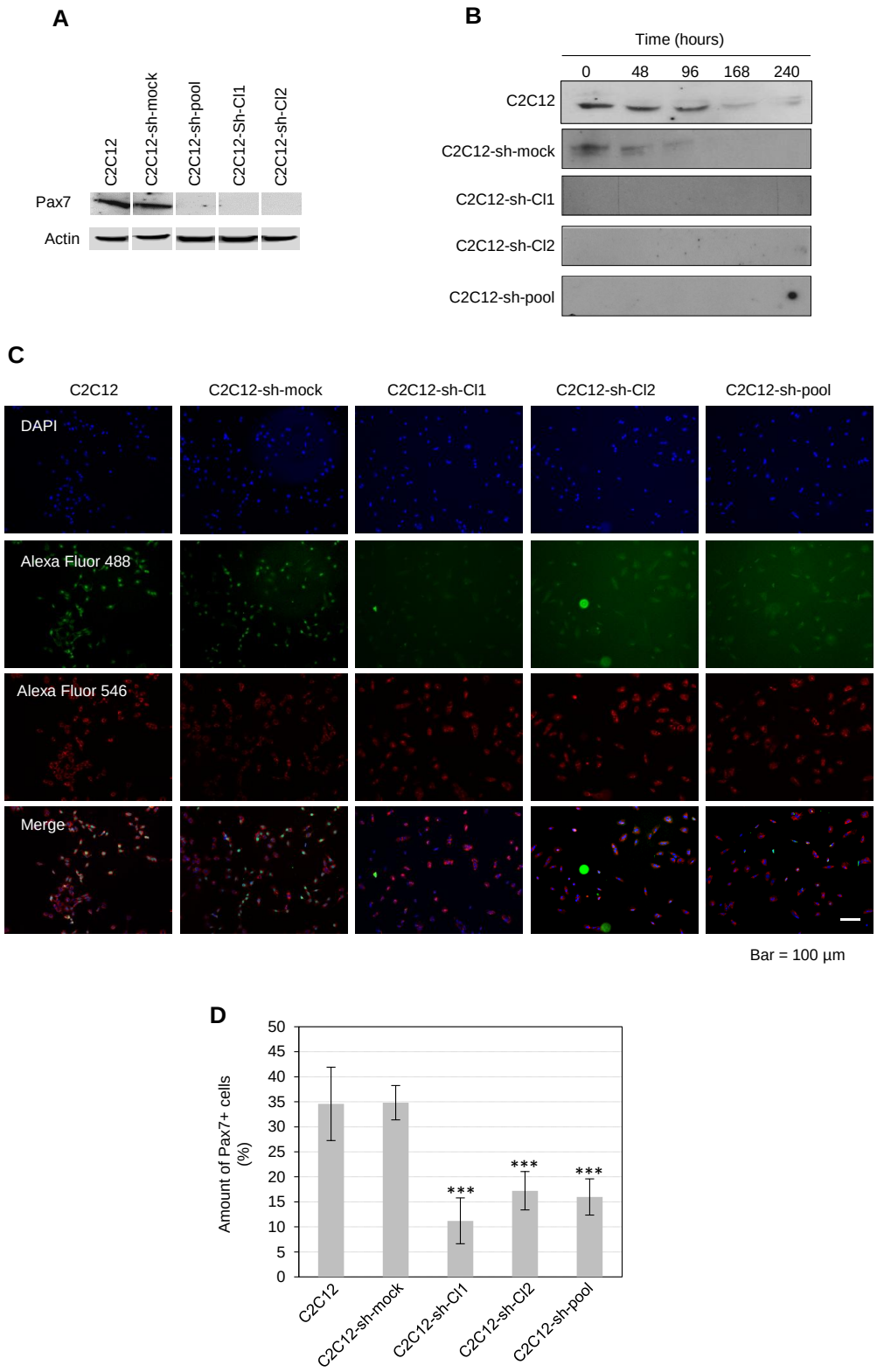

A
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-pool
C2C12-Sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
Pax7
Actin
B
Time (hours)
0
48
96
168
240
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool
C
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool
DAPI
Alexa Fluor 488
Alexa Fluor 546
Merge
Bar = 100 µm
D
Amount of Pax7+ cells (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
***
***
***
C2C12
C2C12-sh-mock
C2C12-sh-Cl1
C2C12-sh-Cl2
C2C12-sh-pool

Figure 6

Figure 6. Knockdown of *St6gal1* in C2C12 myoblast induced a decrease of Pax7 expression. (A) Pax7 was examined by western-blot using total cell proteins (50 µg proteins per lane) isolated from proliferating C2C12, mock-sh-treated C2C12 and *St6gal1*-sh-treated C2C12. Actin was used as a loading control. To associate the actin control to the corresponding St6gal1 sample, lanes have been cut and reordered. The actin loading control was the same as in figure 4A because western blots were done from the same experiments. (B) Time course analysis by western-blot of Pax7 in C2C12, mock-sh-treated C2C12 and *St6gal1*-sh-treated C2C12 at various differentiation times. (C) Immunocytochemistry of Pax7 and laminin in proliferating C2C12 with or without *St6gal1* knockdown. Photographs are arranged from top to bottom as: nuclear staining with DAPI, Pax7 staining with Alexa Fluor A488 (green), laminin staining with Alexa Fluor A546 (red), and merge for proliferating C2C12 and clones cells.

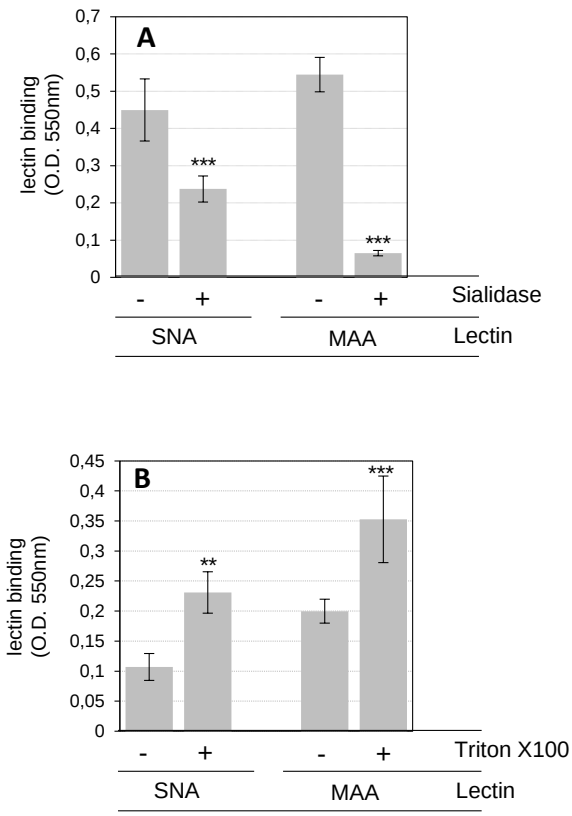


Figure supplemental data 1

Controls of lectins specificity and cell surface labeling.

(A) Verification of lectins specificity. Proliferating C2C12 myoblasts were fixed with paraformaldehyde and treated or not with sialidases before staining with MAA or SNA (0.125 mg/ml) for 1 hour. After washings, the lectins binding amount were measured using anti-digoxigenin-AP antibody at 550 nm. (B) Verification of cell surface labeling. Proliferating C2C12 myoblasts were fixed with paraformaldehyde and treated or not with Troton-X100 before staining with MAA or SNA (0.125 mg/ml) for 1 hour. After washings, the lectins binding amount were measured using anti-digoxigenin-AP antibody at 550 nm. Vertical bars denote standard errors of the mean (SEM) for at least three different sets of independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Résultats complémentaires :

1. Analyse structurale globale des glycoconjugués de surface

1. a. Approche par des lectines

Les cellules (C2C12) ont été mises en contact avec des lectines qui sont des protéines capables de se lier à des motifs glycanniques spécifiques. Un panel de 5 lectines a été utilisé pour cette expérience.

Le but de notre manipulation étant d'observer les modifications des glycannes de surface au niveau de la membrane plasmique, nous avons préféré ne pas décoller et lyser les cellules.

De ce fait, les cellules ont été mises en contact avec les lectines sur leur support de culture.

Cette manipulation a nécessité une mise au point préalable, nous avons donc réalisé des tests pour estimer la reproductibilité de la manipulation, la concentration limite des lectines à utiliser et enfin la sensibilité de la manipulation.

Les 5 lectines couplées à la digoxigenine qui ont été testées sont:

- La GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) qui reconnait le mannose liée en α1, 3, α1,6 et α1,2, à un autre mannose.

- La SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) qui reconnait l'acide sialique lié en α2,6 au galactose. Cette lectine nous donne une idée de l'évolution de la sialylation portée essentiellement par des *N*-glycannes.

- La MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) qui reconnait l'acide sialique lié en α2,3 au galactose ; cette lectine nous donne une idée de l'évolution de la sialylation surtout portée par des *O*-glycannes, et les glycolipides.

Les deux marquages, SNA et MAA, renseignent de manière générale de l'évolution de la sialylation périphérique.

- La DSA (Datura stramonium azide), qui reconnait le résidu Galactose lié en β1,4 au GlcNAc, retrouvé sur les *N*-glycannes hybrides et complexes et les *O*-glycannes.

- la PNA-Digoxigenin (Peanut agglutinin), qui reconnait le résidu Galactose lié en β1,3 au GalNAc, retrouvé sur les *O*-glycannes essentiellement de type mucines.

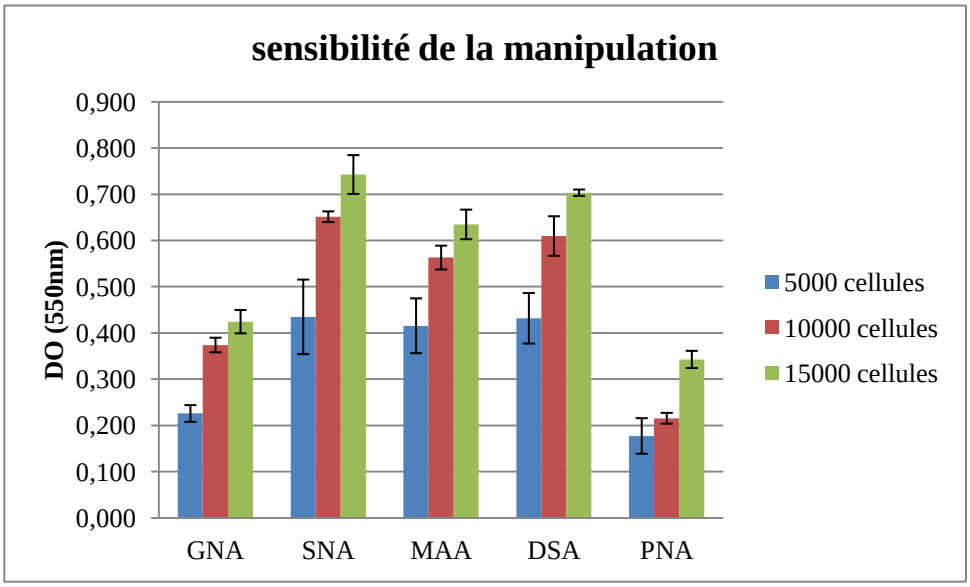


Figure 32 : Tests de sensibilité des marquages par les lectines

Les lectines (GNA, SNA, MAA, DSA, et PNA) sont mises en contact avec des cellules C2C12 en prolifération qui ont été ensemencées à 5 000, 10 000, et 15 000 cellules/cm^2. La manipulation est réalisée 12 heures après l'ensemencement. Après fixation, les cellules à différentes concentration sont mises en contact avec les différentes lectines aux concentrations recommandées par le fournisseur. Après des lavages successifs pour éliminer la fixation aspécifique, le taux de fixation des lectines aux motifs glycanniques est mesuré en utilisant un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (AP). Les valeurs correspondent à la lecture de DO relative à l'absorption colorimétrique obtenue par la réaction NBT-BCIP.

L'absorbance du support plastique a été soustraite de toutes les valeurs représentées. L'expérience a été réalisée en triplicats techniques et biologiques.

i. Spécificité du marquage

Afin de mesurer la sensibilité et la spécificité du marquage par les lectines, nous avons mesuré l'intensité du marquage pour différentes quantités de cellules. Pour cette première série d'analyses, les lectines ont été utilisées aux concentrations recommandées par le fournisseur (cf protocole, partie article).

La manipulation a été réalisée 12 heures après ensemencement des cellules aux concentrations requises pour l'expérience. Nous avons estimé que ce temps était nécessaire aux cellules pour adhérer à leur support de culture, sans pour autant entamer une phase de division.

Le résultat obtenu **(Figure 32)** montre pour toutes les lectines analysées, une augmentation du signal en relation avec l'augmentation du nombre de cellules introduites dans le puits. Il y a donc bien une relation entre le nombre de cellules et l'intensité du signal.

ii. Détermination de la concentration saturante en lectines

Dans une deuxième analyse, nous avons recherché quelle était la concentration en lectine à utiliser dans les marquages ultérieurs. Nous avons donc effectué un marquage des cellules par des concentrations croissantes de lectines. Pour cette analyse, la quantité de cellules en culture est la même pour tous les puits. Les marquages ont été réalisés avec les concentrations en lectines décrites dans le tableau ci-dessous et choisies à partir des données du fournisseur :

Lectine	Concentrations (µg/ml)
SNA, GNA, DSA	0, 5, 10, 50, 100, 200
MAA	0, 25, 50, 100, 250, 500
PNA	0, 50, 100, 250, 500, 1000

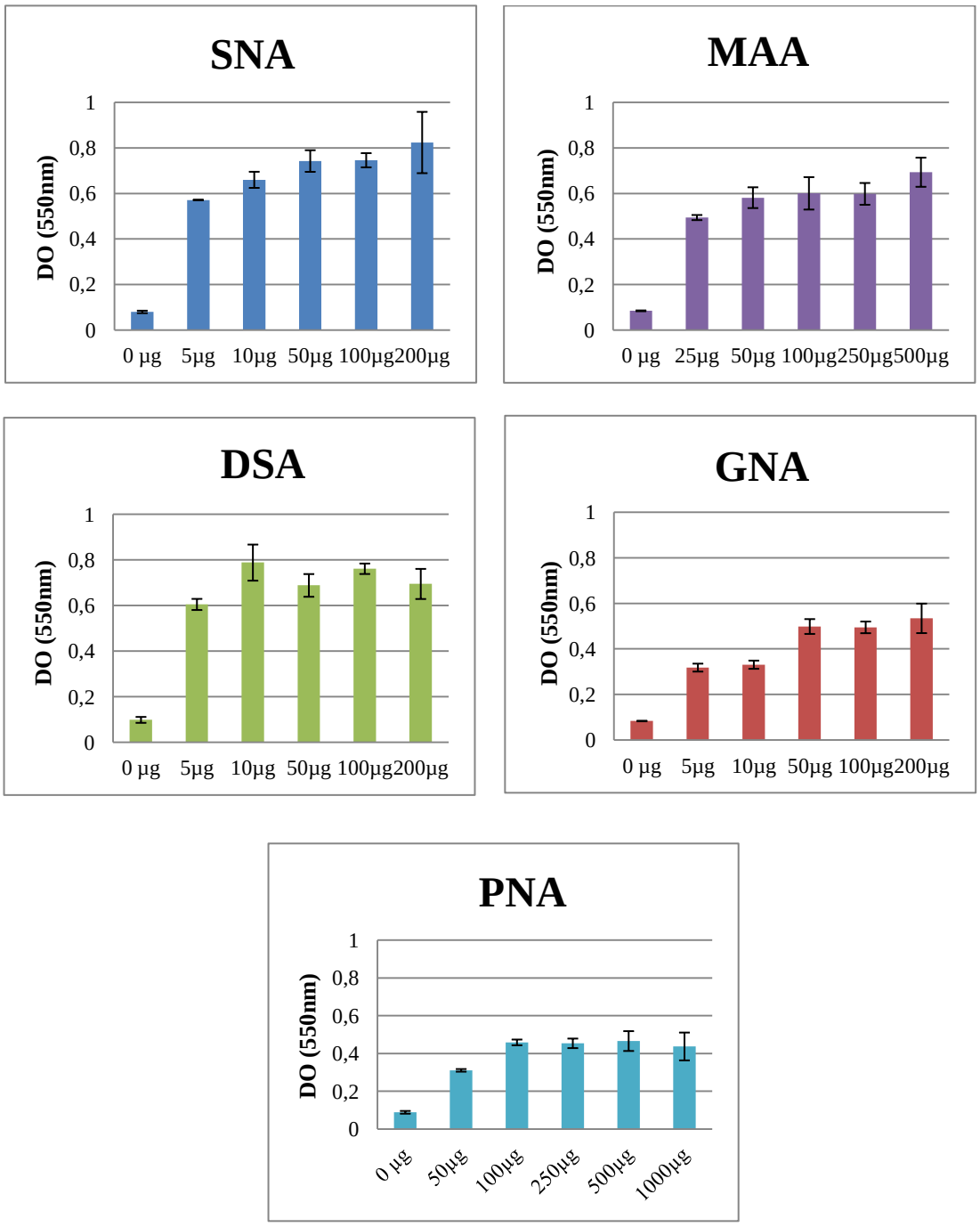


Figure 33 : Mesure du signal émis par les lectines au contact de cellules C2C12 en prolifération.
Les cellules ont été ensemencées à 15000 cellules/cm^2. 12 heures après, les cellules sont fixées puis mises en contact avec chaque lectine à différentes concentrations. Après des lavages successifs pour éliminer la fixation aspécifique, le taux de fixation des lectines aux motifs glycanniques est mesuré en utilisant un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline.
Les valeurs correspondent à des DO à 550 nm, proportionnelles au taux d'absorbances colorimétriques obtenues par la réaction NBT-BCIP, qui est relative au niveau de fixation des lectines.
L'absorbance des cellules mise uniquement au contact de l'anticorps secondaire sans contact préalable avec les lectines a été soustraite de toutes les valeurs représentées.
La manipulation est réalisée en triplicat technique pour chaque point de concentration et pour chaque lectine.

Les résultats montrent que pour SNA, GNA, MAA, et DSA, le plateau est atteint à 50 µg de lectine/ml. Pour être sûrs d'être en conditions saturantes pour la suite des expérimentations, nous avons choisi d'utiliser ces lectines à une concentration de 125µg/ml ***(Figure 33)***. Concernant la PNA, le signal atteint un plateau pour 100 µg/ml de lectine, la condition saturante pour cette lectine sera donc de 250 µg/ml ***(Figure 33).***

Les analyses réalisées ci-dessus ont donc permis de mettre en place les conditions d'utilisation des lectines afin d'étudier les modifications des glycannes de surface lors de la différenciation myogénique des cellules C2C12. Les résultats relatifs à ces analyses sont présentés dans l'article en début de ce chapitre.

1. c. Analyse par spectrométrie de masse

Afin de confirmer et compléter les résultats obtenus avec les lectines, nous avons entrepris l'analyse des glycannes par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, nous avons déterminé le niveau de sialylation des *N*-glycannes pendant la différenciation des C2C12 (prolifération : 0h ; différenciation : 96h, 168h, 216h, 240h).

Pendant les étapes de purification des glycoprotéines, pour extraire les *N*-glycannes, nous réalisons une étape préalable de délipidation (cf protocole – (Vanbeselaere *et al.*, 2012)), étape durant laquelle nous récupérons la fraction glycosphingolipides. Ces derniers, peuvent être purifiés, perméthylés puis analysés par spectrométrie de masse, ceci nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires sur les changements dans la dynamique des glycolipides. ***(Figure 35 et 36).***

Les glycosphingolipides sont construits à partir d'un céramide formé par l'attachement d'un acide gras à la sphingosine, qui se lie par la suite au corps glycannique. La difficulté dans l'analyse des données (MS) réside en la prise en compte des masses des différentes structures du céramide. En effet le céramide peut être constitué de 16 ou 24 atomes de carbone (16C ou 24C), qui peuvent être saturés ou mono-insaturés, pour donner au final 3 formes possibles (C16: 0, C24: 0, C24: 1) présentant des masses différentes. En plus de la diversité observée au niveau du céramide, les structures sialylées d'origine murine présentent du Neu5Gc, qui a une masse moléculaire différente de celle du Neu5Ac ***(Tableau 5)***.

Pour plus de clarté dans la présentation de ces résultats, j'ai dû additionner les pics correspondant aux mêmes structures des glycosphingolipides, même si celles-ci présentent des différences dans la structure du céramide, ou au niveau de l'acide sialique porté par la partie glycannique.

Deux analyses distinctes ont été réalisées, la première consiste à observer les proportions des glycosphingolipides à un point donné de la cinétique de différenciation ***(Figure 35)***, et la seconde à observer l'évolution d'une structure glycannique le long de la cinétique de différenciation ***(Figure 36)***.

Structure	Masse moléculaire (Da)
Céramide - C16 : 0	548 Da
Céramide – C 24 : 0	660 Da
Céramide – C24 : 1	658 Da
aldohexose	204 Da
hexosamine	245 Da
Neu5Ac	361 Da
Neu5Gc	391 Da

Tableau 5 : Masses moléculaires des céramides et des structures sialylées

Supplément : Protocole expérimental :

Les *N*-glycannes ont été purifiés à partir de culots cellulaires de C2C12 en prolifération (0h) et aux temps de différenciation de 96, 168, 216 et 336 heures (20 millions de cellules par condition/ en triplicat), les cellules ont été lyophilisées (Poids sec : 250mg/condition), et une quantité identique estutilisée pour chaque point de différenciation [cf protocole : (Vanbeselaere *et al.*, 2012)]. Nous avons utilisé la *N*-glycosidase F (PNG-ase F- Roche) pour libérer les *N*-glycannes. Cette enzyme clive tous les *N*-glycannes sauf quand le cœur GlcNAc est fucosylé (Tarentino and Plummer Jr., 1994; Tarentino *et al.*, 1985). Les manipulations ont été réalisées en suivant les recommandations du fournisseur. La digestion se fait pendant une nuit à 37°C. Les *N*-glycannes ont été précipités, purifiés sur colonne de charbon, permethylés et préparés pour le dépôt sur plaque de Maldi (cf Annexes2 : supplément de résultats - Ms sur *N*-glycannes).

Les glycospingolipides sont purifiés sur cartouche de C18 activée, et perméthylés avant le dépôt sur plaque de Maldi [cf protocole : (Vanbeselaere *et al.*, 2012)] (cf Annexes2 : supplément de résultats - Ms sur glycosphingolipides). L'acquisition des données est réalisée grâce à 'Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer, les profils MS sont obtenus avec le logiciel 'data explorer software (Applied Biosystems)' en utilisant les paramètres suivants : 'baseline correction' à 38, 'Flexibility' = 0.8, 'degree'= 0.3, et la 'gaussian smooth' = 15.

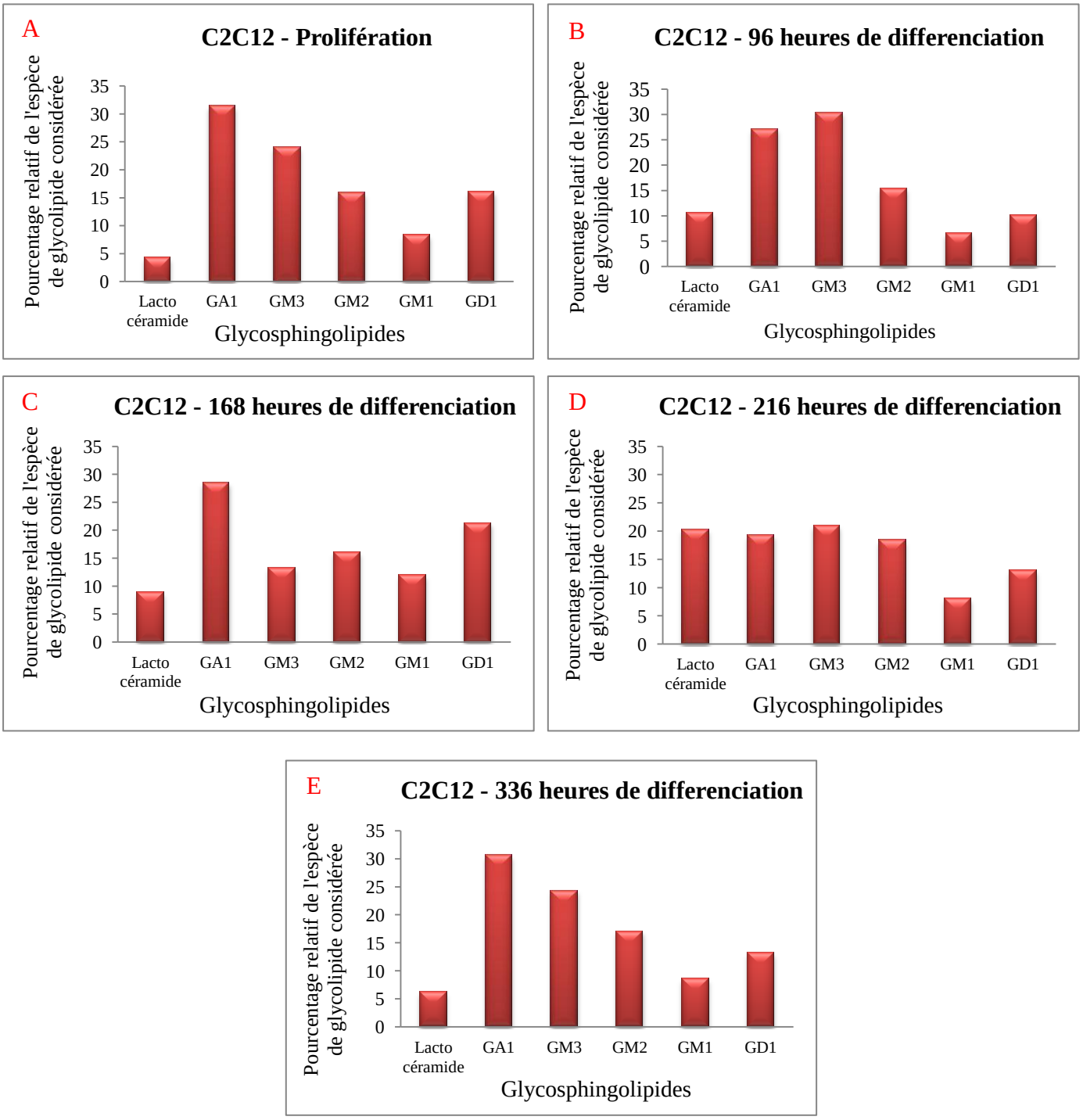


Figure 34 : Analyse des taux de gangliosides durant la différenciation des C2C12
Pourcentage des différents gangliosides (Lactocéramide, GA1, GM3, GM2, GM1, et GD), durant la prolifération (0heures - A) et les étapes de différenciation (96heures - B, 168heures - C, 216heures - D, et 336heures - E) ; les histogrammes sont obtenus à partir des profils MS. Pour chaque point, les pourcentages correspondant à différentes structures sont regroupés, et moyennés.

i. Evolution des différents types de gangliosides lors du processus de différenciation myogénique

La figure 35 montre des profils de distribution des gangliosides assez similaires entre les temps de la prolifération et le début de la différenciation (96 heures) considérés comme les étapes de différenciation primaires. Nous retrouvons une proportion assez importante du GA1 (31%) (Considéré comme le ganglioside neutre) et du GM3. Le reste des ganglisides (GM2, GM1 et GD1) est moins présent avec des pourcentages allant de 8% à 16 % ***(Figure 35-A & B)***. Une augmentation du GM3 est quand même observée à 96 heures de différentiation, il est aussi à noter une baisse des motifs GM1, et GD1 à 96 heures de différenciation ***(Figure 35-B)***. A 168 heures de différenciation ***(Figure 35-C)***, le GA1 reste à un taux de 28%, comparable à celui de la prolifération, par contre une baisse de toutes les formes de gangliosides est observée, mis à part le GD1 qui est à un taux comparable à celui observé en prolifération.

Pour le temps 216 heures ***(Figure 35-D)***, nous observons une tendance à l'augmentation des structures lactocéramides, et du GM2, en contrepartie nous observons une baisse du GA1, et du GM3. Au final, ces structures de gangliosides se stabilisent à un pourcentage quasi similaire (20%). Le GA1 est la seule forme qui est moins représentée à 216 heures, en comparaison avec les autres temps de cinétique.

Une observation intéressante, est l'augmentation du lactocéramide pendant les temps de différenciation 96 heures, 168 heures, et 216heures.

Au temps 336 heures ***(Figure 35-E)***, le profil pour toutes les structures est similaire à celui observé en prolifération, c'est-à-dire que le GA1 et le GM3 sont les gonglisides les plus exprimés. Hormis le pourcentage du GD1 qui reste légèrement inférieur par rapport au temps de prolifération, les pourcentages des GM2, GM1 sont quasi similaires au temps de prolifération.

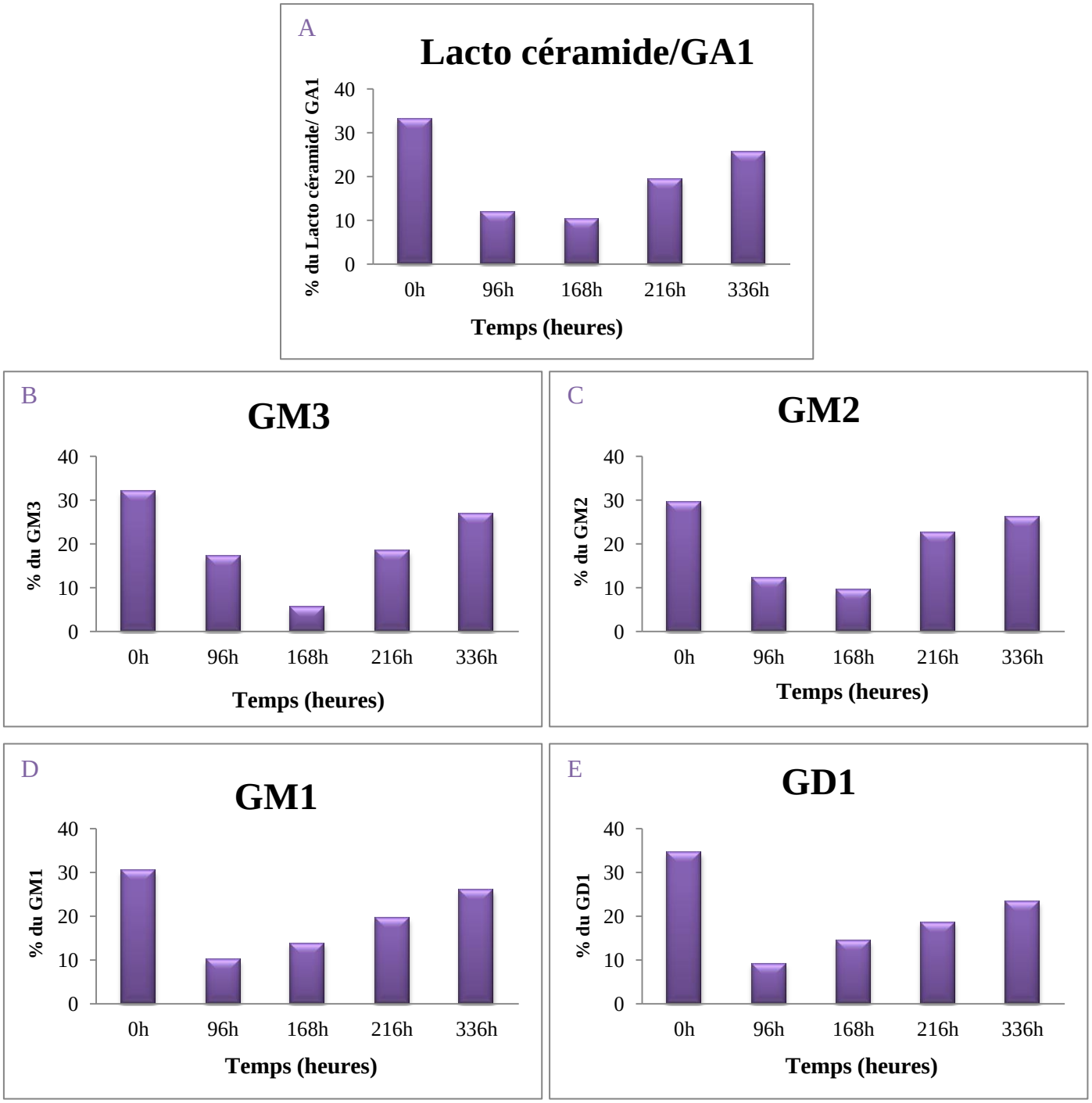


Figure 35 : Evolution de la proportion de certains gangliosides durant la différenciation des cellules C2C12
Pourcentage relatif des espèces de glycolipides durant la cinétique de differenciation :
- le temps de prolifération (0 heure) et les étapes de différentiation (96, 168, 216 et 336 heures).
Les histogrammes sont obtenus à partir des profils MS.
Les structures concernées : structures non sialylées (Lacto céramine, GA1) – A ; GM3-B ; GM2-C ; GM1-D ; GD1- E.
Les valeurs correspondent aux pourcentages moyennés pour chaque structure. La comparaison se fait pour la même structure entre les différents points de la cinétique de différenciation des C2C12.
même structure entre les différents points de la cinétique de différenciation des C2C12..

ii. Evolution des gangliosides durant la différenciation de la cellule musculaire

Pour analyser cette partie, et répondre à la question concernant l'évolution globale pour chaque ganglioside, j'ai regroupé ensemble les valeurs concernant les gangliosides qui ne portent pas d'acide sialique (Lactocéramide et GA1) ***(Figure 36-A)***.

De façon générale, nous observons que tous les gangliosides évoluent en suivant la même dynamique. En effet, une chute dans la quantité de toutes les formes est observée durant la différenciation. Au temps 336 heures, nous observons des taux quasi équivalents à ceux retrouvés en prolifération (0 heures).

Les quantités des gangliosides GM3 et GM2 évoluent de façon similaire lors de la différenciation des cellules C2C12 en myotubes. Leur quantité diminue progressivement et atteint le minimum à 168 heures. Par la suite, nous observons une augmentation progressive et régulière des taux de ces deux gangliosides jusqu'à la fin de l'analyse, sans pour autant qu'ils retrouvent leur valeur initiale ***(Figure 36-B & C)***.

Concernant GM1 et GD1, nous observons également une baisse importante et immédiate de leurs quantités durant les premières heures de différenciation, mais nous observons par la suite une augmentation progressive sans atteindre les valeurs obtenues en prolifération ***(Figure 36-D & E)***.

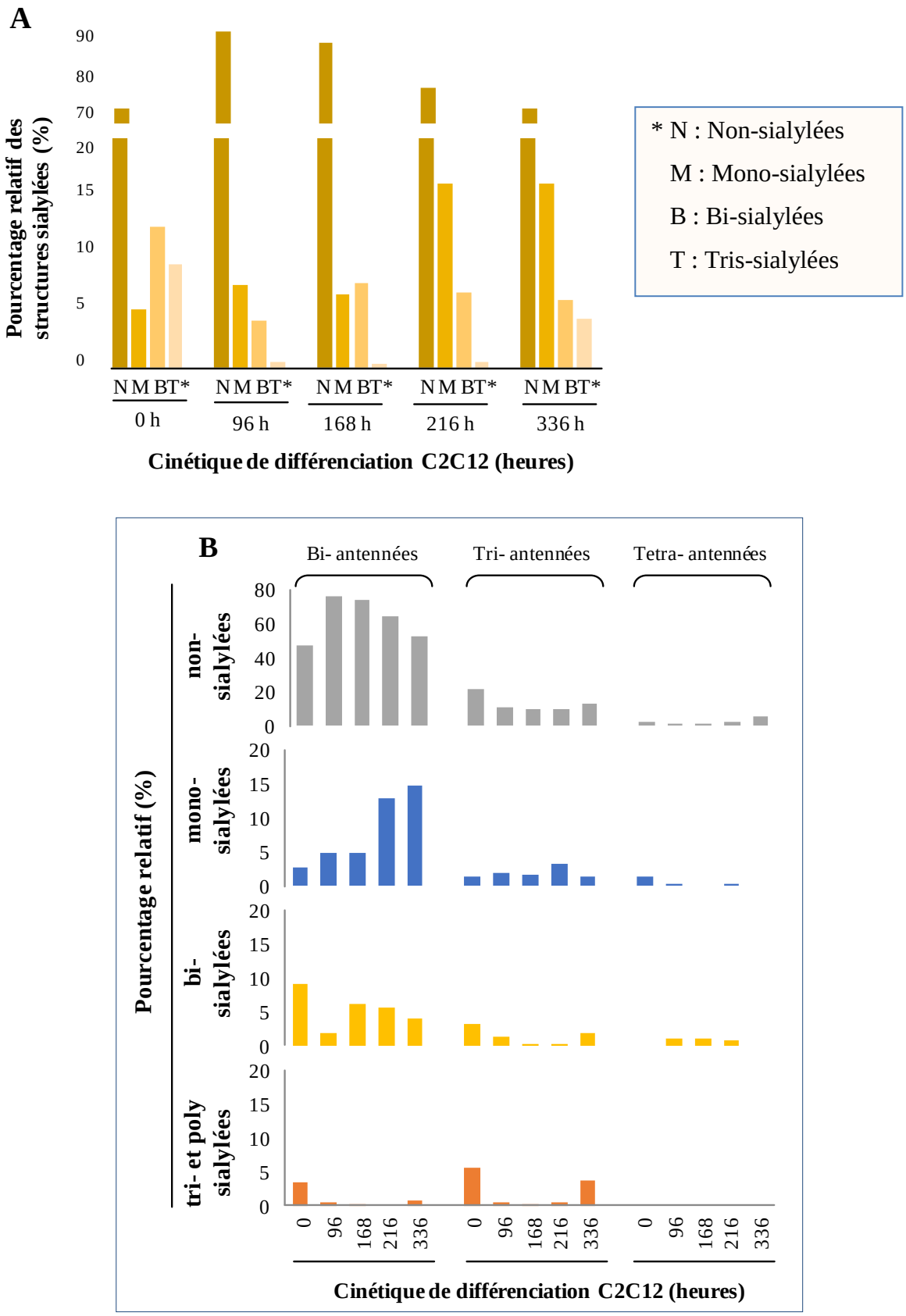


Figure 36 : Analyse de la structure des *N*-glycannes durant la différenciation des C2C12

A. Pourcentages des structures sialylées, (mono-, bi-, tri-) et non sialylées durant la cinétique de différenciation des C2C12, obtenus à partir des intensités des pics, la correspondance entre les pics et les structures est prédite grâce au logiciel 'glyco work bunch'.

B. Etats d'antennages des *N*-glycannes (structures non-, mono-, bi- et tri- sialylées) durant la cinétique de différenciation des C2C12. Ils sont déterminés à partir des intensités des pics, les structures proposées sont des prédictions de structures prédites par le logiciel 'glyco work bunch'.
La quantification relative pour chaque structure glycannique est calculée de la sorte : (l'intensité du pic pour le glycanne considéré) / (intensité de tous les pics) * 100.

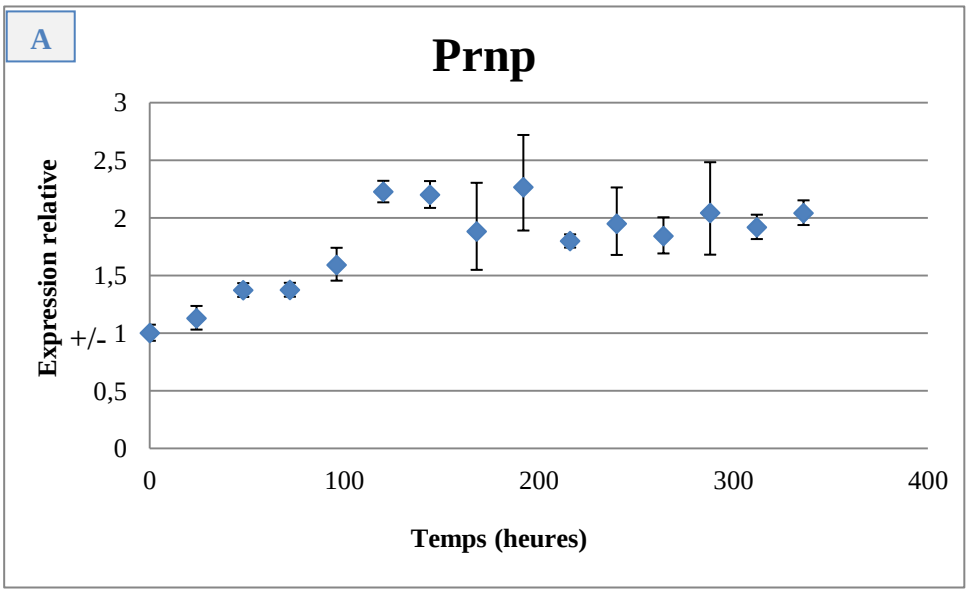
iii. Evolution de la sialylation des structures *N*-glycanniques lors du processus de différenciation myogénique

Nos résultats montrent clairement que les formes non sialylées augmentent progressivement durant les premières étapes de différenciation au détriment des formes tri- et polysialylées, cette augmentation atteint les 15% à 168h ***(Figure 37.A)***.En contrepartie, les motifs bi- et tri-sialylés subissent une baisse progressive au cours de la différenciation myogénique, pour atteindre le minimum de leur expression à 168h de différenciation. A partir de 216h nous commençons à observer une reprise des formes mono-sialylées, alors que les formes bi- et tri-sialylées restent à un taux basal ***(Figure 37.A)***.

