HAL
open science

Identification et analyse fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la myogénèse chez la drosophile : et mise en évidence d'une transition métabolique nécessaire à la différenciation musculaire

Vanessa Tixier

To cite this version:

Vanessa Tixier. Identification et analyse fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la myogénèse chez la drosophile : et mise en évidence d'une transition métabolique nécessaire à la différenciation musculaire. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM19 . tel-02073617

HAL Id: tel-02073617

https://theses.hal.science/tel-02073617

Submitted on 20 Mar 2019

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2011

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° d'ordre :

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Génétique du développement

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2011 par

Vanessa TIXIER

Identification et analyse fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la myogenèse chez la Drosophile

et mise en évidence d'une transition métabolique nécessaire à la différenciation musculaire

---

JURY

M. Laurent PERRIN	Rapporteur
M. Laurent SCHAEFFER	Rapporteur
M. Stefano SCHIAFFINO	Rapporteur
M. Vincent SAPIN	Examinateur
M. Krzysztof JAGLA	Directeur de thèse

UMR Génétique, Reproduction et Développement
CNRS 6247-INSERM U931
Clermont Université

Résumé

Il existe de nombreuses similitudes au niveau des mécanismes génétiques et moléculaires qui contrôlent les différentes étapes de la myogenèse entre la Drosophile et les vertébrés. Afin de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans ce processus, nous avons sélectionné des gènes conservés au cours de l'évolution afin de tester leur rôle dans la myogenèse.

Des gènes candidats conservés entre le poisson zèbre et la Drosophile et exprimés dans des compartiments musculaires ont été sélectionnés *in silico* à partir des bases de données du poisson-zèbre (Zfin) et de la Drosophile (BDGP). Ainsi, 120 gènes ont été mis en évidence, dont plus de la moitié jouerait un rôle dans le métabolisme et sur les 23 testés par ARNi, 20 donnent des phénotypes musculaires suite à la diminution de leur expression. Les défauts musculaires observés ont permis de replacer le rôle putatif de ces 20 gènes dans le processus myogénique, montrant l'efficacité de cette approche.

L'analyse fonctionnelle du gène *Pglym78* impliqué dans la glycolyse a ensuite été réalisée. Ce gène est exprimé spécifiquement dans les muscles somatiques et son atténuation donne des défauts de différenciation musculaire caractérisés par un blocage de la fusion des myoblastes et la formation de muscles plus fins. L'ensemble des autres gènes de la glycolyse s'exprime de la même façon et leur inhibition donne aussi des problèmes de différenciation. Ainsi, il existerait au moment de la différenciation musculaire un switch métabolique se traduisant par une augmentation de la glycolyse, similaire à celui mise en évidence dans les cellules cancéreuses, pouvant contribuer à former l'ATP ainsi que les molécules nécessaires pour la synthèse des protéines, le tout permettant la croissance musculaire. Enfin, l'inhibition de la voie insuline, connue pour stimuler la glycolyse mais également la croissance musculaire, diminue l'activité glycolytique et donne des phénotypes similaires à ceux observés lorsque l'on bloque la glycolyse. Nos résultats mettent en évidence l'existence d'un switch métabolique vers la glycolyse, médié au moins en partie par la voie insuline afin de permettre l'augmentation de la synthèse de biomasse dans le muscle, nécessaire à la poursuite de sa différenciation. Ce travail révèle ainsi l'existence d'un lien entre le métabolisme et le développement musculaires.

Abstract

A large number of genes involved in myogenesis has been described, but several gaps in comprehension of mechanisms giving rise to functional muscles are still remaining. To fill in theses gaps we selected conserved uncharacterized genes expressed in muscular compartments in *Drosophila* and zebrafish and test their functions by RNAi knockdown. We found that most of the candidate genes have a role in different steps of embryonic myogenesis in *Drosophila* and interestingly more than a half of them are involved in metabolism.

One of these candidates, *Pglym78,* encodes a glycolytic enzyme and gives rise to late muscle differentiation defects after knockdown in *Drosophila*. Glycolysis is a major metabolic process providing energy and components for biomass synthesis to rapidly growing/proliferating cells such as cancer cells but its role in embryonic development remains unknown. Here we show that starting from midembryogenesis *Drosophila Pglym78* and almost all the glycolytic genes display muscle specific expression and that, consistent with this, an important increase in glycolytic activity appears since embryonic stage 14, suggesting that glycolysis can play a role in late steps of myogenesis. This possibility is supported by the fact that attenuation of *Pglym78* and other glycolytic genes results in affected muscle differentiation. As shown in *Pglm78* knockdown embryos these phenotypes are due to myoblasts fusion arrest and formation of significantly smaller muscle fibres. In order to understand how glycolysis controls myogenesis, we analysed the insulin pathway known to control glycolytic activity and to positively regulate muscle growth by stimulating protein synthesis. Interestingly, inhibition of insulin pathway in differentiating embryonic *Drosophila* muscles leads to the reduced activity of PyK and to phenotypes that are reminiscent of those of glycolytic genes such as fusion arrest and formation of smaller fibres. Thus, our data reveal that metabolic switch to glycolysis positively regulated by insulin pathway is required to support increased biomass synthesis in syncytial muscle cells revealing direct link between metabolism and development.

TABLE DES ILLUSTRATIONS **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **3**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

I. LA MYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LA DROSOPHILE **5**
I.1. GENERALITES 5
I.2. LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE 5
I.2.1. Étapes précoces 6
Détermination du mésoderme 6
Migration du mésoderme 6
Subdivision du mésoderme 7
I.2.2. Étapes intermédiaires 8
Formation des clusters promusculaires 8
Détermination des myoblastes 9
I.2.3. Étapes tardives 11
La fusion des myoblastes 11
Attachement des myotubes à l'épiderme 14
Innervation des myotubes 16
Formation de l'appareil contractile 18
I.3. FACTEURS DE DETERMINATION MYOGENIQUE ET DE DIFFERENCIATION MUSCULAIRE 21
I.4. LA MYOGENESE ADULTE 22
I.4.1. Les cellules précurseur des muscles adultes 23
I.4.2. Les muscles adultes 23
Les muscles thoraciques 23
Les muscles appendiculaires 24
Les muscles abdominaux 24
I.4.3. Formation des muscles adultes 24
Formation de novo 24
Formation à partir de la trame de muscles larvaires 25
I.5. ANALYSES A GRANDE ECHELLE 25
I.5.1. Description des outils génétiques utilisés 25
I.5.2. Cribles génétiques dans la myogenèse 27
II. LA MYOGENESE SQUELETTIQUE CHEZ LES VERTEBRES **30**
II.1. SOMITOGENESE ET FORMATION DU MYOTOME 30
II.1.1. L'origine des muscles squelettiques : les somites 30
II.1.2. Formation du myotome 32
II.2. SPECIFICATION DES PROGENITEURS MUSCULAIRES 34
II.3. FORMATION DES MYOTUBES ET ACQUISITION DE L'IDENTITE MUSCULAIRE 35
II.3.1. Fusion 35
II.3.2. Acquisition de l'identité musculaire 38
II.3.3. Attachement, innervation et formation de l'appareil contractile 39
Attachement 39
Formation de l'appareil contractile 40
Innervation 40
II.4. LES CELLULES SATELLITES 41
II.5. FACTEURS DE DETERMINATION MYOGENIQUE ET DE DIFFERENCIATION MUSCULAIRE 42
III. METABOLISME ET DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE **45**
III.1. DIVERSITE DES FIBRES MUSCULAIRES 45
III.2. LE METABOLISME MUSCULAIRE 47
III.2.1. Plasticité musculaire 47

III.2.2. Régulation du métabolisme musculaire 47
Métabolisme énergétique.....47
Contrôle de la masse musculaire 49

PROJET DE THESE 55

RESULTATS 58

I. RECHERCHE DE NOUVEAUX GENES IMPLIQUES DANS LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE PAR CRIBLE RNAI 58
I.1. SELECTION DES GENES CANDIDATS PAR UNE APPROCHE *IN SILICO* 58
I.2. ANALYSE FONCTIONNELLE DES GENES CANDIDATS PAR ARN INTERFERENCE 59
I.2.1. Synthèse des ARN double brin 60
I.2.2. Injection des ARNdb 60
Principe.....60
Injections contrôle 61
Effet de l'atténuation d'expression des gènes candidats 61
I.3. ÉTABLISSEMENT DES PROFILS D'EXPRESSION 64
II. ANALYSE FONCTIONELLE DE *PGLYM78* ET MISE EN EVIDENCE D'UNE TRANSITION METABOLIQUE NECESSAIRE POUR LA POURSUITE DE LA MYOGENESE 65
II.1. PRESENTATION DE L'ARTICLE.....65
II.2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 69
II.2.1. Résultats non publiés sur le rôle de Pglym78 au cours de la myogenèse embryonnaire 69
II.2.2. Rôle de Pglym78 au cours de la myogenèse adulte 70
II.2.3. Régulation de la voie Notch par la glycolyse.....71
II.2.4. Rôle de Pglym78 chez le nématode.....72
III. ANALYSES FONCTIONELLES D'AUTRES GENES « MUSCLE-SPECIFIQUES » AU COURS DE LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE.....74
III.1. ANALYSE FONCTIONNELLE DE *NAP1*.....74
III.2. ANALYSES FONCTIONNELLES DE CA-P60A, ARGK ET WUPA.....76
III.2.1. Chez la Drosophile.....76
III.2.2. Chez les autres espèces 78

DISCUSSION.....82

I. SELECTION DE GENES CONSERVES ET ANALYSE DE LEUR ROLE MYOGENIQUE PAR ARNI 82
Résultats du crible génétique.....82
Avantages et limites de la technique d'injection d'ARN double brins 83
II. *CA-P60A, ARGK, WUPA* ET *NAP1*, NOUVEAUX GENES CONSERVES IMPLIQUES DANS LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE 84
III. MISE EN EVIDENCE D'UNE TRANSITION METABOLIQUE PERMETTANT LA POURSUITE DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE.....86
Switch métabolique et effet Warburg.....86
Régulation par la voie insuline 89
Conservation du switch métabolique chez les vertébrés 90
Rôle de la transition métabolique dans la production d'ATP.....91
Métabolisme musculaire avant la transition métabolique et cas des autres cellules 91
Mise en place du « switch » 92
Régulation de la fusion 95

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 98

Concernant le crible 98
Contribution de la glycolyse au développement musculaire 98
Le blocage de la fusion est-il fibre autonome ? 99
Lien entre l'activité glycolytique et la taille des muscles 99
Induction du « switch » muscle-dépendante ? 100
Induction du switch par la voie insuline 100
Lien entre la glycolyse et les ERR 101
Régulation de la transition métabolique par les facteurs induits par l'hypoxie 101

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 103

ANNEXE 1 : 113

ANNEXE 2 : RESULTATS OBTENUS CHEZ LE POULET 114

ANNEXE 3 : RESULTATS OBTENUS CHEZ L'ASCIDIE 115

ANNEXE 4 : RESULTATS OBTENUS CHEZ LE NEMATODE 117

ANNEXE 5 : REVUE 120

Table des illustrations

Figure 1: Développement des muscles somatiques chez la Drosophile
Figure 2 : Structure des muscles embryonnaires de la Drosophile
Figure 3 : Les grandes étapes du processus myogénique
Figure 4 : Détermination et migration du mésoderme
Figure 5 : Subdivision du mésoderme
Figure 6 : Formation des clusters promusculaires et détermination des myoblastes
Figure 7 : Expression des gènes d'identité dans les muscles embryonnaires
Figure 8 : Différentes étapes de fusion des myoblastes
Figure 9 : Rôles des différentes protéines dans la fusion
Figure 10 : Attachement des myotubes à l'épiderme
Figure 11 : Origine des différents motoneurones innervant les muscles larvaires
Figure 12 : Structure des sarcomères
Figure 13 : Modèle de myofibrillogenèse chez la Drosophile
Figure 14 : Rôle de Twist dans la subdivision du mésoderme
Figure 15 : Structure des muscles adultes de la Drosophile
Figure 16 : Les cellules précurseur des muscles adultes (AMPs)
Figure 17 : Formation des muscles adultes de novo et à partir de la trame de muscles larvaires
Figure 18 : Le système UAS-Gal4
Figure 19 : Origine et formation des somites chez les vertébrés
Figure 20 : Comparaison entre la subdivision des somites chez les vertébrés et celle du mésoderme de la Drosophile
Figure 21 : Formation du myotome
Figure 22 : Etapes de la formation des muscles au cours de la myogenèse prénatale chez la souris
Figure 23 : Les cellules satellites des vertébrés
Figure 24 : Principales sources d'ATP musculaire
Figure 25 : Régulation de la croissance musculaire par la voie insuline chez les vertébrés
Figure 26 : Conservation la voie insuline chez la Drosophile
Figure 27 : Stratégie de sélection des gènes candidats
Figure 28 : Evolution du nombre de gènes candidats sélectionnés selon les mises à jour des bases de données
Figure 29 : Classification des gènes candidats
Figure 30 : Evaluation de la spécificité des ARNdb vis-à-vis des gènes candidats grâce au site E-RNAi
Figure 31 : Stratégie d'analyse des gènes candidats par injection d'ARNdb
Figure 32 : Phénotypes observés suite à l'injection des ARNdb ciblant les gènes candidats
Figure 33 : Expression muscle spécifique des gènes Ca-P60A, ArgK, WupA, Nap1 et Pglym78 chez la Drosophile et de leurs orthologues chez le poisson zèbre F
Figure 34 : Phénotypes musculaires observés suite au gain de fonction de Pglym78
Figure 35 : Rôle de Pglym78 au cours de la myogenèse adulte chez la Drosophile
Figure 36 : Phénotypes musculaires observés suite à l'activation de la voie Notch dans les cellules musculaires
Figure 37 : Interaction entre la voie Notch et la glycolyse dans les cellules musculaires
Figure 38 : Profil d'expression de Nap1 et phénotypes musculaires obtenus après inhibition de son expression embryonnaire chez la Drosophile
Figure 39 : Implication de Nap1 dans la formation des muscles de vol chez la Drosophile

Figure 40 : Rôle de Ca-P60A au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile
Figure 41 : Rôle de ArgK au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile
Figure 42 : Localisation de la troponine I au sein du complexe troponine-tropomyosine associé aux filaments fins d'actine
Figure 43 : Rôle de WupA au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile
Figure 44 : Détournements métaboliques observés au cours de l'effet Warburg
Figure 45 : Modèle suggérant l'existence d'un senseur métabolique musculaire permettant la poursuite de la différenciation
Figure 1' : Expression des orthologues de Ca-P60A, WupA et ArgK chez l'embryon de poulet au stade 22
Figure 2' : L'ascidie comme système modèle pour étudier l'évolution des gènes dans la myogenèse
Figure 3' : Profils d'expression des orthologues de Ca-P60A, WupA et ArgK chez l'ascidie
Figure 4' : Mode d'action des morpholinos utilisés pour inhiber l'expression des orhtologues de Ca-P60A, WupA et ArgK chez l'ascidie
Figure 5' : Structure des muscles du corps chez Caenorhabditis elegans
Figure 6' : Analyses fonctionnelles des orthologues de Nap1 (D2096.8), Ca-P60A, (sca-1) WupA (tni-1) et ArgK (ZC434.8) chez Caenorhabditis elegans