Nous observons un rétablissement de ces formes sialylées en toute fin de différenciation à 336h, point à partir duquel nous postulons que la différenciation myogénique a atteint son maximum du moins dans notre modèle *in vitro* ***(Figure 37.A)***.

De plus, en se basant uniquement sur des prédictions de structures, établies grâce au logiciel « glyco work bunch », une corrélation est révélée entre l'évolution de la sialylation et le niveau d'antennage, l'ensemble des prédictions sont présentées en annexe (Annexes2 : supplément de résultats - Ms sur *N*-glycannes). Nous observons une prédominance des formes bi-antennées et bi-sialylées pendant les étapes de prolifération, cette forme est moins présente dans les temps de différenciation. En effet, pendant la différenciation, on observe une prédominance des formes bi-antennées et non sialylées (particulièrement pour les points 96h et 216h) pour revenir, à 336h de différenciation, à un niveau quasi équivalent à celui du 0h (prolifération). A la fin de la différenciation (216h et 336h) on commence à voir apparaitre les formes mono-sialylées, progressivement, pour atteindre un taux important à 336h ***(Figure 37.B)***. Pour les formes bi-sialylées et bi-antennées, elles diminuent progressivement durant les étapes de fusion (avec un minimum de 2% à 96h), pour laisser la place aux formes non- et mono- sialylées ***(Figure 37.B)***.

Pour les tri- et poly-sialylées qu'elles soient bi-, tri-, ou poly-antennées, leur présence est prédominante pendant la prolifération (0h), alors que nous observons une baisse de ces formes pendant la différenciation. Ceci corrobore bien la baisse de la sialylation durant la différenciation myogénique observée préalablement avec les lectines. Il est à noter, que la forme tri-antennée tri- et poly-sialylée a tendance à revenir en toute fin de cinétique (336h) à un taux équivalent à celui observé en prolifération ***(Figure 37.B)***.



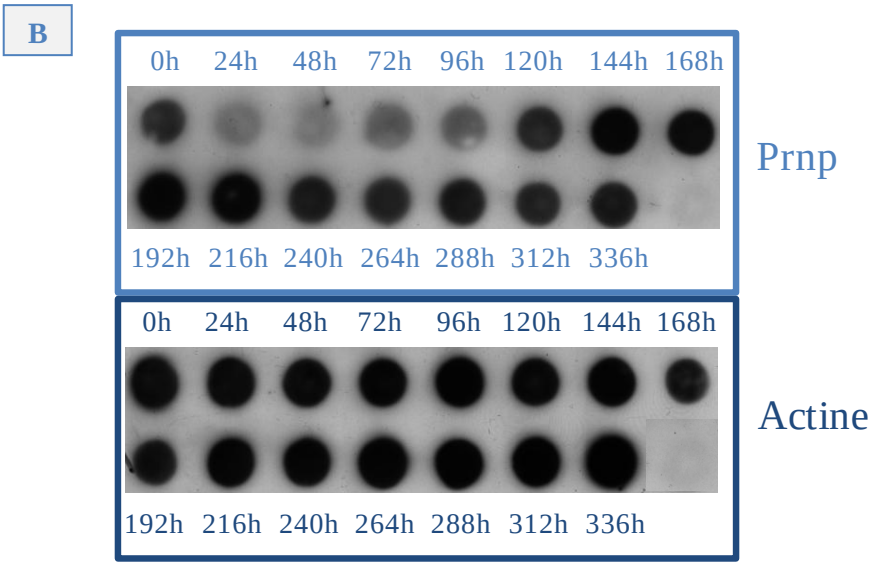


Figure 37 : Etude de l'évolution de la protéine prion (Prnp) durant la différenciation de la cellule musculaire

A- Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression du transcrit *Prnp* dans les cellules C2C12 à différents temps de différenciation myogénique. Les valeurs de quantité relative ont été normalisées par rapport à la quantité des ARNm des gènes de référence 18S et Gapdh. Le temps 0 heure a été considéré comme point de référence. Les cDNA, utilisés sont synthétisés à partir d'ARN extraits de cellules provenant de trois cinétiques de différenciation indépendantes.

B- Dot blot représentant l'expression de la protéine *Prnp* durant la cinétique de différenciation des C2C12. La manipulation est réalisée à partir d'extraits totaux de protéines issues d'une cinétique de différenciation. Le signal est obtenu avec l'Anticorps primaire Sha31 anti Prp, dilué au 1/100000. L'actine est utilisée comme protéine de référence.

2. Evolution de la glycosylation d'une protéine candidate

Parallèlement à l'approche globale de l'analyse des glycannes de surface, nous avons réalisé une analyse ciblée sur une glycoprotéine: la protéine prion. Bien que décrite comme particulièrement exprimée dans le cerveau, cette glycoprotéine est ubiquitaire et donc exprimée dans le muscle où sa fonction reste à définir. L'idée ici est d'évaluer au travers d'une glycoprotéine, le changement de glycosylation qui se produit au cours de la différenciation. Il est évident que des glycosylations spécifiques à certaines protéines pourraient avoir lieu sans pour autant être révélées sur la protéine prion.

Le choix de cette protéine comme modèle réside dans le fait que c'est une glycoprotéine membranaire *N*-glycosylée retrouvée au niveau des rafts lipidiques. De plus, les recherches passées de l'unité sur le prion apportaient une expertise quant à l'utilisation de cette protéine, d'un point de vue technique et du matériel (Anticorps, protéine recombinante…).

La protéine prion possède au moins 52 sites potentiels de glycosylation dont 2 de *N*-glycosylation (Chen *et al.*, 2002; Rudd *et al.*, 2002; Tuzi *et al.*, 2008), les autres étant potentiellement associés à de la *O*-glycosylation. Les deux sites de *N*-glycosylation sont aux positions N184 et N200 et ne sont pas obligatoirement occupés, d'où la présence simultanée de trois glycoformes (Lawson *et al.*, 2005) correspondant à la forme non-glycosylée (24 kDa), monoglycosylée (26 à 30 kDa) sur l'un ou l'autre des sites, et bi-glycosylée (30 à 35 kDa).

Avant d'analyser sa *N*-glycosylation, j'ai examiné les niveaux transcriptionnel et protéique de l'expression de la protéine prion durant la différenciation myogénique. L'expression du gène *Prnp*, par qRT-PCR, augmente jusqu'à 240 heures de différenciation myoblastique puis se stabilise pour des temps plus longs ***(Figure 38-A)***.

A l'échelle protéique, les résultats obtenus par dot-blot corroborent ceux obtenus par qRT PCR, bien que le signal correspondant à la protéine a tendance à diminuer vers la fin de la différenciation ***(Figure 38-B)***.

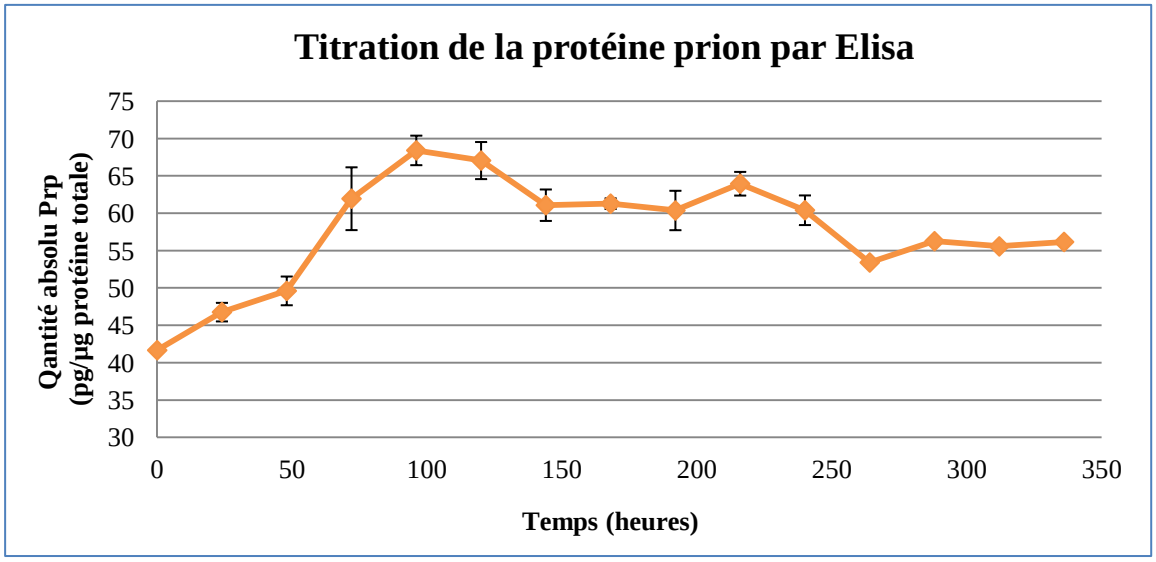


Figure 39 : Quantification de la protéine prion au cours de la cinétique de différenciation des C2C12

La même quantité de protéine totale a été déposée pour chaque temps de cinétique, Les valeurs correspondent à la lecture de la DO à 416nm.

Le signal est relativement proportionnel à la quantité de protéine fixée par rapport à la quantité de protéine totale (1µg), la manipulation est réalisée en triplicat technique et duplicat biologique sur des cinétiques indépendantes.

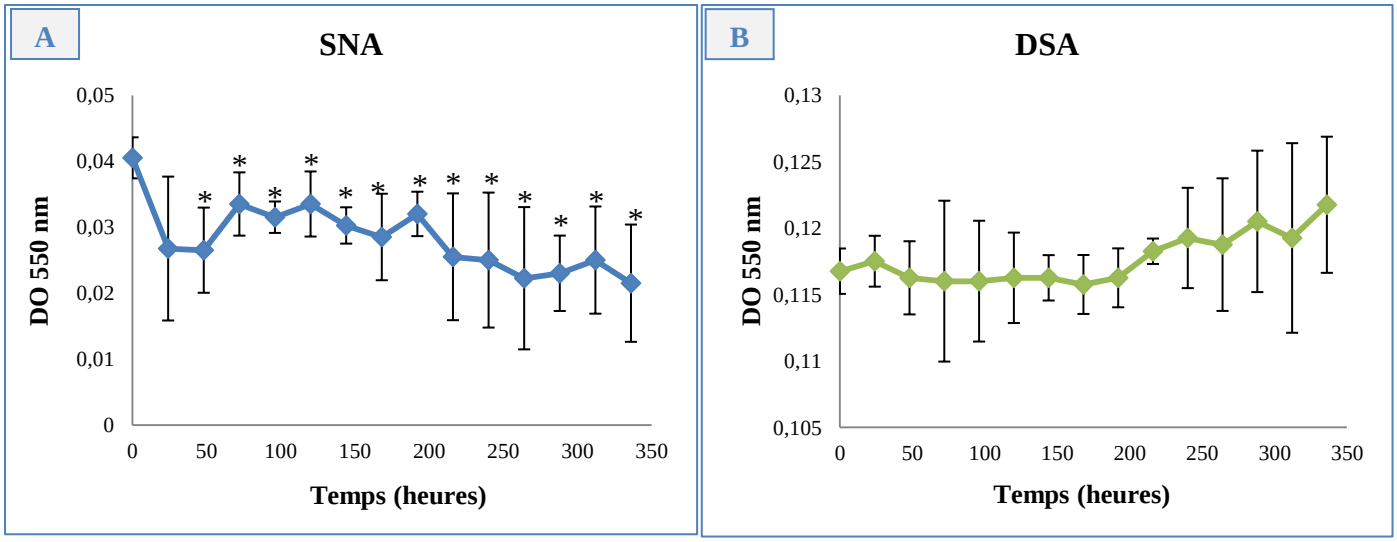


Figure 38: Résultat Elisa lectine sur la protéine prion au cours de la cinétique de différenciation des C1C12.

Une quantité équivalente de protéine prion a été déposée pour chaque point (1µg).

La protéine prion fixée sur le support grâce à un anticorps anti Prp (Sha31), a été mise en contact avec les lectines d'intérêt couplées à la Digoxygénine. Le signal est obtenu grâce à un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline.

Les valeurs correspondent aux absorbances colorimétriques obtenues par la réaction NBT-BCIPqui reflète la fixation de la lectine sur les motifs *N*- glycanniques portées par la protéine prion.

A. détection de la sialylation en α2-6 par SNA.
B. détection du motif Gal-GlcNAc β1-4 par DSA.

2. a. Titration de la protéine prion par Elisa

L'analyse des *N*-glycannes portés par la protéine prion, lors du processus de différenciation myogénique, nécessitait de travailler avec une quantité constante de protéine prion. Dans ce but, une quantitication absolue de la protéine par Elisa sandwich lors du processus de la différenciation myogénique a été réalisée [Cf protocole : (Ermonval *et al.*, 2009)].

En accord avec les résultats précédents, la quantité de protéine prion augmente en début de phase de différenciation (passage de 41,7 à 68,4 pg/µg de protéines totales) jusqu'à 96 heures ***(Figure 39)***. Par la suite, la quantité diminue progressivement pour atteindre 56,1 pg/µg à 336 heures de différenciation.

Supplément : Protocole expérimental :

La même gamme étalon a été utilisée pour obtenir une quantification pour chacun des duplicats biologiques. Les échantillons ont été soumis aux mêmes conditions de manipulation que les protéines totales issues des cinétiques de différenciation.

Une quantification absolue des protéines totales pour chaque point de cinétique a été réalisée par la méthode de Bradford, afin de normaliser les quantités de protéine prion par rapport à la quantité de protéines totales (pg/µg de protéine totale) *(Tableau 1- Annexe : Suppléments de résultats)*.

Pour l'Elisa sandwich, La protéine prion a été captée par un anticorps spécifique (Sha 31- 100ng/puits dans du Tampon sodium phosphate 100mM, pH 8.5), et révélé par un deuxième anticorps anti Prp (SAF 84 - 100ul/puits, dilution au 1/1000eme dans du Tampon sodium phosphate 100mM, pH : 8.5) couplé à HRP, la révélation est réalisée par une réaction peroxydase, la lecture de DO se fait à 416nm.

Pour l'Elisa lectine, les premières étapes de captage de la protéine sont les mêmes que précédemment, l'équivalent de 1 µg en quantité absolue de protéine prion à été déposé pour chaque condition, en fonction du point de cinétique, les volumes ont été réajustés à 200µl avec du PBS. Dans la suite de la manipulation, les mêmes conditions concernant les tampons et les concentrations des lectines ont été utilisées.

2. b. Etat de glycosylation de la protéine prion

La technique de l'Elisa lectine sur la protéine prion, permet d'observer les modifications des structures de glycannes. Cette technique associe les premières étapes de l'Elisa sandwich qui consiste en une capture de la protéine d'intérêt sur un support grâce à un anticorps spécifique. Par la suite, la protéine fixée est mise en contact avec des lectines qui se fixeront quantitativement sur les glycannes portés par la protéine.

Cette expérience est réalisée sur des extraits de protéines totaux à partir des cellules C2C12 en prolifération et à différents temps de différenciation.

Pour la MAA, qui détecte la sialylation en α2,3 , aucun signal n'a été visible, ce qui témoigne de l'absence d'acide sialique lié en α2,3 dans les *N*-glycannes portés par la protéine prion.

Concernant la SNA (pour observer la sialylation en α2,6) une tendance à la baisse devient significative à partir de 72 heures de différenciation ***(Figure 40.A)***. En contrepartie le marquage par la DSA (détection des résidus Gal porteurs d'acide sialique) présente une tendance à l'augmentation. Cette hausse correspondrait au démasquage progressif des résidus galactose, consécutif à la baisse progressive de la sialylation ***(Figure 40.B)***.

Ainsi, cette expérience, réalisée en parallèle des manipulations de lectines sur cellules entières, confirme bien une hyposialylation au cours de la différenciation des cellules C2C12.

A ce stade du projet, nous avons décidé de suivre la piste de la sialylation, néanmoins, afin de centrer nos objectifs, et pour respecter le temps qui m'était imparti, nous avons décidé de nous intéresser uniquement à la *N*-glycosylation et à la sialylation en α2,6.

3. Etude fonctionnelle des populations clonales sous-exprimant *St6gal1*

Dans le but, de confirmer le lien entre la baisse de la sialylation et la différenciation des cellules C2C12, nous nous sommes intéressés aux niveaux de transcription des gènes codant pour des acteurs de la sialylation en α2,6 sur le ganactose, notamment des sialyltransférases impliquées dans l'ajout ce motif, ainsi que des sialidases responsables du clivage de l'acide sialique.

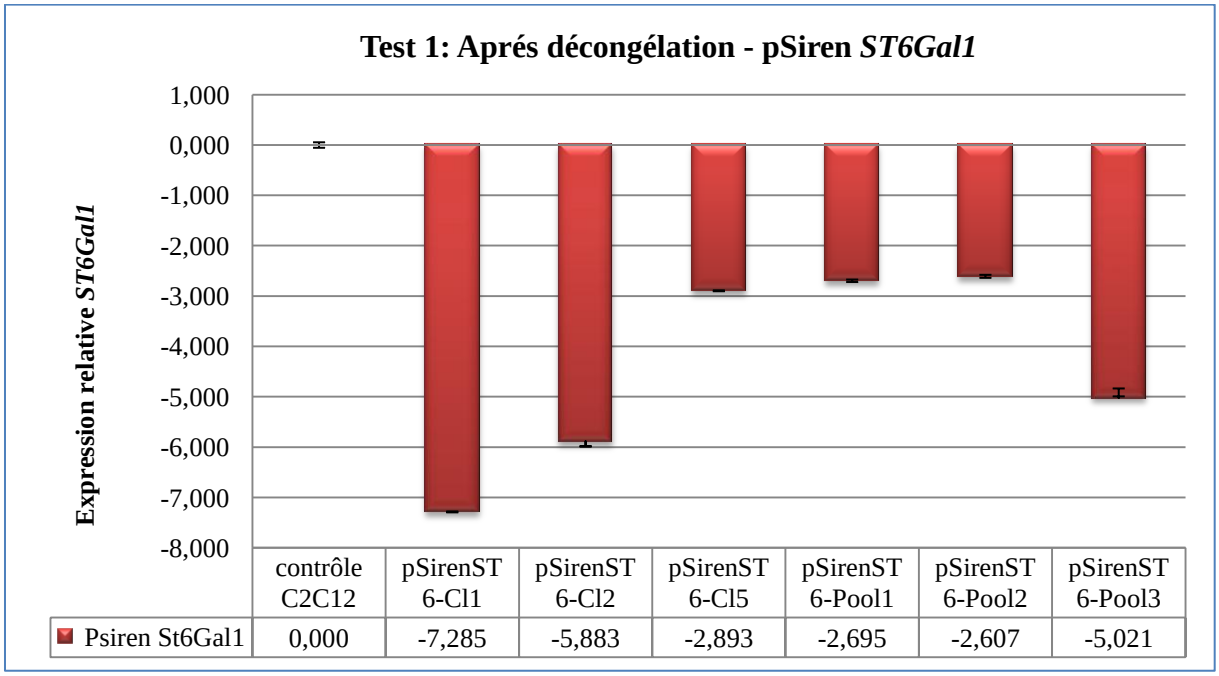
Notre choix s'est porté sur les gènes codant les sialyltransférases *St6gal1* et *St6gal2*, responsables du greffage de l'acide sialique en α2,6 sur les *N*-glycannes portés par des glycoprotéines et des glycannes libres, ainsi que sur les génes codant les sialidases *Neu1*, *Neu2*, *Neu3*, et *Neu4*.

La première étape, préalable à l'étude de la dynamique d'expression de ces gènes, a consisté à vérifier leurs expressions dans notre modèle cellulaire, cette vérification nous a permis de constater que les gènes *St6gal2* et *Neu4* n'étaient pas exprimés dans les cellules C2C12, ces deux gènes ont été écartés de l'étude.

Pour les gènes *St6gal1*, *Neu1*, et *Neu2* nous avons constaté une évolution de leur dynamique d'expression durant la différenciation des C2C12. En revanche, nous n'avons pas observé de différences significatives dans l'expression de *Neu3*. L'ensemble de ces résultats sont exposés dans la figure 2 - Article.

Grâce à la première partie, nous avons établi le changement de sialylation au cours des étapes de fusion myoblastique. Pour établir une relation entre cette modification des structures périphériques et la différenciation de la cellule musculaire, des clones sous-exprimant les gènes d'intérêt ont été réalisés. Pour ce faire, nous avons utilisé des sh-RNA, Des rétrovirus comme mode d'infection, et le vecteur d'extinction pSiren (cf. référence RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector - Clontech Laboratories).

Ainsi, des clones sous-exprimant *Neu1*, *Neu2* et *St6Gal1* ont été réalisés, seuls les clones sous-exprimant *St6gal1* ont été pour le moment analysés.



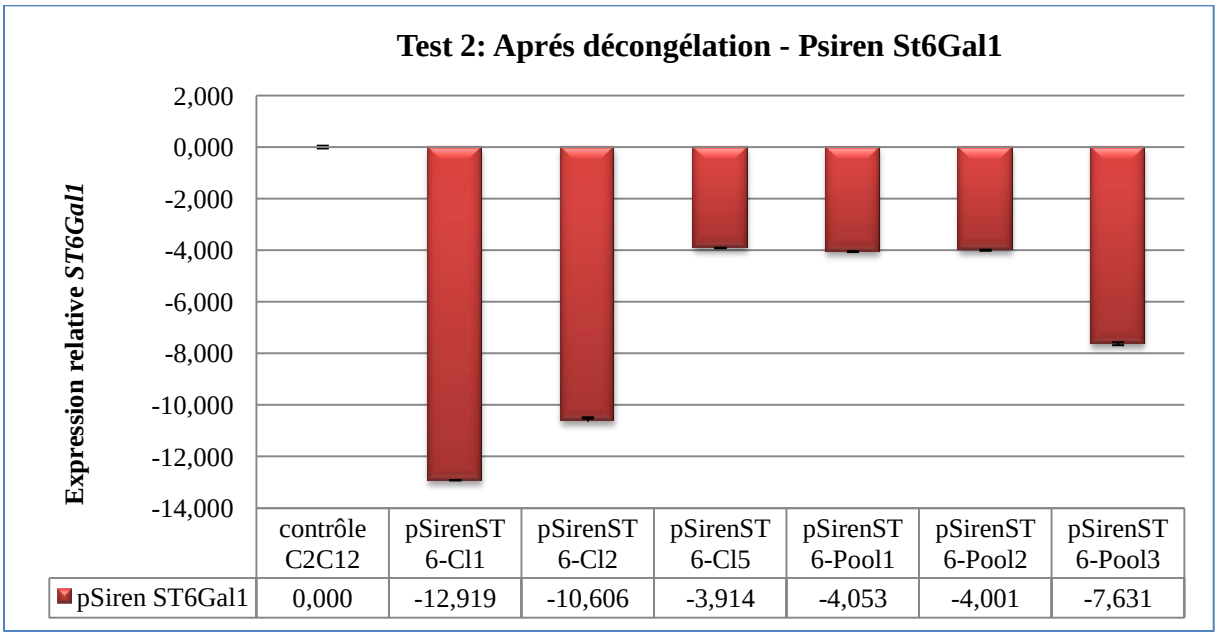


Figure 40: Expression de *St6Gal1* dans différents clones C2C12 transfectés stablement par le vecteur pSiren-Sh *St6Gal1*

L'analyse a été réalisée dans le but de vérifier la stabilité de l'expression du ShRNA qui cible l'ARNm du gène *St6Gal1* dans les clones transfectés. Les valeurs correspondent à des quantités relatives (RQ) d'ARNm, déterminées par rapport aux cellules témoins, non transfectées. Les résultats ont été normalisés avec deux contrôles endogènes (18S, et Gapdh). Les pools sont constitués à partir d'un mélange cellulaire hétérogène obtenu par transfection stable avec le vecteur d'intérêt, et non isolées en clones.

3. a. Validation des clones sous-exprimant *St6Gal1*

i. Stabilité du transgène

Cinq clones et trois « pools » ont été examinés. Pour choisir les clones les plus intéressants nous avons utilisé comme critères de sélection, le niveau d'expression et la stabilité des clones après congélation.

Les clones 3, 4 et 5 ont présenté de nombreuses difficultés (difficulté de prolifération, mort cellulaire accrue, sensibilité aux changements de culture les plus mineurs), ces clones ont été écartés de l'étude.

Après deux cycles de décongélation, les 2 clones restants ainsi que les 3 "pools" présentaient une certaine stabilité phénotypique ainsi qu'un niveau d'extinction de *St6gal1* relativement constant ***(Figure 41 -A & .B)***.

Les 2 clones (1, 2) ont été maintenus dans l'étude ainsi que le pool 3, ils ont été nommés pSiren ST6-cl1, pSiren ST6-cl2 et pSiren ST6-pool. En parallèle, des clones pSirenMock, ont été construits, ces cellules ont été transfectées dans les mêmes conditions avec le même vecteur portant un shRNA qui ne cible rien dans nos cellules.

Ces derniers ont été utilisés comme contrôles, montrant que le phénotype obtenu n'était pas lié à la technique de transfection utilisée, mais bien à l'extinction de notre gène d'intérêt.

ii. Validation par les lectines de l'hyposialylation périphérique en α2,6

Avant de procéder à l'étude fonctionnelle, c'est-à-dire à l'examen de l'aptitude des clones à se différencier, des manipulations de contrôle ont été réalisées pour confirmer la diminution quantitative de la protéine ST6Gal1 ainsi qu'à vérifier la baisse de la sialylation périphérique en α2,6 (Figure 4-article) dans les clones shRNA *St6Gal1*.

D'abord, en utilisant la lectine SNA, nous avons bien observé une différence de fixation sur nos clones en comparaison avec les cellules C2C12 contrôle ***(Figure 42)***, ce qui témoigne d'une baisse significative de la sialylation périphérique en α2,6. Cette manipulation apporte une valeur ajoutée aux expérimentations de fluomarquage membranaire par des lectines (cf. protocole et résultats- partie article). En effet, grâce à la réaction colorimétrique, nous avons quantifié le niveau de diminution de la sialylation périphérique dans nos clones.

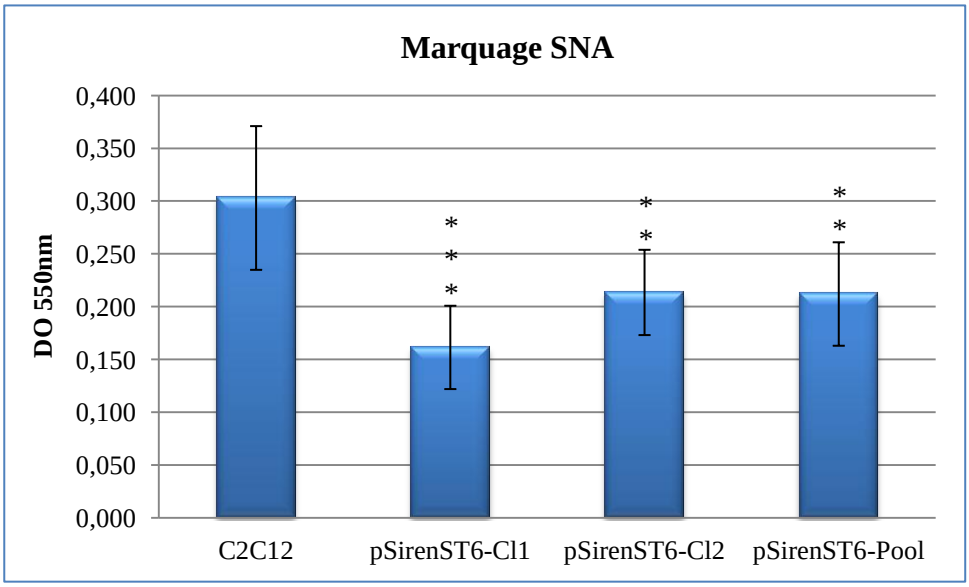
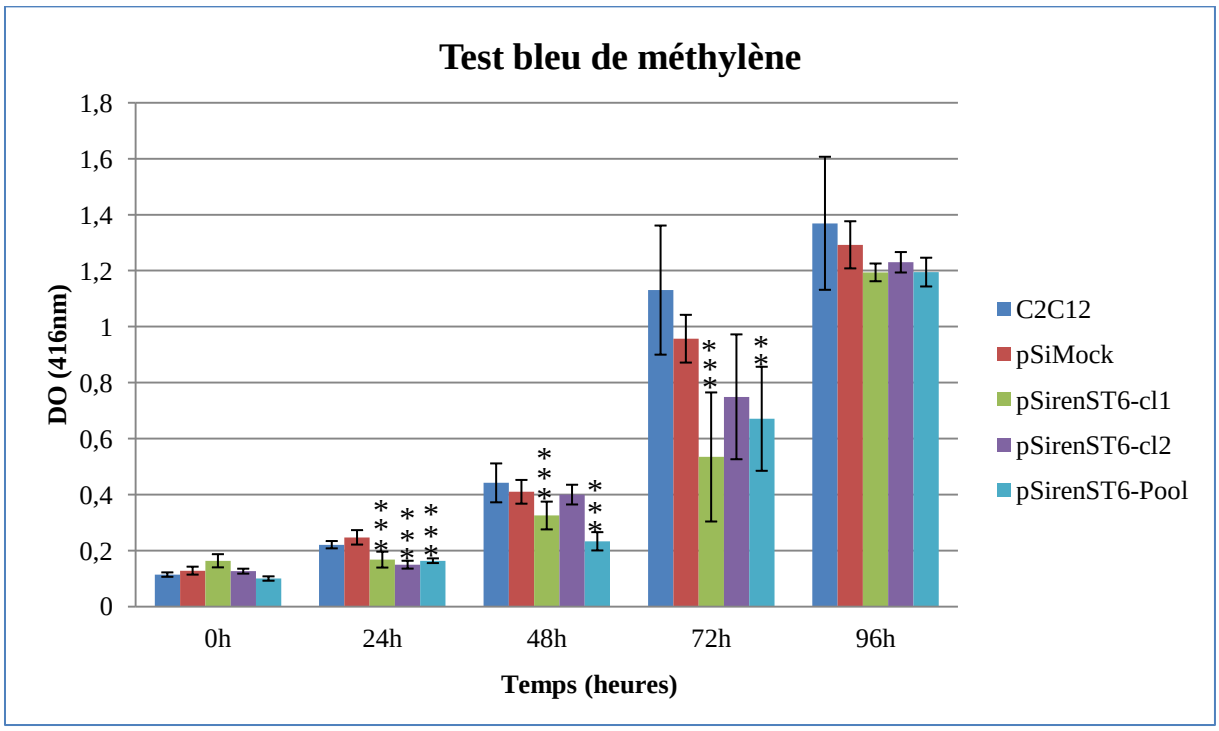


Figure 41: Détection de la α2, 6 sialylation sur les clones sous exprimant la St6gal1

Les cellules ont été mises en contact avec la SNA couplées à la Digoxygénine, pour la détection de la sialylation en α2-6. Le signal est obtenu grâce à un anticorps secondaire anti-digoxigenie couplé à la phosphatase alcaline.

Les valeurs de DO à 550 nm, correspondent aux absorbances colorimétriques obtenues par la réaction NBT-BCIP, et qui reflètent la fixation de la lectine aux motifs sialylés en α2-6 membranaire.

Le test statistique est un test de student : * - P 0.05, **- P 0.01, ***- P 0.005



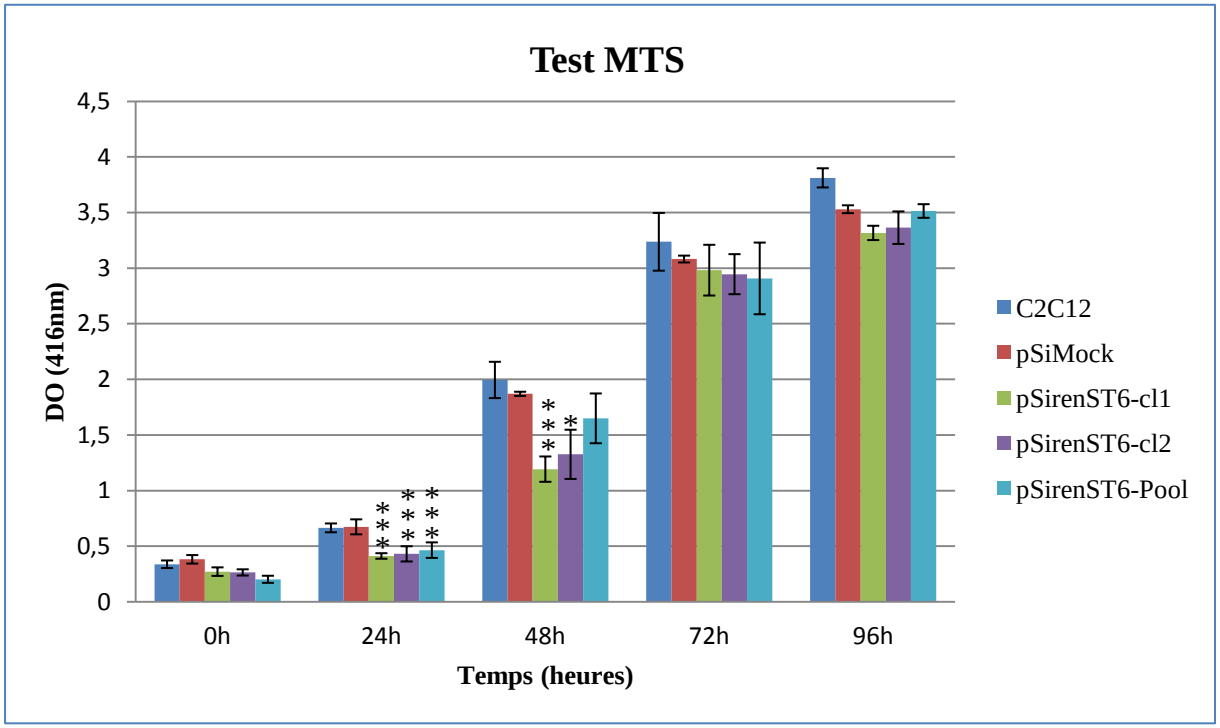


Figure 42: Test de prolifération sur les clones pSiren St6Gal1
La prolifération des cellules sous-exprimant *St6gal1* a été analysée par deux méthodes différentes pour pallier aux limites de chacune. Les valeurs correspondent à des moyennes réalisées à partir des valeurs de DO obtenues en triplicats techniques, et en duplicats biologiques pour chaque manipulation. Les valeurs de DO ont été normalisées à un blanc qui correspond à l'absorbance des substrats en absence des cellules.
Le test statistique est un test de student : * - P 0.05, **- P 0.01, ***- P 0.005

iii. Test de prolifération

En plus de leur aptitude à se différencier (voir article), les clones sous-exprimant *St6gal1* ont été soumis à des tests de prolifération. Les cellules ont été ensemencées à la même densité 12 heures avant le temps 0h (temps correspondant à la première lecture), de sorte qu'elles aient le temps d'adhérer au support de culture sans pour autant entamer une phase importante de prolifération. Nous avons appliqué la technique MTS qui est basée sur l'activité métabolique des cellules et la technique de pénétration du bleu de méthylène dans les cellules vivantes.

Les résultats obtenus avec ces deux manipulations montrent la même tendance dans la prolifération des clones par rapport aux contrôles C2C12 et les pSirenMock ***(Figure 43- A-B)***. En effet, nous observons un retard de prolifération des clones pSirenST6 et le « pool », particulièrement aux premières heures (les premières 48h) ; néanmoins l'écart a tendance à se réduire à partir de 72h ; ceci étant particulièrement visible avec la technique MTS. Avec le bleu de méthylène, la différence de prolifération est confirmée, sauf pour le clone 2 qui semble rattraper son retard.

Discussion

La plus part des glycoconjugués impliqués dans la myogenèse sont essentiellement retrouvés à la surface de la membrane plasmique ou au niveau de la matrice extracellulaire. Les fonctions biologiques des glycannes sont principalement portées par les monosaccharides périphériques des glycoprotéines et des glycolipides, comme le galactose, le N-acétylgalactosamine, le fucose, et l'acide sialique. Ce dernier en particulier semble intervenir dans les interactions cellulaires du fait de son encombrement stérique, son volume d'hydratation, et les charges négatives qu'il porte (Ricci *et al.*, 2006).

Le rôle des glycannes terminaux est d'autant plus important qu'ils sont reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques porteurs de domaines lectines (Gunten and Simon, 2006). Les premières études visant la dynamique des glycoconjugués dans un contexte myogénique ont montré des modifications de la taille et de la composition des glycolipides de surface de la lignée myoblastique L6 de rat (Wahrmann *et al.*, 1980). De même, il a été montré un changement du profil de fixation de la lectine concanavaline A (ConA), qui reconnait des *N*-glycannes (Senechal *et al.*, 1983). Cette expérience a été réalisée sur des extraits de glycoprotéines membranaires à différents temps de différenciation des cellules L6 (Senechal *et al.*, 1983; Weintraub *et al.*, 1989).

Une étude plus récente, conduite sur les cellules C2C12, a révélé plusieurs familles de protéines *N*-glycosylées potentiellement impliquées dans la fusion, mais aucune donnée sur les modifications des motifs glycanniques n'a été générée (Gundry *et al.*, 2009).

Au laboratoire l'étude de Mathilde Janot, a bien montré une dynamique au niveau transciptomique des glyco-gènes, néanmoins cette étude n'a pas apporté de données sur les structures glycanniques de surface (Janot *et al.*, 2009).

De ce fait, l'objectif de ce travail a été d'établir une relation entre les structures glycanniques périphériques et les étapes de fusion myoblastiques. Dans cette première partie, nous avons réussi à mettre en évidence des changements dans les structures glycanniques de surface durant la fusion myoblastique *in vitro*. Elle concerne à la fois le degré d'antennage des *N*-glycannes et leur niveau de sialylation. La baisse de la sialylation périphérique au cours de la différenciation des cellules C2C12 est cohérente avec le fait que le processus de fusion myoblastique mette en jeux un rapprochement et des contacts cellulaires. En effet, il est possible qu'une sialylation accrue nuise à l'interaction entre cellules destinées à fusionner.

Néanmoins la suite de l'étude, notamment l'étude fonctionnelle des clones sous-exprimant la sialyltransférase ST6Gal1, a mis en évidence une réelle modification dans le profil

d'expression des principaux acteurs (Myf6 en particulier) impliqués dans la fusion myoblastique.

Les clones sous-exprimant *St6gal1* présentent un retard de prolifération comparativement aux contrôles. Ce retard n'est observé que dans les premières heures de prolifération car rapidement, les clones rattrapent ce retard. Par contre, lors de l'initiation de la différenciation, les clones poursuivent en phase de prolifération jusqu'à 12 heures après les contrôles C2C12 et pSirenMock (Observation personnelle). Malgré cette phase de prolifération prolongée observée dans les clones sous-exprimant *St6gal1*, aucunes différences dans les indexes de fusion en début de cinétique de différenciation n'est observée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les clones présentent un rythme de différenciation plus rapide que les cellules « contrôles ».

Une autre explication pourrait concerner l'expression de *MyoD* qui s'exprime plus tardivement dans les clones par rapport aux cellules contrôles. En effet durant la différenciation des C2C12, l'augmentation de l'expression de *MyoD* induit une sortie du cycle cellulaire, et l'activation de la transcription d'autres gènes myogéniques tels que *MyoG* et *Myf5* (Guo et al., 1995; Rudnicki and Jaenisch, 1995).

Une hypothèse concernant les clones sous-exprimant *St6gal1* serait que *MyoD* ne constituerait pas un élément décisif dans l'entrée en différentiation des clones. Par contre, l'implication de *MyoG* pourrait être envisagée car son expression est augmentée dans les clones et coïncide avec l'apparition des premiers myotubes.

MyoD reste toujours moins exprimé dans les clones par rapport aux cellules C2C12, en dépit du fait que son expression augmente dans les clones après le lancement de la différenciation. Cette augmentation de l'expression de *MyoD* au sein des clones sous-exprimant *St6Gal1*est suivi de près par les pics d'expression de *MyoG*.

Cette observation pourrait signifier que les myoblastes qui présentent une hypo-sialylation périphérique (clones sous-exprimant *St6gal1*) ne présentent pas le même programme myogénique que les contrôles. Ceci reste toutefois très difficile à démontrer. En effet, nous n'avons considéré que l'expression de certains facteurs impliqués dans la différenciation myogénique, alors que la sialylation a un impact pléiotrope dans la cellule. Une stratégie de type gène candidat n'est donc pas envisageable sur les clones.

La poursuite des analyses des clones pourrait être envisagée via une stratégie plus globale de type 'Genom wide'. En mesurant sur la totalité du transcriptome, des facteurs connus comme étant impliqués dans la différenciation, nous pourrions ainsi avoir une vision plus globale concernant les facteurs modifiés dans les clones qui sous expriment la *St6gal1*.

De plus, nous pourrions analyser l'expression des miRNA dans les clones grâce à des puces dédiées. En effet, plusieurs études ont montré l'implication de ces ARNs dans le programme myogénique, notamment les miR-1, les miR-133, les miR-206, les miR-125b, les miR-23a, les miR-486 (Wang, 2013).

Des études globales de comparaison des profils d'expression entre les clones sous exprimant la *St6gal1* et les cellules contrôles, sont à envisager dans l'optique de répondre à des questions concernant les phénotypes observés chez les clones, et qui restent en suspend.