Tableau 1 : Principales protéines impliquées dans la fusion des myoblastes chez la Drosophile et leurs orthologues vertébrés
Tableau 2 : Conservation des gènes Ca-P60A, ArgK,et WupA chez le poulet, l'ascidie et le nématode

Liste des abréviations

ADN Acide Déoxy-ribonucléique
ADNc ADN complémentaire
AEL After egg laying
AMP Adult Muscle Precursor cell
AMPc Adénosine Mono-Phosphate cyclique
ARN Acide ribonucléique
ARNdb ARN double brin
ARNi ARN interference
ARNm ARN messager
ATP Adenosine Triphosphate
bHLH basic Helix-Loop-Helix
BMP Bone Morphogenetic Proteins
CamK Calcium calmodulin dependant protein kinase
CBP CRE Binding Protein
DA1 Dorsal Acute 1
DFM Direct Flight Muscle
Dilp Drosophila insulin like protein
DVM DorsoVentral Muscle
FGF Fibroblasts growth factor
GADPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT4 Glucose transporter 4
GSK3 glycogène synthase kinase 3
H2A/H2B Histone 2A/2B
HAT Histone AcetylTransferase
HDAC Histone deacetylase
HIF Hypoxia inducible factor
IFM Indirect flight Muscle
IGF-1 Insulin-like growth factor 1
IPC Insulin Producing Cells
IRS Insulin Receptor Substrate
KO Knock Out
LDH Lactate deshydrogenase
LT Lateral Transverse
MAFbx Muscle Atrophy F-box
MAPK Mitogen-activated protein kinase
MEF2 Myocyte enhancer factor 2
MHC Myosine Heavy chain
MRF Myogenic Regulatory Factors
Nap Nucleosome Assembly Protein
TOR target of rapamycin
MET Microscopie Electronique en Transmission
MuRF Muscle Ring Finger
Myf5 Myogenic factor 5
MyoD myoblast determination protein 1/myogenic differentiation 1
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKA Protéine Kinase AMPc-Dépendante
PKB Protéine Kinase B
PKC Protéine Kinase C
PSM post somitic mesoderm
SBM Segmental Border Muscle
Shh Sonic Hedgehog
TOR Taget Of Rapamycin
UAS Upstream Activated Sequence
UPS Ubiquitin-proteasome system
Wnt Wint

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

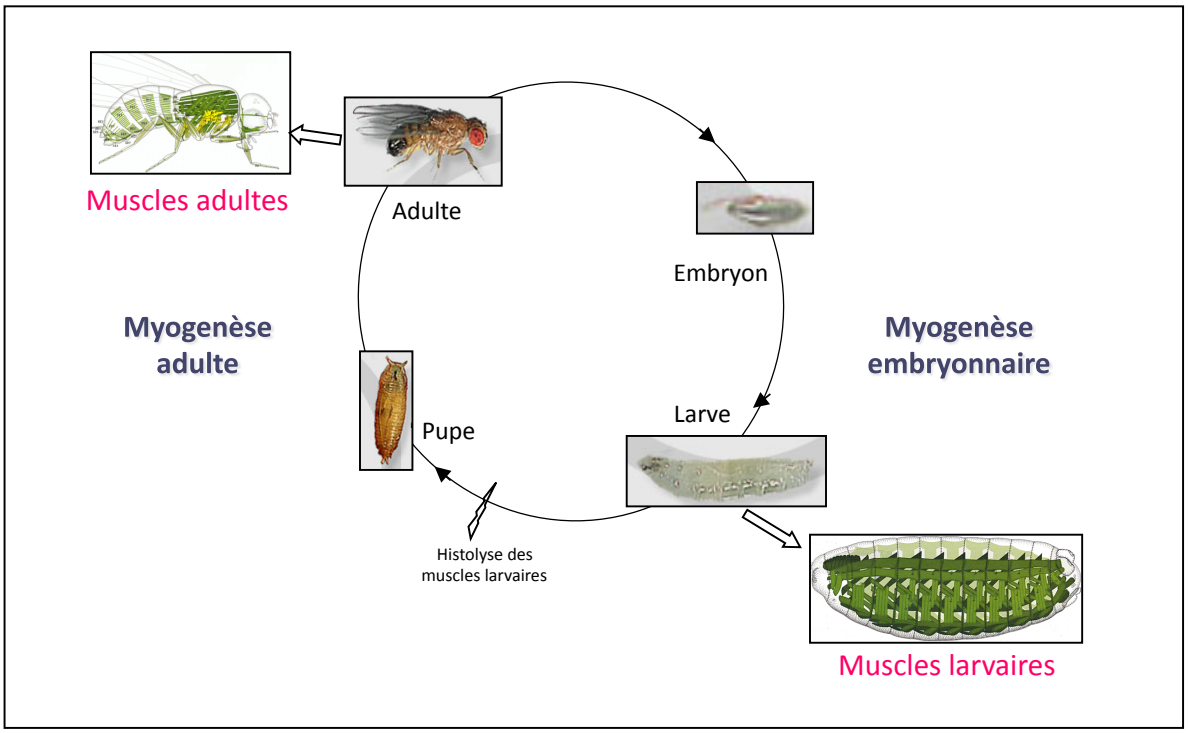


Figure 1: Développement des muscles somatiques chez la Drosophile

Les muscles se forment en deux vagues successives de myogenèse. La première, au cours de l'embryogenèse permet la formation des muscles larvaires et la deuxième aboutit au développement des muscles de la mouche adulte