La différence dans le phénotype de différenciation entre les contrôles et les clones sous-exprimant réside en premier lieu dans la vitesse de différenciation. Les clones finissent leur différenciation plus précocement pour atteindre un maximum de 80% de différenciation à partir de 192h contre 55% pour les C2C12 et les pSiren Mock. Nous avons aussi remarqué qu'en plus d'avoir une fusion myoblastique accélérée, celle-ci est augmentée. En effet, nous observons un nombre de myotubes plus important dans les clones par rapport aux contrôles, en plus la taille des myotubes est beaucoup plus importante dans les clones que dans les cellules C2C12 « contrôle ».

Nous avons constaté que les clones sous-exprimant *St6gal1* présentent un nombre plus important de myotubes avec en plus un nombre de noyaux supérieur à 10 au fur et à mesure que nous avançons dans la cinétique de différenciation. Ceci peut être expliqué par une efficacité différente de la fusion secondaire. Dans notre travail nous avons mis en évidence une expression plus forte de *Myf6* dans les clones sous-exprimant *St6gal1*, acteur important de la fusion secondaire.

Dans un travail publié en 2007, Jin *et al.* ont étudié l'expression, la modulation, et l'activité de *Myf6* dans un contexte myogénique. Les résultats montrent qu'une expression ectopique de *Myf6* dans les premières heures de différenciation, induit la prolifération des myoblastes, en activant la cycline E, et en régulant négativement p21. De plus, cette expression précoce de *Myf6* induit la dégradation de la protéine MYOD (Jin *et al.*, 2007). Les auteurs ont conclut que MYOD, et MYF6 pourraient avoir un rôle antagoniste sur la différenciation myogénique. Les auteurs ont émis l'hypothèse de l'existence d'une régulation négative mutuelle entre les protéines MYOD et MYF6, en fonction de l'étape de différenciation des cellules (Jin *et al.*, 2007). La baisse de l'expression de *MyoD* dans nos clones pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression de *Myf6*, par la levée de l'inhibition induite par la protéine MYOD. De plus, *Myf6*, qui est impliqué dans la fusion secondaire (Sabourin and Rudnicki,

2000), pourrait expliquer la taille des myotubes, et le nombre important de noyaux observés dans les conditions d'hyposialylation.
Nous avons également constaté qu'en situation d'hyposialylation, l'index de fusion des cellules atteint des valeurs bien supérieures à celles obtenues dans les conditions contrôle. Ce plus grand nombre de cellules en différenciation provient probablement de la population de cellules de réserve ; qui représentent dans notre modèle (C2C12) entre 30 et 35%. Dans des conditions standards, ces cellules ne rentrent pas en différenciation, et sont maintenues dans un état de quiescence. Un des marqueurs les plus utilisés pour identifier les cellules de réserve est le facteur Pax7. Nous avons constaté une forte sous-expression de ce facteur (1000 à 3000 fois moins) dans les clones sous-exprimant *St6gal1*, par rapport aux cellules contrôles.

La déplétion accrue des cellules de réserve (*Pax7*+) dans les clones sous-exprimant *St6gal1* peut expliquer la taille des myotubes, et le taux de fusion qui atteint les 80%. En effet, la déplétion en *Pax7* induit en différenciation des cellules qui devaient initialement rester quiescentes. De ce fait, nous observons l'engagement d'un plus grand nombre de cellules en différenciation au détriment de la population de cellules de réserve.

L'expression retardée et amoindrie de *MyoD* dans les clones pourrait être aussi due à une faible expression de *Pax7*. En effet, *in vivo* l'expression de ces deux facteurs (*MyoD* et *Pax7*) est concomitante et a lieu pendant la migration et la détermination de la lignée myogénique (Lagha *et al.*, 2008). De plus, des souris double *KO Pax3/7* sont capables de former le dermomyotome précoce, mais la différenciation myogénique est stoppée. Les cellules progénitrices s'engagent vers un autre devenir que musculaire et se caractérisent par l'absence d'expression des facteurs myogéniques *MyoD* et *Myf5* (Relaix *et al.*, 2005).

Ainsi les observations réalisées *in vivo* sur les souris *KO Pax3/7* pourraient suggérer que l'expression de *Pax7* est essentielle pour l'expression des facteurs myogéniques précoces, tels que *MyoD*. De plus dans les premières étapes de fusion de notre modèle cellulaire (C2C12), nous observons l'existence d'une population cellulaire qui exprime *MyoD* et *Pax7* simultanément (Der Vartanian *et al.*, 2015).
Au cours de notre investigation, nous avons constaté une dynamique dans la présence de motifs *O*-glycanniques portés par des mucines. L'implication des *O*-glycannes dans la différenciation musculaire n'a pas fait l'objet de beaucoup d'investigations, à l'exception de l'étude faite dans le laboratoire sur la *O*-fucosylation, et la *O*-glucosylation du récepteur

Notch (Der Vartanian *et al.*, 2015). Dans ce contexte, une des études les plus pertinentes a été réalisée sur les *O*-glycannes des mucines portées par le domaine MSD des NCAM dans le muscle squelettique. Il a été montré que ce glycoconjugué était important du fait de sa reconnaissance par des lectines spécifiques (Walsh *et al.*, 1989). Il faudra attendre 2003, avec l'étude de Suzuki, pour avoir plus d'informations sur les mucines et le développement musculaire. En utilisant les C2C12, les auteurs ont montré, par mutagénèse dirigée contre le domaine MSD, que l'absence du *O*-glycanne de type mucine diminue la fusion myoblastique. Le *O*-glycanne porté par ce domaine semble donc jouer un rôle primordial dans les interactions de la NCAM au cours du développement musculaire. Les résultats, que nous avions obtenus avec la PNA soulignent également une baisse générale de ce type de glycosylation au cours de la différenciation. Dans l'état actuel de nos résultats, aucune relation ne peut être effectuée entre notre travail et les travaux effectués sur ce motif glycannique. En effet, nous avons observé l'évolution globale de ce type d'*O*-glycosylation au niveau membranaire, alors que les travaux retrouvés dans la littérature se sont focalisés sur une seule protéine candidate (la NCAM) (Suzuki *et al.*, 2003a). Le même travail a montré que forcer la polysialylation portée par les *N*-glycannes des NCAM durant les premières étapes de différenciation inhibe la fusion musculaire (Suzuki *et al.*, 2003a). Ce résultat corrobore l'idée que la sialylation régule négativement la fusion myoblastique, c'est la raison pour laquelle nous observons une baisse physiologique de celle-ci durant la fusion myoblastique.

Des résultats préliminaires ont été générés concernant le ganglisides. Peu d'éléments sont connus sur l'implication des glycosphingolipides dans la myogenèse, et pourtant ils représentent une proportion importante de la membrane plasmique. De ce fait, ils sont au premier rang dans les interactions membranaires mises en jeu lors de la fusion myoblastique. Chez l'homme et la souris, le GM3 est le ganglioside le plus représenté dans le muscle squelettique (Müthing *et al.*, 1994; Cacić *et al.*, 1994; Müthing and Cacić, 1997). Les glycosphingolipides partagent avec les glycoprotéines plusieurs structures glycanniques terminales. Les glycosphingolipides sont connus pour être des médiateurs de l'adhésion cellulaire et de la transduction du signal (Hakomori *et al.*, 1998). Ces propriétés physiologiques résultent de leur capacité à se regrouper en micro-domaines membranaires (les rafts lipidiques), ainsi ils interagissent avec différents composants fonctionnels tels que les intégrines, les récepteurs de facteurs de croissance (récepteurs à l'EGF par exemple) ou encore les protéines kinases (Hakomori, 2004; Todeschini *et al.*, 2008).

Dans le contexte de la myogenèse, quelques investigations pour le moins anciennes se sont intéressées au rôle des glycolipides. Elles ont montré que la fusion myoblastique

s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des glycolipides neutres et des gangliosides, en particulier du lactocéramide et du GM3 (Leskawa and Hogan, 1990; Cambron and Leskawa, 1994) . Au cours de notre étude, nous avons observé une augmentation du GM3 à 96 heures de différenciation, ce qui est conforme à d'autres données de la littérature (Müthing *et al.*, 1994; Cacić *et al.*, 1994; Müthing and Cacić, 1997). Aussi, nous avions relevé une baisse dans les strucutures sialylées de façon générale notamment (GM2, et GD2).

Cette baisse quantitative des gangliosides sialylés peut être associée à l'augmentation de l'expression des sialidases notamment Neu2, est une enzyme cytosolique qui cible aussi bien les glycolipides que les glycoprotéines.

En considérant l'implication bien décrite et reconnue des glycosphingolipides au niveau des plateformes de signalisation membranaires particulièrement mises en jeu au cours du développement musculaire, des investigations plus poussées seraient requises afin de déterminer le rôle de ces glycoconjugués au cours de la fusion myoblastique.

Partie 2 : Glycosylation et adipogenèse

En plus d'avoir examiné la glycosylation dans le contexte de la myogenèse, j'ai participé à un travail d'étude de la glycosylation dans le contexte de la différenciation adipogénique des cellules satellites murines. L'intérêt d'une telle étude est de distinguer dans les variations de la glycosylation périphérique ce qui est spécifique à la voie musculaire de ce qui est commun aux deux processus de différenciation. Le modèle que nous manipulons se prête bien à cette étude puisque les cellules satellites musculaires sont capables, selon les conditions du milieu de culture, de se différencier en cellules musculaires ou de se transdifférencier en pré-adipocytes (Aguiari *et al.*, 2008).

Lors de son travail de thèse, Mathilde JANOT a analysé l'expression de 375 gènes en relation avec la glycosylation, en utilisant comme modèle cellulaire les cellules C2C12 (Janot *et al.*, 2009). Cette étude a été reprise par Vincent Grassot, mais en utilisant les cellules satellites murines comme modèle d'étude (Grassot *et al.*, 2014a).

Un groupe de gènes régulés de façon identique lors de la différenciation myogénique des deux types cellulaires a été identifié (Grassot *et al.*, 2014a). Afin d'évaluer l'implication réelle de ces gènes dans le phénomène de différenciation, une analyse d'expression de ces glycogènes dans les deux voies de différenciation des cellules satellites (myogenèse *versus* adipogenèse) a été réalisée. Cette démarche permet de révéler ce qui est spécifique à la myogenèse et à la pré-adipogenèse.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier 56 gènes, parmi les gènes d'intérêt, dont l'expression est spécifiquement modifiée durant la différenciation pré-adipogénique. Ces gènes codent pour des acteurs essentiels dans l'établissement de structures glycanniques. Ils peuvent contribuer aux phénomènes de reconnaissance, d'adhésion, et de modulation de la matrice extracellulaire. Leur expression est donc particulièrement régulée pour induire la différenciation et notamment la différenciation pré-adipogénique.

Je présente ci-dessous les résultats obtenus dans ce projet sous la forme d'un projet d'article.

Article 2 - Glycosylation related genes are involved in regulation of early adipogenesis of murine satellite cells

Vincent Grassot[1,2], Amel Bouchatal[1,2], Anne Da Silva[1,2], Sandrine Chantepie[3,4], Dulce Papy-Garcia[3,4], Abderrahman Maftah[1,2], Paul-François Gallet[1,2] and Jean-Michel Petit[1,2§]

[1] INRA, UMR 1061, F- 87000 Limoges, France

[2] Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Unité de Génétique Moléculaire Animale, UGMA, F-87060 Limoges, France

[3] CNRS, EAC 7149, F-94000 Créteil, France

[4] Université Paris Est Créteil, Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire Croissance, Régénération, Réparation et Régénération Tissulaires, CRRET, F-94000 Créteil, France.

[§]Corresponding author

Author's correspondence:

VG: vincent.grassot@unilim.fr

AB: amel.bouchatal@unilim.fr

ADS: anne.blondeau@unilim.fr

SC: sandrine.chantepie@u-pec.fr

DPG: papy@u-pec.fr

AM: maftah@unilim.fr

PFG: francois.gallet@unilim.fr

JMP: jean-michel.petit@unilim.fr

Postal :

Pr. Jean-Michel Petit

UMR 1061 Génétique Moléculaire Animale ; Faculté des Sciences et Techniques

123 Avenue Albert Thomas

87060 Limoges CEDEX - FRANCE

Phone : +33 555 4576 71

Fax : +33 555 4576 53

Abstract

Background. Satellite cells are undifferentiated cells present in the skeletal muscle where they are responsible for post-natal growth and regeneration of muscle. Activation and differentiation of satellite cells require many modifications in their surrounding environment which can be related to the variations of gene expression. As an exemple, modification of 37 glycosylation related genes was evidenced at the early stages of C2C12 cell differentiation. The adipogenic differentiation may also be affected by modifications of expression of the glycosylation related genes.

Methods. By using murine satellite cells (MSC) and their ability to differentiate into myotubes or preadipocytes, we selected glycosylation related genes whose variations of expression were specific to the early adipogenic differentiation. According to the proteins they encode, we proceeded in a first time to the detection of *N*-glycans and their sialylation, and then to the quantification of glycosaminoglycans, at different stages during the early adipogenic differentiation.

Results. mRNA quantification revealed that the expression of 56 glycosylation related genes was specifically modified during early adipogenesis. The amounts of *N*-glycans and alpha(2,6) linked sialic acids were significantly decreased during the differentiation of MSC. A high amount of heparan sulfates in adipogenic differentiating cells was also detected.

Conclusion. We evidenced that when MSC differentiation was oriented to early adipogenesis, the myogenic differentiation process was inhibited as a consequence of *N*-Glycan degradation and of heparan sulfate increase at the cell surface.

Keywords

Glycosylation related genes; Murine satellite cells; Early Adipogenesis; Myogenesis, Heparan sulfates; *N*-glycans sialylation.

Introduction

The skeletal muscle satellite cells localized between the myofiber and the lamina membrane are considered as adult stem cells (Asakura et al., 2001b). These cells ensure the post-natal growth and the regeneration of skeletal muscle (Church et al., 1966; Le Grand and Rudnicki, 2007). Activated satellite cells proceed to an asymetric division and produce two daughter cells. Only the bigger daughter cell will initiate a myogenic differentiation process. The second cell will stay in a quiescent state to permit the self-renewal of the satellite cell pool (Relaix and Zammit, 2012). In some cases, the bigger cell could differentiate in a preadipocyte in response to a specific stimulation, e.g. a high glucose concentration (Aguiari et al., 2008). This multipotency allows to compare the behaviour of a cell type committed in different differentiation pathways. A previous study shown that interleukin 17 inhibits myogenesis and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts (Kocić et al., 2012). More generally, it is well known that the activation and the differentiation of satellite cells are modulated by their environnement, which is called “niche”, and which includes particularly the glycanic structures of cell components (Lander et al., 2012; Pallafacchina et al., 2010b).
Glycosylation leads to the synthesis of a large variety of glycans with specific functions. Glycans present in the extracellular matrix and/or at the cell surface could contribute to the cell fate (Wolf et al., 2012),(Lau et al., 2007b). The diversity of glycanic structures constitues a powerful recognition system that plays a crucial role in cell migration (Janik et al., 2010; Lock et al., 2008), adhesion (Gu et al., 2012), as well as in cell proliferation and/or differentiation (Lau et al., 2007b). For instance, it was demonstrated that O-GlcNAcylation inhibits skeletal muscle differentiation (Ogawa et al., 2012).

In a previous study, the expression levels of 375 glycosylation related genes were analyzed during the first 72 hours of C2C12 myoblast differentiation into myotubes [1]. The proteins encoded by these genes belong to glycosyltranferases, glycosidases, lectins, sulfotransferases, adhesion proteins and proteins involved in sugar metabolism and transport. These genes associated to integrin genes were also analyzed during murine satellite cell (MSC) differentiation, 136 exhibited a modified mRNA expression during MSC differentiation and among them, 31 displayed an important up- or down-regulations (Grassot et al., 2014b).

In the present study, we used murine satellite cells and their ability to differentiate into myotubes or preadipocytes to identify glycosylation genes whose expression level was specifically modified during the early steps of the adipogenic pathway. We quantified the

transcripts amount of 383 glycosylation genes (supplementary data, Table 1) corresponding to 375 genes previously analyzed by Janot et al [1] and to 8 additional genes encoding integrins.

Materials and methods

Cell cultures

Murine satellite cells were isolated from posterior leg muscles of C3H mice as described previously (Grassot et al., 2014b). The extracted cells were cultured in HAM F10 medium (Sigma) supplemented with 5 mM L-glutamin, 20% (v/v) horse serum, 50 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 5 ng/mL Basic-Fibroblast Growth Factor (Sigma). At 70% confluence, cells were differentiated into myotubes with HAM F10 medium supplemented with L-glutamin, antibiotics and only 10% (v/v) horse serum or trans-differentiated into fat storage cells when 50 mM glucose were added to the proliferation medium.

Fixation and staining of preadipocytes and myotubes

After differentiation, the culture medium was removed and cells were washed twice with PBS 1X (Life Technologies). Cells and myotubes were fixed with 10% (v/v) formalin for 15 min at room temperature and then washed twice with PBS 1X. Nuclei were stained with Shandon Harris hematoxylin (0.44% (v/v), Thermoscientific) for 1 hour at room temperature. After two washing with PBS 1X, cytoplasm was stained with Shandon eosin Y aqueous (0.5% (v/v), Thermoscientific) for 30 min at room temperature. Fusion index of satellite cells corresponds to the ratio of nuclei in myotubes on total nuclei determined for six different microscopic fields.

To identify preadipocytes, the fixation step included 10% (v/v) formalin for 30 min at 37°C. Then fixed cells were stained with 0.3% (v/v) Oil-red-O (Sigma) in 60% isopropanol as previously described (Salehzada et al., 2009).

Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

For each kinetic point, cells were rinsed twice with PBS 1X and harvested following trypsination (PBS, 1mM EDTA, 0.05% (w/v) trypsin). The RNA extraction was performed using the RNeasy mini Kit (Qiagen Inc.). Quality and quantity of total RNA were measured using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies Inc.). One microgram of total RNA

was converted into cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) and random hexamers.

Relative quantity of mRNA was measured by qRT-PCR on ABI Prism 7900 Sequence Detector System using TaqMan probe-based chemistry (Applied Biosystems). Two nanograms of cDNA were used to quantify 4 myogenic and adipogenic markers or glycosylation related genes, in 96-well plates or TaqMan Low Density Array cards respectively; see Table 1 in supplementary data for the gene list. The gene expression was followed during differentiation or trans-diferentiation as previously described by Janot *et al.* [1] and Grassot *et al*. [13]. Eight genes encoding integrin subunits (*Itga1*, *Itga8*, *Itga10*, *ItgaD*, *ItgaE*, *ItgaV*, *Itgb1*, and *Itgb6*) were added to complete this gene family. Five reference genes: *18S RNA*, *G6pdx*, *Gapdh*, *Tcea*, *Tbp* were used for relative quantification.

The values used for comparison were the Relative Quantity (RQ) corresponding to the report of expression at a sampling time point and the time 0 hours as reference. A significant variation is considered for a RQ up to 2 or less than 0.5.

Cluster analysis

AdipoC*g*(*Tm*) and MyoC*g*(*Tm*) are the logarithms to base 2 of the ratios for gene *g* in adipogenesis or myogenesis respectively, measured at *Tm*, the time point of the kinetic [*Tm* which is included in *T*(24h, 48h and 72h for myogenesis or 72h, 120h and 168h for adipogenesis)]. All ratio values are log transformed (base 2) to treat inductions or repressions of identical magnitude as numerically equal but with opposite sign. Genes showing over or under expression in the adipogenesis condition (i.e. $\log_2>1$ or $\log_2<-1$) were selected. We then performed clustering analysis on this selection in order to identify and deeply investigate genes showing patterns of expression most interesting. We used the *k*-means (Hartigan and Wong, 1979) clustering algorithm, based on nearest-centroid sorting, to automatically classify genes into group genes sharing similar expression clustering analysis. The algorithm was implemented with the cosine distance as the metric during the clustering process. The algorithm partitioned the data set into K=10 disjoint subsets. All of the analyses were realized with MeV software (MultiExperiment Viewer v 4.7.4).

Lectin assay

Satellite cells were seeded at 5 000 cells/cm² on 24-well plate and cells were engage in trans-differentiation as describe above. Cells in proliferation state or at different time course of trans-differentiation kinetic were washed with PBS, and then fixed with paraformaldehyde

4% (w/v) in PBS (20 min, room temperature). A panel of four digoxigenin labelled lectins (DIG glycan differentiation Kit, Roche) were used. The lectins used were *Datura stramonium* agglutinin (DSA), which binds to galactose-α(1,4)-N-acetylglucosamine*; Maackia amurensis* agglutinin (MAA) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) specific to sialic acids terminally α(2,3) linked to galactose, and α(2,6) linked to galactose or *N*-acetylgalactosamine respectively. After saturation of no specific sites for 30 min at room temperature with blocking reagent 1X (DIG kit), cells were washed with lectin buffer 1 (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5) supplemented with 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$ and 1 mM $CaCl_2$. Cells were then incubated with digoxigenin labelled lectins (125 $\mu g.ml^{-1}$ in lectin buffer 1 and 200µl/well), for 1h at room temperature. After several washes with TBS, cells were incubated with anti-digoxigenin-alcalin phosphatase (AP) antibody (1:1000 in TBS) for 1h at room temperature. Cells were then washed with lectin buffer 2 (0.1 M Tris-HCl, 0.05 mM $MgCl_2$, 0.1 M NaCl, pH 9.5) and revealed with a NBT/BCIP solution (NBT: 4-Nitro-Blue-Tetrazolium chloride/ BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate) at 1:50 in lectin buffer 2 for 30 min at room temperature. The reaction was stopped with DMSO 100%, and the absorbance was measured at 595 nm.

Relative *N*-glycan quantitfication by dot blotting

At each time point of differentiation or trans-differentiation, total cell proteins were prepared by solubilizing cells with triton buffer (Tris-HCl 50mM, pH 7.4 supplemented with 0.5% (v/v) triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate and protease inhibitor cocktail (Roche)). Protein concentration was determined using the Bradford procedure (Bradford, 1976) and 50µg of total cell proteins were doted on nitrocellulose membrane. Membranes were saturated with TBS buffer supplemented with 0.05% (v/v) tween and 1X (v/v) Blocking reagent (Roche) and blots were probed with concanavalin A coupled to peroxidase (1:1 000 for 1h at room temperature, Roche). The concanavalin A presents a high affinity to branched α-mannosidic structures such as hybrid type and biantennary complex type *N*-Glycans. Dots were visualized after incubation with 3,3′-diaminobenzidine (5 min at room temperature; Sigma) or by treatment with the chemoluminescence kit (CN 11500694001, Roche).

Sulfated GAG quantification

The cells were prepared as described by Barbosa et al. (Barbosa et al., 2003). Briefly, cell at confluence were washed twice in PBS before being scraped. After centrifugation, the cell pellet was suspended in 300 µL extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM NaCl, 3

mM MgCl2 and 1 % Triton X-100) and proteins were digested by proteinase K (200 µg/mL) at 56°C overnight. The digestion mixture was then centrifuged 10 min at 10 000 x*g* in Nanosep MF 0.2 µm tubes from Pall Corporation (France) to eliminate DNA and debris. To completely remove DNA, an additional DNase (Qiagen) treatment was made at 30 U/mL sample (37°C, overnight). For total sulfated GAG quantification, the digested samples were diluted by vol. with 4 M NaCl and vigorously stirred during 10 min. Remaining proteins were precipitated and supernatants were cleaned twice by chloroform (v/v) extraction. This step was followed by an overnight dialysis against Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$) and then against water for 4h. For chondroitin sulfate (CS) quantification, 25 µL of previously prepared sample were mixed with 25 µL sodium nitrite (5% w/v) and 25 µL acetic acid (33% v/v). Samples were gently shaken for 1h at room temperature, and then the reaction was stop by addition of 25 µL of ammonium sulfamate (12.5% w/v). The remaining CS were quantified by using 1-9 dimethyl-methylene blue (DMMB). The efficiency of the separation procedure was controlled by selective digestion of the sample with heparinases or chondroitinase cocktails. Isolated GAGs were treated with heparinases I/II/III cocktail (0.25 mU each) for 24 h at 37°C or with chondroitinase ABC (25 mU/sample) for 2 h at 37°C. Undigested GAGs were then quantified by using dimethyl methylene blue (DMMB). The efficiency of the enzymatic digestions has been controlled by treating, in the same way, standard CS or HS at similar concentrations.

Sulfated GAGs and explicit amount of CS after nitrous acid treatment were quantified using DMMB assay, according to Barbosa *et al.* (Barbosa et al., 2003).

Results and discussion

Murin Satellite Cell (MSC) differentiation and gene scattering.

We followed the expression patterns of 383 glycosylation related genes during the time course of early adipogenic and myogenic differentiation of MSC. MSC cultured on Matrigel^{TM} were induced to differentiate into myotubes by serum deprivation during 72h or to trans-differentiate into preadipocytes by the presence of a high glucose concentration (around 100mM) in culture medium for 168h. We established that 24, 48 and 72 hours of differentiation corresponded to 72, 120 and 168 hours of trans-differentiation, since the percentage of myotubes and preadipocytes were equivalent for these times (Figure 1A). So, they were retained for future comparisons between myogenic and early adipogenic differentiations. Representative photomicrographs from 72 hours differentiation of MSC into

myotubes evidence long multinucleated cells with a mean value of 5 nuclei per cell (Figure 1B top right). The representative photomicrographs after 168 hours of trans-differentiation of MSC into preadipocytes clearly evidence big cells which accumulate lipid droplets stained by Oil-Red (Figure 1B bottom right). In addition to the phenotypic observations, the myogenic differentiation process was followed by measurements of transcrit amonts of two myogenic genes: *Myf5* and *MyoG*. During the first 24 hours of myogenic differentiation, *MyoG* transcript amount hightly increased (70 times fold change) while *Myf5* amount decreased (Figure 1C). For longuer times, they remained unchanged. By contrast, during trans-differentiation, a slight increase of both gene expression was observed. The transcript amounts of *Dlk1* and *Ppara*, two early adipogenesis markers, increased during the trans-differentiation process, while no significant variations during myogenic differentiation were detected (Figure 1D). We also examined in the MCS used the expression of the *PDGFR-α* gene, which is expressed in adipocyte precursor cells. The murine satellite cells we prepared did not express this gene (data not shown). However, when cultured in adipogenic conditions such as high glucose concentrations, MSC were able to engage themselves in the early adipogenic program as shown by the following of *Dlk1* and *Ppara* expressions.

The above results confirmed the good differentiation processes. Then we have followed the expression level of glycosylation genes in MSC during 72 hours and 168 hours for myogenic differentiation and early adipogenic trans-differentiation respectively. Among the 383 genes analyzed, 214 were not retained since only little (lower than 2) changes in expression were measured during both differentiation pathways. The remaining 169 genes were split into 10 sets by *K*-means cluster analysis (Figure 2; supplementary data Figure 1). In clusters 3, 4, 8 and 10, a significant variation of expression was observed however in the same sens for myogenic and early adipogenic differentiation (Figure 2). Consequently, the 29 genes they contain were not retained. Among the remaining 140 genes, 127 were distributed in 4 majors clusters 1, 5, 6, 9, and 13 genes in minor clusters 2 and 7 (Figure 2). Whatever the cluster, only genes with a large difference in expression between the both differentiation pathways were selected. (see an exemple in supplementary data, Figure 2) In cluster 1, only 5 genes were retained due to the high variation opposition between up regulation in myogenesis and down-regulation in early adipogenesis. In cluster 5, the 17 higher repressed genes were maintained even if they did not present significant variation of expression in myogenesis. In cluster 6, 11 genes were selected, they were mainly up regulated during early adipogenesis and down-regulated during myogenesis. In cluster 9, all genes were up regulated in both processes and only the 19 among them which are significantly up regulated in adipogenesis were retained. Among the 6 genes of cluster 2, one was selected due to its high repression at

the first 72 hours of early adipogenesis. In cluster 7, 3 genes were selected, they were highly repressed after 120 hours of early early adipogenic differentiation only (Table in figure 2). Finaly, our screening method allows us to found 56 genes with an expressin varation specifically related to the early adipogenesis, the genes distribution were summarized in supplementary data Figure 3. For further investigations only these 56 genes were considered.

Adipogenic trans-differentiation requires a decrease of sialylated N-glycans

The selected genes were classified into 7 groups according to their functions : cell adhesion and recognition (12 genes); *N*-glycan and other glycan biosynthesis and degradation (5 and 8 genes respectively); glycosaminoglycan metabolism (7 genes); glycolipid metabolism (9 genes); glycogen and sugar metabolisms (11 genes); finally, 4 genes were classified as "other functions" (Figure 3; see details in Table 1).

In the group of genes corresponding to "cell adhesion and recognition", we noticed the over-expression of *ItgaX* and *Itga7*, two integrins genes involved in interactions with the extracellular matrix (Takada et al., 2007). This could be related to the adhesion and migration of transdifferentiated cells, as already demonstrated for the proteins ITGA1 and ITGB1 in normal preadipocytes (Patrick and Wu, 2003). By contrast, *ItgaL* and *Itgb2*, two integrins genes involved in cell-cell interactions (Takada et al., 2007) were repressed in early adipogenesis. Regarding the other adhesion proteins, we observed a decreased expression of *Lgals9*, *Siglecg* and *Selp* that encode for lectins. The gene *Mcam* also called *CD146* encoding a molecule implicated in the control of cell-cell cohesion was also down-regulated. These observations suggest that cell-cell links highly decreased during early adipogenesis. Our results agree with data on Connexin-43, a membrane phosphoprotein that mediates direct inter-cellular communication by forming gap junctions. It becomes highly phosphorylated in early adipocyte differentiation and its degradation is vital for preadipocyte differentiation and maturation (Yeganeh et al., 2012).

During MSC early adipogenesis, we also observed a large down-regulation the *N*-glycan biosythesis genes. The *Alg6*, *Man1a* and *Mgat2* genes coding proteins involved at different stages of *N*-glycan core structure biosynthesis were down-regulated. The genes *St3gal4* that permits the *N*-glycan sialylation is also down regulated (Okajima et al., 1999c). In addition, trans-differentiating cells up regulated *N-gly1* and *Fuca2* that encode respectively a *N*-glycanase and a fucosidase, which cleaves terminal fucoses on *N*-glycans (Laury-Kleintop et al., 1987; Suzuki et al., 2003b). All these observations suggest a reduction of *N*-glycan structures during the early adipogenesis. To sustain this observation, we measured the *N*-

glycan amounts during MSC myogenic differentiation and trans-differentiation with ConA lectin. No significant variation of N-glycan amounts was observed during the 72h of MSC myogenic differentiation (Figure 4A). On the contrary, the *N*-glycan amount decreased of about 25% during the first 120 hours of early adipogenesis (Figure 4B). Moreover, a study on *N*-glycan evolution during human mesenchymal cell differentiation showed that more than hundred different *N*-glycans were modified under adipogenic trans-differentiation conditions compared to undifferentiated cells (Hamouda et al., 2013). These differences mainly concerned high-mannosylated *N*-glycans, hybrid and complexe *N*-glycans, and shown a decrease of the peripheral fucosylation. These modifications are in agreement with our observation of the up regulation of *Fuca2* and the down-regulation of sialyltransferase encoding genes during the trans-differentiation of MSC. We also evaluated the modifications of sialylated glycans by lectin binding (Figure 5). Using SNA lectin, we observed a decrease of terminal α-2,6-sialylation around 50% and 70% after 120 and 168 hours of trans-differentiation respectively (Figure 5A). The binding of MAA lectin showed a significant decrease of α-2,3-sialylation only at 168 hours of trans-differentiation (Figure 5B). Whereas the α-2,6-sialylation progressively disappeared during myogenic and pre-adipogenic differentiation, the α-2,3-sialylation was affected latter. Its decrease was observed at 48 hours of myogenic differentiation and only at 168 hours of trans-differentiation. The evolution of sialylated structures correlated with the increased binding of the DSA lectin, which recognizes mainly terminal galactose (Figure 5C). These results were in agreements with the transcriptomic data and may be associated to the cell-cell interactions needed for the two differentiation processes. Indeed, myogenesis requires contact between myoblasts before their fusion (Rochlin et al., 2010) and preadipocytes need cell-cell contacts for the formation of the lobules (Kuri-Harcuch et al., 1984a).

Heparan sulfates increased during pre-adipogenic trans-differentiation.

We evidenced that during trans-differentiation of MSC, some glycosaminoglycan metabolism genes were transcriptionally modified (Table I). These genes encode enzymes involved in heparan sulfate (HS) biosynthesis (*Ext1, Extl3*), heparan sulfation (*Hs3st3b1, Hs6st3*), chondroitin sulfation (*Chst11*) and keratan sulfation (*Chst1*). Genes encoding for heparan sulfation were over-expressed whereas sulfation of other GAG structures seems to be repressed. We measured the content of sulfated GAGs and compared the realtive amount of heparan and chondroitin sulfates of MSC in myogenic differentiation (72 hours) and in early adipogenic trans-differentiation (168 hours) (Figure 6).

Total sulfated GAGs were highly increased at 168h of early adipogenesis (10.51µg/10^6 cells). This was mainly related to a higher production of HS, which increased by 5.28 fold (Table of figure 6) during the 168 hours of pre-adipogenesis. In the same time the CS production more slightly increased (only 2.25 fold). Moreover, we observed no other sulfated GAGs after treatments of samples with chondroitinase ABC and heparitinases, suggesting the absence of keratane and/or dermatan sulfates. This result correlates well with our transcriptomic results and also with published data showing that adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hASC) is favoured by heparan sulfate proteoglycans (HSPG) (*e.g.*: syndecan) and fibronectin interactions [26, 27], and that HSPG-mediated adhesion is an interesting mechanism to change cell shape.

We postulate that interactions between MSCs and fibronectin depend on heparan sulfate proteoglycans and contribute to enhance the adipogenic differentiation of MSCs. Moreover, the increase in heparan sulfate biosynthesis could lead to the formation of a FGF/FGF-Receptor/Heparan Sulfate Proteoglycan complexes. Such a complexe has been already described for its capacity to induce signals that inhibit the myogenic differentiation (Brunetti and Goldfine, 1990; Pellegrini, 2001). This explains why no HS were observed during the myogenic differentiation of MSCs. Indeed, HS that represented 69.36 % before differentiation totally disappeared after 72 hours of myogenesis and were replaced by chondroitin sulfates (figure 6), a result in agreement with increased chondroitin sulfate synthesis during myogenic process [13].

We have also found that a hyualuronidase encoded by *Hyal1* is up regulated in MSC differentiated in pre-adipocytes. It is known that hyaluronans help the sequestration of TGF-β1 receptor (Ito et al., 2004). The degradation of hyaluronans in early adipogenesis could lead to the release of TGF-β1 receptor and to its activation by TGF-β1 an inhibitor of myogenesis. Thus, the changes in the type of GAG components of both the extracellular matrix and proteoglycans located at the cell surface seem to be specific to the differenciation pathways of murine satellite cells.

Conclusion

Our transcriptomic screening identifies 56 genes whose expressions significantly varied during early adipogenesis of MSC. According to the function of their products we suggest a model for the involvement of these related glycosylation and adhesion genes in pre-adipogenesis compared to myogenesis (Figure 7). Growing evidence shows that soluble factors and extracellular matrix components such as proteoglycans provide an optimal microenvironment controlling stem cell functions. We observed a remodelling of the extracellular matrix with an increase of heparan sulfates, which could contribute to (1) pre-adipogenesis by the binding of cells to syndecans and (2) to myogenesis inhibition via a FGF/FGFR complex. The decrease of hyaluronans leads to the release of TGF-β1 receptors, which can be activated by the binding of free TGF-β1 and thus favour the myogenic inhibition. TGF-β1 sequestered by decorin a chontroitin/dermaran sulfate proteoglycan in the ECM may be released following the decrease of sulfated GAGs. The beginning of pre-adipogenesis is concomitant to a lower amount of *N*-sialylated-glycans due to both the *N*-glycan degradation and the inhibition of their synthesis by a decrease of sialyltransferase gene expression. The loss of *N*-glycan could modify the receptor efficiency at the cell surface and inhibit the myogenic process and favour the entry of MSC into early adipogenesis. The murine satellite cells adapt their environment to promote differentiation pathway in which they engage.

Acknowledgements

We are grateful to Région Limousin for their PhD thesis grant.

References :

[1] A. Asakura, M. Komaki, M. Rudnicki, Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation, Differ. Res. Biol. Divers. 68 (2001) 245–253.

[2] J.C.T. Church, R.F.X. Noronha, D.B. Allbrook, Satellite cells and skeletal muscle regeneration, Br. J. Surg. 53 (1966) 638–642. doi:10.1002/bjs.1800530720.

[3] F. Le Grand, M. Rudnicki, Satellite and stem cells in muscle growth and repair, Development. 134 (2007) 3953 –3957. doi:10.1242/dev.005934.

[4] F. Relaix, P.S. Zammit, Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: The cell on the edge returns centre stage, Dev. Camb. 139 (2012) 2845–2856.

[5] P. Aguiari, S. Leo, B. Zavan, V. Vindigni, A. Rimessi, K. Bianchi, et al., High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 1226 –1231. doi:10.1073/pnas.0711402105.

[6] J. Kocić, J.F. Santibañez, A. Krstić, S. Mojsilović, I.O. Dorđević, D. Trivanović, et al., Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2, Biochim. Biophys. Acta. 1823 (2012) 838–849. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.001.

[7] G. Pallafacchina, S. François, B. Regnault, B. Czarny, V. Dive, A. Cumano, et al., An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells, Stem Cell Res. 4 (2010) 77–91. doi:10.1016/j.scr.2009.10.003.

[8] A.D. Lander, J. Kimble, H. Clevers, E. Fuchs, D. Montarras, M. Buckingham, et al., What does the concept of the stem cell niche really mean today?, BMC Biol. 10 (2012) 19. doi:10.1186/1741-7007-10-19.

[9] M.T. Wolf, K.A. Daly, J.E. Reing, S.F. Badylak, Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix, Biomaterials. 33 (2012) 2916–2925. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.055.

[10] K.S. Lau, E.A. Partridge, A. Grigorian, C.I. Silvescu, V.N. Reinhold, M. Demetriou, et al., Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation, Cell. 129 (2007) 123–134. doi:10.1016/j.cell.2007.01.049.

[11] J.G. Lock, B. Wehrle-Haller, S. Strömblad, Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration, Semin. Cancer Biol. 18 (2008) 65–76. doi:10.1016/j.semcancer.2007.10.001.

[12] M.E. Janik, A. Lityńska, P. Vereecken, Cell migration-the role of integrin glycosylation, Biochim. Biophys. Acta. 1800 (2010) 545–555. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.013.

[13] J. Gu, T. Isaji, Q. Xu, Y. Kariya, W. Gu, T. Fukuda, et al., Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion, Glycoconj. J. 29 (2012) 599–607. doi:10.1007/s10719-012-9386-1.

[14] M. Ogawa, H. Mizofuchi, Y. Kobayashi, G. Tsuzuki, M. Yamamoto, S. Wada, et al., Terminal differentiation program of skeletal myogenesis is negatively regulated by O-GlcNAc glycosylation, Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1820 (2012) 24–32. doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.011.

[15] V. Grassot, A. Da Silva, J. Saliba, A. Maftah, F. Dupuy, J.-M. Petit, Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis, BMC Genomics. 15 (2014) 621. doi:10.1186/1471-2164-15-621.

[16] T. Salehzada, L. Cambier, N. Vu Thi, L. Manchon, L. Regnier, C. Bisbal, Endoribonuclease L (RNase L) regulates the myogenic and adipogenic potential of myogenic cells, PloS One. 4 (2009) e7563. doi:10.1371/journal.pone.0007563.

[17] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
[18] I. Barbosa, S. Garcia, V. Barbier-Chassefière, J.-P. Caruelle, I. Martelly, D. Papy-García, Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies, Glycobiology. 13 (2003) 647–653. doi:10.1093/glycob/cwg082.
[19] Y. Takada, X. Ye, S. Simon, The integrins, Genome Biol. 8 (2007) 215–215. doi:10.1186/gb-2007-8-5-215.
[20] C.W. Patrick Jr, X. Wu, Integrin-mediated preadipocyte adhesion and migration on laminin-1, Ann. Biomed. Eng. 31 (2003) 505–514.
[21] A. Yeganeh, G.L. Stelmack, R.R. Fandrich, A.J. Halayko, E. Kardami, P. Zahradka, Connexin 43 phosphorylation and degradation are required for adipogenesis, Biochim. Biophys. Acta. 1823 (2012) 1731–1744. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.009.
[22] T. Okajima, S. Fukumoto, H. Miyazaki, H. Ishida, M. Kiso, K. Furukawa, et al., Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11479–11486.
[23] T. Suzuki, M.A. Kwofie, W.J. Lennarz, Ngly1, a mouse gene encoding a deglycosylating enzyme implicated in proteasomal degradation: expression, genomic organization, and chromosomal mapping, Biochem. Biophys. Res. Commun. 304 (2003) 326–332.
[24] L.D. Laury-Kleintop, I. Damjanov, J.A. Alhadeff, Antibody-affinity purification of novel alpha-L-fucosidase from mouse liver, Biochem. J. 245 (1987) 589–593.
[25] H. Hamouda, M. Ullah, M. Berger, M. Sittinger, R. Tauber, J. Ringe, et al., N-Glycosylation Profile of Undifferentiated and Adipogenically Differentiated Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells - Towards a Next Generation of Stem Cell Markers, Stem Cells Dev. (2013) 130707215800003. doi:10.1089/scd.2013.0108.
[26] K. Rochlin, S. Yu, S. Roy, M.K. Baylies, Myoblast fusion: When it takes more to make one, Dev. Biol. 341 (2010) 66–83. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.024.
[27] W. Kuri-Harcuch, C. Argüello, M. Marsch-Moreno, Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture, Differentiation. 28 (1984) 173–178. doi:10.1111/j.1432-0436.1984.tb00280.x.
[28] Y. Kusano, K. Oguri, Y. Nagayasu, S. Munesue, M. Ishihara, I. Saiki, et al., Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin, Exp. Cell Res. 256 (2000) 434–444. doi:10.1006/excr.2000.4802.
[29] I.-S. Park, M. Han, J.-W. Rhie, S.H. Kim, Y. Jung, I.H. Kim, et al., The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism, Biomaterials. 30 (2009) 6835–6843. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.057.
[30] A. Brunetti, I.D. Goldfine, Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor, J. Biol. Chem. 265 (1990) 5960–5963.
[31] L. Pellegrini, Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view, Curr. Opin. Struct. Biol. 11 (2001) 629–634.
[32] T. Ito, J.D. Williams, D.J. Fraser, A.O. Phillips, Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization, J. Biol. Chem. 279 (2004) 25326–25332. doi:10.1074/jbc.M403135200.