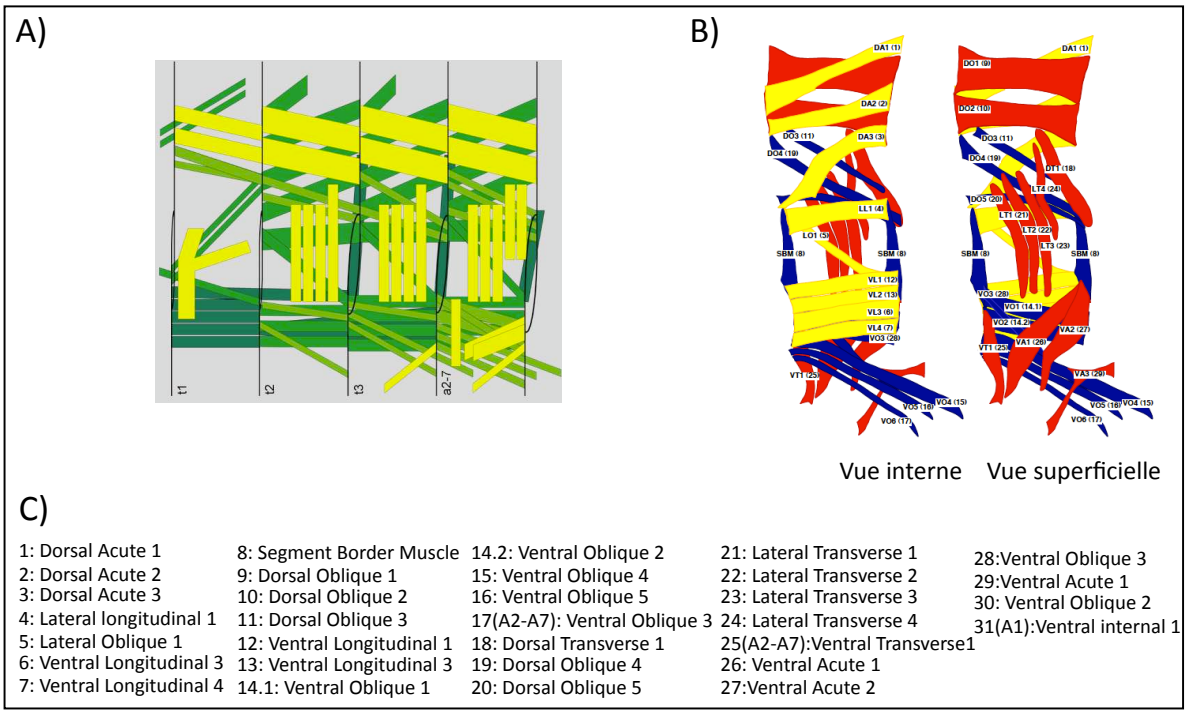


Figure 2 : Structure des muscles embryonnaires de la Drosophile

A) Représentation schématique du patron musculaire en fonction des segments thoraciques (T1, T2, T3) et abdominaux (A2 à A7)

B) Représentation schématique et C) nomenclature du patron musculaire somatique dans un segment abdominal

D'après Flymove et Ruiz-Gomez *et al.*, 1997

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA MYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LA DROSOPHILE

I.1. Généralités

La myogenèse est le processus par lequel l'ensemble de la musculature d'un organisme est généré. Quel que soit le type de muscles, ils trouvent leur origine dans le mésoderme. Chez la Drosophile, les muscles somatiques sont l'équivalent des muscles squelettiques des vertébrés. Ils se forment en deux phases au cours de la vie de la mouche: une première phase, embryonnaire, permet la mise en place des muscles larvaires. La deuxième phase faite suite à l'histolyse de la majorité des muscles larvaires au cours de la métamorphose et aboutit à la formation des muscles adultes **(Fig. 1)**.

I.2. La myogenèse embryonnaire

Les muscles larvaires qui sont produits au cours de l'embryogenèse assurent la locomotion de la larve. Ils sont chacun constitués d'une seule fibre musculaire multinucléée (fibre syncitiale), contrairement aux muscles squelettiques des vertébrés qui sont multifibrillaires. L'embryon de Drosophile présente une structure segmentée et chaque hémisegment comprend jusqu'à une trentaine de muscles différents organisés de manière stéréotypée, les segments abdominaux A2 à A7 présentant un patron musculaire similaire (Bate, 1990) **(Fig. 2)**. Chacun de ces muscles est identifiable par sa taille, sa position et son orientation selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral, le nombre de noyaux qu'il possède, ses sites d'attachement à l'épiderme et son innervation (Bate and Rushton, 1993). Pour une meilleure adéquation avec les résultats que nous avons obtenus suite au crible par ARN interférence, j'ai choisi de présenter le processus de myogenèse embryonnaire en trois parties qui regroupent les étapes selon la chronologie des évènements, à savoir les étapes précoces, intermédiaires et tardives de la myogenèse embryonnaire
(Fig. 3).

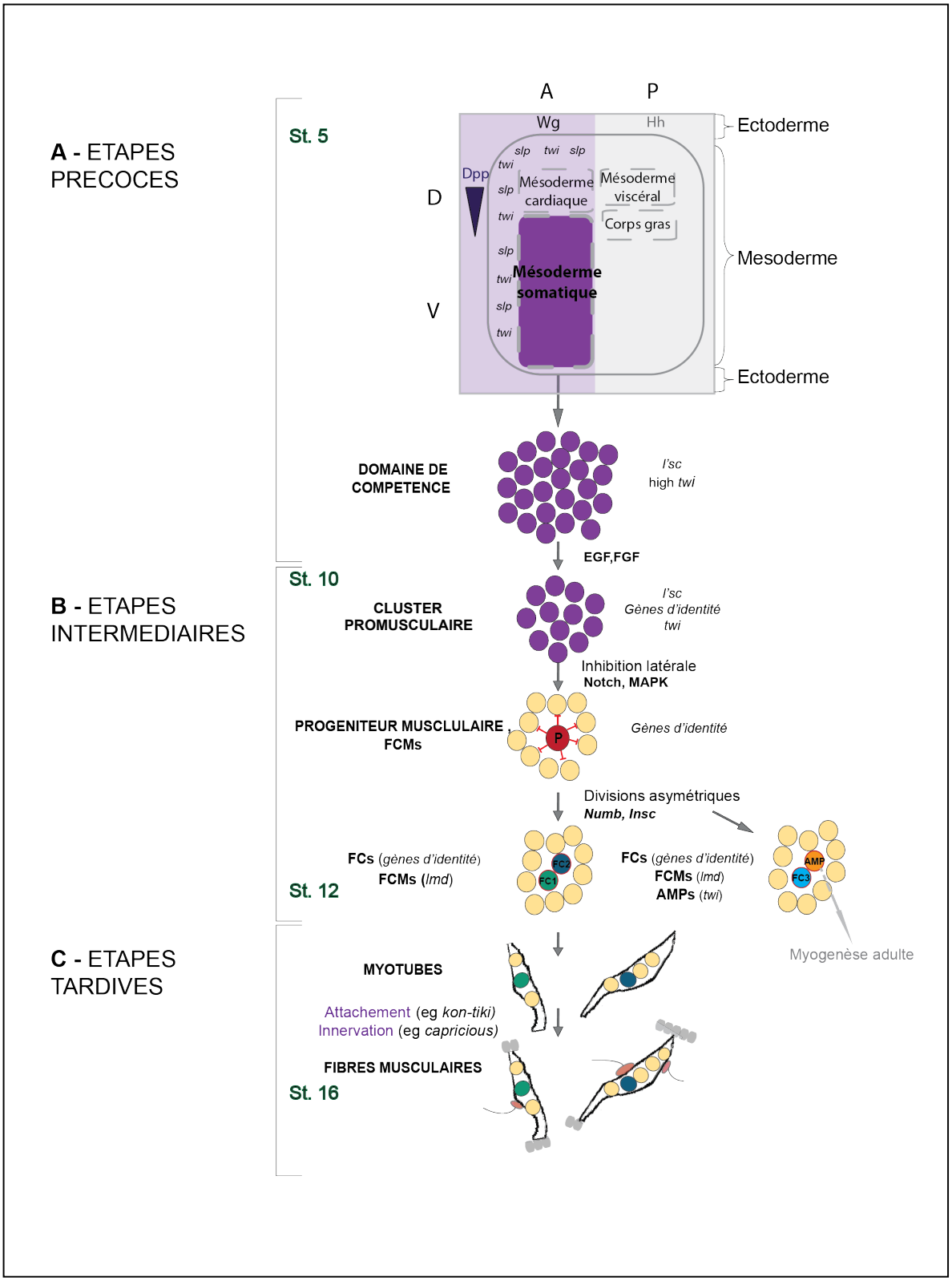


Figure 3 : Les grandes étapes du processus myogénique

La myogenèse embryonnaire peut être décomposée en trois temps regroupant les étapes précoces A), les étapes intermédiaires B) et les étapes tardives C)