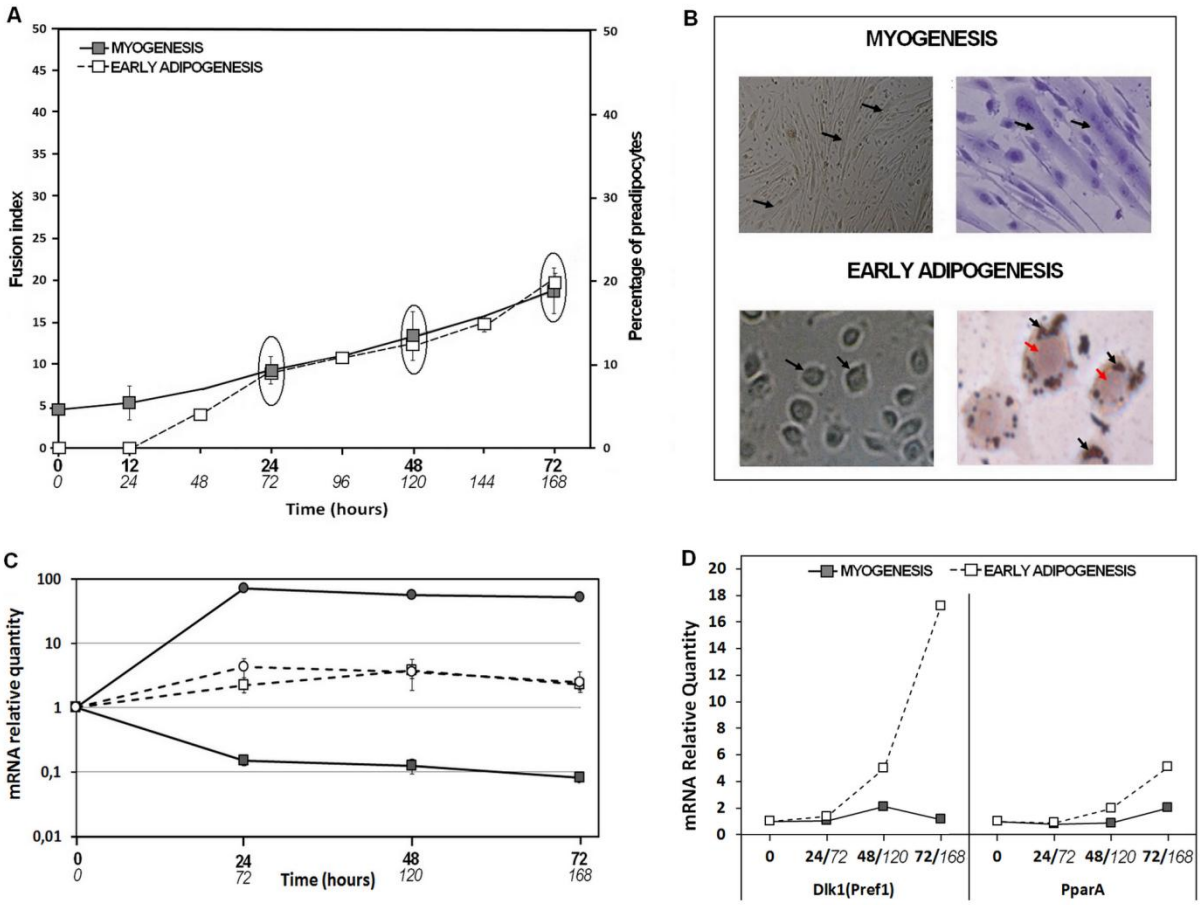
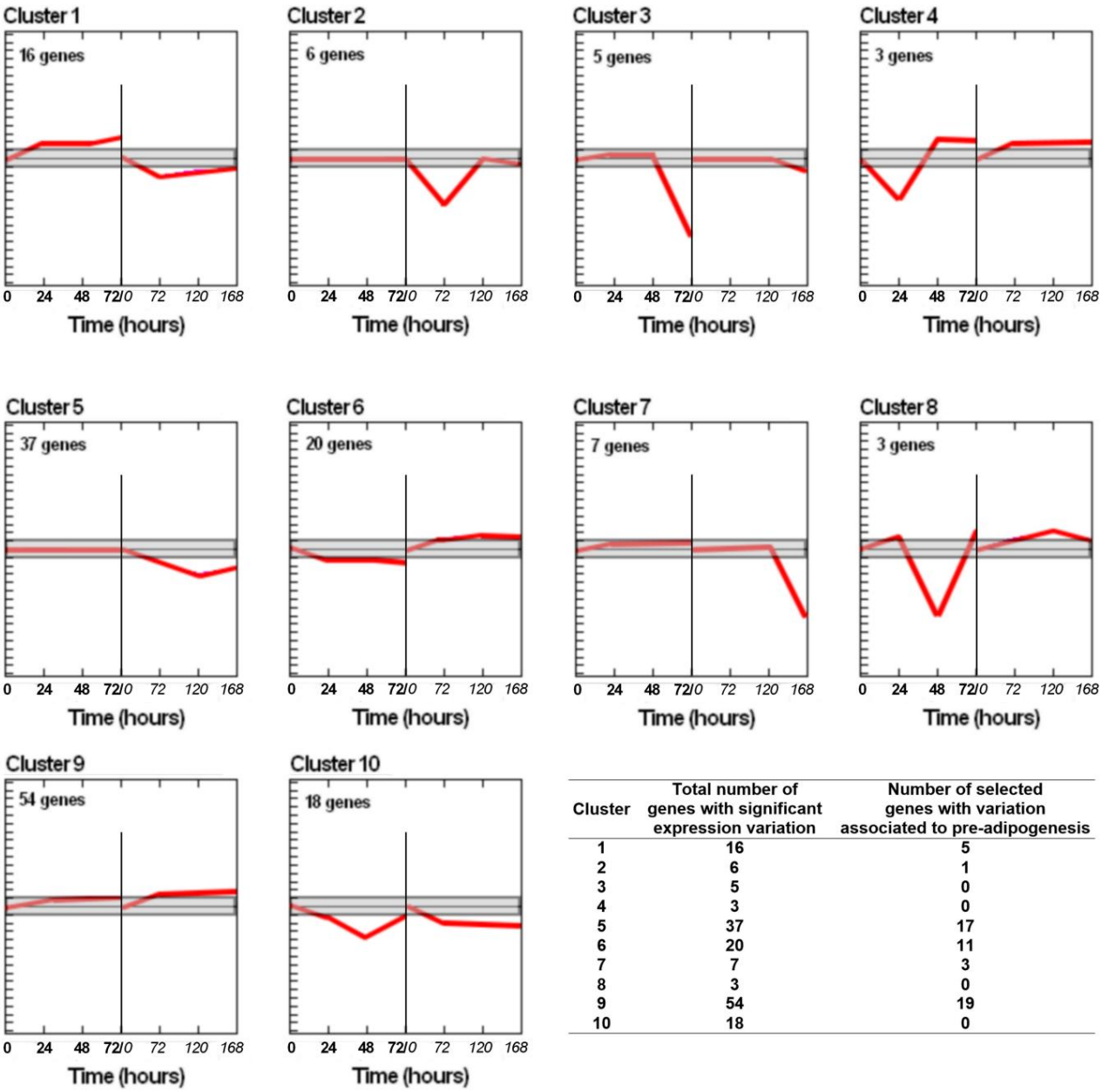


Figure 1. Differentiation of murine satellite cells into myotubes and pre-adipocytes.

A. Measurement of fusion index (dark grey squares) and preadipocyte formation (white squares) during MSC differentiation. Times in bold correspond to the myogenesis kinetic and the italic ones to the adipogenesis kinetic. Circles pointed out the selected times where fusion index and percentage of preadipocyte were significatively close. **B.** Photomicrograph of differentiated MSC. **Top:** MSC after 72h of myogenic differentiation. Top left: Phase microscopy picture (magnification x100); Top right: Phase microscopy picture (magnification x400) of MSC after hematoxylin/eosin staining. Arrows point out myotubes. **Bottom :** MSC after 168h of adipogenic trans-differentiation. Bottom left: Phase microscopy pictures (magnification x100); Bottom right: Phase microscopy picture (magnification x100) of MSC after Oil-Red staining. Black arrows point out lipid droplet accumulations, red ones show nuclei (magnification x400). **C.** Expression of the myogenic regulatory factor *MyoG* (circles) and *Myf5* (squares) during myogenic differentiation (dark grey) and early adipogenesis (white) of MSC. **D.** Expression of the early adipogenic markers *Ppara* and *Dlk1* during differentiation of satellite cells into myotubes (dark grey) and trans-differentiation into preadipocytes (white). Bars represent the 5% standard error.



Cluster	Total number of genes with significant expression variation	Number of selected genes with variation associated to pre-adipogenesis
1	16	5
2	6	1
3	5	0
4	3	0
5	37	17
6	20	11
7	7	3
8	3	0
9	54	19
10	18	0

Figure 2. Cluster analysis of glycosylation related gene expression profiles during the myogenic and early adipogenic differentiations of of MSC.

The 169 genes were gathered in 10 clusters with a method (see Methods) taking into account their variations during the 72h of myogenesis (bold) and during the 168h of early adipogenesis (italic). Relative expression levels are plotted against the time of differentiation.The red line represents the mean expression profiles determined from all gene expression profiles in one cluster (see supplementary data, Figure 1). The grey band showed the variation considered as insignificant. The table gives the number of genes selected for each cluster considering the expresion variations associated to adipogenesis.

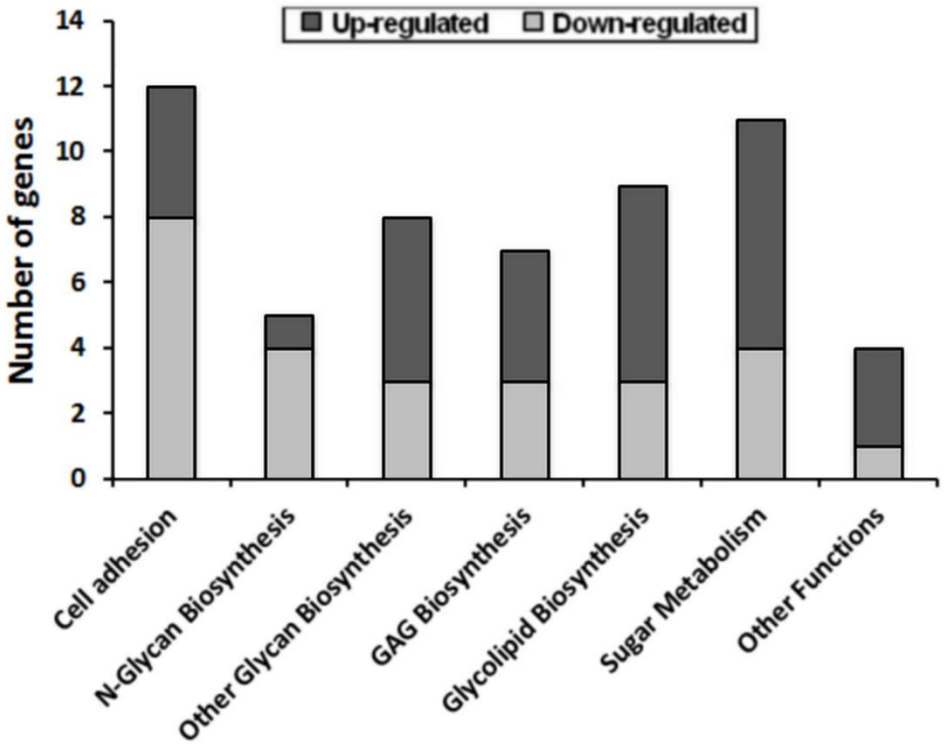


Figure 3. Classification of genes according to their product function.

The 56 selected genes are divided into seven families according to their product function. In dark grey: up reguled genes ; in light grey: down-reguled genes.

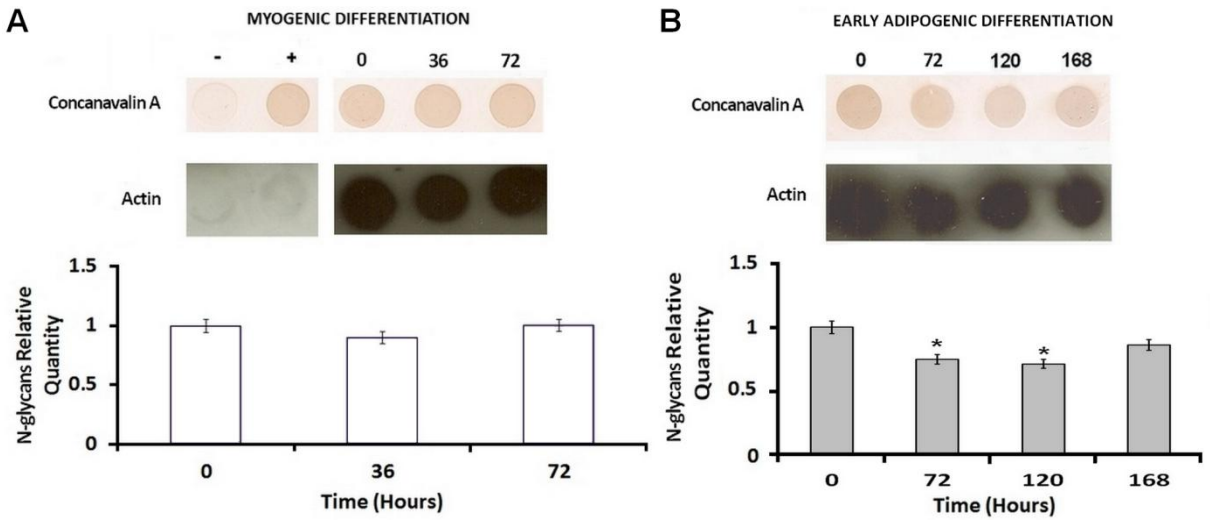


Figure 4. Relative quantitfication of total *N*-glycans during MSC differentiations.

The total protein extract (50 µg) was doted on nitrocellulose membrane and the *N*-glycans revealed using Con-A during myogenesis (**A**) or early adipogenesis (**B**). Carboxypeptidase Y was used as a negative control (-); Fetuin was used as positive control (+). Histograms represent the densitometric analyses by using actin as a reference. Bars represent the 5% standard error, *P<0.05.

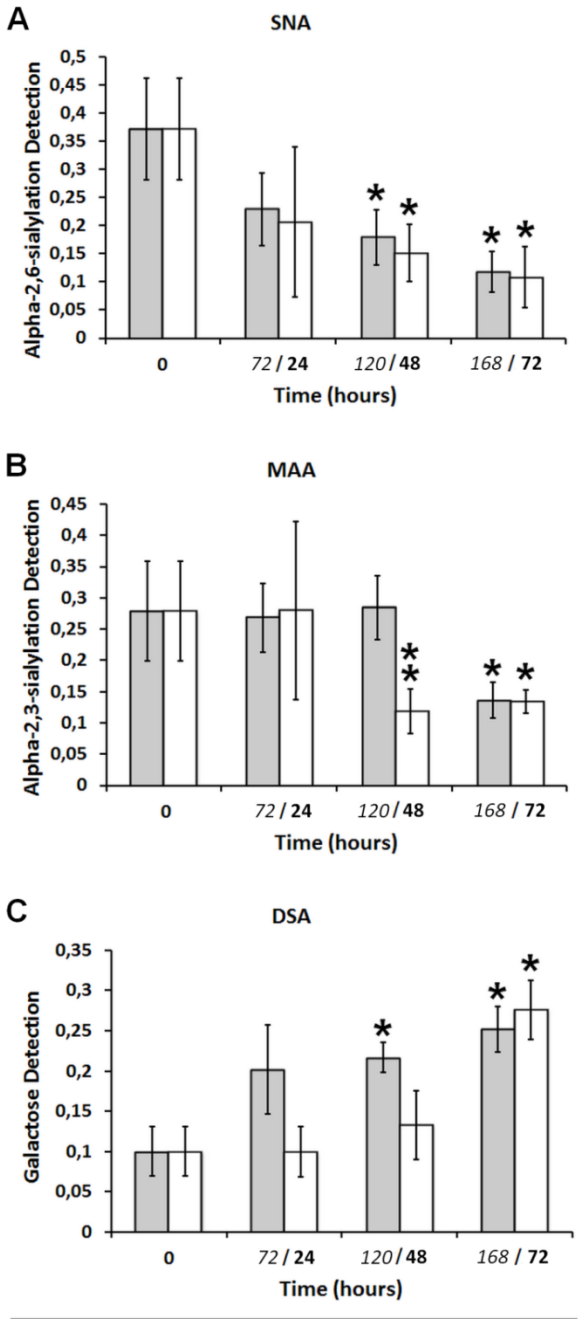
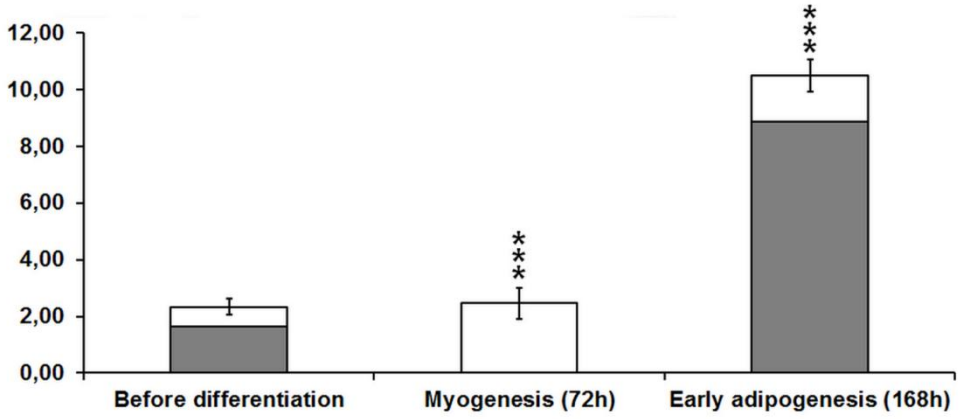


Figure 5. Variation of glycans at the cell surface during MSC differentiations.

MSC at various times of differentiation were fixed and submitted to lectin binding. (**A**) Measurement of α-2,6-linked sialic acids with SNA lectin; (**B**) Measurement of α-2,3-linked sialic acids with MAA lectin; (**C**) Measurement of terminal galactose with DSA lectin. Adipogenesis (grey) or myogenesis (white).

Bars represent the standard deviation; * significative difference between the time of differentiation and before induction of differentiation with P<0.05; ** significative difference between early adipogenesis and myogenesis with P<0.05.



Sulfated GAGs	Percentage of sulfated GAGs (corresponding GAG amount in µg/10⁶ cells)		
	Before differentiation	Myogenesis (72 hours)	Early adipogenesis (168 hours)
HS	69.36 (1.63 ± 0.13)	0.00	84.40 (8.87 ± 1.23)
CS	30.21 (0.71 ± 0.05)	100 (2.46 ± 0.82)	15.60 (1.64 ± 0.15)
		Sulfated GAG ratio	
HS/CS	2.30	0	5.41
HS_{72}/HS_0	-	0	5.28
CS_{72}/CS_0	-	3.46	2.25

Figure 6. Sulfated glycosaminoglycan quantification in undifferentiated and differentiated MSC.

Murine satellite cells were subjected to myogenic differentiation for 72h and early adipogenic differentiation for 168h. Total sulfated GAGs, sulfated heparans and chondroitins were quantified according to the DMMB procedure. The amount of chondroitin sulfates (CS; white) and heparan sulfates (HS; dark grey) were reported. Bars represent the standard deviation, *** P<0.01. The associated table shows the percentage of each sulfated GAG and the corresponding amount before and after the two differentiations. XS_{72} and XS_{168} correspond to sulfated GAGs after 72 hours of myogenic or 168 hours of pre-adipogenic differentiation respectively and XS_0 before differentiation.

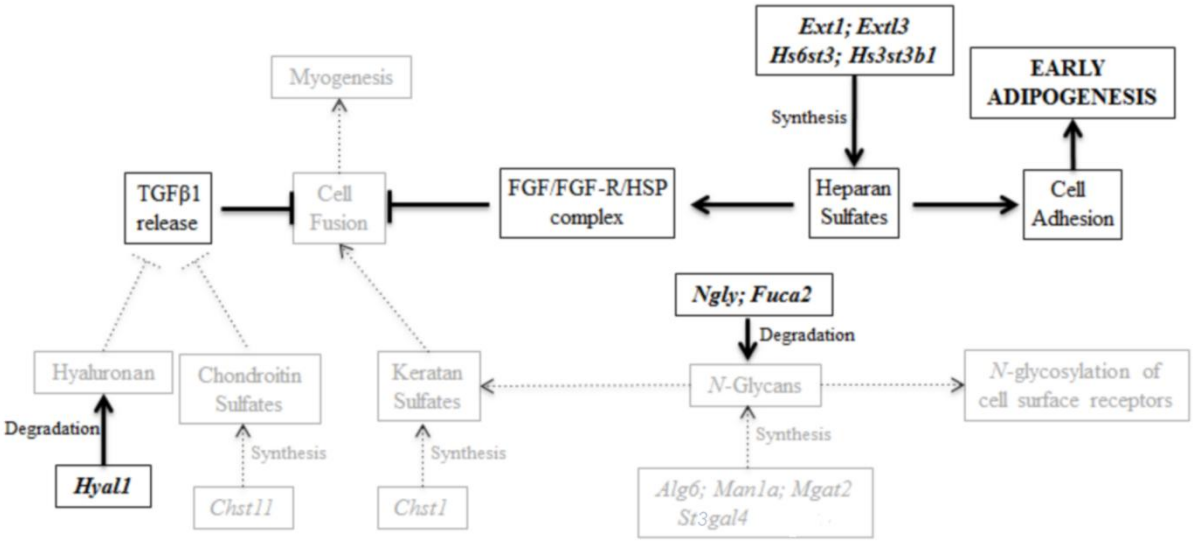


Figure 7. Interaction network of glycosylation related genes during adipogenesis induction.

The networks were based on our observations and according to the literature. All up regulated genes and activated cell processes are written in black, the down-regulated genes and repressed processes are written in grey. Arrows show activation and "T" repression.

Table 1. The 56 selected genes specific to early adipogenesis of MSC gathered according to their functions.

Amounts of the selected genes were specifically modified during the early adipogenesis of murine satellite cells.

Gene symbol	Product	Expression pattern	Function familly	Number of genes
L1cam	L1 cell adhesion molecule	Down regulated	Adhesion molecule	12
Mcam*	Melanoma cell adhesion molecule	Down regulated		
Mrc2	C-type mannose receptor 2	Down regulated		
ItgaL	Integrin alpha L	Down regulated	Integrin / Integrin-like	

Itgb2	Integrin béta 2	Down regulated		
ItgaE	Integrin alpha E	Up regulated		
ItgaX*	Integrin alpha X	Up regulated		
Itga7	Integrin alpha 7	Up regulated		
Lgals9*	Lectin, galactose binding, soluble 9	Down regulated	Lectin familly	
Selp*	Selectin, platelet	Down regulated		
Siglecg*	Sialic acid binding Ig-like lectin G	Down regulated		
Clec2h	C-type lectin domain family 2, member h	Up regulated		
Pigf	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F	Down regulated	GPI anchor-Protein linkage	13
Gpaa1	GPI anchor attachment protein 1	Up regulated		
Pigo	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	Up regulated		
Ngly1	N-glycanase 1	Up regulated	N-glycan linkage Degradation	
Alg6	Asparagine-linked glycosylation 6	Down regulated	N-Glycan biosynthesis	
Man1a	Mannosidase 1, alpha	Down regulated		
Mgat2	Mannoside acetylglucosaminyltransferase 2	Down regulated		
St3gal4	Beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	Down regulated		
Chst8*	Carcohydrate sulfotransferase 8	Up regulated		
Gcnt3	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3	Down regulated	O-Glycan biosynthesis	
B4galt5	Beta 1,4-galactosyltransferase 5	Down regulated		
Ogt	O-linked N-acetylglucosaminetransferase	Up regulated		
Fuca2	Fucosidase, alpha-L- 2	Up regulated	Peripheral glycosylation degradation	
Ext1	Exostoses (multiple) 1	Down regulated	Heparan biosynthesis	7
Extl3	Exostoses (multiple)-like 3	Up regulated		
Hs3st3b1	Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B1	Up regulated	Heparan sulfation	
Hs6st3	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3	Up regulated		
Hyal1	Hyaluronoglucosaminidase 1	Up regulated	Hyaluronan degradation	
Chst11	Carbohydrate sulfotransferase 11	Down regulated	Chondroitin sulfation	
Chst1*	Carbohydrate sulfotransferase 1	Down regulated	Keratan sulfation	

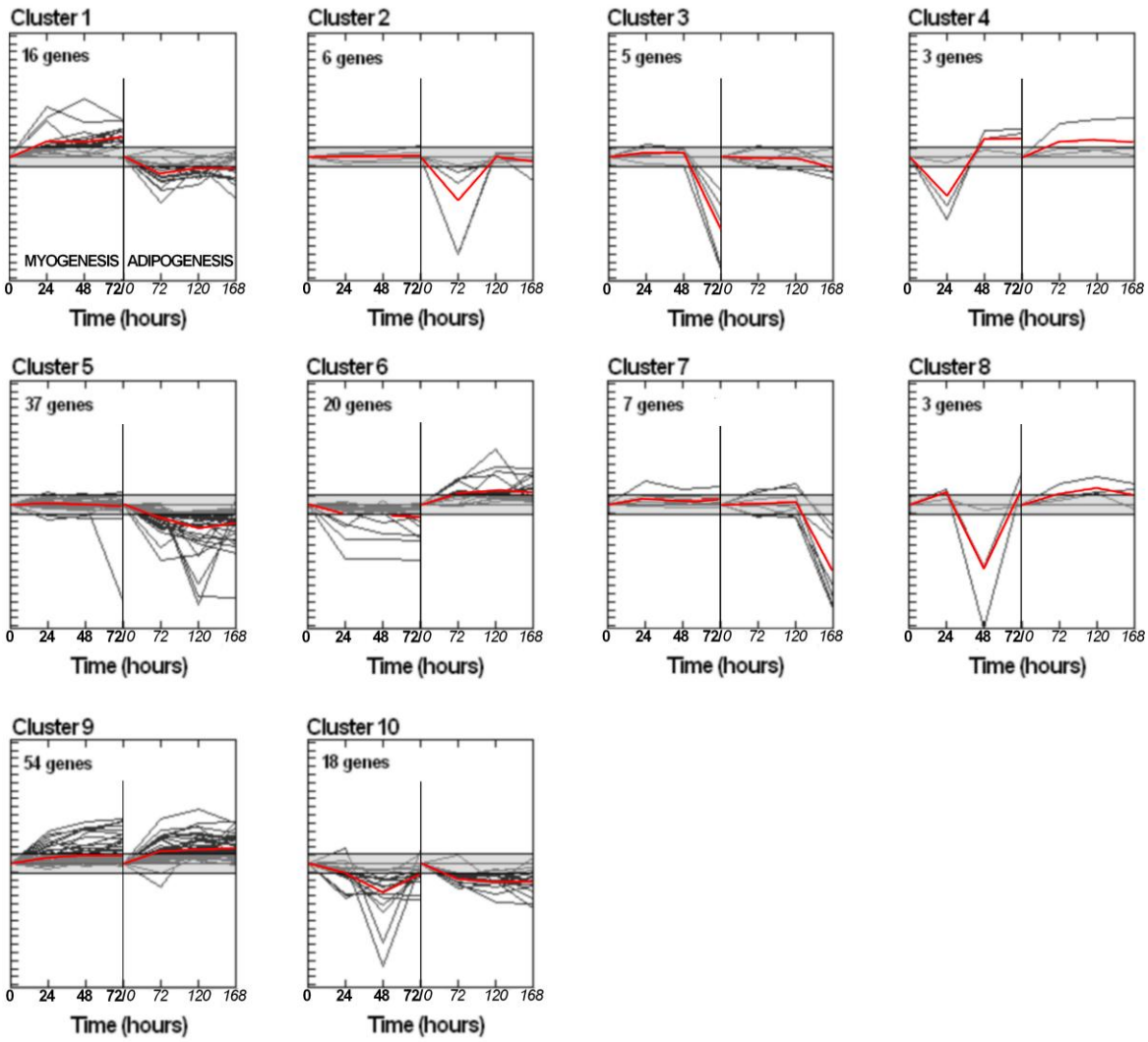
St6galnac3*	N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3	Down regulated	Ganglio serie biosynthesis	9
B3galnt1	Beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1	Down regulated	Globo serie biosynthesis	
B3gnt1	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1	Up regulated	Lacto/Neo-Lacto serie biosynthesis	
B3gnt2	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	Up regulated		
Fut2	Fucosyltransferase 2	Up regulated		
Fut4*	Fucosyltransferase 4	Up regulated		
St3gal5*	Beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	Down regulated		
Gba2	Glucosidase beta 2	Up regulated	Glycolipid degradation	
Naga	N-acetyl galactosaminidase, alpha	Up regulated		
Gaa	Glucosidase, alpha, acid	Up regulated	Glycogen degradation	11
Ganc	Glucosidase, alpha; neutral C	Up regulated		
Cmah*	Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	Down regulated	Sugar metabolisms	
Gne	2 épimerase kinase	Down regulated		
Nans	N-acetylneuraminic acid synthase	Down regulated		
Ugdh	UDP-glucose dehydrogenase	Down regulated		
Fuk*	Fucokinase	Up regulated		
Galt	Galactose-1-phosphate uridyl transferase	Up regulated		
Gmppa	GDP-mannose pyrophosphorylase A	Up regulated		
Gnpnat1	Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1	Up regulated		
Slc2a8	Solute carrier family 2, member 8	Up regulated		
Thbd	Thrombomodulin	Down regulated	Other functions	4
Athl1	ATH1, acid trehalase-like 1	Up regulated		
Glt8d1	Glycosyltransferase 8 domain containing 1	Up regulated		
Parp3	Poly-ADP-ribose polymerase family, member 3	Up regulated		
* genes with an opposite expression pattern between myogenesis and adipogenesis.				

Supplementary data, Table 2. Three hundred and eighty three genes under study

List of 383 murine glycosylation genes selected for use in our screening.

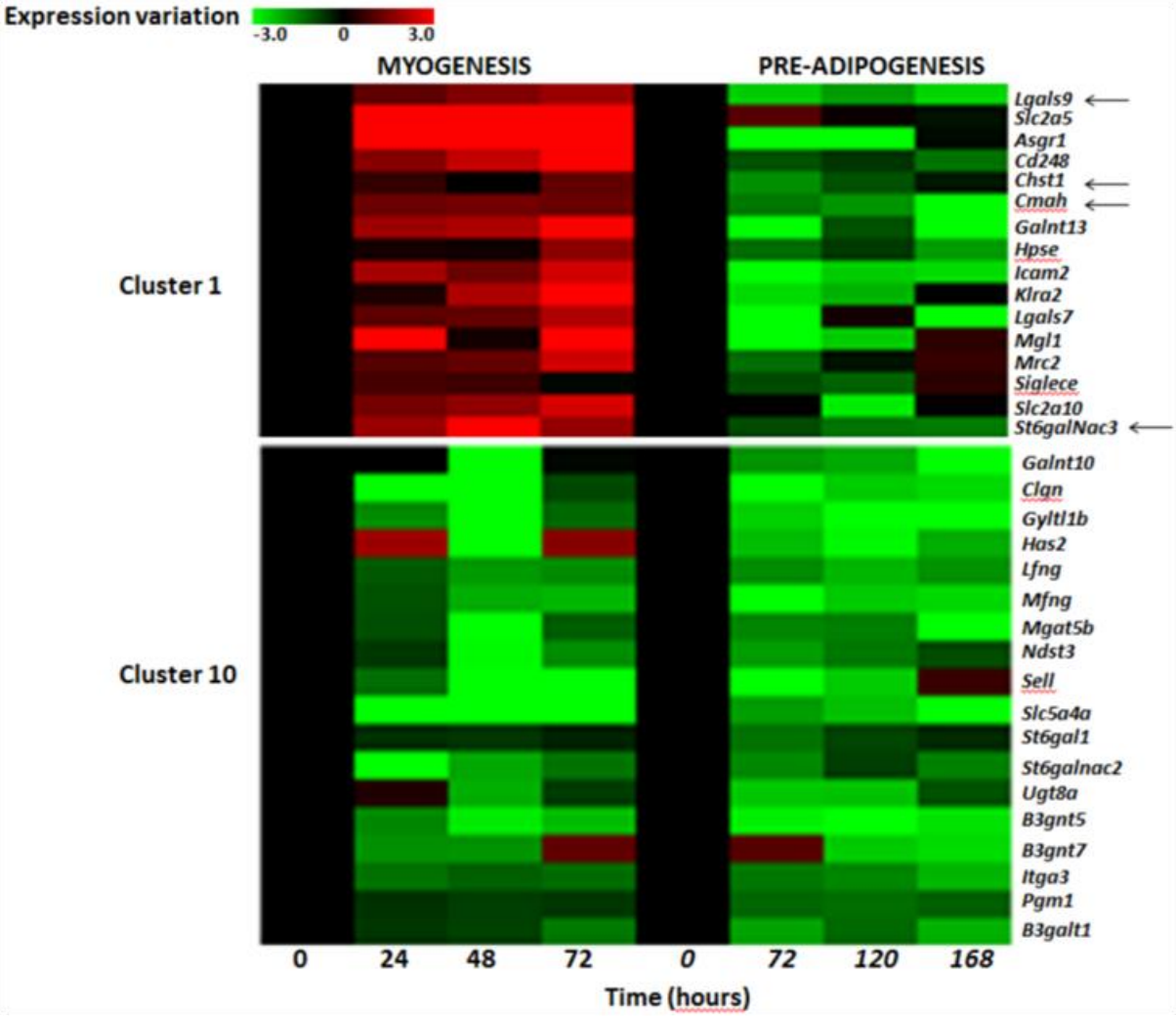
A	B	C		D - F	G		H	I	
Abo	B3galnt1	C1galt1	Chst4	D4st1	G6pc	Ganc	Has1	Icam2	Itgae
Actb	B3galt1	C1galt1c1	Chst5	Dad1	G6pdx	GAPDH	Has2	Idua	Itgam
Alg11	B3galt2	C76566	Chst7	Ddost	Gaa	Gba	Has3	Itga1	Itgav
Alg12	B3galt4	Calr	Chst8	Dgcr2	Gal3st1	Gba2	Hexa	Itga10	Itgax
Alg1	B3galt5	Calr3	Clec11a	Dpagt1	Galc	Gbgt1	Hexb	Itga11	Itgb1
Alg2	B3galt6	Canx	Clec1b	Dpm1	Galk1	Gcnt2	Hpse	Itga2	Itgb1bp1
Alg3	B3gat1	Cd207	Clec2d	Dpm2	Galnact2	Gcnt3	Hs2st1	Itga2b	Itgb1bp2
Alg5	B3gat2	Cd22	Clec2e	Edem1	Galnt1	Gcs1	Hs3st3a1	Itga3	Itgb2
Alg6	B3gat3	Cd248	Clec2g	Edem2	Galnt10	Ggta1	Hs3st3b1	Itga4	Itgb2l
Alg9	B3gnt1	Cd33	Clec2h	Ext1	Galnt11	Gla	Hs6st2	Itga5	Itgb3
Amy1	B3gnt2	Cd47	Clec2i	Ext2	Galnt12	Glb1	Hs6st3	Itga6	Itgb4bp
Art1	B3gnt3	Cd83	Clec3b	Extl1	Galnt13	Glg1	Hyal1	Itga7	Itgb5
Art2b	B3gnt5	Cd8b1	Clec4a2	Extl2	Galnt2	Glt8d1	Hyal2	Itga8	Itgb6
Art4	B3gnt7	Chi3l1	Clec4b1	Extl3	Galnt3	Glycam1	Hyal3	Itga9	Itgb7
Asgr1	B4galnt1	Chi3l3	Clec4d	Fcna	Galnt4	Gmds		Itgal	Itgb8
Asgr2	B4galnt2	Chi3l4	Clec4e	Fuca1	Galnt5	Gmppa		ItgaD	Itgbl1
Athl1	B4galt1	Chia	Clec4n	Fuca2	Galnt6	Gmppb			
Atrn	B4galt2	Chid1	Clec5a	Fuk	Galnt7	Gne			
	B4galt3	Chpf2	Clec7a	Fut1	Galntl1	Gnpnat1			
	B4galt4	Chst1	Clgn	Fut10	Galntl5	Gpaa1			
	B4galt5	Chst10	Cmah	Fut2	Galt	Gusb			
	B4galt6	Chst11	Cmas	Fut4	Ganab	Gyltl1b			
	B4galt7	Chst12	Cplx3	Fut8					
	Bclp2	Chst2	Csgalnact1						
		Chst3	Ctbs						
			Ctsa						

K	L	M	N	O - P	R	S		T-X
Kl	L1cam	Mag	Naga	Ogt	Renbp	Sec1	Slc5a2	Tbp
Klb	Large	Man1a	Nagk	Olr1	Rfng	Sele	Slc5a3	Tcea1
Klra10	Lctl	Man1a2	Naglu	Parp1	Rft1	Sell	Slc5a4a	Thbd
Klra2	Lfng	Man2a1	Nagpa	Parp2	Rpn1	Selp	Slc5a4b	Tsta3
Klra5	Lgals1	Man2a2	Nans	Parp3	Rpn2	Siglec1	St3Gal1	Uap1
Klra6	Lgals12	Man2b1	Ncam1	Pdia3		Siglece	St3Gal2	Ugcg
Klrb1a	Lgals2	Man2b2	Ncam2	Pecam1		Siglecf	St3Gal3	Ugcgl2
Klrb1c	Lgals3	Man2c1	Ndst1	Pgm1		Siglecg	St3Gal4	Ugdh
Klrc1	Lgals3bp	Manba	Ndst2	Pgm2		Slc2a1	St3Gal5	Ugp2
Klrc2	Lgals7	Manea	Ndst3	Pgm3		Slc2a10	St3Gal6	Ugt2a1
Klrc3	Lgals8	Masp1	Ndst4	Pigb		Slc2a2	St6gal1	Ugt2a3
Klrd1	Lgals9	Masp2	Neu1	Pigc		Slc2a3	St6gal2	Ugt2b1
Klre1	Lman2	Mcam	Neu2	Pigf		Slc2a4	St6GalNac1	Ugt2b34
Klrg1		Mfi2	Neu3	Pigk		Slc2a5	St6GalNac2	Ugt3a2
Klrk1		Mfng	Neu4	Pigm		Slc2a6	St6galnac3	Ugt8
		Mgat2	Ngly1	Pign		Slc2a8	St6GalNac4	Ust
		Mgat3		Pigo		Slc2a9	St6galnac5	Vcam1
		Mgat4a		Pigq		Slc35a1	St6GalNac6	Wbscr17
		Mgat4b		Pigt		Slc35a2	St8sia1	Wdfy3
		Mgat4c		Pitpna		Slc35a3	St8sia2	Xylt1
		Mgat5b		Pitpnb		Slc35b1	St8sia3	Xylt2
		Mgat5		Pitpnm1		Slc35b4	St8sia4	
		Mgea5		Pitpnm2		Slc35c1	St8sia5	
		Mgl1		Pmm1		Slc35d1	St8sia6	
		Mgl2		Pmm2		Slc5a1	Stt3a	
		Mpdu1		Pofut1		Slc5a11	Stt3b	
		Mrc2		Pofut2				
				Pomgnt1				
				Pomt1				
				Pomt2				
				Prkcsh				



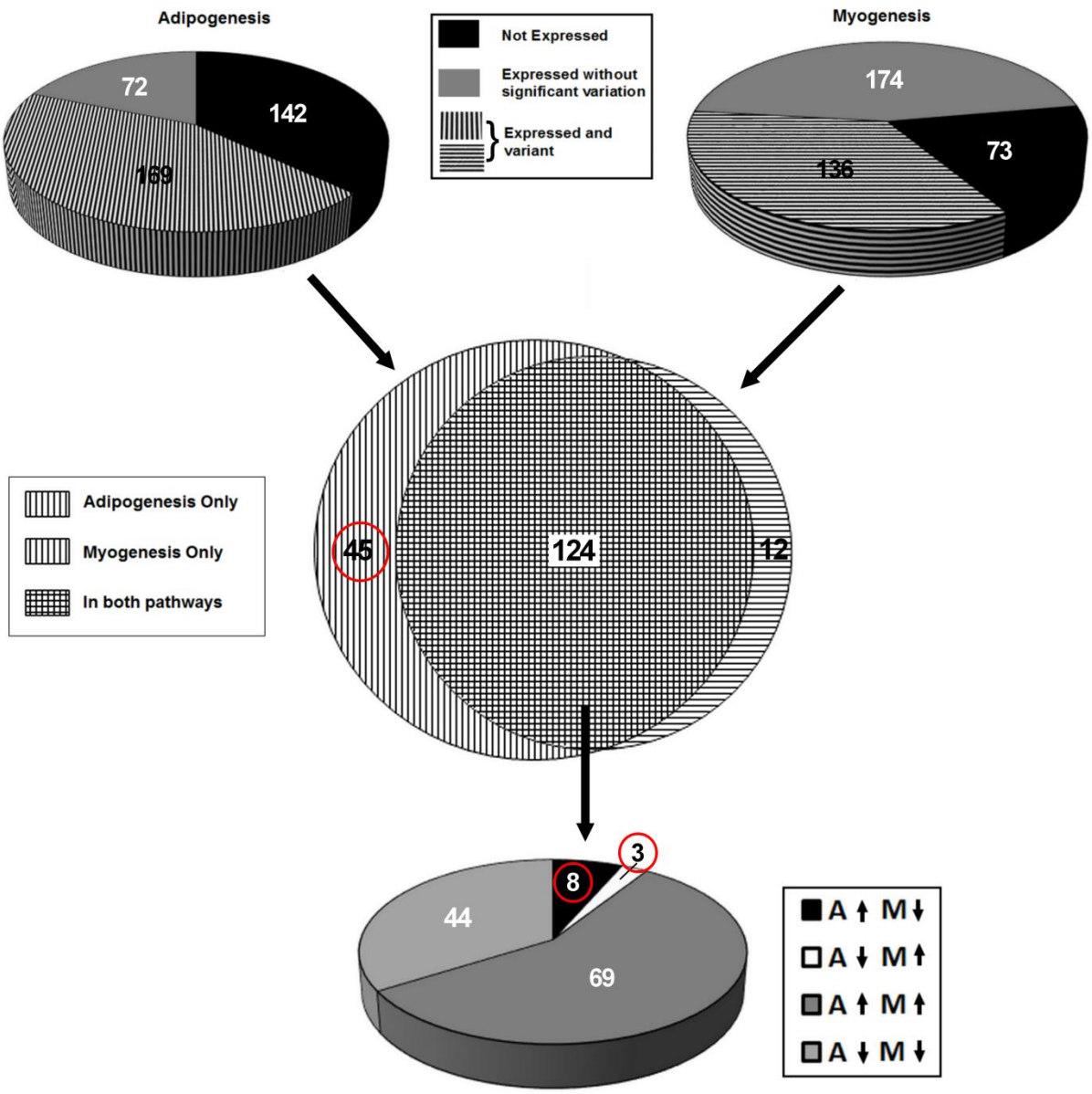
Supplementary data, Figure 1. Clustering of glycosylation related genes based on their expression profiles during the myogenic and early adipogenic differentiations of MSC.