D'après Tixier *et al.*, 2010

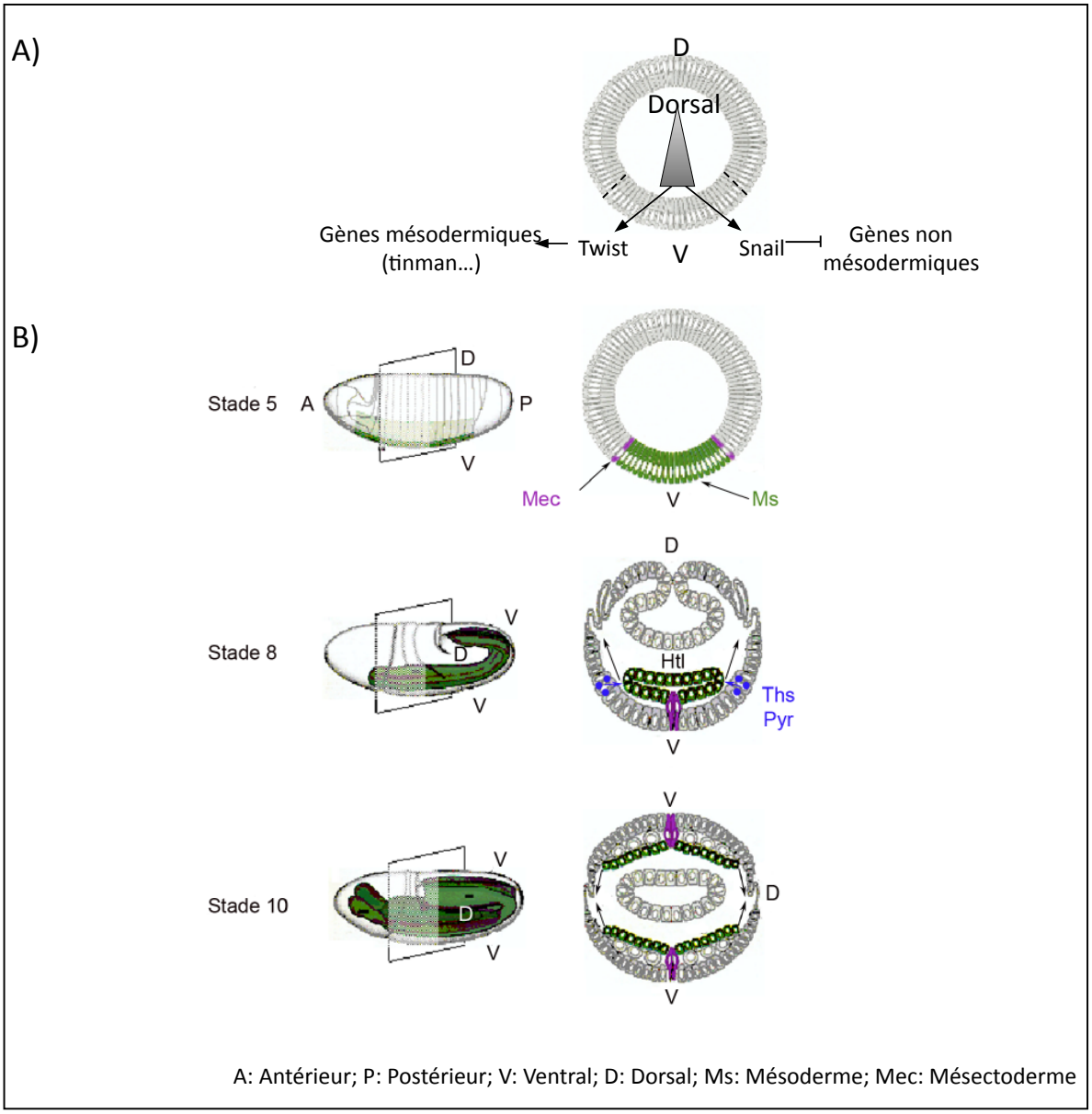


Figure 4 : Détermination et migration du mésoderme

A) Le mésoderme est déterminé en ventral par une forte concentration de protéine Dorsal qui active Twist et Snail. Twi active l'expression de gènes impliqués dans le programme myogénique alors que Snail réprime l'expression des gènes non mésodermiques

B) Une fois déterminé, le mésoderme s'invagine à l'intérieur de la cavité embryonnaire. Les ligands, Thisbee (Ths) et Pyramus (Pyr) exprimés au niveau du neuroectoderme se fixent sur le récepteur Heartless (Htl) exprimé au niveau des cellules mésodermiques, ce qui induit leur migration vers la partie dorsale

D'après V. Hartenstein, 1993, Atlas of Drosophila development

I.2.1. Étapes précoces

Bien que nous nous intéressons à la formation des muscles somatiques de la Drosophile, les muscles viscéraux, cardiaques et le corps gras (analogue fonctionnel du foie des vertébrés) dérivent également du mésoderme. La première étape à l'origine du développement des fibres musculaires est donc la formation du mésoderme. Parmi les évènements précoces, on trouve ainsi la spécification des cellules mésodermiques, la migration et la subdivision du mésoderme au sein de chaque segment, selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Détermination du mésoderme

Le mésoderme est un feuillet embryonnaire formé pendant l'embryogenèse précoce, au cours de la gastrulation. Il est déterminé en position ventrale de l'embryon au stade blastoderme par une forte concentration de la protéine Dorsal qui induit l'expression des facteurs de transcription Twist (Twi) et Snail (Sna) (Ip et al., 1992; Thisse et al., 1991). Twi active l 'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le programme myogénique (Sandmann et al., 2007). Parmi eux on trouve le gène *tinman* (*tin)* qui permet le développement du mésoderme somatique dorsal et des dérivés viscéraux et cardiaques (Azpiazu and Frasch, 1993). Sna a pour fonction de limiter l'extension des territoires voisins tels que le neurectoderme, en réprimant l'expression des gènes qui contrôlent leur développement (Leptin, 1991). L'action combinée de ces deux facteurs de transcription permet de déterminer précisément la région ventrale de l'embryon qui adoptera une identité mésodermique **(Fig. 4A)**.

Migration du mésoderme

Une fois déterminées, et en parallèle de l'élongation de la bande germinale, les cellules mésodermiques s'invaginent et migrent dorsalement jusqu'à former une monocouche sous-jacente à l'épiderme (Leptin and Grunewald, 1990). Ce processus est sous la dépendance de l'expression du récepteur de la famille FGF Heartless (Htl) au niveau du mésoderme et de ses ligands Thisbee (Ths) et Pyramus (Pyr) au niveau du neurectoderme **(Fig. 4B)**(Shishido et al., 1997; Stathopoulos et al., 2004). La migration des cellules mésodermiques nécessite qu'elles effectuent une transition