The 169 genes were clusterized with a method taking account of their variation during the 72h of myogenesis (bold) and during the 168h of early adipogenesis (italic). Ten clusters were obtained (see Methods). Relative expression levels are plotted against the time of differentiation. In a cluster, the grey lines represent expression profile for each gene and the red line represents the mean expression profile for this cluster. The grey band showed the variation considered as insignificant.



Supplementary data, Figure 2. Expression maps of the cluster 1 and 10.

Examples of one selected cluster (1) and one discarded cluster (10). Their expression maps were presented and the associated genes were listed on the right side. Black arrow point out four selected genes with a high difference between myogenic and early adipogenic expression profiles.



Supplementary data, Figure 3. Distribution of the selected genes.

The expression of 383 glycosylation genes were followed and only the genes with a significant variation were compared. We retained (1) the genes with a significant variation only in early adipogenic process and (2) the genes with an opposite variation between the both myogenic and early adipogenic pathways (red circles).

Discussion & Conclusion

Discussion Générale

C'est avec une certitude et beaucoup de questions que je clôture ces trois années d'investigations relatives à l'étude de l'impact de la sialylation lors du processus de différenciation myogénique.

La certitude : un remaniement de la topographie moléculaire des glycoconjugués de surface se produit durant les différenciations myogénique et adipogénique.

Au niveau du laboratoire, des données sur des modifications de l'expression des glycogènes ont déjà été produites, notamment par Mathilde Janot et Vincent Grassot. Ces gènes concernent notamment les glycosyltransférases, les glycosidases, les lectines, les transporteurs de nucléotides sucres. Néanmoins, peu de données ont été générées sur les conséquences de ces remaniements d'expression génique sur les glycoconjugués de surface.

Au départ de ce projet, nous avions recherché les modifications des glycoconjugués de surface grâce aux lectines. Cette stratégie nous a très rapidement mis sur la piste de la sialylation, que nous avons approfondi dans la suite de l'étude.

Les acides sialiques sont des sucres périphériques, leur présence à la surface de la cellule est généralement très régulée, du fait des propriétés biologiques qu'ils confèrent en raison de leur charge et leur encombrement stérique. La modulation de la quantité de ces sucres a déjà été décrite dans de nombreux processus, particulièrement en cas de cancer, où leur rôle dans le phénomène de métastase a été largement documenté (Harduin-Lepers *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Concernant la différenciation myogénique, les investigations les plus abouties relatives à la sialylation, concernent la polysialylation des NCAM. Cette étude a montré le rôle inhibiteur des acides sialiques sur la différenciation musculaire (Suzuki *et al.*, 2003a). Les autres travaux conduits dans un contexte myogénique concernent les études des sialidases (Anastasia *et al.*, 2008; Fanzani *et al.*, 2008).

Une conclusion se dégage de toutes ces études: la sialylation périphérique semble réguler négativement l'étape de fusion des myoblastes en myotubes. Ce résultat a été obtenu en observant directement la dynamique des glycoconjugués de surface (sialylation en α2,6 et α2,3) durant la cinétique de différenciation des cellules C2C12. A ce stade du travail, ce résultat nous a semblé logique ; car nous pouvions imaginer que lors des étapes de fusion myoblastique, une baisse des charges négatives à la surface cellulaire serait un élément favorisant le rapprochement et l'interaction cellulaire.

Ce même principe est aussi celui des cellules cancéreuses, qui pour se détacher lors du phénomène de métastases, augmentent les charges négatives à leur surface. Néanmoins dans le cas de ces deux cellules (myoblaste et cellule cancéreuse), la réalité est beaucoup plus complexe, et ne se limite pas à des questions de charges. En effet, les acides sialiques sont portés par de nombreux récepteurs de surface et interviennent dans la régulation de leurs interactions avec leurs ligands. De plus, l'acide sialique est aussi reconnu par différents récepteurs qui lui sont spécifiques, notamment les séléctines et les SIGLEC. Ces derniers sont aussi capables d'induire la phosphorylation de domaines activateurs (ITAM), ou inhibiteurs (ITIM), qui constituent une plateforme de transduction du signal, et qui sont largement documentés dans l'activation des cellules immunitaires (Crocker and Varki, 2001). Concernant les sélectines, il a déjà été montré que les cellules métastasiques se lient aux E-séletines exprimées par les cellules de la paroi endothéliale en utilisant le motif sialyl Lewis. Cette liaison permet la dissémination et la migration des cellules cancéreuses (M. A. Krzewinski-Recchi *et al.*, 2003).

Compte tenu des données bibliographiques, nous émettons l'hypothèse que dans le cas de la myogenèse ces considérations sont également vérifiées. Nous pouvons supposer qu'une modification de la glycosylation des protéines hautement impliquées dans la myogenèse telles que les intégrines, mais également des protéines de surface de type récepteurs plus largement impliqués dans des phénomènes de différenciation, aura des conséquences sur l'établissement de la fusion myoblastique. En effet, de nombreuses protéines membranaires impliquées dans la myogenèse sont glycosylées. Ainsi, il a été montré que de nombreux récepteurs de facteurs de croissance, notamment EGFR, sont affectés dans leurs réponses par le nombre et l'anténnage des *N*-glycannes qu'ils portent (Lau *et al.*, 2007c). Concernant l'EGFR, une relation entre son activité d'auto phosphorylation et le taux des gangliosides GM3 au niveau de la membrane plasmique a été établie (Zhou *et al.*, 1994). D'autres études ont mis en exergue dans un contexte myogénique, une relation causale entre l'expression de la neuraminidase *Neu3* (neuraminidase localisée au niveau de la membrane plasmique donc l'activité est spécifique vis-à-vis des gangliosides) et l'activité de l'EGFR. En effet, une sous-expression de *Neu3* dans les cellules myoblastiques induit une modification de l'activité de l'EGFR et amène les cellules à entrer en apoptose (Anastasia *et al.*, 2008). A contrario, une augmentation quantitative de l'enzyme NEU3, conduit à l'apparition de myotubes hypertrophiques en passant par la voie ERK/MAPK, qui est apparemment induite par les GM3 membranaires (Scaringi *et al.*, 2013).

Ces données montrent clairement une relation entre le niveau de sialylation membranaire et la fusion myoblastique ; tant au niveau des acides sialiques portées par les glycolipides, que ceux portés pas les glycoprotéines.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes focalisés sur la sialylation en α2,6 liée au galactose des *N*-glycannes. Ce choix a été dicté par deux observations :

- La première, est que la liaison d'acides sialiques en α2,6 est largement répandue au niveau des *N*-glycannes.

- La seconde est que la famille des sialyltransférases qui catalysent ce type de liaison, ne comprend que deux membres, la *St6gal1* et la *St6gal2*, ce qui représente un avantage pour la réalisation de l'étude (absence de l'effet de compensation par plusieurs autres enzymes par exemple).

Les premières analyses ont montré que *St6Gal2* n'était pas exprimée dans notre modèle cellulaire. De ce fait, notre travail s'est exclusivement focalisé sur *St6Gal1*. La modulation de l'expression du gène codant cette sialyltransférase a été utilisée comme outil pour modifier la sialylation périphérique en α2,6 de la cellule, dans le but d'observer l'effet d'une hypo-sialylation sur la differenciation myogénique.

Les résultats que nous avions obtenus indiquent une augmentation de la fusion myoblastique en cas de sous-expression de *St6gal1*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fanzani sur *Neu*2 (Fanzani *et al.*, 2003). La modification de l'expression des MRFs dans les clones sous-exprimant *St6Gal1* pourrait être expliquée (i) indirectement par le dysfonctionnement de récepteurs membranaires dont l'activité est sensible au changement de leur glycosylation ; ou (ii) directement par l'affection d'un facteur de transcription. Cette question reste posée à l'heure actuelle.

Nos résultats ont révélé une forte diminution de l'expression du facteur *Pax7* par les cellules sous-exprimant *St6gal1*. Il en résulte une déplétion en cellules de réserve au sein de la population cellulaire. Le mécanisme par lequel la sialylation périphérique affecte l'expression de *Pax7* est sans doute la plus grande question qui reste posée dans ce projet.

Un début de réponse peut être inspiré par les études relatives à la myopathie héréditaire à corps d'inclusion (HIBM). Les patients atteints par cette myopathie présentent une hypo-sialylation périphérique de la cellule musculaire, qui induit une perte de l'intégrité progressive de la myofibre. De plus, l'hypo-sialylation est associée à un déséquilibre des charges qui perturbe fortement le passage de l'influx nerveux, du fait que la membrane plasmique est dans un état de dépolarisation permanent. Cette myopathie apparait à l'âge adulte. Elle est à progression lente et se caractérise par l'apparition de corps d'inclusion au niveau

cytoplasmique et la perte de la capacité régénérative généralement observée chez les patients atteints de dystrophie musculaire par exemple (livre « Myology : Basic and clinical. Vol1 ; 3ed-2004 - page 1311-1320 » (Engel AG and Franzini-Armstrong C, 2004)).

Le phénotype observé était initialement imputé à une baisse de l'activité de l'enzyme GNE (Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase), mais les travaux de Milman Krentsis *et al.* (2011) indiquent que l'hypo-sialylation seule ne peut pas expliquer le phénotype observé. Les souris *KO GNE* présentent une létalité prénatale et les études *in vivo* sur ce modèle s'avèrent non concluantes. Dans ce travail, pour s'affranchir de cette limite, les auteurs ont réalisé une culture de cellules *ES ex vivo*, issues des souris *KO GNE* (Milman Krentsis *et al.*, 2011).

Lors des premières étapes de mise en culture des cellules GNE-/-, celles-ci présentaient une capacité de prolifération, d'adhésion et de migration amoindrie par rapport aux cellules GNE+/+. Néanmoins, ces cellules (GNE-/-) se différencient sans aucune difficulté en cardiomyocytes ou en myocytes (Milman Krentsis *et al.*, 2011).

Une mesure des marqueurs moléculaires de la différenciation myogénique a mis en évidence la disparition totale de l'expression de *Pax7* et de *MyoD* lors de l'initiation du processus myogénique des cellules GNE-/-. Ce résultat obtenu *ex vivo* avec des cellules présentant une hypo-sialylation périphérique est similaire à ce que nous avons obtenu *in vitro* avec notre modèle de lignée myoblastique C2C12 sous-exprimant *St6gal1* (Milman Krentsis *et al.*, 2011). Ceci témoigne d'une relation directe ou indirecte entre l'hypo-sialylation périphérique et l'expression de facteurs clés de la différenciation myogénique comme Pax7.

Dans un travail publié en 2007, des auteurs ont isolé des cellules satellites à partir de biopsie de patients HIBM, afin de tester *ex vivo* la capacité de prolifération, de différenciation, et de régénération (Amsili *et al.*, 2007; Broccolini *et al.*, 2006). Lors de la différenciation de ces cellules, les auteurs n'ont pas remarqué une différence dans l'index de fusion, mis à part que les cellules HIBM entament la différenciation précocement par rapport aux cellules témoin. A partir de ce constat, les auteurs ont conclu que les cellules issues de patients HIBM, ont la capacité de proliférer et de se différencier, avec de légères disparités par rapport aux cellules témoins. Ce qui est logique au vu des phénotypes des patients.

D'où la légitime question : Ne serait-ce pas un problème de régénération myogénique plutôt qu'un problème de différenciation myogénique ? Pour répondre à cette question, les auteurs ont constaté que les cellules HIBMavaient une réponse plus importante face à l'apoptose en comparaison avec les témoins (Amsili *et al.*, 2007).

Le fait que les cellules HIBM, possèdent toutes une capacité proliférative et de différenciation peut expliquer le fait que les patients ont un développement musculaire normal, et que la maladie n'apparaisse qu'à l'âge adulte, en n'affectant que certains muscles. Ceci explique aussi que cette myopathie est à progression lente. Les auteurs ont concluent que le problème chez ces patients pourrait être une perte de la capacité de régénération, ce qui explique l'absence de régénération constatée dans les biopsies des patients (Amsili *et al.*, 2007; Broccolini *et al.*, 2006).

La déplétion de *Pax7* dans nos lignées sous-exprimant *St6gal1*, et qui par conséquent présentent une hypo-sialylation périphérique en α2,6 va dans le même sens que les conclusions exprimées par les travaux sur la myopathie à corps d'inclusion. En effet, la sialylation périphérique pourrait jouer un rôle dans la régénération myogénique, et non pas dans la différenciation en elle-même. *In vitro*, nous avions observé une augmentation dans le volume des myotubes et la vitesse de différenciation, ce constat a aussi été associé à une déplétion accrue des cellules de réserve dans nos clones sous-exprimant *St6gal1*.

L'extrapolation de ces données *in vivo*, pourrait bien expliquer une partie du phénotype des myopathes souffrant d'hyposialylation périphérique. En effet, ces patients développent des muscles normaux et fonctionnels. Cependant, à l'âge adulte, et en dépit de la progression lente de la maladie, les patients sont dans l'incapacité de contre balancer cette myo-dégénérescence avec des tentatives de régénération. *Pax7* est primordiale dans la survie et le maintien des cellules satellites, une déplétion de celui-ci pourrait expliquer la sensibilité des cellules face à l'apoptose chez les patients atteints d'HIBM.

Conclusion et perspectives

Pour conclure, ce travail a soulevé de nombreuses questions :

La baisse de la sialylation périphérique durant la fusion myoblastique est-elle confirmée dans d'autres modèles?

La majorité des travaux (les nôtres compris) qui ont mis en exergue une baisse de la sialylation périphérique lors d'un processus de différenciation, ont été réalisés sur un modèle cellulaire *in vitro*. Cette étude devrait être étendue à un modèle *ex vivo*, en partant par exemple de cellules satellites.

De plus des analyses plus poussées devraient être effectué afin d'estimer l'évolution des acides sialiques membranaires de façon plus précise au cours du processus de différenciation myogénique. Par exemple, au cours de notre étude nos avions estimé le taux d'acides sialiques par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse après hydrolyse et couplage au DMB. Cette analyse pourrait être appliquée à des fractions cellulaires enrichies en membranes, ceci pour différents temps de la cinétique de différenciation myogénique.

Qu'en est-il des autres modifications observées à la surface de la cellule lors de la différenciation myogénique ?

Lors de nos investigations, nous avons noté une baisse de la sialylation en α2,3 sur des glycoconjugués de surface des cellules C2C12 en différenciation. C'est un type de liaison largement porté par des glycolipides de surface. De plus un réarrangement dans le profil des gangliosides membranaires (notamment les GM3, les GM2 et les GD1) a été observé par spectrométrie de masse.

Cette expérimentation a été réalisée une seule fois, de ce fait, nous envisagerons de reproduire nos manipulations de spectrométrie de masse sur des cinétiques de différenciation myoblastique, afin de confirmer la modification dans le profil des gangliosides membranaires. De plus, cette analyse pourrait être approfondie par une stratégie ms/ms, pour différencier les deux types de liaisons (α2, 3 et α2, 6).

En second lieu, des dérégulations de l'expression des gènes responsables de l'établissement de ces structures devront être envisagées dans un contexte myogénique. La famille des gènes *St3gal* est multigénique (6 sous-familles), et les enzymes correspondantes présentent une

affinité équivalente pour les glycolipides et les glycoprotéines, mis à part la St3galV, qui a une affinité spécifique vis-à-vis des glycolipides. Nous pouvons imaginer que des phénomènes de compensation par d'autres gènes de la même famille sont possibles si nous touchons à l'expression d'un gène de la famille. Néanmoins une récente étude effectuée sur la St3Gal-3,-4, et -6 dans un contexte hématologique (interaction selectines - sialyl lewis ^{x} entre les cellules endothéliale et les leucocytes) ont montré que la présence du sialyl lewis ^{x} à la membrane est perturbée uniquement par l'affection de la St3Gal-4, et aucune compensation n'a été observée par les autres membres de la famille (Mondal *et al.*, 2015). Nous pouvons imaginer qu'en dépit de leur affinité croisée pour les mêmes substrats accepteurs, ces enzymes présentent un substrat préférentiel. Nous pouvons alors viser l'α2,3 sialyltransférase, en fonction des glycoconjugués de surface que nous voulons cibler.

Dans notre travail, il serait intéressant de cibler la sialylation des gangliosides de surface en modifiant l'expression de la *St3gal5*, un début de réponse à été apporté par les études conduites sur NEU3 qui dégrade au niveau membranaire ce type de sialylation (Anastasia *et al.*, 2008) . Des informations supplémentaires pourront être générées si la baisse de sialylation survient au niveau de la synthèse des gangliosides sialylés (sous-expression de la sialyltransférase), et non pas au niveau membranaire (hydrolyse des résidus sialyl au niveau de la membrane). Comme cela a été le cas quand nous avons touché à la sialylation en 2-6 des *N*-glycoconjugués portés par les glycoprotéines en sous exprimant la *St6gal1* ; en comparaison avec les travaux qui ont porté sur la Neuraminidase *Neu2* (Fanzani *et al.*, 2003, 2012).

Nous avions également observé la modification d'un motif glycannique porté par les *O*-glycannes. Ce résultat mériterait d'être approfondi, notamment avec l'utilisation d'autres lectines et des anticorps spécifiques aux motifs *O*-glycanniques. Un panel de lectines et d'anticorps existe sur le marché, un répertoire de ces outils a été publié dans la deuxième édition du livre « Essentials of Glycobiology. 2nd edition » (Chapitre 45 : Cummings and Etzler, 2009). Ces résultats pourront ensuite être confrontés aux données de transcriptomique déjà acquises au laboratoire. Un projet qui s'intéresse à l'utilisation de tels outils est déjà en cours au laboratoire. Dans le cadre d'une thèse, l'intérêt est porté sur les motifs fucosyl et leur évolution dans un contexte myogénique.

La baisse de la sialylation durant la différenciation est-elle spécifique à la myogenèse ?

Les résultats obtenus lors de la différenciation myogénique des cellules satellites ont bien confirmé la baisse de la sialylation périphérique observée lors de la différenciation des cellules C2C12. Cette baisse de la sialylation périphérique est également constatée au cours de la différenciation pré-adipogénique, ce qui témoigne de l'importante régulation de la sialylation périphérique.

La baisse observée au cours de la pré-adipogénèse concerne plus particulièrement la liaison en α2,6 des acides sialiques. Cette baisse peut aussi être corrélée à la modification des motifs *N*-glycanniques observée et qui résulte de changements dans l'expression des glycogènes impliqués dans l'établissement et la dégradation de ces motifs glycanniques.

La baisse de la sialylation semble logique dans les deux cas de différentiation. D'une part, lors de la différenciation myogénique, elle favorise le rapprochement cellulaire nécessaire à la fusion myoblastique, et d'autre part, lors de l'adipogénèse, elle favorise les lobules de cellules adipocytaires (Kuri-Harcuch *et al.*, 1984b). Afin de poursuivre l'étude, nous devrions exploiter la capacité de trans-différenciation des cellules satellites. Ces derniers peuvent adopter un devenir ostéogénique dans des conditions de culture particulières. Dans ce cas, le suivi, de l'expression des glycogènes pourrait nous donner un supplément d'information sur l'implication des acides sialiques dans un modèle de différenciation qui n'implique pas forcément une fusion cellulaire. La trans-différenciation vers des ostéoclastes implique une culture particulière des cellules satellites (présence du facteur BMP2 dans le milieu de culture) (Katagiri *et al.*, 1994).

Pour réaliser cette expérimentation, une grande quantité de protéine BMP2 est nécessaire. C'est la raison pour laquelle, au laboratoire, nous essayons de la produire dans système de production eucaryote. L'ADNc de BMP2 a déjà été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote, la mise au point du protocole de production est en cours (Vincent GRASSOT : communication personnelle). La production de cette protéine nous permettrait de tenter la trans-differenciation en ostéoclastes, afin de confirmer ou d'affirmer le lien entre la sialylation périphérique et le rapprochement cellulaire.

Quel est le lien entre la sialylation périphérique et l'expression de Pax7 ?

La régulation de l'expression de *Pax7* est dépendante de plusieurs voies de signalisation, notamment celle de Notch, Wnt, SHH, IGF, et TNF*α* ; en citant uniquement celles qui agissent directement sur l'expression de *Pax7*.

Nous savons aussi que ces voies passent par l'activation de récepteurs membranaires qui sont potentiellement glycosylées et porteurs d'acides sialiques. Nous pouvons imaginer que la modification de la sialylation périphérique dans nos clones sous-exprimant *ST6gal1* a probablement changé la signalisation induite par un ou des récepteur(s). Cette modification de la glycosylation peut intervenir à plusieurs niveaux notamment sur l'adressage membranaire du récepteur, sa liaison au ligand et son activité de transduction du signal.Voici ci-dessous quelques exemples :

La voie Wnt /β-caténine : La voie des Wnt fait intervenir la β-caténine *(Perez-Ruiz et al.,* 2008). Ce facteur est aussi activé pas les M-cadhérines lors de l'activation des cellules satellites (Wróbel *et al.,* 2007) . Les M-cadhérines sont fortement exprimées dans les cellules satellites en quiescence et au cours des étapes précoces de la régénération. Elles sont aussi exprimées dans les myoblastes en prolifération (Irintchev *et al.,* 1994). Durant la différenciation myogénique, une relation entre les M-cadhérines et la phosphorylation de la β-cathénine à déjà été décrite, cette activation semble réguler la myogenèse, en agissant sur l'expression de facteurs clés de l'amorçage de la différenciation, tels que *MyoD* (Wang *et al.,* 2013). De plus, il a été montré que la *N*-glycosylation intervenait au cours du processus d'adressage à la membrane des cadhérines (Hall *et al.,* 2014). Une étude récente conduite sur *St6gal1*dans des cellules mésenchymateuses cancéreuses a révélé que la régulation positive de l'expression de l'α2,6 sialyltransférase dans les cellules métastasiques est accompagnée par une augmentation des cadhérines à la surface de la cellule. Les auteurs ont établi le lien entre la sialylation en α2,6, l'adressage membranaire, et le turnover des cadhérines (Lu *et al.,* 2014). En prenant en compte ce dernier travail, ainsi que l'ensemble des données qui établissent un lien entre la M-cadhérine et la β-caténine ; et sachant que la voie β-cathénine régule directement l'expression de *Pax7* (Perez-Ruiz *et al.,* 2008), il apparaît tout à fait pertinent de considérer cette voie de manière approfondie dans la poursuite du projet.

Nous pourrions envisager, dans le cadre de notre projet, de suivre dans un premier temps l'expression et la localisation de la M-cadhérine dans nos clones sous-exprimant *St6gal1*.Si une modification dans le profil de la M-cadhérine était observée, nous pourrions dans un second temps étudier l'activation de la voie β-caténine en analysant sa phosphorylation. Si cette voie est affectée nous pourrions avoir un début de réponse concernant la modulation de l'expression de *Pax7* dans les clones sous-exprimant *St6gal1*.

Le récepteur Notch : Nous savons aujourd'hui que le récepteur Notch porte de nombreuses glycosylations sur son domaine extracellulaire (Stanley, 2007), il est aussi connu que la glycosylation du récepteur Notch intervient fortement dans son activité (Stanley and Okajima, 2010). L'essentiel des travaux qui relient la glycosylation, Notch et la myogenèse portent sur la *O*-glycosylation, notamment la *O*-fucosylation, et la *O*-glucosylation (Jafar-Nejad *et al.*, 2010; Stanley and Okajima, 2010). L'allongement de ce type de glycosylation donne naissance à un glycoconjugué qui se termine par un acide sialique (généralement en α2,3) (Stanley, 2007; Kakuda and Haltiwanger, 2014). Néanmoins, le domaine extracellulaire de Notch porte aussi des *N*-glycannes complexes susceptibles de porter un acide sialique en α2,6. Le seul travail qui traite de la *N*-glycosylation et de la voie Notch a été réalisé sur des cellules souches neuronales. Dans ce travail les auteurs ont montré que le motif Lewis x porté par le N-glycanne est impliqué dans la prolifération cellulaire en activant la voie de Notch (Yagi *et al.*, 2012). Très peu de données sont connues concernant le rôle exact de la N-glycosylation portée par le récepteur Notch, et la modulation de son activité, et encore moins la sialylation de ce récepteur.

Dans un contexte myogénique, ce récepteur intervient très tôt dans la modulation de l'expression de *Pax7* dans les cellules progénitrices myoblastiques. L'expression de *Pax7* est liée à une baisse de la signalisation du récepteur Notch due à l'augmentation de la protéine NUMB, un inhibiteur de la signalisation Notch. Une modification dans l'expression du récepteur Notch a déjà été mise en relation avec la capacité de régénération musculaire (Conboy and Rando, 2002; Conboy *et al.*, 2003). Nous pourrions envisager d'examiner dans un premier temps, l'expression du récepteur Notch ainsi que sa présence au niveau membranaire dans les clones sous exprimant *St6gal1*, afin de vérifier si les modifications apportées à l'environnement glycannique (la sialylation) a une influence sur son expression ou sur sa localisation. En second, lieu nous pourrions étudier dans ces clones l'activation du récepteur Notch, ens'intéressant aux acteurs cytoplasmiques de cette voie de signalisation.

De manière plus générale, une analyse globale des voies de signalisation impliquées dans la différenciation myogénique est engagée dans les clones sous-exprimant *St6gal1*. Par l'utilisation de phospho-puces, les activités de plusieurs voies de signalisation seront examinées, notamment les voies des Pi3K/AKT, MAPK/ERK, p38, EGF, ou encore la voie des Smads.

Nous savons notamment que dans la différenciation myogénique, Les facteurs SHH et IGF ont une action. Ces deux facteurs semblent activer la phosphorylation des MAPK/ERK et Pi3K/AKT, ce qui induit l'expression de *Pax7* (Elia *et al.*, 2007; Madhala-Levy *et al.*, 2012).

Très peu de données sont connues concernant la glycosylation de SHH, ou des récepteurs membranaires impliqués dans sa signalisation. Néanmoins, concernant l'IGF, plus de choses sont connues concernant la glycosylation de son récepteur (IGF-1R). En effet, un travail réalisé sur les cellules tumorales prostatiques amontré que le blocage de la *N*-glycosylation par la tunicamycine, induit une accumulation de l'IGF1-R au niveau cytosolique, et entraine un défaut de son adressage à la membrane (Itkonen and Mills, 2013).

Au vue de cette étude, et des études concernant les autres récepteurs membranaires de type EGFR, et HGFR, exposées précédemment (Lau *et al.*, 2007a), la *N*-glycosylation semble avoir un rôle primordial dans l'adressage membranaire (Isaji *et al.*, 2006), la modification de la sialylation pourra avoir un rôle dans ce sens.

La sialylation périphérique serait-elle impliquée dans la régénération du muscle squelettique ?

Ce qui justifie cette question c'est la défaillance de la régénération musculaire chez les patients atteints de myopathie caractérisée par une hypo-sialylation. De plus nos résultats, mettent en évidence une extinction du facteur *Pax7* dans nos cultures qui sous-expriment *St6gal1*. Ceci implique un engagement plus important des cellules de réserve dans la différenciation myogénique, ce qui induit une déplétion en cellules de réserve quiescentes.

Une des façons de vérifier cette hypothèse, serait en premier lieu d'extrapoler nos résultats sur de l'*in vivo*. En effet, des souris *KO St6gal1* existent (Hennet *et al.*, 1998). Les auteurs déclarent que les souris ne portent aucune particularité phénotypique. Néanmoins, les auteurs se sont focalisés sur l'aspect immunologique, et aucune observation détaillée des autres organes, ou du muscle squelettique n'a été réalisée. De ce fait, une analyse plus minutieuse des muscles de ces souris est nécessaire. Ainsi, des biopsies de muscle squelettique, avec un typage des fibres pourront être réalisées. De plus, ces expérimentations devront être réalisées sur un large panel de muscles squelettique. En effet, seuls les muscles distaux et proximaux sont touchés dans le cas de la myopathie. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la distribution des cellules satellites est différente en fonction du muscle. Bien que présentes dans l'ensemble des muscles squelettiques, leur nombre varie en fonction du muscle; des types de fibres majoritaires; du stade de développement et des espèces (Snow, 1983). Généralement les fibres lentes de type I présentent un nombre plus important de cellules satellites que les fibres rapides de type II (Gibson and Schultz, 1982).

L'estimation du nombre de cellules satellites dans les muscles issus des souris *KO St6gal1* nous donnerait une première indication, qui pourrait être en accord avec la déplétion en cellules de réserve observée *in vitro* sur les C2C12 sous-exprimant *St6gal1*.

De plus, la capacité de régénération du muscle de ces souris pourrait être estimée en observant la réparation du muscle après l'induction d'une lésion mécanique, ou en traitant par des toxines, comme la cardiotoxine. Des cultures *ex vivo* de cellules satellites issues des muscles de souris *KO St6gal1*, pourront aussi être réalisées afin de tester la capacité proliférative et de différenciation de ces cellules ; mais aussi, estimer le taux d'expression des facteurs clés de la myogenèse comme les facteurs *Pax*, et les MRFs.

Références

Abiola, M., Favier, M., Christodoulou-Vafeiadou, E., Pichard, A.-L., Martelly, I., and Guillet-Deniau, I. (2009). Activation of Wnt/beta-catenin signaling increases insulin sensitivity through a reciprocal regulation of Wnt10b and SREBP-1c in skeletal muscle cells. PloS One *4*, e8509.

Abriel, H., Cabo, C., Wehrens, X.H.T., Rivolta, I., Motoike, H.K., Memmi, M., Napolitano, C., Priori, S.G., and Kass, R.S. (2001). Novel Arrhythmogenic Mechanism Revealed by a Long-QT Syndrome Mutation in the Cardiac Na+ Channel. Circ. Res. *88*, 740–745.

Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N.A., Pan, H., Haltiwanger, R.S., and Bellen, H.J. (2008). Rumi, a CAP10 domain protein, is a glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. Cell *132*, 247–258.

Aguiari, P., Leo, S., Zavan, B., Vindigni, V., Rimessi, A., Bianchi, K., Franzin, C., Cortivo, R., Rossato, M., Vettor, R., et al. (2008). High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 1226–1231.

Akiho, M., Nakashima, H., Sakata, M., Yamasa, Y., Yamaguchi, A., and Sakuma, K. (2010). Expression profile of Notch-1 in mechanically overloaded plantaris muscle of mice. Life Sci. *86*, 59–65.

Akita, K., Yoshida, S., Ikehara, Y., Shirakawa, S., Toda, M., Inoue, M., Kitawaki, J., Nakanishi, H., Narimatsu, H., and Nakada, H. (2012). Different levels of sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in patients with endometriosis and ovarian cancer. Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc. *22*, 531–538.

Alonso, D.F., Gabri, M.R., Guthmann, M.D., Fainboim, L., and Gomez, D.E. (1999). A novel hydrophobized GM3 ganglioside/Neisseria meningitidis outer-membrane-protein complex vaccine induces tumor protection in B16 murine melanoma. Int. J. Oncol. *15*, 59–66.

Amsili, S., Shlomai, Z., Levitzki, R., Krause, S., Lochmuller, H., Ben-Bassat, H., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2007). Characterization of hereditary inclusion body myopathy myoblasts: possible primary impairment of apoptotic events. Cell Death Differ. *14*, 1916–1924.

Anastasia, L., Papini, N., Colazzo, F., Palazzolo, G., Tringali, C., Dileo, L., Piccoli, M., Conforti, E., Sitzia, C., Monti, E., et al. (2008). NEU3 Sialidase Strictly Modulates GM3 Levels in Skeletal Myoblasts C2C12 Thus Favoring Their Differentiation and Protecting Them from Apoptosis. J. Biol. Chem. *283*, 36265–36271.

Angata, T., and Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. Chem. Rev. *102*, 439–469.

Angata, K., Suzuki, M., McAuliffe, J., Ding, Y., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2000). Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. J. Biol. Chem. *275*, 18594–18601.

Angata, K., Yen, T.Y., El-Battari, A., Macher, B.A., and Fukuda, M. (2001). Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity. J. Biol. Chem. *276*, 15369–15377.

Angata, K., Suzuki, M., and Fukuda, M. (2002). ST8Sia II and ST8Sia IV Polysialyltransferases Exhibit Marked Differences in Utilizing Various Acceptors Containing Oligosialic Acid and Short Polysialic Acid THE BASIS FOR COOPERATIVE POLYSIALYLATION BY TWO ENZYMES. J. Biol. Chem. *277*, 36808–36817.

Angström, J., Teneberg, S., and Karlsson, K.A. (1994). Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of Vibrio cholerae, Escherichia coli, and Clostridium tetani: evidence for overlapping epitopes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 11859–11863.

Appenheimer, M.M., Huang, R.-Y., Chandrasekaran, E.V., Dalziel, M., Hu, Y.P., Soloway, P.D., Wuensch, S.A., Matta, K.L., and Lau, J.T.Y. (2003). Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. Glycobiology *13*, 591–600.

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

Argov, Z., and Yarom, R. (1984). “Rimmed vacuole myopathy” sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. J. Neurol. Sci. *64*, 33–43.

Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rüther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. EMBO J. *17*, 6289–6299.

Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M. (2001a). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. Differ. Res. Biol. Divers. *68*, 245–253.

Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M. (2001b). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. Differ. Res. Biol. Divers. *68*, 245–253.

Babino, A., Oppezzo, P., Bianco, S., Barrios, E., Berois, N., Navarrete, H., and Osinaga, E. (2000). Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *86*, 753–759.

Baboval, T., Koul, O., and Smith, F.I. (2000). N-Glycosylation site occupancy of rat α-1,3-fucosyltransferase IV and the effect of glycosylation on enzymatic activity. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1475*, 383–389.

Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell *75*, 73–82.

Bakker, H., Schoenmakers, P.S., Koeleman, C.A.M., Joziasse, D.H., Die, I. van, and Eijnden, D.H. van den (1997). The substrate specificity of the snail Lymnaea stagnalis UDP-GlcNAc:GlcNAcβ-R β4-N-acetylglucosaminyltransferase reveals a novel variant pathway of complex-type oligosaccharide synthesis. Glycobiology *7*, 539–548.

Baldus, S.E., Zirbes, T.K., Glossmann, J., Fromm, S., Hanisch, F.G., Mönig, S.P., Schröder, W., Schneider, P.M., Flucke, U., Karsten, U., et al. (2001). Immunoreactivity of monoclonal

antibody BW835 represents a marker of progression and prognosis in early gastric cancer. Oncology *61*, 147–155.

Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefière, V., Caruelle, J.-P., Martelly, I., and Papy-García, D. (2003). Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. Glycobiology *13*, 647–653.

Barrow, H., Tam, B., Duckworth, C.A., Rhodes, J.M., and Yu, L.-G. (2013). Suppression of Core 1 Gal-Transferase Is Associated with Reduction of TF and Reciprocal Increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 Glycans in Human Colon Cancer Cells. PLoS ONE *8*.

Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H.L. (1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 15603–15607.

Baycin-Hizal, D., Gottschalk, A., Jacobson, E., Mai, S., Wolozny, D., Zhang, H., Krag, S.S., and Betenbaugh, M.J. (2014). Physiologic and pathophysiologic consequences of altered sialylation and glycosylation on ion channel function. Biochem. Biophys. Res. Commun.

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

De Beer, T., Vliegenthart, J.F., Löffler, A., and Hofsteenge, J. (1995). The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alpha-mannopyranose. Biochemistry (Mosc.) *34*, 11785–11789.

Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Cell *61*, 49–59.

Bennett, E.S. (2002). Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na+ channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I. J. Physiol. *538*, 675–690.

Bennett, E., Urcan, M.S., Tinkle, S.S., Koszowski, A.G., and Levinson, S.R. (1997b). Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. J. Gen. Physiol. *109*, 327–343.

Bergwerff, A.A., Hulleman, S.H., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F., Shaw, L., Reuter, G., and Schauer, R. (1992). Nature and biosynthesis of sialic acids in the starfish Asterias rubens. Identification of sialo-oligomers and detection of S-adenosyl-L-methionine: N-acylneuraminate 8-O-methyltransferase and CMP-N-acetylneuraminate monooxygenase activities. Biochimie *74*, 25–37.

Bettenhausen, B., Hrabě de Angelis, M., Simon, D., Guénet, J.L., and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. Dev. Camb. Engl. *121*, 2407–2418.

Bink, R.J., Habuchi, H., Lele, Z., Dolk, E., Joore, J., Rauch, G.-J., Geisler, R., Wilson, S.W., den Hertog, J., Kimata, K., et al. (2003). Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish. J. Biol. Chem. *278*, 31118–31127.

Biol, M.C., Martin, A., and Louisot, P. (1992). Nutritional and developmental regulation of glycosylation processes in digestive organs. Biochimie *74*, 13–24.

Biressi, S., Molinaro, M., and Cossu, G. (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Dev. Biol. *308*, 281–293.

Bjoern, S., Foster, D.C., Thim, L., Wiberg, F.C., Christensen, M., Komiyama, Y., Pedersen, A.H., and Kisiel, W. (1991). Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. J. Biol. Chem. *266*, 11051–11057.

Black, B.L., and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *14*, 167–196.

Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. J. Biol. Chem. *270*, 2889–2892.

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

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol. Rev. *82*, 291–329.

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

Bobowski, M., Vincent, A., Steenackers, A., Colomb, F., Van Seuningen, I., Julien, S., and Delannoy, P. (2013). Estradiol Represses the GD3 Synthase Gene ST8SIA1 Expression in Human Breast Cancer Cells by Preventing NF?B Binding to ST8SIA1 Promoter. PLoS ONE *8*.

Boccuto, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C.-F., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., et al. (2014). A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. Hum. Mol. Genet. *23*, 418–433.

Bonten, E., van der Spoel, A., Fornerod, M., Grosveld, G., and d' Azzo, A. (1996). Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. Genes Dev. *10*, 3156–3169.

Bouyer, C., Forestier, L., Renand, G., and Oulmouden, A. (2014). Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. PloS One *9*, e97399.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. *72*, 248–254.

Brand-Saberi, B., and Christ, B. (1999). Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. Cell Tissue Res. *296*, 199–212.

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

Brand-Saberi, B., Müller, T.S., Wilting, J., Christ, B., and Birchmeier, C. (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. Dev. Biol. *179*, 303–308.

Braun, T., and Arnold, H.H. (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. EMBO J. *14*, 1176–1186.

Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 349–361.

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

Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 678–689.

Breitbart, R.E., Liang, C.S., Smoot, L.B., Laheru, D.A., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. Dev. Camb. Engl. *118*, 1095–1106.

Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., and Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. Glycobiology *16*, 29R – 37R.

Broccolini, A., Gidaro, T., Morosetti, R., Gliubizzi, C., Servidei, T., Pescatori, M., Tonali, P.A., Ricci, E., and Mirabella, M. (2006). Neprilysin participates in skeletal muscle regeneration and is accumulated in abnormal muscle fibres of inclusion body myositis. J. Neurochem. *96*, 777–789.

Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochim. Biophys. Acta *1473*, 67–95.

Brohmann, H., Jagla, K., and Birchmeier, C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. Dev. Camb. Engl. *127*, 437–445.

Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. Nature *406*, 411–415.

Brunetti, A., and Goldfine, I.D. (1990). Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. J. Biol. Chem. *265*, 5960–5963.

Bryan, B.A., Li, D., Wu, X., and Liu, M. (2005). The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *62*, 1547–1555.

Bryson-Richardson, R.J., and Currie, P.D. (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. Nat. Rev. Genet. *9*, 632–646.

Bubka, M., Link-Lenczowski, P., Janik, M., Pocheć, E., and Lityńska, A. (2014). Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in human melanoma cells. Implications for MCAM N-glycosylation. Biochimie *103*, 37–49.

Buchberger, A., Ragge, K., and Arnold, H.H. (1994). The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2. J. Biol. Chem. *269*, 17289–17296.

Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. Curr. Opin. Genet. Dev. *16*, 525–532.

Buckingham, M., and Montarras, D. (2008). Skeletal muscle stem cells. Curr. Opin. Genet. Dev. *18*, 330–336.

Buckingham, M., and Relaix, F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *23*, 645–673.

Buckingham, M., and Rigby, P.W.J. (2014). Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. Dev. Cell *28*, 225–238.

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J. Anat. *202*, 59–68.

Bülow, H.E., and Hobert, O. (2006). The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *22*, 375–407.

Bülow, H.E., Tjoe, N., Townley, R.A., Didiano, D., van Kuppevelt, T.H., and Hobert, O. (2008). Extracellular sugar modifications provide instructive and cell-specific information for axon-guidance choices. Curr. Biol. CB *18*, 1978–1985.

Burda, P., and Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim. Biophys. Acta *1426*, 239–257.

Cacić, M., Müthing, J., Kracun, I., Neumann, U., and Weber-Schürholz, S. (1994). Expression of neutral glycosphingolipids and gangliosides in human skeletal and heart muscle determined by indirect immunofluorescence staining. Glycoconj. J. *11*, 477–485.

Calvete, J.J., and Sanz, L. (2008). Analysis of O-glycosylation. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *446*, 281–292.

Cambron, L.D., and Leskawa, K.C. (1994). Glycosphingolipids during skeletal muscle cell differentiation: comparison of normal and fusion-defective myoblasts. Mol. Cell. Biochem. *130*, 173–185.

Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F., and Karsten, U. (1996). Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. Histochem. Cell Biol. *106*, 197–207.

Carnac, G., Primig, M., Kitzmann, M., Chafey, P., Tuil, D., Lamb, N., and Fernandez, A. (1998). RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. Mol. Biol. Cell *9*, 1891–1902.

Caserta, F., Tchkonia, T., Civelek, V.N., Prentki, M., Brown, N.F., McGarry, J.D., Forse, R.A., Corkey, B.E., Hamilton, J.A., and Kirkland, J.L. (2001). Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. *280*, E238–E247.

Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.-M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.-H., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2009). GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. Biol. Chem. *390*, 601–609.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., and Delannoy, P. (2010a). Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Breast Cancer Res. BCR *12*, 204.

Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2010b). GD_3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. Mol. Cancer Res. MCR *8*, 1526–1535.

Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guérardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., and Delannoy, P. (2012). The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. Glycobiology *22*, 806–816.

De Celis, J.F., and Bray, S.J. (2000). The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. Dev. Camb. Engl. *127*, 1291–1302.

Chai, J., and Tarnawski, A.S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc. *53*, 147–157.

Chai, W., Yuen, C.T., Kogelberg, H., Carruthers, R.A., Margolis, R.U., Feizi, T., and Lawson, A.M. (1999). High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. Eur. J. Biochem. FEBS *263*, 879–888.

Chambers, A.E., Logan, M., Kotecha, S., Towers, N., Sparrow, D., and Mohun, T.J. (1994). The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in Xenopus embryos. Genes Dev. *8*, 1324–1334.

Champigny, M.J., Perry, R., Rudnicki, M., and Igdoura, S.A. (2005). Overexpression of MyoD-inducible lysosomal sialidase (neu1) inhibits myogenesis in C2C12 cells. Exp. Cell Res. *311*, 157–166.

Charge, S.B.P. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. Physiol. Rev. *84*, 209–238.

Chavin, S.I., and Weidner, S.M. (1984). Blood clotting factor IX. Loss of activity after cleavage of sialic acid residues. J. Biol. Chem. *259*, 3387–3390.

Chen, C., and Colley, K.J. (2000). Minimal structural and glycosylation requirements for ST6Gal I activity and trafficking. Glycobiology *10*, 531–583.

Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., and Wang, D.-Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. J. Cell Biol. *190*, 867–879.

Chen, P.-Y., Lin, C.-C., Chang, Y.-T., Lin, S.-C., and Chan, S.I. (2002). One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 12633–12638.

Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., and Endo, T. (1997). Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine

peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. J. Biol. Chem. *272*, 2156–2162.

Choi, J., Costa, M.L., Mermelstein, C.S., Chagas, C., Holtzer, S., and Holtzer, H. (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 7988–7992.

Christ, B., and Ordahl, C.P. (1995). Early stages of chick somite development. Anat. Embryol. (Berl.) *191*, 381–396.

Church, J.C.T., Noronha, R.F.X., and Allbrook, D.B. (1966). Satellite cells and skeletal muscle regeneration. Br. J. Surg. *53*, 638–642.

Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y., and Michalski, J.-C. (2004). Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics MCP *3*, 577–585.

Cieniewski-Bernard, C., Mounier, Y., Michalski, J.-C., and Bastide, B. (2006). O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *100*, 1499–1505.

Cinnamon, Y., Kahane, N., Bachelet, I., and Kalcheim, C. (2001). The sub-lip domain--a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. Development *128*, 341–351.

Colman, P.M., and Ward, C.W. (1985). Structure and diversity of influenza virus neuraminidase. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *114*, 177–255.

Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. Dev. Cell *3*, 397–409.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Smythe, G.M., and Rando, T.A. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. Science *302*, 1575–1577.

Cooke, J., and Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. J. Theor. Biol. *58*, 455–476.

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

Coon, J.S., Weinstein, R.S., and Summers, J.L. (1982). Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. *77*, 692–699.

Corfield, T. (1992). Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. Glycobiology *2*, 509–521.

Cossu, G., and Tajbakhsh, S. (2007). Oriented cell divisions and muscle satellite cell heterogeneity. Cell *129*, 859–861.

Coughlan, C.M., Seckl, J.R., Fox, D.J., Unsworth, R., and Breen, K.C. (1996). Tissue-specific regulation of sialyltransferase activities in the rat by corticosteroids in vivo. Glycobiology *6*, 15–22.

Creek, K.E., Weisman, D.C., and Morré, D.J. (1980). The subcellular distribution of cytidine 5'-monophosphosialic acid synthetase in rat liver. Eur. J. Cell Biol. *23*, 157–165.

Crocker, P.R., and Varki, A. (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. Trends Immunol. *22*, 337–342.

Cuenda, A., and Cohen, P. (1999). Stress-activated Protein Kinase-2/p38 and a Rapamycin-sensitive Pathway Are Required for C2C12 Myogenesis. J. Biol. Chem. *274*, 4341–4346.

Cummings, R.D., and Etzler, M.E. (2009). Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In Essentials of Glycobiology, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.

Czifra, G., Tóth, I.B., Marincsák, R., Juhász, I., Kovács, I., Acs, P., Kovács, L., Blumberg, P.M., and Bíró, T. (2006). Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta. Cell. Signal. *18*, 1461–1472.

Dai, Z., Wu, F., Yeung, E.W., and Li, Y. (2010). IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues. Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc. *20*, 275–281.

Dall'Olio, F., Malagolini, N., and Serafini-Cessi, F. (1992). Enhanced CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity of human colon cancer xenografts in athymic nude mice and of xenograft-derived cell lines. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *50*, 325–330.

Dalziel, M., Lemaire, S., Ewing, J., Kobayashi, L., and Lau, J.T. (1999). Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. Glycobiology *9*, 1003–1008.

Darling, R.J., Kuchibhotla, U., Glaesner, W., Micanovic, R., Witcher, D.R., and Beals, J.M. (2002). Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. Biochemistry (Mosc.) *41*, 14524–14531.

Darvish, D., Vahedifar, P., and Huo, Y. (2002). Four novel mutations associated with autosomal recessive inclusion body myopathy (MIM: 600737). Mol. Genet. Metab. *77*, 252–256.

Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987–1000.

Delannoy, P., Pelczar, H., Vandamme, V., and Verbert, A. (1993). Sialyltransferase activity in FR3T3 cells transformed with ras oncogene: decreased CMP-Neu5Ac:Gal beta 1-3GalNAc alpha-2,3-sialyltransferase. Glycoconj. J. *10*, 91–98.

Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. Nat. Commun. *2*, 499.

Dennis, J.W., Granovsky, M., and Warren, C.E. (1999). Glycoprotein glycosylation and cancer progression. Biochim. Biophys. Acta *1473*, 21–34.

Dequéant, M.-L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. Nat. Rev. Genet. *9*, 370–382.

Dequéant, M.-L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A., and Pourquié, O. (2006). A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. Science *314*, 1595–1598.

Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. Mol. Cell. Biol. *31*, 203–214.

Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. Neuron *40*, 65–79.

Doherty, P., Cohen, J., and Walsh, F.S. (1990). Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. Neuron *5*, 209–219.

Doucey, M.A., Hess, D., Blommers, M.J., and Hofsteenge, J. (1999). Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. Glycobiology *9*, 435–441.

Edmondson, D.G., and Olson, E.N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. Genes Dev. *3*, 628–640.

Edmondson, D.G., Cheng, T.C., Cserjesi, P., Chakraborty, T., and Olson, E.N. (1992). Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. Mol. Cell. Biol. *12*, 3665–3677.

Elia, D., Madhala, D., Ardon, E., Reshef, R., and Halevy, O. (2007). Sonic hedgehog promotes proliferation and differentiation of adult muscle cells: Involvement of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1773*, 1438–1446.

Ellies, L.G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., and Marth, J.D. (2002). Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. Blood *100*, 3618–3625.

Aas-Eng, D.A., Asheim, H.C., Deggerdal, A., Smeland, E., and Funderud, S. (1995). Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells. Biochim. Biophys. Acta *1261*, 166–169.

Engel AG, and Franzini-Armstrong C (2004). Myology : Basic and clinical. Vol 1 (new york: McGraw Hill).

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 4213–4218.

Erbay, E., and Chen, J. (2001). The mammalian target of rapamycin regulates C2C12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. J. Biol. Chem. *276*, 36079–36082.

Erbay, E., Park, I.-H., Nuzzi, P.D., Schoenherr, C.J., and Chen, J. (2003). IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. J. Cell Biol. *163*, 931–936.

Ermonval, M., Petit, D., Le Duc, A., Kellermann, O., and Gallet, P.-F. (2009). Glycosylation-related genes are variably expressed depending on the differentiation state of a bioaminergic neuronal cell line: implication for the cellular prion protein. Glycoconj. J. *26*, 477–493.

Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser. *3*, 139–166.

Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Zizioli, D., Presta, M., Preti, A., and Marchesini, S. (2003). Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells. FEBS Lett. *547*, 183–188.

Fanzani, A., Colombo, F., Giuliani, R., Preti, A., and Marchesini, S. (2006). Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy. FEBS J. *273*, 3709–3721.

Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Rossi, S., Stoppani, E., Martinet, W., Preti, A., and Marchesini, S. (2008). The enzymatic activity of sialidase Neu2 is inversely regulated during in vitro myoblast hypertrophy and atrophy. Biochem. Biophys. Res. Commun. *370*, 376–381.

Fanzani, A., Zanola, A., Faggi, F., Papini, N., Venerando, B., Tettamanti, G., Sampaolesi, M., and Monti, E. (2012). Implications for the mammalian sialidases in the physiopathology of skeletal muscle. Skelet. Muscle *2*, 23.

Fehon, R.G., Johansen, K., Rebay, I., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of Drosophila: implications for notch function. J. Cell Biol. *113*, 657–669.

Feldman, B.J., Streeper, R.S., Farese, R.V., and Yamamoto, K.R. (2006). Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 15675–15680.

Fernández Madrid, F., Tang, N., Alansari, H., Karvonen, R.L., and Tomkiel, J.E. (2005). Improved approach to identify cancer-associated autoantigens. Autoimmun. Rev. *4*, 230–235.

Finne, J. (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. J. Biol. Chem. *257*, 11966–11970.

Fiúza, U.-M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. J. Endocrinol. *194*, 459–474.

Florini, J.R., Ewton, D.Z., and Magri, K.A. (1991). Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. Annu. Rev. Physiol. *53*, 201–216.

Florini, J.R., Ewton, D.Z., and Coolican, S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr. Rev. *17*, 481–517.

Freeze, H.H., and Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. Curr. Opin. Struct. Biol. *15*, 490–498.

Fukumoto, H., Nishio, K., Ohta, S., Hanai, N., Fukuoka, K., Ohe, Y., Sugihara, K., Kodama, T., and Saijo, N. (1999). Effect of a chimeric anti-ganglioside GM2 antibody on ganglioside GM2-expressing human solid tumors in vivo. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *82*, 759–764.

Gagneux, P., and Varki, A. (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. Glycobiology *9*, 747–755.

Gagneux, P., Cheriyan, M., Hurtado-Ziola, N., van der Linden, E.C.M.B., Anderson, D., McClure, H., Varki, A., and Varki, N.M. (2003). Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. J. Biol. Chem. *278*, 48245–48250.

Galen, J.E., Ketley, J.M., Fasano, A., Richardson, S.H., Wasserman, S.S., and Kaper, J.B. (1992). Role of Vibrio cholerae neuraminidase in the function of cholera toxin. Infect. Immun. *60*, 406–415.

Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., and 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. Mol. Biol. Cell *7*, 719–729.

Gavel, Y., and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Eng. *3*, 433–442.

Ge, C., Liu, T., Hou, X., and Stanley, P. (2008). In vivo consequences of deleting EGF repeats 8-12 including the ligand binding domain of mouse Notch1. BMC Dev. Biol. *8*, 48.

Geyer, H., and Geyer, R. (2006). Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. Biochim. Biophys. Acta *1764*, 1853–1869.

Ghazizadeh, M., Oguro, T., Sasaki, Y., Aihara, K., Araki, T., and Springer, G.F. (1990). Immunohistochemical and ultrastructural localization of T antigen in ovarian tumors. Am. J. Clin. Pathol. *93*, 315–321.

Ghazizadeh, M., Ogawa, H., Sasaki, Y., Araki, T., and Aihara, K. (1997). Mucin carbohydrate antigens (T, Tn, and sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas: relationship with histopathology and prognosis. Hum. Pathol. *28*, 960–966.

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

Giordanengo, V., Bannwarth, S., Laffont, C., Van Miegem, V., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Lefebvre, J.C. (1997). Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. Eur. J. Biochem. FEBS *247*, 558–566.

Giordani, J., Bajard, L., Demignon, J., Daubas, P., Buckingham, M., and Maire, P. (2007). Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 11310–11315.

Glass, D.J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care *13*, 225–229.

Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C., and Bray, S. (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. EMBO J. *25*, 4697–4706.

Glüer, S., Schelp, C., Madry, N., von Schweinitz, D., Eckhardt, M., and Gerardy-Schahn, R. (1998). Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. Br. J. Cancer *78*, 106–110.

Goldbeter, A., and Pourquié, O. (2008). Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the Notch, Wnt and FGF signaling pathways. J. Theor. Biol. *252*, 574–585.

Gomez, C., and Pourquie, O. (2009). Developmental control of segment numbers in vertebrates. J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol. *312*, 533–544.

Gomez-Casati, D.F., Martín, M., and Busi, M.V. (2013). Polysaccharide-synthesizing glycosyltransferases and carbohydrate binding modules: the case of starch synthase III. Protein Pept. Lett. *20*, 856–863.

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

Goridis, C., and Brunet, J.F. (1992). NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. Semin. Cell Biol. *3*, 189–197.

Gorsky, Y., Vanky, F., and Sulitzeanu, D. (1976). Isolation from patients with breast cancer of antibodies specific for antigens associated with breast cancer and other malignant diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *73*, 2101–2105.

Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A., and Olson, E.N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. Mol. Cell. Biol. *9*, 5022–5033.

Goulding, M., Lumsden, A., and Paquette, A.J. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. Dev. Camb. Engl. *120*, 957–971.

Le Grand, F., and Rudnicki, M. (2007). Satellite and stem cells in muscle growth and repair. Development *134*, 3953–3957.

Grassot, V., Da Silva, A., Saliba, J., Maftah, A., Dupuy, F., and Petit, J.-M. (2014). Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis. BMC Genomics *15*, 621.

Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. Physiol. Rev. *78*, 783–809.

Grifone, R., Demignon, J., Houbron, C., Souil, E., Niro, C., Seller, M.J., Hamard, G., and Maire, P. (2005). Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. Dev. Camb. Engl. *132*, 2235–2249.

Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature *435*, 954–958.

Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T., and Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. Nucleic Acids Res. *18*, 667.

Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., and Du, Y. (2012). Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. Glycoconj. J. *29*, 599–607.

Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. Cell *72*, 309–324.

Gu, Y., Zhang, J., Mi, W., Yang, J., Han, F., Lu, X., and Yu, W. (2008). Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. Breast Cancer Res. BCR *10*, R1.

Gundry, R.L., Raginski, K., Tarasova, Y., Tchernyshyov, I., Bausch-Fluck, D., Elliott, S.T., Boheler, K.R., Eyk, J.E.V., and Wollscheid, B. (2009). The Mouse C2C12 Myoblast Cell Surface N-Linked Glycoproteome IDENTIFICATION, GLYCOSITE OCCUPANCY, AND MEMBRANE ORIENTATION. Mol. Cell. Proteomics *8*, 2555–2569.

Gunten, S. von, and Simon, H.-U. (2006). Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins may regulate innate immune responses by modulating the life span of granulocytes. FASEB J. *20*, 601–605.

Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C., and Walsh, K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. Mol. Cell. Biol. *15*, 3823–3829.

Gutiérrez, J., and Brandan, E. (2010). A novel mechanism of sequestering fibroblast growth factor 2 by glypican in lipid rafts, allowing skeletal muscle differentiation. Mol. Cell. Biol. *30*, 1634–1649.

Hakomori, S. (2004). Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. An. Acad. Bras. Ciênc. *76*, 553–572.

Hakomori, S., and Zhang, Y. (1997). Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. Chem. Biol. *4*, 97–104.

Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998). New insights in glycosphingolipid function: “glycosignaling domain,” a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules,involved in cell adhesion coupled with signaling. Glycobiology *8*, xi – xix.

Hall, M.K., Weidner, D.A., Dayal, S., and Schwalbe, R.A. (2014). Cell surface N-glycans influence the level of functional E-cadherin at the cell-cell border. FEBS Open Bio *4*, 892–897.

Haltiwanger, R.S. (2002). Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. Curr. Opin. Struct. Biol. *12*, 593–598.

Haltiwanger, R.S., and Lowe, J.B. (2004). Role of glycosylation in development. Annu. Rev. Biochem. *73*, 491–537.

Hamilton, W.B., Helling, F., Lloyd, K.O., and Livingston, P.O. (1993). Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *53*, 566–573.

Hamouda, H., Ullah, M., Berger, M., Sittinger, M., Tauber, R., Ringe, J., and Blanchard, V. (2013). N-Glycosylation Profile of Undifferentiated and Adipogenically Differentiated Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells - Towards a Next Generation of Stem Cell Markers. Stem Cells Dev. 130707215800003.

Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I., and Bevilacqua, M.P. (1994). Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. J. Biol. Chem. *269*, 10637–10643.

Handa, K., and Hakomori, S.-I. (2012). Carbohydrate to carbohydrate interaction in development process and cancer progression. Glycoconj. J. *29*, 627–637.

Hanisch, F.-G., Reis, C.A., Clausen, H., and Paulsen, H. (2001). Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides. Glycobiology *11*, 731–740.

Haraguchi, M., Yamashiro, S., Furukawa, K., Takamiya, K., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995). The effects of the site-directed removal of N-glycosylation sites from beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase on its function. Biochem. J. *312*, 273–280.

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S., and Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. Biochimie *83*, 727–737.

Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P., and Oriol, R. (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. Glycobiology *15*, 805–817.

Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J.-M., and Oriol, R. (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. BMC Evol. Biol. *8*, 258.

Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M.-A., Colomb, F., Foulquier, F., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. (2012). Sialyltransferases functions in cancers. Front. Biosci. Elite Ed. *4*, 499–515.

Harris, R.J., and Spellman, M.W. (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. Glycobiology *3*, 219–224.

Harris, R.J., Ling, V.T., and Spellman, M.W. (1992). O-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. J. Biol. Chem. *267*, 5102–5107.

Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature *446*, 1017–1022.

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

Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol. *91*, 534–551.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. Science *291*, 2364–2369.

Hennet, T., Chui, D., Paulson, J.C., and Marth, J.D. (1998). Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 4504–4509.

Henry, M.D., and Campbell, K.P. (1999). Dystroglycan inside and out. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 602–607.

Herbst, R., Iskratsch, T., Unger, E., and Bittner, R.E. (2009). Aberrant development of neuromuscular junctions in glycosylation-defective Large(myd) mice. Neuromuscul. Disord. NMD *19*, 366–378.

Héron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J.C., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. J. Cell. Physiol. *214*, 158–165.

Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF-βs and their receptors - insights into evolution of the TGF-β superfamily. FEBS Lett. *586*, 1860–1870.

Hinderlich, S., Salama, I., Eisenberg, I., Potikha, T., Mantey, L.R., Yarema, K.J., Horstkorte, R., Argov, Z., Sadeh, M., Reutter, W., et al. (2004). The homozygous M712T mutation of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase results in reduced enzyme activities but not in altered overall cellular sialylation in hereditary inclusion body myopathy. FEBS Lett. *566*, 105–109.

Hirmo, S., Kelm, S., Schauer, R., Nilsson, B., and Wadström, T. (1996). Adhesion of Helicobacter pylori strains to alpha-2,3-linked sialic acids. Glycoconj. J. *13*, 1005–1011.

Hirsch, N.P. (2007). Neuromuscular junction in health and disease. Br. J. Anaesth. *99*, 132–138.

Hofsteenge, J., Müller, D.R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W.J., and Vliegenthart, J.F. (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. Biochemistry (Mosc.) *33*, 13524–13530.

Hofsteenge, J., Blommers, M., Hess, D., Furmanek, A., and Miroshnichenko, O. (1999). The Four Terminal Components of the Complement System AreC-Mannosylated on Multiple Tryptophan Residues. J. Biol. Chem. *274*, 32786–32794.

Hofsteenge, J., Huwiler, K.G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D.F., and Peter-Katalinic, J. (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. J. Biol. Chem. *276*, 6485–6498.

Horstkorte, R., Mühlenhoff, M., Reutter, W., Nöhring, S., Zimmermann-Kordmann, M., and Gerardy-Schahn, R. (2004). Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids. Exp. Cell Res. *298*, 268–274.

Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. Neuron *16*, 735–743.

Hu, Y.P., Dalziel, M., and Lau, J.T. (1997). Murine hepatic beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene expression involves usage of a novel upstream exon region. Glycoconj. J. *14*, 407–411.

Huxley, H.E. (1985). The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications. J. Exp. Biol. *115*, 17–30.

Huxley, H.E. (2002). The mechanism of muscular contraction. Science 164:1356-1366, 1969. Clin. Orthop. S6–S17.

Hykollari, A., Dragosits, M., Rendić, D., Wilson, I.B.H., and Paschinger, K. (2014). N-glycomic profiling of a glucosidase II mutant of Dictyostelium discoideum by off-line'' liquid chromatography and mass spectrometryElectrophoresis.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. Nature *355*, 696–702.

Ignotz, R.A., and Massagué, J. (1985). Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *82*, 8530–8534.

Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T., et al. (1999). Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine-alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. Glycobiology *9*, 1213–1224.

Ioffe, E., and Stanley, P. (1994). Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 728–732.

Ioffe, E., Liu, Y., and Stanley, P. (1997). Complex N-glycans in Mgat1 null preimplantation embryos arise from maternal Mgat1 RNA. Glycobiology *7*, 913–919.

Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *199*, 326–337.

Isaji, T., Sato, Y., Zhao, Y., Miyoshi, E., Wada, Y., Taniguchi, N., and Gu, J. (2006). N-Glycosylation of the β-Propeller Domain of the Integrin α5 Subunit Is Essential for α5β1 Heterodimerization, Expression on the Cell Surface, and Its Biological Function. J. Biol. Chem. *281*, 33258–33267.

Itkonen, H.M., and Mills, I.G. (2013). N-linked glycosylation supports cross-talk between receptor tyrosine kinases and androgen receptor. PloS One *8*, e65016.

Ito, T., Williams, J.D., Fraser, D.J., and Phillips, A.O. (2004). Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization. J. Biol. Chem. *279*, 25326–25332.

Izumida, Y. (1991). [Roles of plasma proteins and surface negative charge of erythrocytes in erythrocyte aggregation]. Nihon Seirigaku Zasshi J. Physiol. Soc. Jpn. *53*, 1–12.

Jaeken, J., and Matthijs, G. (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *8*, 261–278.

Jaeken, J., Artigas, J., Barone, R., Fiumara, A., de Koning, T.J., Poll-The, B.T., de Rijk-van Andel, J.F., Hoffmann, G.F., Assmann, B., Mayatepek, E., et al. (1997). Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectrofocusing pattern of serum sialotransferrins. J. Inherit. Metab. Dis. *20*, 447–449.

Jafar-Nejad, H., Leonardi, J., and Fernandez-Valdivia, R. (2010). Role of glycans and glycosyltransferases in the regulation of Notch signaling. Glycobiology *20*, 931–949.

Jamieson, J.C., McCaffrey, G., and Harder, P.G. (1993). Sialyltransferase: a novel acute-phase reactant. Comp. Biochem. Physiol. B *105*, 29–33.

Janik, M.E., Lityńska, A., and Vereecken, P. (2010). Cell migration-the role of integrin glycosylation. Biochim. Biophys. Acta *1800*, 545–555.

Janot, M., Audfray, A., Loriol, C., Germot, A., Maftah, A., and Dupuy, F. (2009). Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. BMC Genomics *10*, 483.

Jeanneau, C., Chazalet, V., Augé, C., Soumpasis, D.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imberty, A., and Breton, C. (2004). Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal I ROLE OF N-GLYCOSYLATION AND A NOVEL CONSERVED SIALYLMOTIF. J. Biol. Chem. *279*, 13461–13468.

Jin, L., McLean, P.A., Neel, B.G., and Wortis, H.H. (2002). Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. J. Exp. Med. *195*, 1199–1205.

Jin, X., Kim, J.-G., Oh, M.-J., Oh, H.-Y., Sohn, Y.-W., Pian, X., Yin, J.L., Beck, S., Lee, N., Son, J., et al. (2007). Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *364*, 476–482.

Johnson, D., Montpetit, M.L., Stocker, P.J., and Bennett, E.S. (2004). The Sialic Acid Component of the β1 Subunit Modulates Voltage-gated Sodium Channel Function. J. Biol. Chem. *279*, 44303–44310.

Julien, S., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Gouyer, V., Huet, G., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2001). Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNac I) cDNA. Glycoconj. J. *18*, 883–893.

Kakeji, Y., Maehara, Y., Morita, M., Matsukuma, A., Furusawa, M., Takahashi, I., Kusumoto, T., Ohno, S., and Sugimachi, K. (1995). Correlation between sialyl Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. Br. J. Cancer *71*, 191–195.

Kakuda, S., and Haltiwanger, R.S. (2014). Analyzing the posttranslational modification status of Notch using mass spectrometry. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1187*, 209–221.

Kalcheim, C., Cinnamon, Y., and Kahane, N. (1999). Myotome formation: a multistage process. Cell Tissue Res. *296*, 161–173.

Kang, M.J., Kim, C., Jeong, H., Cho, B.-K., Ryou, A.L., Hwang, D., Mook-Jung, I., and Yi, E.C. (2013). Synapsin-1 and tau reciprocal O-GlcNAcylation and phosphorylation sites in mouse brain synaptosomes. Exp. Mol. Med. *45*, e29.

Kaplan, H.A., Woloski, B.M., Hellman, M., and Jamieson, J.C. (1983). Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. J. Biol. Chem. *258*, 11505–11509.

Kästner, S., Elias, M.C., Rivera, A.J., and Yablonka-Reuveni, Z. (2000). Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *48*, 1079–1096.

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J. Cell Biol. *127*, 1755–1766.

Kaushal, S., Schneider, J.W., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. Science *266*, 1236–1240.

Keren, A., Tamir, Y., and Bengal, E. (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. Mol. Cell. Endocrinol. *252*, 224–230.

Kirschner, J. (2013). Congenital muscular dystrophies. Handb. Clin. Neurol. *113*, 1377–1385.

Kitagawa, H., and Paulson, J.C. (1994a). Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. J. Biol. Chem. *269*, 1394–1401.

Kitagawa, H., and Paulson, J.C. (1994b). Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. J. Biol. Chem. *269*, 17872–17878.

Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Tate, S., and Inagaki, F. (1993). Novel oligosaccharides with the sialyl-Le(a) structure in human milk. J. Biochem. (Tokyo) *114*, 504–508.

Kobayashi, H., Terao, T., and Kawashima, Y. (1992). [Serum sialyl Tn antigen as a prognostic marker in patients with epithelial ovarian cancer]. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi *44*, 14–20.

Kocić, J., Santibañez, J.F., Krstić, A., Mojsilović, S., Dorđević, I.O., Trivanović, D., Ilić, V., and Bugarski, D. (2012). Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic

differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2. Biochim. Biophys. Acta *1823*, 838–849.

Kodar, K., Izotova, J., Klaamas, K., Sergeyev, B., Jarvekulg, L., and Kurtenkov, O. (2013). Aberrant glycosylation of the anti-Thomsen-Friedenreich glycotope immunoglobulin G in gastric cancer patients. World J. Gastroenterol. WJG *19*, 3573–3582.

Kollias, H.D., and McDermott, J.C. (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *104*, 579–587.

Kono, M., Yoshida, Y., Kojima, N., and Tsuji, S. (1996). Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. J. Biol. Chem. *271*, 29366–29371.

Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y.C., Hamamoto, T., Kojima, N., and Tsuji, S. (1997). Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression. Glycobiology *7*, 469–479.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem. *54*, 631–664.

Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., and Hofsteenge, J. (1998). Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. Mol. Biol. Cell *9*, 301–309.

Krol, A.J., Roellig, D., Dequéant, M.-L., Tassy, O., Glynn, E., Hattem, G., Mushegian, A., Oates, A.C., and Pourquié, O. (2011). Evolutionary plasticity of segmentation clock networks. Development *138*, 2783–2792.

Krzewinski-Recchi, M.-A., Julien, S., Juliant, S., Teintenier-Lelièvre, M., Samyn-Petit, B., Montiel, M.-D., Mir, A.-M., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P. (2003). Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. Eur. J. Biochem. FEBS *270*, 950–961.

Kuisk, I.R., Li, H., Tran, D., and Capetanaki, Y. (1996). A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. Dev. Biol. *174*, 1–13.

Kumar, S.R., Sauter, E.R., Quinn, T.P., and Deutscher, S.L. (2005). Thomsen-Friedenreich and Tn Antigens in Nipple Fluid: Carbohydrate Biomarkers for Breast Cancer Detection. Clin. Cancer Res. *11*, 6868–6871.

Kundra, R., and Kornfeld, S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. J. Biol. Chem. *274*, 31039–31046.

Kuratani, S. (2008). Is the vertebrate head segmented?-evolutionary and developmental considerations. Integr. Comp. Biol. *48*, 647–657.

Kuri-Harcuch, W., Argüello, C., and Marsch-Moreno, M. (1984a). Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. Differentiation *28*, 173–178.

Kuri-Harcuch, W., Argüello, C., and Marsch-Moreno, M. (1984b). Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. Differ. Res. Biol. Divers. *28*, 173–178.

Kusano, Y., Oguri, K., Nagayasu, Y., Munesue, S., Ishihara, M., Saiki, I., Yonekura, H., Yamamoto, H., and Okayama, M. (2000). Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. Exp. Cell Res. *256*, 434–444.

Laack, E., Nikbakht, H., Peters, A., Kugler, C., Jasiewicz, Y., Edler, L., Hossfeld, D.K., and Schumacher, U. (2002). Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung. Am. J. Pathol. *160*, 1001–1008.

Ladi, E., Nichols, J.T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L.-T., Boulter, J., Sun, Y.E., Kintner, C., and Weinmaster, G. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. J. Cell Biol. *170*, 983–992.

Lagha, M., Sato, T., Bajard, L., Daubas, P., Esner, M., Montarras, D., Relaix, F., and Buckingham, M. (2008a). Regulation of Skeletal Muscle Stem Cell Behavior by Pax3 and Pax7. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *73*, 307–315.

Lagha, M., Kormish, J.D., Rocancourt, D., Manceau, M., Epstein, J.A., Zaret, K.S., Relaix, F., and Buckingham, M.E. (2008b). Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. Genes Dev. *22*, 1828–1837.

Laine, R.A. (1994). A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05 x 10(12) structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. Glycobiology *4*, 759–767.

Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., and Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. Annu. Rev. Biochem. *77*, 521–555.

Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? BMC Biol. *10*, 19.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. J. Biol. Chem. *277*, 49831–49840.

Lantuejoul, S., Moro, D., Michalides, R.J., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1998). Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. Am. J. Surg. Pathol. *22*, 1267–1276.

Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., and Dennis, J.W. (2007a). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. Cell *129*, 123–134.

Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., and Dennis, J.W. (2007b). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. Cell *129*, 123–134.

Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., and Dennis, J.W. (2007c). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. Cell *129*, 123–134.

Laury-Kleintop, L.D., Damjanov, I., and Alhadeff, J.A. (1987). Antibody-affinity purification of novel alpha-L-fucosidase from mouse liver. Biochem. J. *245*, 589–593.

Lawson, V.A., Collins, S.J., Masters, C.L., and Hill, A.F. (2005). Prion protein glycosylation. J. Neurochem. *93*, 793–801.

Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Møller, N.P., and Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 4355–4359.

Lee, S.J., and McPherron, A.C. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass. Curr. Opin. Genet. Dev. *9*, 604–607.

Lee, S.J., Park, L.C., Lee, J., Kim, S., Choi, M.K., Hong, J.Y., Park, S., Maeng, C.H., Chang, W., Kim, Y.S., et al. (2012). Unique perception of clinical trials by Korean cancer patients. BMC Cancer *12*, 594.

Lee, Y.C., Kaufmann, M., Kitazume-Kawaguchi, S., Kono, M., Takashima, S., Kurosawa, N., Liu, H., Pircher, H., and Tsuji, S. (1999). Molecular cloning and functional expression of two members of mouse NeuAcalpha2,3Galbeta1,3GalNAc GalNAcalpha2,6-sialyltransferase family, ST6GalNAc III and IV. J. Biol. Chem. *274*, 11958–11967.

Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., and Irvine, K.D. (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. Dev. Camb. Engl. *130*, 6411–6421.

Lemercier, C., To, R.Q., Carrasco, R.A., and Konieczny, S.F. (1998). The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. EMBO J. *17*, 1412–1422.

Leschziner, A., Moukhles, H., Lindenbaum, M., Gee, S.H., Butterworth, J., Campbell, K.P., and Carbonetto, S. (2000). Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. J. Neurochem. *74*, 70–80.

Leskawa, K.C., and Hogan, E.L. (1990). Regulation of glycolipid synthesis during differentiation of clonal murine muscle cells. Mol. Cell. Biochem. *96*, 163–173.

Li, H., and Capetanaki, Y. (1994). An E box in the desmin promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription. EMBO J. *13*, 3580–3589.

Li, M., and Dalakas, M.C. (2000). The muscle mitogen-activated protein kinase is altered in sporadic inclusion body myositis. Neurology *54*, 1665–1670.

Li, L., Heller-Harrison, R., Czech, M., and Olson, E.N. (1992). Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. Mol. Cell. Biol. *12*, 4478–4485.

Li, Y., Lei, L., Irvine, K.D., Baker, N.E., and Li, L. (2003). Notch activity in neural cells triggered by a mutant allele with altered glycosylation. Dev. Camb. Engl. *130*, 2829–2840.

Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S., and Schlag, P.M. (2002). Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. Exp. Cell Res. *276*, 101–110.

Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. Cell *80*, 909–917.

Lis, H., and Sharon, N. (1993). Protein glycosylation. Eur. J. Biochem. *218*, 1–27.

Liu, J., Liu, H., Zhang, W., Wu, Q., Liu, W., Liu, Y., Pan, D., Xu, J., and Gu, J. (2013). N-acetylglucosaminyltransferase V confers hepatoma cells with resistance to anoikis through EGFR/PAK1 activation. Glycobiology *23*, 1097–1109.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell *75*, 59–72.

Livingston, B.D., and Paulson, J.C. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. J. Biol. Chem. *268*, 11504–11507.

Lock, J.G., Wehrle-Haller, B., and Strömblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. Semin. Cancer Biol. *18*, 65–76.

Löffler, A., Doucey, M.A., Jansson, A.M., Müller, D.R., de Beer, T., Hess, D., Meldal, M., Richter, W.J., Vliegenthart, J.F., and Hofsteenge, J. (1996). Spectroscopic and protein chemical analyses demonstrate the presence of C-mannosylated tryptophan in intact human RNase 2 and its isoforms. Biochemistry (Mosc.) *35*, 12005–12014.

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

Lu, J., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., and Gu, J. (2014). β-Galactoside α2,6-sialyltranferase 1 promotes transforming growth factor-β-mediated epithelial-mesenchymal transition. J. Biol. Chem. *289*, 34627–34641.

Lübke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K., and Körner, C. (2001). Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. Nat. Genet. *28*, 73–76.

Luo, Y., Nita-Lazar, A., and Haltiwanger, R.S. (2006a). Two Distinct Pathways for O-Fucosylation of Epidermal Growth Factor-like or Thrombospondin Type 1 Repeats. J. Biol. Chem. *281*, 9385–9392.

Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R.S., and Panin, V.M. (2006b). Protein O-Fucosyltransferase 2 Adds O-Fucose to Thrombospondin Type 1 Repeats. J. Biol. Chem. *281*, 9393–9399.

Ma, R., Matthew Decker, N., Anilus, V., Moskal, J.R., Burgdorf, J., Johnson, J.R., Basu, M., Banerjee, S., and Basu, S. (2009). Post-translational and transcriptional regulation of glycolipid glycosyltransferase genes in apoptotic breast carcinoma cells: VII. Studied by DNA-microarray after treatment with L-PPMP. Glycoconj. J. *26*, 647–661.

Madhala-Levy, D., Williams, V.C., Hughes, S.M., Reshef, R., and Halevy, O. (2012). Cooperation between Shh and IGF-I in promoting myogenic proliferation and differentiation via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways requires Smo activity. J. Cell. Physiol. *227*, 1455–1464.

M. A. Krzewinski-Recchi, Hornez, L., Verdière, A., Harduin-Lepers, A., Bonneterre, J., Delannoy, P., and Peyrat, J.P. (2003). Prognostic value of tumoral sialyltransferase expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. Int. J. Biol. Markers *18*, 116–122.

Manya, H., and Endo, T. (2004). [Defective O-mannosyl glycosylation causes congenital muscular dystrophies]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. *49*, 2451–2456.

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

Marino, J.H., Hoffman, M., Meyer, M., and Miller, K.S. (2004). Sialyltransferase mRNA abundances in B cells are strictly controlled, correlated with cognate lectin binding, and differentially responsive to immune signaling in vitro. Glycobiology *14*, 1265–1274.

Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoën, N., Clément, M., and Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. Biochimie *83*, 565–573.

Mathews, L.S., Hammer, R.E., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1988). Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. Endocrinology *123*, 433–437.

Matsushita, Y., Cleary, K.R., Ota, D.M., Hoff, S.D., and Irimura, T. (1990). Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *63*, 780–791.

Mauro, A., and Adams, W.R. (1961). THE STRUCTURE OF THE SARCOLEMMA OF THE FROG SKELETAL MUSCLE FIBER. J. Biophys. Biochem. Cytol. *10*, 177–185.

McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. J. Clin. Invest. *100*, S97–S103.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature *387*, 83–90.

Meezan, E., Wu, H.C., Black, P.H., and Robbins, P.W. (1969). Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. Biochemistry (Mosc.) *8*, 2518–2524.

Mercier, D., Wierinckx, A., Oulmouden, A., Gallet, P.F., Palcic, M.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Petit, J.M., Levéziel, H., and Julien, R. (1999). Molecular cloning, expression and exon/intron organization of the bovine beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase gene. Glycobiology *9*, 851–863.

De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. Nat. Rev. Drug Discov. *1*, 769–783.

Miano, J.M. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. J. Mol. Cell. Cardiol. *35*, 577–593.