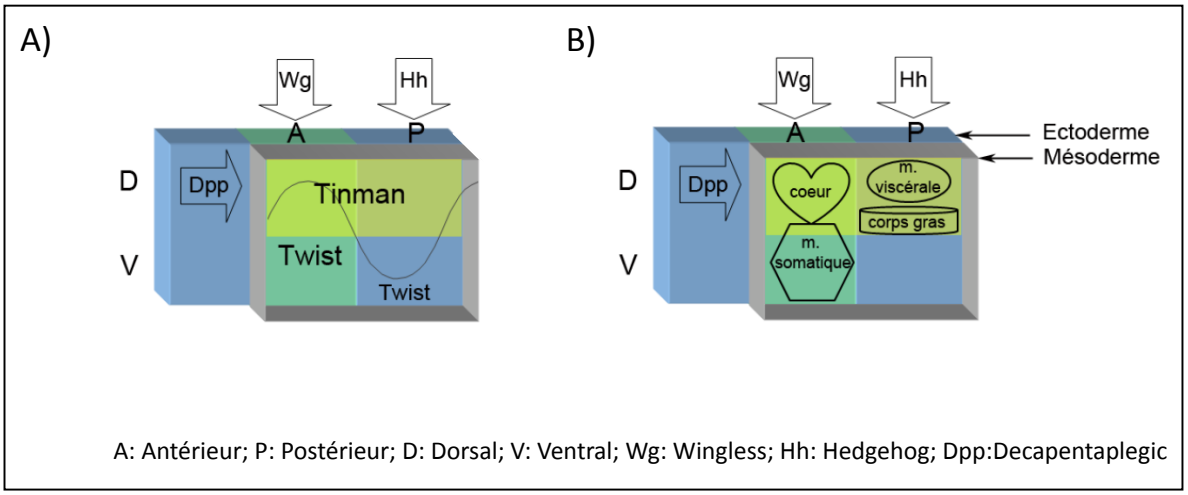


Figure 5 : Subdivision du mésoderme

A) Les signaux ectodermiques Wg, Hh et Dpp permettent la subdivision du mésoderme suivant les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. La subdivision suivant l'axe antéro-postérieur s'effectue par la modulation de l'expression de *twist* et de *tinman*

B) La forte expression de *twist* en antérieur permet la formation du coeur et de la musculature somatique dorsale. La faible expression de *twist* en postérieur favorise le développement de la musculature viscérale et du corps gras.

épithélio-mésenchymateuse (Oda et al., 1998; Smallhorn et al., 2004), accompagnée de changements de formes et d'une prolifération importante (Leptin and Grunewald, 1990).

Subdivision du mésoderme

Suite à sa migration, le mésoderme est subdivisé dans chaque segment en quatre domaines principaux selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Cette régionalisation est sous l'influence de signaux d'origine ectodermique et de gènes sélecteurs mésodermiques et correspond à la spécification des différents dérivés mésodermiques qui donneront les muscles viscéraux, somatiques, cardiaques et le corps gras **(Fig. 3A et Fig.5)**.

La limite antéropostérieure de chaque segment est déterminée par les signaux Wingless (Wg) (en antérieur) et Hedgehog (Hh) (en postérieur) provenant de l'ectoderme. Hh induit l'expression de *even-skipped* (*eve*), et des facteurs de transcription Bagpipe (Bap) et Serpent (Srp), spécifiant respectivement la musculature viscérale et le corps gras (Azpiazu and Frasch, 1993; Azpiazu et al., 1996). On trouve un faible niveau de Twist en postérieur.

En antérieur, Wg induit l'expression du gène *sloppy-paired (slp)* qui réprime l'expression de *bap* et de *srp* (Azpiazu et al., 1996) et permet de maintenir un niveau élevé de Twist (Lee and Frasch, 2000) favorisant la formation de la musculature somatique et cardiaque, au détriment des dérivés viscéraux et du corps gras. Ainsi, Twi, dont l'expression est d'abord uniforme dans tout le mésoderme, voit ses niveaux modulés dans chaque segment selon l'axe antéro-postérieur, permettant la détermination de régions spécifiques correspondant à des dérivés mésodermiques particuliers (voir paragraphe I.3).

La subdivision dorso-ventrale du mésoderme dans un segment est dépendante de l'expression du facteur ectodermique Decapentaplegic (Dpp) (Frasch, 1995). Dpp est sécrété uniquement par la partie dorsale de l'ectoderme et permet de maintenir l'expression de *tin* (activée initialement et de manière uniforme dans tout le mésoderme par Twi) dans le mésoderme dorsal, déterminant la formation du muscle cardiaque et des muscles somatiques dorsaux (Azpiazu and Frasch, 1993). À l'inverse, la partie ventrale, qui n'est pas sous l'influence de Dpp exprime les facteurs

de transcription Pox meso et D-six4 qui sont impliqués dans la détermination de certains muscles ventraux, latéraux et du corps gras (Clark et al., 2006; Duan et al., 2007).

À la fin de la subdivision du mésoderme, chacun des quatre territoires spécifiés exprime des facteurs de transcription responsables de la détermination d'un type de dérivé mésodermique. Ainsi, le mésoderme viscéral et le mésoderme du corps gras se forment dans le territoire d'expression d'*Eve* et *Tin* (sous l'influence de Hh et de Dpp respectivement). Le mésoderme du coeur et le mésoderme somatique dorsal sont définis dans le territoire d'expression de *Slp* et de *Tin* (sous l'influence de Wg et de Dpp). Enfin, le mésoderme somatique ventral est déterminé dans le territoire d'expression de *Slp* et de *Pox meso* (cellules sous l'influence de Wg).

I.2.2. Étapes intermédiaires

Les étapes que nous qualifions ici d' « intermédiaires » correspondent aux processus aboutissant à la spécification des différents myoblastes, dérivant du mésoderme somatique et qui formeront, lors des étapes tardives, les muscles somatiques. Chez la Drosophile comme chez les vertébrés, les fibres musculaires sont multinucléées et se forment par un processus de fusion asymétrique entre deux types de myoblastes à savoir une cellule fondatrice (FC) et plusieurs myoblastes compétents à la fusion (FCM) (Bate, 1990). Nous allons donc voir les différentes étapes qui aboutissent à la formation des FC et des FCM.

Formation des clusters promusculaires

Bien qu'acquérant des identités différentes par la suite, FC et FCM sont au départ issus d'un groupe de cellules équivalentes qui expriment le gène proneural *lethal of scute (l'sc)*. Ce sont les signaux Wg et Dpp qui permettent l'expression de *l'sc* et donc la détermination de ces domaines de compétence (Carmena et al., 1995). Par la suite, l'activation de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) *via* les récepteurs FGF (Fibroblast Growth Factor) et EGF (Epidermal Growth Factor) permet de restreindre l'expression de *l'sc* à certaines cellules, formant les clusters

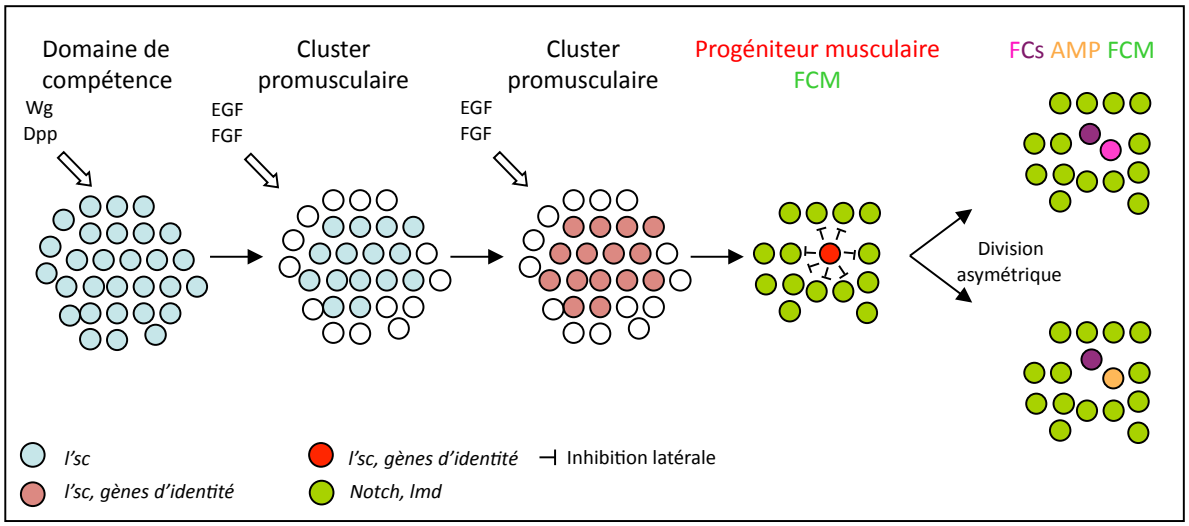


Figure 6 : Formation des clusters promusculaires et détermination des myoblastes

Sous l'influence de Wg et Dpp, il y a formation des domaines de compétence exprimant l'sc. La voie MAPK permet ensuite de restreindre l'expression de *l'sc* dans les cellules du cluster promusculaire et d'induire celle des gènes d'identité

L'inhibition latérale médiée par la voie Notch permet la spécification d'un progéniteur musculaire par cluster qui se divise ensuite afin de former les FC et/ou les AMP

promusculaires **(Fig. 6)** (Buff et al., 1998; Carmena et al., 1998a; Michelson et al., 1998). Certaines cellules du cluster commencent alors à exprimer des gènes d'identité qui seront par la suite requis pour contrôler la formation de fibres musculaires spécifiques (voir p. 10)(Carmena et al., 1998b). À ce stade, dans chaque cluster, toutes les cellules ont théoriquement la capacité de devenir une FC ou un FCM.

Détermination des myoblastes

Un processus d'inhibition latérale relayé par la voie de signalisation Notch va permettre de déterminer les cellules fondatrices (FC) et les myoblastes compétents à la fusion (FCM) **(Fig. 6)**. En effet, au sein de chaque cluster, une seule cellule va être spécifiée en progéniteur musculaire (à l'origine des FC). Elle maintient l'activité de la voie MAPK provoquant l'activation de la voie Notch dans les cellules adjacentes (Carmena et al., 2002). Cela va conduire à une inhibition de *l'sc* et de l'activité MAPK dans ces cellules, ainsi qu'à l'expression de gènes spécifiques du programme des FCM tels que *lame duck (lmd)* (Duan et al., 2001). À l'inverse, dans le progéniteur musculaire, le maintien d'activité de la voie MAPK permet l'expression de *l'sc* et des gènes d'identité.

Les FC sont formées par division des progéniteurs musculaires. Cette division conduit à la formation de deux FC, d'une FC et d'une cellule AMP (Adult Muscle Precursor, cellules requises lors de la myogenèse adulte, voir I-4), ou d'une FC et d'une cellule péricardiaque (Ruiz Gomez and Bate, 1997). Cette division se produit donc généralement de manière asymétrique et permet la formation de deux cellules filles différentes à partir d'un même progéniteur. Au cours de ce processus, deux complexes protéiques comprenant respectivement les protéines Numb (Nb) et Inscuteable (Insc) se localisent aux pôles opposés de la cellule progénitrice (Carmena et al., 1998b). Après division, les deux cellules filles héritent donc d'un des deux complexes. Nb réprime la signalisation Notch (Guo et al., 1996), la différence d'identité entre les deux cellules filles réside donc en partie dans leur capacité à répondre aux signaux activant la voie Notch. Les cellules AMP n'héritent pas du complexe protéique Nb et possèdent donc une voie Notch active. Ces cellules participent à la myogenèse adulte et restent donc dans un état indifférencié pendant

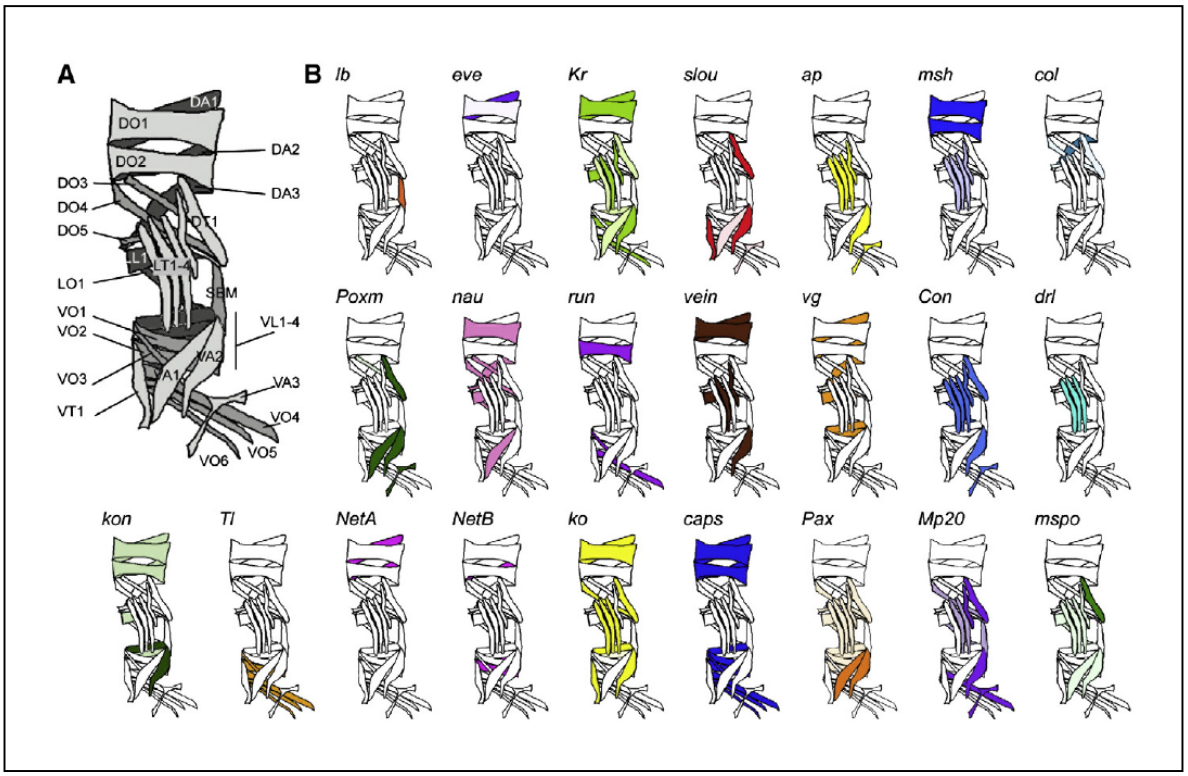


Figure 7 : Expression des gènes d'identité dans les muscles embryonnaires

A) Représentation schématique des muscles embryonnaires dans un segment et expression des gènes d'identité dans chacun de ces muscles B)

D'après Tixier *et al.*, 2010

la myogenèse embryonnaire probablement grâce à l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de Notch tels que *twi* (Anant et al., 1998).