Milman Krentsis, I., Sela, I., Eiges, R., Blanchard, V., Berger, M., Becker Cohen, M., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2011). GNE Is Involved in the Early Development of Skeletal and Cardiac Muscle. PLoS ONE *6*.

Mitchell, P.J., Johnson, S.E., and Hannon, K. (2002). Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb. Dev. Dyn. *223*, 12–23.

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N.C., and Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. Trends Biochem. Sci. *31*, 156–163.

Miwa, T., and Kedes, L. (1987). Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene. Mol. Cell. Biol. *7*, 2803–2813.

Miyagi, T., and Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. Glycobiology *22*, 880–896.

Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. Cell *83*, 1125–1136.

Moloney, D.J., Shair, L.H., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L., and Haltiwanger, R.S. (2000a). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. J. Biol. Chem. *275*, 9604–9611.

Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., et al. (2000b). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. Nature *406*, 369–375.

Mondal, N., Buffone, A., Stolfa, G., Antonopoulos, A., Lau, J.T.Y., Haslam, S.M., Dell, A., and Neelamegham, S. (2015). ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. Blood *125*, 687–696.

Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. Science *309*, 2064–2067.

Moore, C.J., and Hewitt, J.E. (2009). Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. Glycoconj. J. *26*, 349–357.

Mootoosamy, R.C., and Dietrich, S. (2002). Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis. Development *129*, 573–583.

Mozzetta, C., Consalvi, S., Saccone, V., Forcales, S.V., Puri, P.L., and Palacios, D. (2011). Selective control of Pax7 expression by TNF-activated p38α/polycomb repressive complex 2 (PRC2) signaling during muscle satellite cell differentiation. Cell Cycle *10*, 191–198.

Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., and Gerardy-Schahn, R. (1996). Polysialylation of NCAM by a single enzyme. Curr. Biol. CB *6*, 1188–1191.

Mukai, A., and Hashimoto, N. (2013). Regulation of pre-fusion events: recruitment of M-cadherin to microrafts organized at fusion-competent sites of myogenic cells. BMC Cell Biol. *14*, 37.

Mulens, V., de la Torre, A., Marinello, P., Rodríguez, R., Cardoso, J., Díaz, R., O'Farrill, M., Macias, A., Viada, C., Saurez, G., et al. (2010). Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. Hum. Vaccin. *6*.

Muntoni, F. (2004). Journey into muscular dystrophies caused by abnormal glycosylation. Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis. *23*, 79–84.

Muscat, G.E., Perry, S., Prentice, H., and Kedes, L. (1992). The human skeletal alpha-actin gene is regulated by a muscle-specific enhancer that binds three nuclear factors. Gene Expr. *2*, 111–126.

Muskavitch, M.A. (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. Dev. Biol. *166*, 415–430.

Müthing, J., and Cacić, M. (1997). Glycosphingolipid expression in human skeletal and heart muscle assessed by immunostaining thin-layer chromatography. Glycoconj. J. *14*, 19–28.

Müthing, J., Maurer, U., Sostarić, K., Neumann, U., Brandt, H., Duvar, S., Peter-Katalinić, J., and Weber-Schürholz, S. (1994). Different distributions of glycosphingolipids in mouse and rabbit skeletal muscle demonstrated by biochemical and immunohistological analyses. J. Biochem. (Tokyo) *115*, 248–256.

Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., and Fujiki, N. (1995). Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 5087–5091.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. Nature *364*, 532–535.

Nakagoe, T., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M.-A., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., Arisawa, K., and Ishikawa, H. (2002a). Predictive factors for preoperative serum levels of sialy Lewis(x), sialyl Lewis(a) and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. Anticancer Res. *22*, 451–458.

Nakagoe, T., Fukushima, K., Itoyanagi, N., Ikuta, Y., Oka, T., Nagayasu, T., Ayabe, H., Hara, S., Ishikawa, H., and Minami, H. (2002b). Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *128*, 257–264.

Nakagoe, T., Fukushima, K., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Nanashima, A., Tanaka, K., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., et al. (2002c). Increased expression of sialyl Lewis(x) antigen in penetrating growth type A early gastric cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *21*, 363–369.

Nakagoe, T., Fukushima, K., Tanaka, K., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., et al. (2002d). Evaluation of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens expression levels as predictors of recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *21*, 107–113.

Nakata, D., Zhang, L., and Troy, F.A. (2006). Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. Glycoconj. J. *23*, 423–436.

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Fredette, B., Ranscht, B., and Fukuda, M. (1995). Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 7031–7035.

Nanashima, A., Yamaguchi, H., Nakagoe, T., Matsuo, S., Sumida, Y., Tsuji, T., Sawai, T., Yamaguchi, E., Yasutake, T., and Ayabe, H. (1999). High serum concentrations of sialyl Tn antigen in carcinomas of the biliary tract and pancreas. J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg. *6*, 391–395.

Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. (1994). Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 7952–7956.

Navankasattusas, S., Zhu, H., Garcia, A.V., Evans, S.M., and Chien, K.R. (1992). A ubiquitous factor (HF-1a) and a distinct muscle factor (HF-1b/MEF-2) form an E-box-independent pathway for cardiac muscle gene expression. Mol. Cell. Biol. *12*, 1469–1479.

Nemansky, M., De Leeuw, R., Wijnands, R.A., and Van Den Eijnden, D.H. (1995). Enzymic Remodelling of the N- and O-Linked Carbohydrate Chains of Human Chorionic Gonadotropin. Eur. J. Biochem. *227*, 880–888.

Nilsson, I., and von Heijne, G. (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. J. Biol. Chem. *275*, 17338–17343.

Nishimura, H., Kawabata, S., Kisiel, W., Hase, S., Ikenaka, T., Takao, T., Shimonishi, Y., and Iwanaga, S. (1989). Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl2-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. J. Biol. Chem. *264*, 20320–20325.

Nishiyama, T., Matsumoto, Y., Watanabe, H., Fujiwara, M., and Sato, S. (1987). Detection of Tn antigen with Vicia villosa agglutinin in urinary bladder cancer: its relevance to the patient's clinical course. J. Natl. Cancer Inst. *78*, 1113–1118.

Nohara, K., Wang, F., and Spiegel, S. (1998). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res. Treat. *48*, 149–157.

Numa, F., Tsunaga, N., Michioka, T., Nawata, S., Ogata, H., and Kato, H. (1995). Tissue expression of Sialyl Tn antigen in gynecologic tumors. J. Obstet. Gynaecol. Tokyo Jpn. *21*, 385–389.

Ogata, S., Ho, I., Chen, A., Dubois, D., Maklansky, J., Singhal, A., Hakomori, S., and Itzkowitz, S.H. (1995). Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa. Cancer Res. *55*, 1869–1874.

Ogata, S., Ho, I., Maklansky, J., Chen, A., Werther, J.L., Reddish, M., Longenecker, B.M., Sigurdson, E., Iishi, S., Zhang, J.Y., et al. (2001). A rat model to study the role of STn antigen in colon cancer. Glycoconj. J. *18*, 871–882.

Ogawa, M., Mizofuchi, H., Kobayashi, Y., Tsuzuki, G., Yamamoto, M., Wada, S., and Kamemura, K. (2012). Terminal differentiation program of skeletal myogenesis is negatively regulated by O-GlcNAc glycosylation. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1820*, 24–32.

Ogawa, M., Sakakibara, Y., and Kamemura, K. (2013). Requirement of decreased O-GlcNAc glycosylation of Mef2D for its recruitment to the myogenin promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. *433*, 558–562.

Ohtsubo, K., and Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell *126*, 855–867.

Ohyama, C. (2008). Glycosylation in bladder cancer. Int. J. Clin. Oncol. *13*, 308–313.

Okada, M., Itoh Mi, M., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S., et al. (2002). b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. J. Biol. Chem. *277*, 1633–1636.

Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (1999a). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. J. Biol. Chem. *274*, 11479–11486.

Okajima, T., Fukumoto, S., Ito, H., Kiso, M., Hirabayashi, Y., Urano, T., and Furukawa, K. (1999b). Molecular cloning of brain-specific GD1alpha synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats. J. Biol. Chem. *274*, 30557–30562.

Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (1999c). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. J. Biol. Chem. *274*, 11479–11486.

Okajima, T., Chen, H.H., Ito, H., Kiso, M., Tai, T., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (2000). Molecular cloning and expression of mouse GD1alpha/GT1aalpha/GQ1balpha synthase (ST6GalNAc VI) gene. J. Biol. Chem. *275*, 6717–6723.

O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1999). Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. J. Exp. Med. *189*, 1307–1313.

Olson, E.N. (1993). Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *7*, 1369–1378.

Olson, E.N., and Klein, W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes Dev. *8*, 1–8.

Ordahl, C.P., and Douarin, N.M.L. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. Development *114*, 339–353.

Ordahl, C.P., Berdougo, E., Venters, S.J., and Denetclaw, W.F. (2001). The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. Development *128*, 1731–1744.

Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M. (2010a). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. Stem Cell Res. *4*, 77–91.

Pallafacchina, G., François, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D., and Buckingham, M. (2010b). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. Stem Cell Res. *4*, 77–91.

Pancino, G., Osinaga, E., Charpin, C., Mistro, D., Barque, J.P., and Roseto, A. (1991). Purification and characterisation of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4. Br. J. Cancer *63*, 390–398.

Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. Nature *387*, 908–912.

Panin, V.M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D.J., Irvine, K.D., and Haltiwanger, R.S. (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. J. Biol. Chem. *277*, 29945–29952.

Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Dileo, L., Carubelli, I., Sampaolesi, M., Monti, E., Tettamanti, G., and Venerando, B. (2012). MmNEU3 sialidase over-expression in C2C12 myoblasts delays differentiation and induces hypertrophic myotube formation. J. Cell. Biochem. *113*, 2967–2978.

Park, I.-S., Han, M., Rhie, J.-W., Kim, S.H., Jung, Y., Kim, I.H., and Kim, S.-H. (2009). The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. Biomaterials *30*, 6835–6843.

Park, J.-Y., Park, M.-R., Bui, H.-T., Kwon, D.-N., Kang, M.-H., Oh, M., Han, J.-W., Cho, S.-G., Park, C., Shim, H., et al. (2012). α1,3-galactosyltransferase deficiency in germ-free miniature pigs increases N-glycolylneuraminic acids as the xenoantigenic determinant in pig-human xenotransplantation. Cell. Reprogramming *14*, 353–363.

Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. Science *267*, 1024–1027.

Parkkinen, J., Rogers, G.N., Korhonen, T., Dahr, W., and Finne, J. (1986). Identification of the O-linked sialyloligosaccharides of glycophorin A as the erythrocyte receptors for S-fimbriated Escherichia coli. Infect. Immun. *54*, 37–42.

Parkyn, G., Mootoosamy, R.C., Cheng, L., Thorpe, C., and Dietrich, S. (2002). Hypaxial muscle development. Results Probl. Cell Differ. *38*, 127–141.

Parmacek, M.S., Ip, H.S., Jung, F., Shen, T., Martin, J.F., Vora, A.J., Olson, E.N., and Leiden, J.M. (1994). A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. Mol. Cell. Biol. *14*, 1870–1885.

Patel, R.Y., and Balaji, P.V. (2006). Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. Glycobiology *16*, 108–116.

Patel, R.Y., and Balaji, P.V. (2007). Fold-recognition and comparative modeling of human beta3GalT I, II, IV, V and VI and beta3GalNAcT I: prediction of residues conferring acceptor substrate specificity. J. Mol. Graph. Model. *26*, 255–268.

Patnaik, S.K., and Stanley, P. (2005). Mouse large can modify complex N- and mucin O-glycans on alpha-dystroglycan to induce laminin binding. J. Biol. Chem. *280*, 20851–20859.

Patrick, C.W., Jr, and Wu, X. (2003). Integrin-mediated preadipocyte adhesion and migration on laminin-1. Ann. Biomed. Eng. *31*, 505–514.

Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. J. Biol. Chem. *264*, 17615–17618.

Pellegrini, L. (2001). Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. Curr. Opin. Struct. Biol. *11*, 629–634.

Perez-Ruiz, A., Ono, Y., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S. (2008). beta-Catenin promotes self-renewal of skeletal-muscle satellite cells. J. Cell Sci. *121*, 1373–1382.

Petit, D., Mir, A.-M., Petit, J.-M., Thisse, C., Delannoy, P., Oriol, R., Thisse, B., and Harduin-Lepers, A. (2010). Molecular phylogeny and functional genomics of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases that explain ubiquitous expression of st6gal1 gene in amniotes. J. Biol. Chem. *285*, 38399–38414.

Petit, D., Teppa, E., Mir, A.-M., Vicogne, D., Thisse, C., Thisse, B., Filloux, C., and Harduin-Lepers, A. (2014). Integrative View of α2,3-Sialyltransferases (ST3Gal) Molecular and Functional Evolution in Deuterostomes: Significance of Lineage-Specific Losses. Mol. Biol. Evol. msu395.

Poe, J.C., and Tedder, T.F. (2012). CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance. Trends Immunol. *33*, 413–420.

Potthoff, M.J., and Olson, E.N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. Dev. Camb. Engl. *134*, 4131–4140.

Priatel, J.J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C.J., Richardson, K.B., Page, D.M., Fukuda, M., Varki, N.M., and Marth, J.D. (2000). The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. Immunity *12*, 273–283.

Puckett, R.L., Moore, S.A., Winder, T.L., Willer, T., Romansky, S.G., Covault, K.K., Campbell, K.P., and Abdenur, J.E. (2009). Further evidence of Fukutin mutations as a cause of childhood onset limb-girdle muscular dystrophy without mental retardation. Neuromuscul. Disord. NMD *19*, 352–356.

Rabbani, S.A., Mazar, A.P., Bernier, S.M., Haq, M., Bolivar, I., Henkin, J., and Goltzman, D. (1992). Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. J. Biol. Chem. *267*, 14151–14156.

Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A., Isenberg, D., Rook, G., Axford, J.S., and Roitt, I. (1988). The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Springer Semin. Immunopathol. *10*, 231–249.

Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J.F., Nita-Lazar, A., Kosik, K.S., and Haltiwanger, R.S. (2005). Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. J. Biol. Chem. *280*, 32133–32140.

Rampal, R., Luther, K.B., and Haltiwanger, R.S. (2007). Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. Curr. Mol. Med. *7*, 427–445.

Rath, V.L., Verdugo, D., and Hemmerich, S. (2004). Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. Drug Discov. Today *9*, 1003–1011.

Ravindranath, M.H., Muthugounder, S., Presser, N., Ye, X., Brosman, S., and Morton, D.L. (2005). Endogenous immune response to gangliosides in patients with confined prostate cancer. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *116*, 368–377.

Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell *67*, 687–699.

Recchi, M.A., Hebbar, M., Hornez, L., Harduin-Lepers, A., Peyrat, J.P., and Delannoy, P. (1998). Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. Cancer Res. *58*, 4066–4070.

Recio-Pinto, E., Thornhill, W.B., Duch, D.S., Levinson, S.R., and Urban, B.W. (1990). Neuraminidase treatment modifies the function of electroplax sodium channels in planar lipid bilayers. Neuron *5*, 675–684.

Relaix, F., and Zammit, P.S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: The cell on the edge returns centre stage. Dev. Camb. *139*, 2845–2856.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. Nature *435*, 948–953.

Ren, D., Jia, L., Li, Y., Gong, Y., Liu, C., Zhang, X., Wang, N., and Zhao, Y. (2014). ST6GalNAcII mediates the invasive properties of breast carcinoma through PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway. IUBMB Life *66*, 300–308.

Ren, H., Accili, D., and Duan, C. (2010). Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 5857–5862.

Ricci, E., Broccolini, A., Gidaro, T., Morosetti, R., Gliubizzi, C., Frusciante, R., Di Lella, G.M., Tonali, P.A., and Mirabella, M. (2006). NCAM is hyposialylated in hereditary inclusion body myopathy due to GNE mutations. Neurology *66*, 755–758.

Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., and Baylies, M.K. (2010). Myoblast fusion: When it takes more to make one. Dev. Biol. *341*, 66–83.

Rogers, G.N., Herrler, G., Paulson, J.C., and Klenk, H.D. (1986). Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. J. Biol. Chem. *261*, 5947–5951.

Rohfritsch, P.F., Joosten, J.A.F., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Laporte, B., Juliant, S., Cerutti, M., Delannoy, P., Vliegenthart, J.F.G., and Kamerling, J.P. (2006). Probing the substrate specificity of four different sialyltransferases using synthetic beta-D-Galp-(1-->4)-beta-D-GlcpNAc-(1-->2)-alpha-D-Manp-(1-->O) (CH(2))7CH3 analogues general activating effect of replacing N-acetylglucosamine by N-propionylglucosamine. Biochim. Biophys. Acta *1760*, 685–692.

Le Roith, D., Scavo, L., and Butler, A. (2001). What is the role of circulating IGF-I? Trends Endocrinol. Metab. TEM *12*, 48–52.

De Romeuf, C., Dutertre, C.-A., Le Garff-Tavernier, M., Fournier, N., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., Bihoreau, N., Behrens, C.K., Béliard, R., et al. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcgammaRIIIA/CD16. Br. J. Haematol. *140*, 635–643.

Roseman, S., Jourdian, G.W., Watson, D., and Rood, R. (1961). Enzymatic synthesis of sialic acid 9-phosphates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *47*, 958–961.

Rossi, S., Stoppani, E., Martinet, W., Bonetto, A., Costelli, P., Giuliani, R., Colombo, F., Preti, A., Marchesini, S., and Fanzani, A. (2009). The cytosolic sialidase Neu2 is degraded by autophagy during myoblast atrophy. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1790*, 817–828.

Roth, J., Blaha, I., Bitter-Suermann, D., and Heitz, P.U. (1988). Blastemal cells of nephroblastomatosis complex share an onco-developmental antigen with embryonic kidney and Wilms' tumor. An immunohistochemical study on polysialic acid distribution. Am. J. Pathol. *133*, 596–608.

Rotwein, P., and Wilson, E.M. (2009). Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. J. Cell. Physiol. *219*, 503–511.

Rudd, P.M., Merry, A.H., Wormald, M.R., and Dwek, R.A. (2002). Glycosylation and prion protein. Curr. Opin. Struct. Biol. *12*, 578–586.

Rudnicki, M.A., and Jaenisch, R. (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *17*, 203–209.

Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. Cell *71*, 383–390.

Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell *75*, 1351–1359.

Sabourin, L.A., and Rudnicki, M.A. (2000). The molecular regulation of myogenesis. Clin. Genet. *57*, 16–25.

Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. J. Cell Biol. *150*, 1375–1384.

Saito, T., Miyoshi, E., Sasai, K., Nakano, N., Eguchi, H., Honke, K., and Taniguchi, N. (2002). A secreted type of beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity. J. Biol. Chem. *277*, 17002–17008.

Salehzada, T., Cambier, L., Vu Thi, N., Manchon, L., Regnier, L., and Bisbal, C. (2009). Endoribonuclease L (RNase L) regulates the myogenic and adipogenic potential of myogenic cells. PloS One *4*, e7563.

Sambasivan, R., Gayraud-Morel, B., Dumas, G., Cimper, C., Paisant, S., Kelly, R.G., Kelly, R., and Tajbakhsh, S. (2009). Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. Dev. Cell *16*, 810–821.

Sambasivan, R., Kuratani, S., and Tajbakhsh, S. (2011). An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles. Dev. Camb. Engl. *138*, 2401–2415.

Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Steelant, W.F., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2000). Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. Biochim. Biophys. Acta *1474*, 201–211.

Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J., and Sanger, J.M. (2010). Assembly and dynamics of myofibrils. J. Biomed. Biotechnol. *2010*, 858606.

dos-Santos, P.B., Zanetti, J.S., Vieira-de-Mello, G.S., Rego, M.B., A, A.R.-S., and Beltrao, E.I.C. (2014). Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *7*, 2337–2349.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr. Biol. CB *14*, 1296–1302.

Sarker, K.P., and Lee, K.-Y. (2004). L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. Oncogene *23*, 6064–6070.

Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T., and Hasegawa, M. (1993). Expression cloning of a novel Gal beta (1-3/1-4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. J. Biol. Chem. *268*, 22782–22787.

Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., and Nishi, T. (1994). Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). J. Biol. Chem. *269*, 15950–15956.

Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. Nature *341*, 303–307.

Sato, K., and Miyagi, T. (1996). Involvement of an endogenous sialidase in skeletal muscle cell differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *221*, 826–830.

Scaringi, R., Piccoli, M., Papini, N., Cirillo, F., Conforti, E., Bergante, S., Tringali, C., Garatti, A., Gelfi, C., Venerando, B., et al. (2013). NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1α. J. Biol. Chem. *288*, 3153–3162.

Schachter, H. (2001). The clinical relevance of glycobiology. J. Clin. Invest. *108*, 1579–1582.

Van Schaftingen, E., and Jaeken, J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. FEBS Lett. *377*, 318–320.

Schauer, R. (1991). Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. Glycobiology *1*, 449–452.

Scheidegger, E.P., Sternberg, L.R., Roth, J., and Lowe, J.B. (1995). A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. J. Biol. Chem. *270*, 22685–22688.

Schengrund, C.L., and Ringler, N.J. (1989). Binding of Vibrio cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands. J. Biol. Chem. *264*, 13233–13237.

Schenkman, S., Ferguson, M.A., Heise, N., de Almeida, M.L., Mortara, R.A., and Yoshida, N. (1993). Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. *59*, 293–303.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol. Rev. *91*, 1447–1531.

Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M., and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 945–950.

Schneider, J.A., Clark, K.F., Greene, A.A., Reisch, J.S., Markello, T.C., Gahl, W.A., Thoene, J.G., Noonan, P.K., and Berry, K.A. (1995). Recent advances in the treatment of cystinosis. J. Inherit. Metab. Dis. *18*, 387–397.

Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. Science *264*, 1467–1471.

Schuster-Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. (2007). Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 537–542.

Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A New Look at the Origin, Function, and “Stem-Cell” Status of Muscle Satellite Cells. Dev. Biol. *218*, 115–124.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. Cell *102*, 777–786.

Seidenfaden, R., Krauter, A., Schertzinger, F., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2003). Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. Mol. Cell. Biol. *23*, 5908–5918.

Senechal, H., Delain, D., Schapira, G., and Wahrmann, J.P. (1983). Alterations in glycosylation of plasma membrane proteins during myogenesis. Exp. Cell Res. *147*, 341–350.

Seppala, R., Lehto, V.P., and Gahl, W.A. (1999). Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. Am. J. Hum. Genet. *64*, 1563–1569.

Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R., and Joshi, L. (2003). Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. Nat. Biotechnol. *21*, 1470–1471.

Shao, L., and Haltiwanger, R.S. (2003). O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *60*, 241–250.

Shao, L., Luo, Y., Moloney, D.J., and Haltiwanger, R. (2002). O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase. Glycobiology *12*, 763–770.

Shao, L., Moloney, D.J., and Haltiwanger, R. (2003). Fringe Modifies O-Fucose on Mouse Notch1 at Epidermal Growth Factor-like Repeats within the Ligand-binding Site and the Abruptex Region. J. Biol. Chem. *278*, 7775–7782.

Sharon, N., and Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. Sci. Am. *268*, 82–89.

Sharon, N., and Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology *14*, 53R – 62R.

Shih, H.P., Gross, M.K., and Kioussi, C. (2008). Muscle development: forming the head and trunk muscles. Acta Histochem. *110*, 97–108.

Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Takahashi, T., and Hirai, H. (2001). Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. J. Biol. Chem. *276*, 25753–25758.

Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-Box Family of Transcription Factors. Eur. J. Biochem. *229*, 1–13.

Snow, M.H. (1983). A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. Anat. Rec. *207*, 593–604.

Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., and Tuil, D. (1996). Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. Mol. Cell. Biol. *16*, 6065–6074.

Sparrow, D.B., Chapman, G., Wouters, M.A., Whittock, N.V., Ellard, S., Fatkin, D., Turnpenny, P.D., Kusumi, K., Sillence, D., and Dunwoodie, S.L. (2006). Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostal dysostosis with a severe vertebral phenotype. Am. J. Hum. Genet. *78*, 28–37.

Sperandio, M., Gleissner, C.A., and Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. Immunol. Rev. *230*, 97–113.

Spicer, D.B., Rhee, J., Cheung, W.L., and Lassar, A.B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. Science *272*, 1476–1480.

Spiro, R.G., Lucas, F., and Rudall, K.M. (1971). Glycosylation of hydroxylysine in collagens. Nature. New Biol. *231*, 54–55.

Stanley, P. (2007). Regulation of Notch Signaling by Glycosylation. Curr. Opin. Struct. Biol. *17*, 530–535.

Stanley, P., and Okajima, T. (2010). Roles of glycosylation in Notch signaling. Curr. Top. Dev. Biol. *92*, 131–164.

Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *33*, 151–208.

Stibler, H., Holzbach, U., Tengborn, L., and Kristiansson, B. (1996). Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb. *7*, 118–126.

Strehle, E.M. (2003). Sialic acid storage disease and related disorders. Genet. Test. *7*, 113–121.

Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A.R., and Muñoz-Cánoves, P. (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. EMBO J. *23*, 365–375.

Suzuki, M., Angata, K., Nakayama, J., and Fukuda, M. (2003a). Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. J. Biol. Chem. *278*, 49459–49468.

Suzuki, T., Kwofie, M.A., and Lennarz, W.J. (2003b). Ngly1, a mouse gene encoding a deglycosylating enzyme implicated in proteasomal degradation: expression, genomic organization, and chromosomal mapping. Biochem. Biophys. Res. Commun. *304*, 326–332.

Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., and Buckingham, M. (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. Nature *384*, 266–270.

Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. Genome Biol. *8*, 215–215.

Takashima, S. (2008). Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. Biosci. Biotechnol. Biochem. *72*, 1155–1167.

Takashima, S., Tsuji, S., and Tsujimoto, M. (2002a). Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. Genomic analysis of human sialyltransferase genes. J. Biol. Chem. *277*, 45719–45728.

Takashima, S., Ishida, H.-K., Inazu, T., Ando, T., Ishida, H., Kiso, M., Tsuji, S., and Tsujimoto, M. (2002b). Molecular cloning and expression of a sixth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. J. Biol. Chem. *277*, 24030–24038.

Takashima, S., Tsuji, S., and Tsujimoto, M. (2003). Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. J. Biochem. (Tokyo) *134*, 287–296.

Tamir, Y., and Bengal, E. (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. J. Biol. Chem. *275*, 34424–34432.

Tan, L., Psaltis, A., Baker, L.M., McGuckin, M., Rousseau, K., and Wormald, P.-J. (2010). Aberrant mucin glycoprotein patterns of chronic rhinosinusitis patients with bacterial biofilms. Am. J. Rhinol. Allergy *24*, 319–324.

Tarentino, A.L., and Plummer Jr., T.H. (1994). [4] Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum. In Methods in Enzymology, G.W.H. William J. Lennarz, ed. (Academic Press), pp. 44–57.

Tarentino, A.L., Gómez, C.M., and Plummer, T.H. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. Biochemistry (Mosc.) *24*, 4665–4671.

Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S., and Gauthier-Rouvière, C. (2009). N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. J. Biol. Chem. *284*, 23137–23145.

Taylor, M.E., and Drickamer, K. (2003). Structure-function analysis of C-type animal lectins. Methods Enzymol. *363*, 3–16.

Teintenier-Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cérutti, M., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. Biochem. J. *392*, 665–674.

Terasawa, K., Furumoto, H., Kamada, M., and Aono, T. (1996). Expression of Tn and Sialyl-Tn Antigens in the Neoplastic Transformation of Uterine Cervical Epithelial Cells. Cancer Res. *56*, 2229–2232.

Theodosis, D.T., Bonhomme, R., Vitiello, S., Rougon, G., and Poulain, D.A. (1999). Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 10228–10236.

Thotakura, N.R., Szkudlinski, M.W., and Weintraub, B.D. (1994). Structure-function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrotrophin by sequential deglycosylation and resialylation. Glycobiology *4*, 525–533.

Tian, E., and Ten Hagen, K.G. (2009). Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. Glycoconj. J. *26*, 325–334.

Tian, E., Hoffman, M.P., and Ten Hagen, K.G. (2012). O-glycosylation modulates integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane components. Nat. Commun. *3*, 869.

Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., and Hakomori, S. (2008). Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 1925–1930.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. Cell *46*, 567–574.

Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., and Glass, D.J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *296*, C1258–C1270.

Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J.L., Robin, P., Leibovitch, S.A., Sassone-Corsi, P., and Harel-Bellan, A. (1993). Repression of c-fos promoter by MyoD on muscle cell differentiation. Nature *363*, 79–82.

Tsuji, S., Datta, A.K., and Paulson, J.C. (1996). Systematic nomenclature for sialyltransferases. Glycobiology *6*, v – vii.

Tuzi, N.L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R.M., et al. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. PLoS Biol. *6*, e100.

Vanbeselaere, J., Chang, L.-Y., Harduin-Lepers, A., Fabre, E., Yamakawa, N., Slomianny, C., Biot, C., Khoo, K.-H., and Guerardel, Y. (2012). Mapping the expressed glycome and glycosyltransferases of zebrafish liver cells as a relevant model system for glycosylation studies. J. Proteome Res. *11*, 2164–2177.

Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Carnac, G., Lamb, N., and Fernandez, A. (1992). Serum response factor p67SRF is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines. J. Cell Biol. *118*, 1489–1500.

Varki, A. (1992). Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. Curr. Opin. Cell Biol. *4*, 257–266.

Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology *3*, 97–130.

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

Der Vartanian, A., Audfray, A., Al Jaam, B., Janot, M., Legardinier, S., Maftah, A., and Germot, A. (2015). Protein O-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway. Mol. Cell. Biol. *35*, 391–405.

Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J., et al. (1999). A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. Nat. Genet. *23*, 462–465.

Vijay, I.K. (1998). Developmental and hormonal regulation of protein N-glycosylation in the mammary gland. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia *3*, 325–336.

Voglmeir, J., Kaloo, S., Laurent, N., Meloni, M.M., Bohlmann, L., Wilson, I.B.H., and Flitsch, S.L. (2011). Biochemical correlation of activity of the α-dystroglycan-modifying

glycosyltransferase POMGnT1 with mutations in muscle-eye-brain disease. Biochem. J. *436*, 447–455.

Vogt, G., Vogt, B., Chuzhanova, N., Julenius, K., Cooper, D.N., and Casanova, J.-L. (2007). Gain-of-glycosylation mutations. Curr. Opin. Genet. Dev. *17*, 245–251.

Wahrmann, J.P., Senechal, H., Etienne-Decerf, J., and Winand, R.J. (1980). Changes in cell surface glycopeptides during myogenesis in wild-type and non-fusing mutant L6 rat myoblasts. FEBS Lett. *115*, 230–234.

Wallace, S.E., Conta, J.H., Winder, T.L., Willer, T., Eskuri, J.M., Haas, R., Patterson, K., Campbell, K.P., Moore, S.A., and Gospe, S.M. (2014). A novel missense mutation in POMT1 modulates the severe congenital muscular dystrophy phenotype associated with POMT1 nonsense mutations. Neuromuscul. Disord. NMD *24*, 312–320.

Walsh, F.S., Parekh, R.B., Moore, S.E., Dickson, G., Barton, C.H., Gower, H.J., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). Development *105*, 803–811.

Wang, X.H. (2013). MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care *16*, 258–266.

Wang, B.L., Springer, G.F., and Harwick, L.C. (1998). T (Thomsen-Friedenreich) and Tn epitope location and their spatial relations to adhesion plaques on human breast carcinoma cells: immunogold-silver staining studies at scanning electron microscopic level. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. *30*, 503–509.

Wang, C., Wu, Z., Yuan, J., Wang, B., Zhang, P., Zhang, Y., Wang, Z., and Huang, L. (2014). Simplified quantitative glycomics using the stable isotope label Girard's reagent p by electrospray ionization mass spectrometry. J. Proteome Res. *13*, 372–384.

Wang, G., Yeh, H.I., and Lin, J.J. (1994). Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene. J. Biol. Chem. *269*, 30595–30603.

Wang, J., Dube, D.K., White, J., Fan, Y., Sanger, J.M., and Sanger, J.W. (2012). Clock is not a component of Z-bands. Cytoskelet. Hoboken NJ *69*, 1021–1031.

Wang, P.H., Li, Y.F., Juang, C.M., Lee, Y.R., Chao, H.T., Tsai, Y.C., and Yuan, C.C. (2001a). Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. Gynecol. Oncol. *83*, 121–127.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A., and Keating, M.T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell *80*, 805–811.

Wang, Y., Tan, J., Sutton-Smith, M., Ditto, D., Panico, M., Campbell, R.M., Varki, N.M., Long, J.M., Jaeken, J., Levinson, S.R., et al. (2001b). Modeling human congenital disorder of glycosylation type IIa in the mouse: conservation of asparagine-linked glycan-dependent functions in mammalian physiology and insights into disease pathogenesis. Glycobiology *11*, 1051–1070.

Wang, Y., Mohamed, J.S., and Alway, S.E. (2013). M-cadherin-inhibited phosphorylation of ß-catenin augments differentiation of mouse myoblasts. Cell Tissue Res. *351*, 183–200.

Warren, G., and Malhotra, V. (1998). The organisation of the Golgi apparatus. Curr. Opin. Cell Biol. *10*, 493–498.

Warren, L., and Felsenfeld, H. (1961a). N-Acetylmannosamine-6-phosphate and N-acetylneuraminic acid-9-phosphate as intermediates in sialic acid biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *5*, 185–190.

Warren, L., and Felsenfeld, H. (1961b). The biosynthesis of N-acetylneuraminic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. *4*, 232–235.

Wei, L., Zhou, W., Croissant, J.D., Johansen, F.E., Prywes, R., Balasubramanyam, A., and Schwartz, R.J. (1998). RhoA signaling via serum response factor plays an obligatory role in myogenic differentiation. J. Biol. Chem. *273*, 30287–30294.

Weigel, P.H. (1993). Endocytosis and function of the hepatic asialoglycoprotein receptor. Subcell. Biochem. *19*, 125–161.

Weigel, P.H., and Yik, J.H.N. (2002). Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. Biochim. Biophys. Acta *1572*, 341–363.

Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P.H., and Paulson, J.C. (1987). Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor. J. Biol. Chem. *262*, 17735–17743.

Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B., and Miller, A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 5434–5438.

Wen, D.X., Svensson, E.C., and Paulson, J.C. (1992). Tissue-specific alternative splicing of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. J. Biol. Chem. *267*, 2512–2518.

Wen, Y., Bi, P., Liu, W., Asakura, A., Keller, C., and Kuang, S. (2012). Constitutive Notch Activation Upregulates Pax7 and Promotes the Self-Renewal of Skeletal Muscle Satellite Cells. Mol. Cell. Biol. *32*, 2300–2311.

Westerblad, H., Bruton, J.D., and Katz, A. (2010). Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. Exp. Cell Res. *316*, 3093–3099.

Wilhelm, J., Kalyan, N.K., Lee, S.G., Hum, W.T., Rappaport, R., and Hung, P.P. (1990). Deglycosylation increases the fibrinolytic activity of a deletion mutant of tissue-type plasminogen activator. Thromb. Haemost. *63*, 464–471.

Willer, T., Lee, H., Lommel, M., Yoshida-Moriguchi, T., de Bernabe, D.B.V., Venzke, D., Cirak, S., Schachter, H., Vajsar, J., Voit, T., et al. (2012). ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. Nat. Genet. *44*, 575–580.

Williams, B.A., and Ordahl, C.P. (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. Development *120*, 785–796.

Wilson, E.M., and Rotwein, P. (2007). Selective Control of Skeletal Muscle Differentiation by Akt1. J. Biol. Chem. *282*, 5106–5110.

Wilson, E.M., Tureckova, J., and Rotwein, P. (2004). Permissive roles of phosphatidyl inositol 3-kinase and Akt in skeletal myocyte maturation. Mol. Biol. Cell *15*, 497–505.

Wolf, M.T., Daly, K.A., Reing, J.E., and Badylak, S.F. (2012). Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. Biomaterials *33*, 2916–2925.

Wopereis, S., Lefeber, D.J., Morava, E., and Wevers, R.A. (2006). Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. Clin. Chem. *52*, 574–600.

Wróbel, E., Brzóska, E., and Moraczewski, J. (2007). M-cadherin and beta-catenin participate in differentiation of rat satellite cells. Eur. J. Cell Biol. *86*, 99–109.

Wuensch, S.A., Huang, R.Y., Ewing, J., Liang, X., and Lau, J.T. (2000). Murine B cell differentiation is accompanied by programmed expression of multiple novel beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase mRNA forms. Glycobiology *10*, 67–75.

Xu, A., Lei, L., and Irvine, K.D. (2005). Regions of Drosophila Notch that contribute to ligand binding and the modulatory influence of Fringe. J. Biol. Chem. *280*, 30158–30165.

Yaffe, D., and Saxel, O. (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. Differ. Res. Biol. Divers. *7*, 159–166.

Yagi, H., Saito, T., Yanagisawa, M., Yu, R.K., and Kato, K. (2012). Lewis X-carrying N-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway. J. Biol. Chem. *287*, 24356–24364.

Yamada, T., Bando, H., Takeuchi, S., Kita, K., Li, Q., Wang, W., Akinaga, S., Nishioka, Y., Sone, S., and Yano, S. (2011). Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2-expressing small-cell lung cancer cells. Cancer Sci. *102*, 2157–2163.

Yamashiro, S., Okada, M., Haraguchi, M., Furukawa, K., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995). Expression of alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene in human cancer cell lines: high level expression in melanomas and up-regulation in activated T lymphocytes. Glycoconj. J. *12*, 894–900.

Yamashita, K., Hara-Kuge, S., and Ohkura, T. (1999). Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. Biochim. Biophys. Acta *1473*, 147–160.

Yan, Q., Bach, D.Q., Gatla, N., Sun, P., Liu, J.-W., Lu, J.-Y., Paller, A.S., and Wang, X.-Q. (2013). Deacetylated GM3 Promotes uPAR-Associated Membrane Molecular Complex to Activate p38 MAPK in Metastatic Melanoma. Mol. Cancer Res. *11*, 665–675.

Yang, J.-H., Choi, J.-H., Jang, H., Park, J.-Y., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011). Histone chaperones cooperate to mediate Mef2-targeted transcriptional regulation during skeletal myogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *407*, 541–547.

Yang, L.-T., Nichols, J.T., Yao, C., Manilay, J.O., Robey, E.A., and Weinmaster, G. (2005). Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. Mol. Biol. Cell *16*, 927–942.

Yang, W., Zhang, Y., Li, Y., Wu, Z., and Zhu, D. (2007). Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. J. Biol. Chem. *282*, 3799–3808.

Yarema, K.J., and Bertozzi, C.R. (1998). Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. Curr. Opin. Chem. Biol. *2*, 49–61.

Yeganeh, A., Stelmack, G.L., Fandrich, R.R., Halayko, A.J., Kardami, E., and Zahradka, P. (2012). Connexin 43 phosphorylation and degradation are required for adipogenesis. Biochim. Biophys. Acta *1823*, 1731–1744.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. Physiol. Rev. *93*, 23–67.

Yogalingam, G., Bonten, E.J., van de Vlekkert, D., Hu, H., Moshiach, S., Connell, S.A., and d' Azzo, A. (2008). Neuraminidase 1 is a Negative Regulator of Lysosomal Exocytosis. Dev. Cell *15*, 74–86.

Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., and Tsuji, S. (1995). Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain. J. Biol. Chem. *270*, 14628–14633.

Yu, H., and Chen, X. (2007). Carbohydrate post-glycosylational modifications. Org. Biomol. Chem. *5*, 865–872.

Yusuf, F., and Brand-Saberi, B. (2006). The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. Anat. Embryol. (Berl.) *211 Suppl 1*, 21–30.

Zanoteli, E., van de Vlekkert, D., Bonten, E.J., Hu, H., Mann, L., Gomero, E.M., Harris, A.J., Ghersi, G., and d' Azzo, A. (2010). Muscle Degeneration in Neuramindase 1 Deficient Mice Results from Infiltration of the Muscle Fibers by Expanded Connective Tissue. Biochim. Biophys. Acta *1802*, 659–672.

De Zegher, F., and Jaeken, J. (1995). Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 from birth through adolescence. Pediatr. Res. *37*, 395–401.

Zetser, A., Gredinger, E., and Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. J. Biol. Chem. *274*, 5193–5200.

Zhang, S., Zhang, H.S., Cordon-Cardo, C., Reuter, V.E., Singhal, A.K., Lloyd, K.O., and Livingston, P.O. (1997). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *73*, 50–56.

Zhao, J., Patwa, T.H., Lubman, D.M., and Simeone, D.M. (2008). Protein biomarkers in cancer: natural glycoprotein microarray approaches. Curr. Opin. Mol. Ther. *10*, 602–610.

Zhao, Y., Itoh, S., Wang, X., Isaji, T., Miyoshi, E., Kariya, Y., Miyazaki, K., Kawasaki, N., Taniguchi, N., and Gu, J. (2006). Deletion of Core Fucosylation on α3β1 Integrin Down-regulates Its Functions. J. Biol. Chem. *281*, 38343–38350.

Zhao, Y., Li, Y., Ma, H., Dong, W., Zhou, H., Song, X., Zhang, J., and Jia, L. (2014). Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. Mol. Cell. Proteomics MCP *13*, 520–536.

Zheng, M., Fang, H., and Hakomori, S. (1994). Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. J. Biol. Chem. *269*, 12325–12331.

Zheng, M., Ruan, Y., Yang, M., Guan, Y., and Wu, Z. (2004). The comparative study on ultrastructure and immunohistochemistry in AFP negative and positive hepatocellular carcinoma. J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban *24*, 547–549, 559.

Zhou, H., Warren, P.G., Froehlich, J.W., and Lee, R.S. (2014). Dual Modifications Strategy to Quantify Neutral and Sialylated N-Glycans Simultaneously by MALDI-MS. Anal. Chem. *86*, 6277–6284.

Zhou, Q., Hakomori, S., Kitamura, K., and Igarashi, Y. (1994). GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. J. Biol. Chem. *269*, 1959–1965.

Zhou, X.Y., Morreau, H., Rottier, R., Davis, D., Bonten, E., Gillemans, N., Wenger, D., Grosveld, F.G., Doherty, P., Suzuki, K., et al. (1995). Mouse model for the lysosomal disorder galactosialidosis and correction of the phenotype with overexpressing erythroid precursor cells. Genes Dev. *9*, 2623–2634.

Zuber, C., Lackie, P.M., Catterall, W.A., and Roth, J. (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. J. Biol. Chem. *267*, 9965–9971.

Annexes

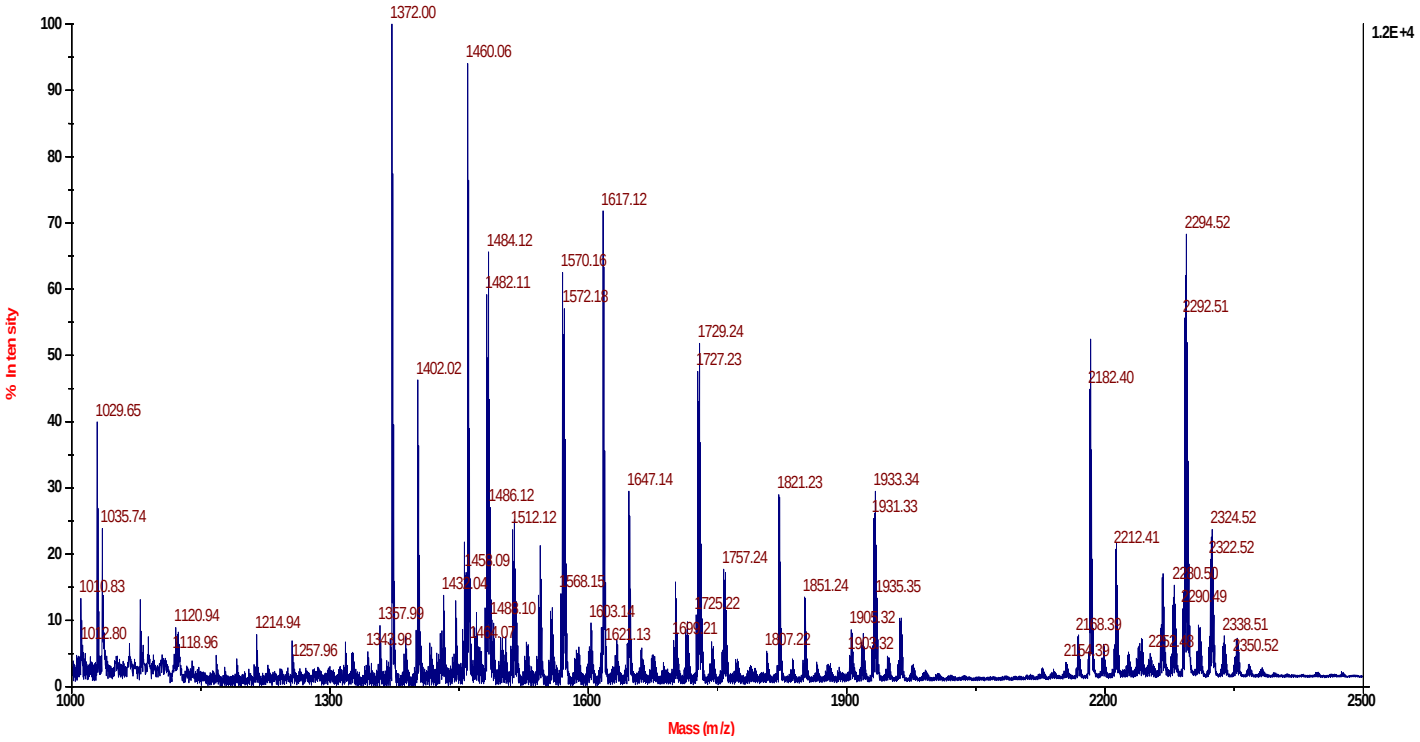
Annexe : Supplément résultat 1 – Elisa lectines

Temps de cinétiques	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h	264h	288h	312h	336h
Quantification protéine totale (µg/100µl)	135	111,2	137,6	170,6	141,4	126,8	167,1	179	173,2	190,9	154	242,7	217	184,8	138,1
Quantification Prp(pg)	5626	8475	9471	10568,5	9673,5	8502,5	10206,5	10970	10456,5	8800	9302,5	12962,5	12208	10269	7756
Prp(pg/1µg proteines totale)	41,674	48,932	49,612	61,949	68,412	67,054	61,080	61,285	60,372	63,953	60,406	53,410	56,258	55,568	56,162
Volume pour 1ng Prp	23,996	20,437	20,156	16,142	14,617	14,913	16,372	16,317	16,564	15,636	16,555	18,723	17,775	17,996	17,806

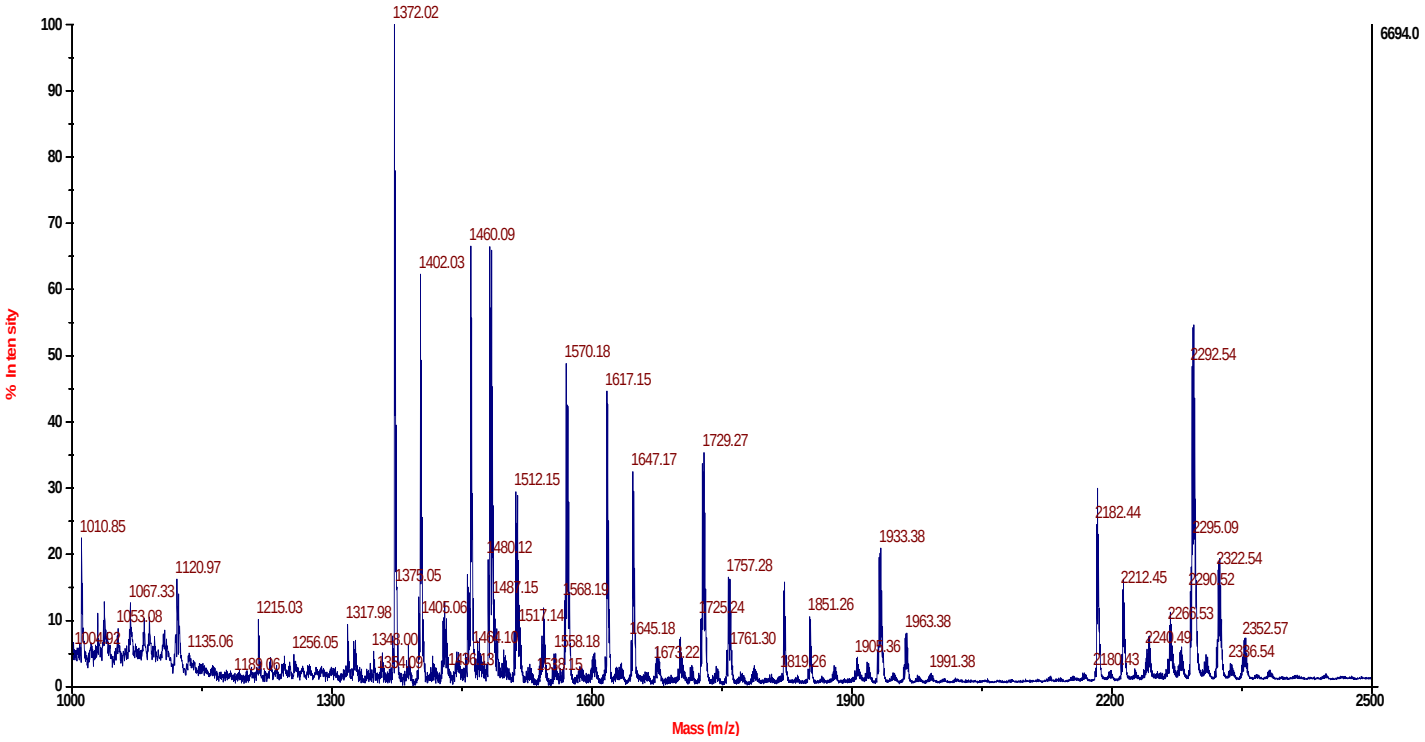
Tableau 1- Annexe : Calculs des quantités de protéines prion pour l'Elisa lectine sur protéine candidate

Annexe : Supplément résultat 2 – Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides

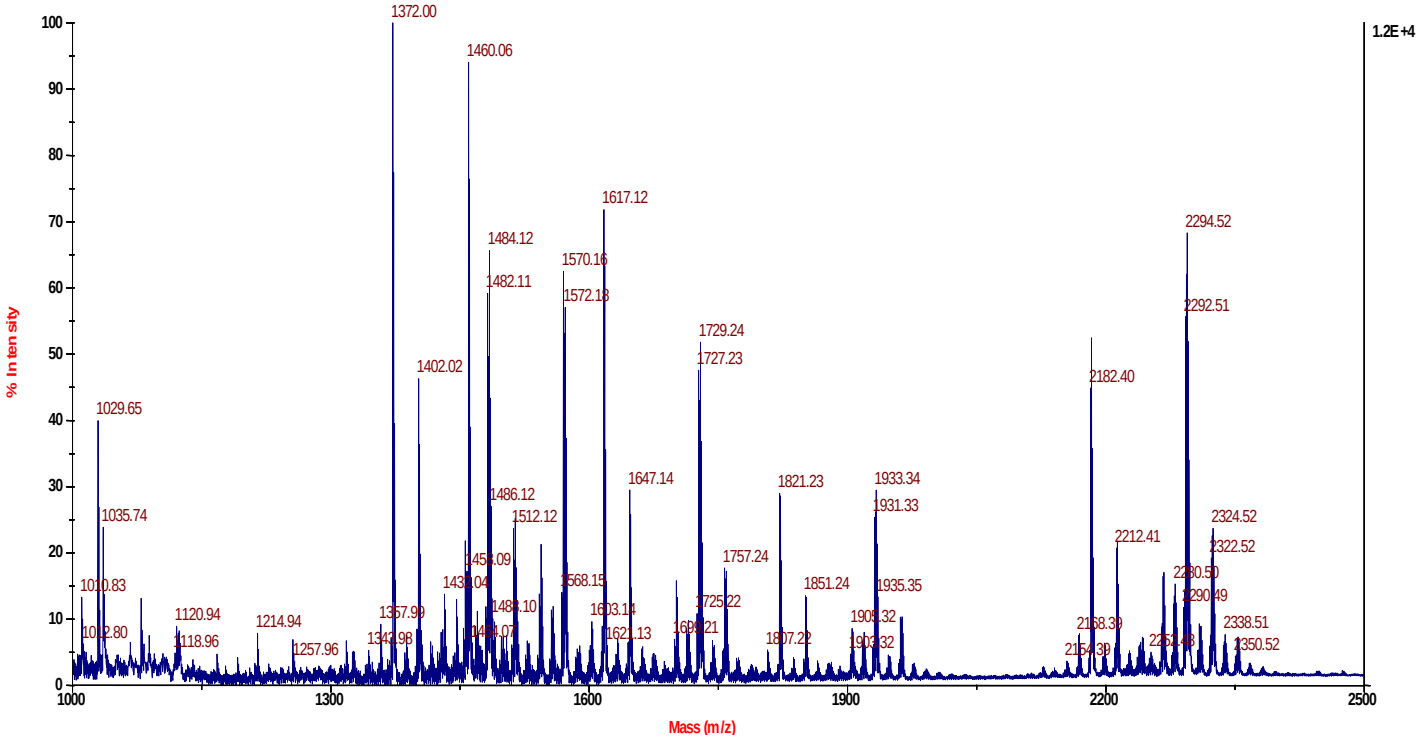
Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides: C2C12 en prolifération (0h)



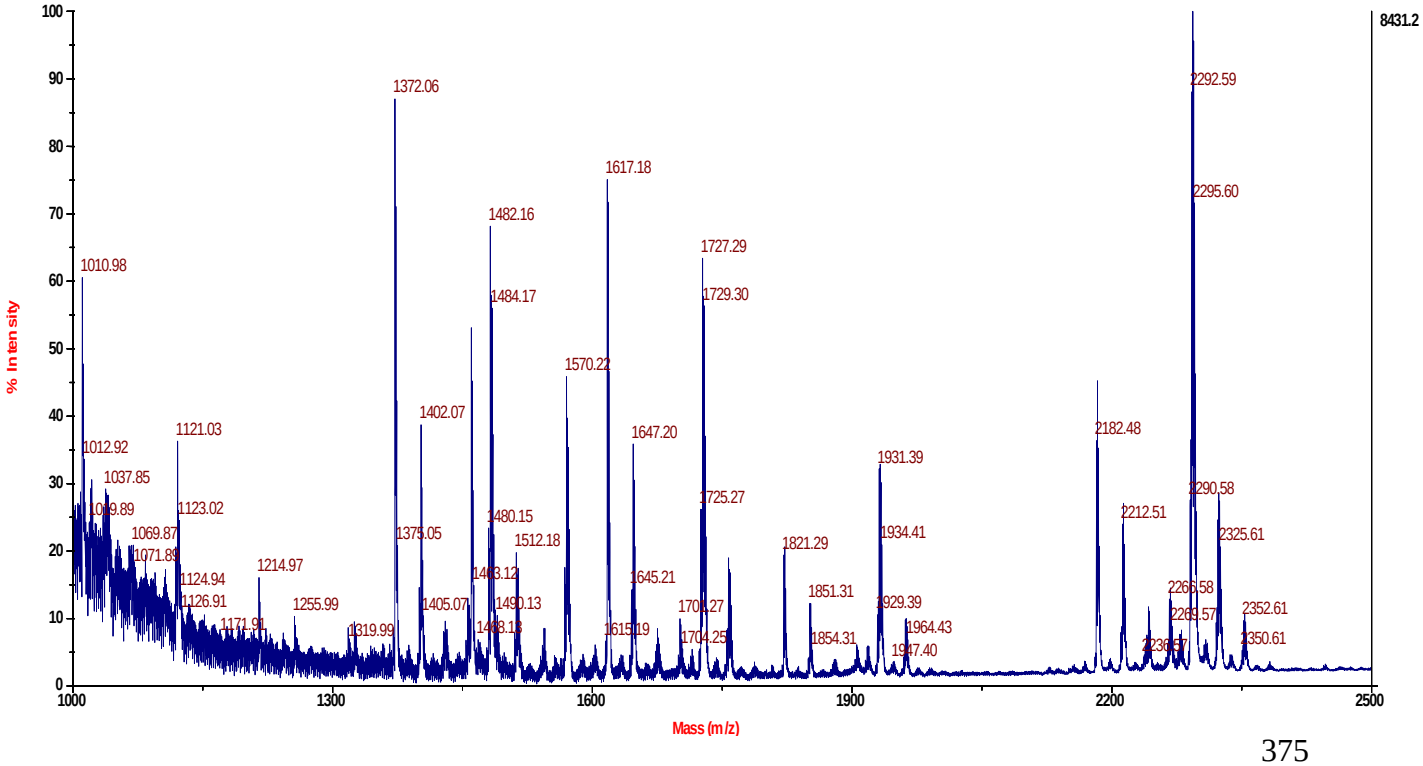
Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides: C2C12 en différenciation (96h)



Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides: C2C12 en différenciation (168h)



Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides: C2C12 en différenciation (216h)



Spectrométrie de masse sur glycosphingolipides: C2C12 en différenciation (336h)

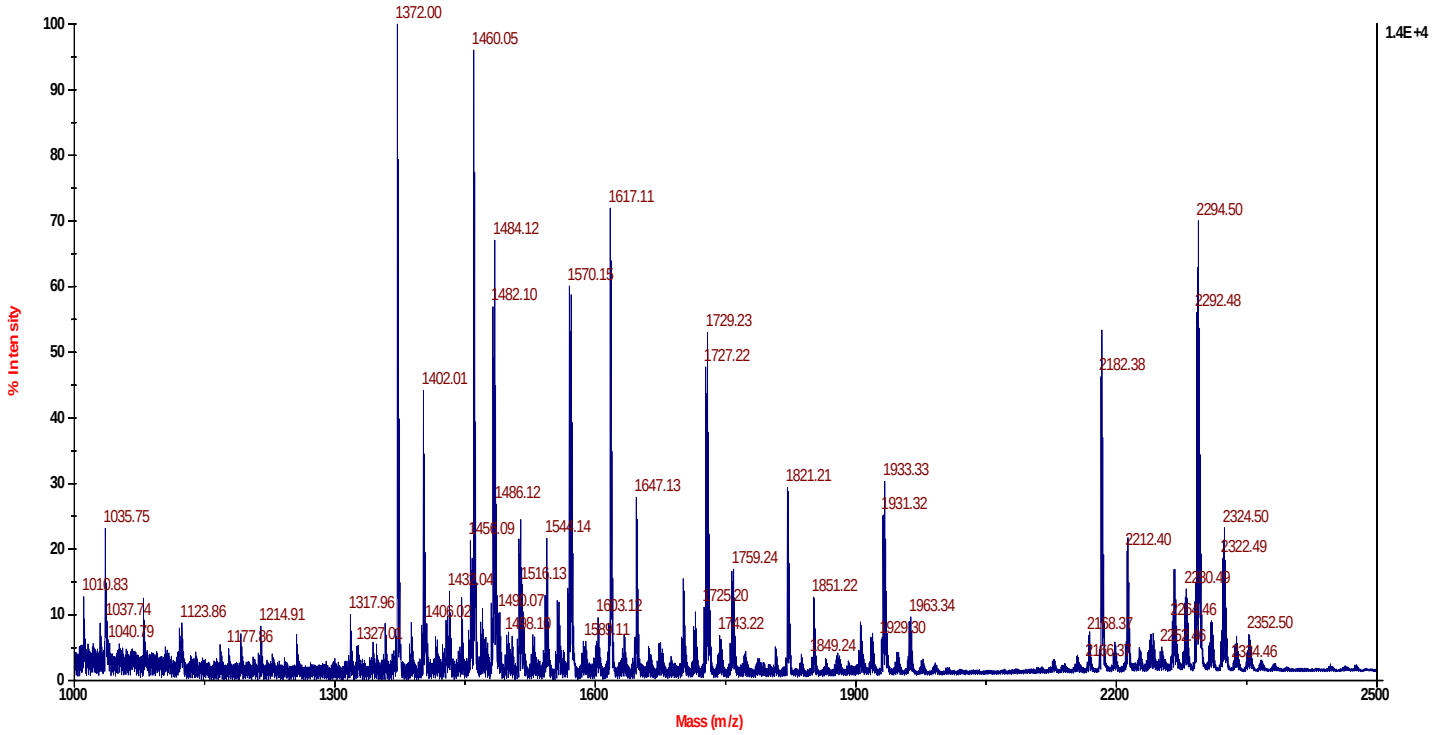
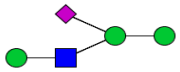
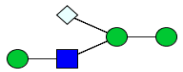
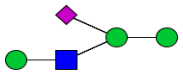
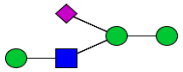
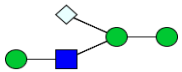
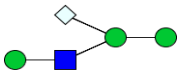
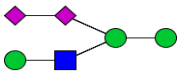


Figure 1- Annexe : Exemple de profil Ms obtenus par spectrométrie de masse sur les glycosphingolipides

Tableau 2- Annexe : Prédiction des structures des glycosphingolipides par ‘Glyco work bunch’

0h	96h	168h	216h	336h	Structure du glycannes	Céramide	Description
	1010.822	1010.76254	1010.8318	1010.77783		c16:0	**Lac (548)**
1120.8799	1120.9932		1120.9249	1120.8850		c24:0	**Lac (660)**
1371.9684	1371.9893	1371.9894	1372.0061	1371.9771		c16:0	**GM3-Ac (548)**
1401.9769	1401.9988	1401.9991	1402.03859	1401.9860		c16:0	**GM3-Gc (548)**
1460.0198	1460.0664	1460.0444	1460.06221	1460.029873		c16:0	**GA1 (548)**
	1482.09958	1482.10059	1482.1186	1482.06243		c24:1	**GM3-Ac (658)**
1484.07789		1484.1034		1484.0882		c24:0	**GM3-Ac (660)**
	1512.1211	1512.0991	1512.1408			c24:1	**GM3-Gc (658)**
1514.09541						c24:0	**GM3-Gc (660)**

1570.12523	1570.1525	1570.15428	1570.1733	1570.1368		c24:1	**GA1 (658)**
				1572.1508		c24:0	**GA1 (660)**
1618.0952	1617.1383	1617.1165	1617.1362	1617.0978		c16:0	**GM2-Ac (548)**
1647.1024	1647.1322	1647.1347	1647.1547	1647.1152		c16:0	**GM2-Gc (548)**
1727.1886		1727.2242	1727.2452	1727.2026		c24:1	**GM2-Ac (658)**
	1729.2339	1729.2371		1729.2154		c24:0	**GM2-Ac (660)**
	1757.2620	1757.24044	1757.2618	1757.2180		c24:1	**GM2-Gc (658)**
1759.2087				1759.2232		c24:0	**GM2-Gc (660)**

1821.17104		1822.2312	1821.2327	1821.1864		c16:0	**GM1-Ac (548)**
1851.1909	1851.2275	1852.23508	1851.2543	1851.2068		c16:0	**GM1-Gc (548)**
	1932.3431	1931.3235	1931.3732	1931.2963		c24:1	**GM1-Ac (658)**
1933.3024		1933.3468	1933.3454	1933.3196		c24:0	**GM1-Ac (660)**
	1961.3298		1961.3854	1961.3336		c24:1	**GM1-Gc (658)**
1963.3019				1963.3196		c24:0	**GM1-Gc (660)**
2183.3674	2183.4153	2183.4228	2183.4494	2183.3886		c16:0	**GD1-Ac2 (548)**

2212.3721	2213.4334	2212.4288	2212.4557	2212.3937		c16:0	**GD1-Ac-Gc (548)**
	2242.4673	2240.4660	2242.4744			c16:0	**GD1- Gc2 (548)**
	2293.5387	2292.5168	2293.5465	2292.4794		c24:1	**GD1-Ac2 (658)**
2294.4603				2294.4833		c24:0	**GD1-Ac2 (660)**
		2322.5243		2322.4861		c24:1	**GD1-Ac-Gc (658)**
2323.4710	2323.5239		2324.5610	2324.5031		c24:0	**GD1-Ac-Gc (660)**
	2352.5149 2354.5676	2350.5239 2354.4859		2352.4849		c24:1 c24:0	**GD1-Gc-Gc (658)** **GD1-Gc-Gc (660)**

Annexe : Supplément résultat 3 – Spectrométrie de masse sur *N*-glycannes

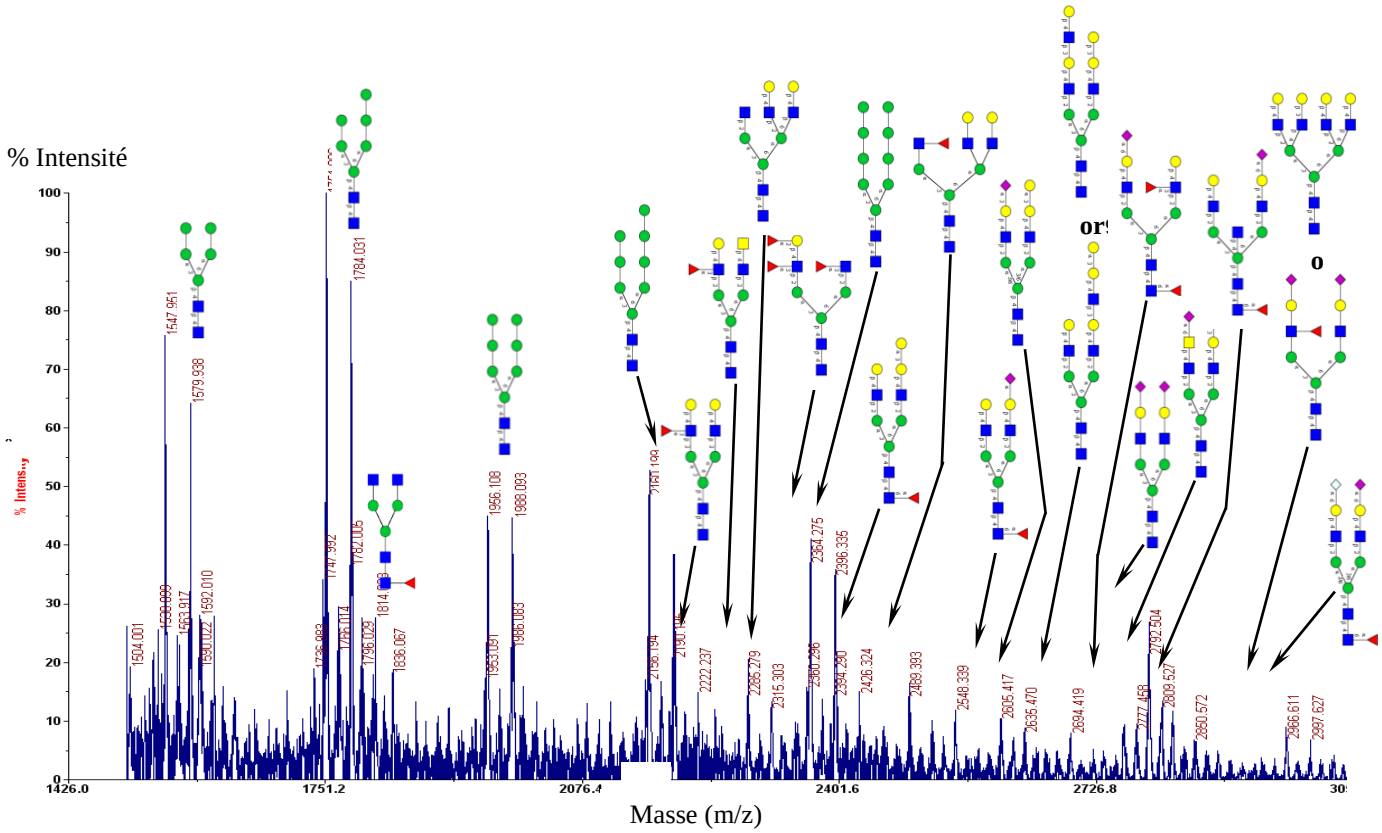


Figure 2- Annexe : Exemple de profil Ms obtenus par spectrométrie de masse sur les *N*-glycolipides avec les prédictions correspondantes aux piques, obtenues grâce à l'analyse par 'gluco work bunch'

Tableau 3- Annexe : Prédiction des structures des *N*-glycannes par 'Glyco work bunch'

Piques (Masse)					**Prédiction des structures**
0h	**96h**	**168h**	**216h**	**336h**	
1546,137	1548,049	1547,861	1547,933	1548,113	**GlcNAc2-Man5 sous méthylé**
1579,930	1579,867	1579,843	1579,893	1579,861	**GlcNAc2-Man5**
-	**-**	**-**	1590,865	1590,118	**GlcNAc3-Man3-Fuc**
-	**-**	**-**	**-**	1619,957	**GlcNAc3-Man3-Gal**
1752,000	1751,935	1751,911	1751,965	1751,932	**GlcNAc2-Man6 sous méthylé**
1785,005	1783,956	1783,957	1783,986	1783,953	**GlcNAc2-Man6**
-	**-**	1813,976	1814,973	**-**	**GlcNac4-Man3-Fuc (H)**
-	**-**	1835,988	1835,993	**-**	**GlcNac4-Man3-Fuc (Na)**
-	**-**	1866,000	1867,142	**-**	**GlcNac4-Man3-Gal (Na)**
1907,060	**-**	1907,022	1906,010	1907,020	**GlcNac5-Man3**
				1949,992	**GlcNAc4-Man3-GalNac1(4s)**
1956,187	1956,041	1957,022	1957,081	1956,068	**GlcNAc2-Man7 sous méthylé**
-	**-**	**-**	1972,051	**-**	**GlcNac4-Man3-GalNac**
-	**-**	**-**	**-**	1982,090	**GlcNAc3-Man3-Gal1-NeuAc1**
1989,081	1988,055	1988,031	1988,064	1988,056	**GlcNAc2-Man7**
-	**-**	**-**	2000,103	**-**	**GlcNAc3-Man3- GalNac-NeuAc**
-	**-**	2018,081	2019,149	2018,097	**GlcNac4-Man3-Gal-Fuc**
-	**-**	2070,106	2070,135	**-**	**GlcNac4-Man3-Gal2**
2111,141	2111,139	2111,098	2111,208	2110,187	**GlcNAc5-Man3- Gal1**
-	**-**	**-**	2125,185	2127,059	**GlcNac4-Man3-GalNac-Fuc**
-	**-**	**-**	2156,217	**-**	**GlcNAc3-Man3- GalNac-NeuAc-Fuc**
2160,144	2160,117	2161,132	2160,188	2160,105	**GlcNAc2-Man8 sous méthylé**
-	**-**	**-**	2176,173	**-**	**GlcNac4-Man3-GalNac-Gal**
2192,157	2193,176	2193,153	2193,209	2192,169	**GlcNAc2-Man8**

BOUCHATAL Amel | Thèse de doctorat Biologie, Santé| Université de Limoges | 2015

-	2206,118	2206,168	2206,226	2208,157	**GlcNAc4-Man3-Gal1-NeuAc1**
2222,255	2222,179	2222,139	2222,203	2222,220	**GlcNAc4-Man3-Gal2-Fuc (H)**
2244,318	2244,214	2244,173	2244,210	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-Fuc (Na)**
-	-	2274,183	2275,262	-	**GlcNac4-Man3-Gal3**
-	-	-	-	2251,368	**GlcNAc4-Man3-Gal3**
2285,176	2286,207	2285,229	2285,253	2285,363	**(GlcNAc5)-Man3-Gal1-Fuc ou (GlcNAc4-GalNAc1)**
2315,303	2315,224	2315,240	2315,242	2315,209	**GlcNAc5-Man3- Gal2**
2365,278	2365,223	2365,240	2364,262	2365,238	**GlcNAc4-Man3-Gal-Fuc3**
-	-	-	2379,226	-	**GlcNAc4-Man3-Gal1-NeuAc1-Fuc**
-	2381,240	2380,214	2381,288	-	**GalNAc2-Man9 sous méthylé**
2398,245	2397,252	2396,275	2397,389	2397,327	**GalNAc2-Man9**
-	-	-	-	2417,424	**GlcNAc4-Man3-Gal2-Fuc2**
-	-	2426,304	2426,336	2427,186	**GlcNac4-Man3-Gal3-Fuc**
-	-	-	2431,315	-	**GlcNAc4-Man3-(Gal2-NeuAc1)ou(Gal1-NeuGc-Fuc)**
-	-	-	2448,323	-	**GlcNAc4-Man3-Gal3-Fuc**
-	-	-	2456,324	-	**GlcNAc4-Man3-Gal4**
-	-	2458,306	2458,331	-	**GlcNac4-Man3-GalNac2-Fuc**
2489,300	2490,305	2489,340	2489,372	2490,473	**GlcNAc5-Man3- Gal2-fuc**
2506,000	-	-	2504,338	2503,443	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc1-Fuc**
-	2517,348	-	2517,317	2518,385	**GlcNAc4-Man3-GalNac1-Gal1 -NeuAc1**
2519,437	2520,316	2519,322	-	-	**GlcNAc5-Man3- Gal3**
-	2570,422	-	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-Fuc3 (H)**
-	-	-	-	2592,391	**GlcNAc4-Man3-Gal2-Fuc3 (Na)**
-	2605,338	2605,372	2606,413	2606,539	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc1-Fuc**
-	-	-	2620,441	-	**GlcNAc5-Man3- GalNac3**
-	-	-	-	2630,669	**GlcNAc4-Man3-Gal4-Fuc**
-	-	2635,392	2636,439	2635,491	**GlcNAc4-Man3-Gal3-NeuAc1**

-	-	-	-	2649,406	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc1-Fuc**
-	-	-	2653,410	-	**GlcNAc5-Man3-Gal2-NeuAc1**
-	-	-	2663,489	-	**GlcNAc5-Man3-Gal2-Fuc2**
-	-	-	2673,380	-	**GlcNAc4-Man3-GalNac2-Fuc3**
-	-	2693,403	2693,469	-	**GlcNAc5-Man3- Gal3-Fuc**
2723,548	-	2723,401	2721,433	2722,554	**GlcNAc5-Man3- Gal4**
-	-	-	-	2735,358	**GlcNAc6-Man3-Gal2-Fuc**
2753,491	-	-	-	-	**GlcNAc5-Man3-GalNac2-Gal1- fuc**
2763,466	-	2761,430	2761,498	-	**GlcNAc6-Man3- Gal3**
2778,426	-	2777,451	2777,479	2777,541	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc-fuc2**
2794,548	2793,416	2793,439	2793,539	2793,474	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc2**
2810,593	2809,471	2809,450	2810,564	2809,580	**GlcNAc4-Man3-GalNac1-Gal1-NeuAc2**
2822,000	-	2823,480	2824,526	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc-1-NeuGc1**
2927,557	2926,464	-	-	2827,639	**GlcNAc5-Man3- Gal4**
-	-	2837,474	2837,567	-	**GlcNAc5-Man3-Gal2-fuc3**
-	-	2850,482	2850,511	-	**GlcNAc5-Man3-Gal2-NeuAc1-Fuc**
-	-	-	2864,508	-	**GlcNAc6-Man3- GalNac3**
-	-	2876,425	-	-	**GlcNAc5-Man3-Gal4-Fuc**
-	-	-	2880,560	2880,527	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc1(Na)**
-	-	-	-	2897,589	**GlcNAc5-Man3- Gal3-Fuc**
-	-	-	-	2916,768	**GlcNAc6-Man3-Gal1-Fuc**
-	-	-	2923,521	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc1(H-3S)**
-	-	-	-	2927,529	**GlcNAc5-Man3- Gal4**
-	-	-	2952,587	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc1-Fuc3**
2967,578	2967,517	2967,542	2967,581	-	**(GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc2-Fuc)ou(GlcNAc6-Man3- Gal4)**
-	-	2996,605	2996,603	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc1-NeuGc1-Fuc**

-	-	-	3008,658	-	**GlcNAc6-Man3- Gal4-GalNac1**
-	-	-	3024,616	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-GalNac1-NeuAc1-Fuc2**
-	-	3028,729	-	3028,990	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuGc2-Fuc**
-	-	-	3041,638	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-Fuc3**
-	-	-	3048,510	-	**GlcNAc4-Man3-GalNac2-NeuAc2-Fuc**
-	-	3054,569	3054,642	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc-Fuc**
	-	-	-	3069,932	**GlcNAc6-Man3- Gal1-GalNac3**
3084,478	3084,715	3085,615	3083,621	-	**GlcNAc5-Man3-Gal4-NeuAc1**
3130,630	3133,631	-	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc3**
-	-	-	-	3143,062	**GlcNAc6-Man3-Gal4-Fuc(Na)**
-	-	-	-	3193,004	**GlcNAc5-Man3-Gal3-Fuc4**
-	-	-	3241,725	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc2**
3307,912	-	-	-	-	**GlcNAc6-Man3- Gal4-NeuAc1**
-	-	-	3314,838	3312,850	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc2-Fuc3**
-	-	3317,661	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal4-fuc2**
3328,263	-	3331,725	-	3331,733	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc3-Fuc**
3335,713	-	-	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal3-NeuAc3**
-	-	-	-	3386,019	**GlcNAc5-Man3-Gal2-NeuAc2-Fuc2**
-	3423,965	-	-	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc1-NeuGc1-Fuc**
3453,143	-	-	-	3456,514	**GlcNAc5-Man3-Gal5-NeuAc2-Fuc**
-	-	-	-	3468,721	**GlcNAc6-Man3-Gal4-Fuc3**
-	3474,751	-	-	-	**GlcNAc5-Man3-Gal4-NeuAc1-NeuGc1**
	3534,171		3532,884		**GlcNAc6-Man3-(Gal4-NeuGc1-Fuc) ou (Gal5-NeuAc1)**
3577,817	3580,739	-	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal5-NeuAc2-Fuc**
-	-	3603,771	-	-	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuAc3**
3619,590	3619,695	-	3620,875	-	**GlcNAc4-Man3-Gal4-NeuAc1-NeuGc2-Fuc**
-	-	3632,900	-	-	**GlcNAc8-Man3-Gal4-Fuc**

-	3646,468	-	-		**GlcNAc6-Man3-Gal3-GalNac2 -NeuGc1**
-	-	3668,117	-	-	**GlcNAc4-Man3-Gal2-NeuAc4-Fuc**
3675,344	-	-	-	3674,461	**GlcNAc5-Man3-GalNac1-Gal2-NeuAc2-NeuGc1**
3710,438	3712,213	-	-	-	**GlcNAc5-Man3-GalNac2-Gal1-NeuAc2-NeuGc1**
3835,211	-	-	3837,013	-	**GlcNAc5-Man3-Gal4-NeuAc2-NeuGc1**
-	-	-	-	3825,767	**GlcNAc5-Man3-GalNac1-Gal3-NeuAc3 (H)**
-	-	-	-	3844,649	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuGc3-Fuc (H)**
-	3849,061	-	-	-	**GlcNAc7-Man3-GalNac1-Gal4-NeuGc1**
-	-	3866,099	3867,291	3865,920	**GlcNAc5-Man3-Gal3-NeuGc3-Fuc**
-	3876,036	-	-	3875,665	**GlcNAc6-Man3-GalNac1-Gal2-Fuc2**
-	3897,392	-	-	3896,013	**GlcNAc6-Man3-GalNac1-Gal2-NeuAc2-NeuGc1**
-	-	-	-	3937,357	**GlcNAc6-Man3-Gal8-Fuc(H)**

Résumé :

Le développement du muscle squelettique est un processus complexe très finement régulé, qui inclus des étapes de prolifération de cellules progénitrices appelées myoblastes et des étapes de différenciation pour former des myotubes multi nucléés. La glycosylation est la principale modification post-traductionnelle des protéines. Son rôle dans divers processus biologiques et pathologiques est largement documenté, mais les mécanismes intimes de son implication lors du processus myogénique restent mal élucidés. Nous avons pris comme modèle cellulaire la lignée myoblastique C2C12 car elle est capable de mimer *in vitro* les étapes de prolifération et de différenciation de la cellule musculaire. En utilisant différentes lectines, nous montrons un changement de la sialylation périphérique en α2-6 des glycoconjugués de surface de la cellule C2C12 durant la différenciation myoblastique. En complément, nous avons analysé les *N*-glycannes des glycoprotéines par spectrométrie de masse et mesuré les niveaux d'expression des gènes des α2-6 sialyl-transférases et neuraminidases. Tous les résultats obtenus confirment bien que la différenciation des cellules C2C12 est accompagnée d'une diminution du taux de sialylation des glycoconjugués. Pour mieux comprendre l'implication de la sialylation en α2-6 dans la myogenèse, nous avons réalisé une étude fonctionnelle sur des cellules C2C12 qui sous-expriment *St6gal1* du fait de l'introduction d'un shRNA spécifique. Les clones obtenus présentent de plus forts index de fusion et génèrent un plus grand nombre de myotubes qui, de surcroit, sont de grande taille. Ce phénotype est probablement dû à un engagement accru des cellules de réserve en différenciation. En effet, les clones sous-exprimant *St6gal1* contiennent une plus petite proportion de cellules *Pax7+*, c'est-à-dire de cellules de réserve maintenues dans un état de quiescence.
Ainsi, nos résultats montrent l'importante implication de la sialylation périphérique en α2-6 au cours de la différenciation myogénique.

Mots clés : [myogenèse, glycosylation périphérique, sialylation, C2C12, St6gal1].

Abstract:

Skeletal muscle development is a complex process highly regulated and which includes proliferation then differentiation of progenitor cells or myoblasts into multi-nucleated myotubes. Glycosylation is the main post-translational modification of proteins. Its role in various biological and pathological processes is well documented, but the precise mechanisms of its involvement during myogenesis are still poorly understood.
We have used the C2C12 myoblast as a model cell line since it is able to mimic *in vitro* the steps of muscle cell proliferation and differentiation. Using different lectins we showed a change in the peripheral α2-6 sialylation of the cell surface glycoconjugates, during C2C12 differentiation. Besides, we also analyzed by mass spectrometry the *N*-glycans carried by glycoproteins and measured the expression levels of α2-6 sialyl-transferases and neuraminidases genes. All the results confirm that C2C12 differentiation is accompanied by a decrease of glycoconjugates sialylation. To highlight the involvement of α2-6 sialylation in myogenesis, we performed a functional study of C2C12 cells knockdown for *St6gal1* by a specific shRNA. The generated clones exhibit a higher fusion index and generate more elongated myotubes. This phenotype probably results from an increased commitment of reserve cell in differentiation. Indeed, the clones knockdown for *St6gal1* contain a lower proportion of *Pax7+* cells, i.e. of reserve cells maintained in a quiescent state.
Thus, our results show the significant involvement of the peripheral α2-6 sialylation during myogenic differentiation.

Keywords: [myogenesis, peripheral glycosylation, sialylation, C2C12 cell line, St6gal1].