À la fin de la spécification des myoblastes, trois types cellulaires sont donc formés : les cellules AMP, les FCM et les FC. Seule la FC maintient l'expression des gènes d'identité initiée dans le cluster. Ces gènes d'identité codent pour des facteurs de transcription qui contrôlent l'identité musculaire de la future fibre à savoir sa taille, sa position et son orientation au sein d'un segment, son nombre de noyaux (c'est-à-dire combien de FCM fusionnent avec la FC à l'origine de cette fibre), ses sites d'attachement à l'épiderme et son innervation. Un nombre important de gènes d'identité a été identifié au cours des 20 dernières années (Baylies et al., 1998). Ils présentent des profils d'expression variés et dynamiques au cours du développement. Certains gènes comme *ladybird* (*lb*), *eve* et *collier* (*col*) sont spécifiquement exprimés dans un seul type de FC, et dans le muscle qui en résulte, tandis que d'autres fibres musculaires expriment une combinatoire de facteurs de transcription plus largement exprimés, comme Slouch (Slou/S59), Apterous (Ap), Nautilus (Nau) ou Krüppel (Kr) (Balagopalan et al., 2001; Bourgouin et al., 1992; Crozatier and Vincent, 1999; Jagla et al., 1998; Knirr et al., 1999; Ruiz-Gomez et al., 1997; Su et al., 1999) **(Fig. 7)**. La spécificité d'expression de ces différents gènes est déterminée grâce à des phénomènes de répression mutuelle avec d'autres gènes d'identité (Jagla et al., 2002), à des régulations par les gènes homéotiques (Capovilla et al., 2001; Enriquez et al., 2010) et à l'influence de signaux extrinsèques comme Wg (Knirr and Frasch, 2001). L'identité de chaque muscle reflète l'expression par chaque FC d'une combinatoire spécifique de facteurs d'identité. Cependant, les mécanismes par lesquels les gènes d'identité contrôlent l'acquisition des propriétés musculaires et notamment les effecteurs de ces gènes restent peu connnus.

Après fusion avec la FC ou le myotube en cours de formation, le noyau du FCM nouvellement incorporé perd l'expression de *lmd* et adopte le programme transcriptionnel de la FC (Beckett and Baylies, 2006). Ainsi, les FCM sont considérés comme naïfs quant à leur participation à l'identité musculaire notamment car ils ont la capacité de fusionner avec n'importe quelle FC. Cependant, il a été montré qu'en réalité, ils présentaient une diversité moléculaire plus importante que ce qui avait été proposé initialement. En effet, l'expression des gènes spécifiques des FCM serait

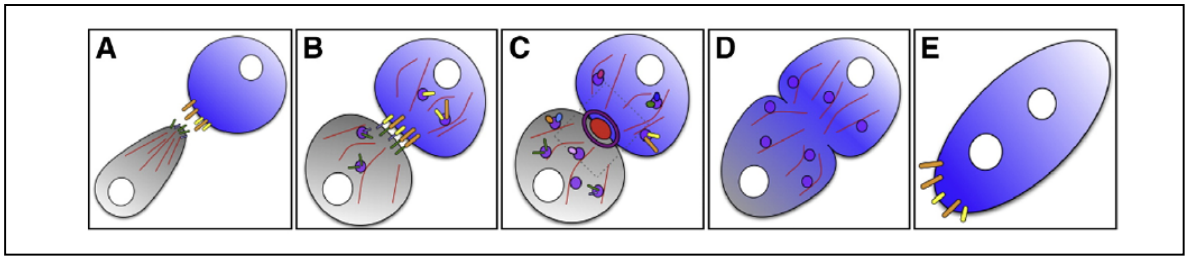


Figure 8 : Différentes étapes de fusion des myoblastes
Après migration des FCM vers les FC, il y a A) attraction, B) reconnaissance et adhésion entre les deux cellules. On assiste ensuite à des remodelages de leurs cytosquelettes respectifs C). Enfin, les membranes sont endocytées au niveau du site de fusion D) afin d'obtenir une seule membrane continue E).

D'après Rochlin *et al.*, 20009

Proteine chez la Drosophile	Expression chez la Drosophile	Fonction	Orhtologue vertébré	Références
Duf(Kirre)	FC	Attraction/adhésion	Famille Kirrel	Ruiz-Gomez et al., 2000; Strunkelnberg et al., 2001;Srinivas et al., 2007
Sns	FCM	Attraction/adhésion	Nephrin	Kestilä et al., 1998; Bour et al., 2000
Rst (Irre)	FC/FCM	Adhésion	Famille Kirrel	Strunkelnberg et al., 2001
Hbs	FCM	Adhésion	Nephrin	; Artero et al., 2001;
Ants/Rols 7	FC	Stabilisation de l'adhésion	Tanc1	Menon and Chia 2001; Chen and Olson 2001;Rau et al., 2001; Menon et al., 2005
Mbc	FC/FCM	Activation des Rac	Dock1/Dock5	Rushton et al., 1995; Erickson et al., 1997; Pajcini et al., 2008; Haralakaet al., 2011
Rac1	FC/FCM	Remodelage du cytosquelette	Rac1	Luo et al., 1994; Hakeda-Suzuki et al., 2002; Srinivas et al., 2007
Rac2	FC/FCM	Remodelage du cytosquelette	Rac2	Hakeda-Suzuki et al., 2002; Srinivas et al., 2007
SCAR	FC/FCM	Activation de Arp2/3	WAVE	
Kette	FC/FCM	Régulation de SCAR	Rac2	Richardson et al., 2007
Arp2/3	ND	Polymérisation de l'actine	Arp2/3	Richardson et al., 2007
Loner (Siz)	FC/FCM	Activation des Rac	IGSec1/Brag2/GEP100	Chen et al., 2003; Richardson et al., 2007

Tableau 1 : Principales protéines impliquées dans la fusion des myoblastes chez la Drosophile et leurs orthologues vertébrés

différente selon les sous-populations de FCM (Artero et al., 2001). De plus la position des FCM à l'intérieur de chaque segment aurait un impact sur le processus de fusion lui-même (Beckett and Baylies, 2007). Ces différences entre les FCM montrent que cette population de cellules n'est pas homogène et suggèrent que cette diversité pourrait participer à l'identité de la future fibre musculaire.

I.2.3. Étapes tardives

La formation des fibres musculaires embryonnaires/larvaires fonctionnelles nécessite la fusion des myoblastes, l'attachement des myotubes à l'épiderme et leur innervation par des motoneurones.

La fusion des myoblastes

La fibre musculaire multinucléée est produite par la fusion d'une FC et de plusieurs FCM, la taille de la fibre musculaire étant déterminée par le nombre d'évènements de fusion (Bate, 1990). Une première vague de fusion a lieu au cours des stades embryonnaires 12 et 13 (7h30 à 10h30 après la ponte, Annexe 1), entre une FC et 2 à 3 FCM, aboutissant à la formation d'un précurseur musculaire. Le recrutement de FCM supplémentaires jusqu'au stade 15 (13h après la ponte) va ensuite augmenter la taille de la fibre et donner un myotube (Beckett and Baylies, 2007). Le processus de fusion se produit en plusieurs étapes **(Fig. 8)**: tout d'abord il y a migration des FCM vers les FC ou les myotubes en cours de formation. On assiste ensuite à l'attraction entre la FC (ou le myotube) et le FCM, puis reconnaissance et adhésion entre les membranes des deux types de myoblastes. Des vésicules puis des plaques de préfusion (dont on ne connaît pas encore la composition), visualisables en microscopie électronique, sont alors formées à l'interface entre les deux cellules. Ensuite, les myoblastes s'allongent et s'alignent. Des pores se créent au niveau des points de contact entre les membranes cellulaires qui sont alors endocytées afin d'obtenir une seule cellule multinucléée (Doberstein et al., 1997). De nombreuses protéines impliquées dans les différentes étapes du processus de fusion ont été identifiées (Abmayr et al., 2008). Elles sont hautement conservées chez les vertébrés

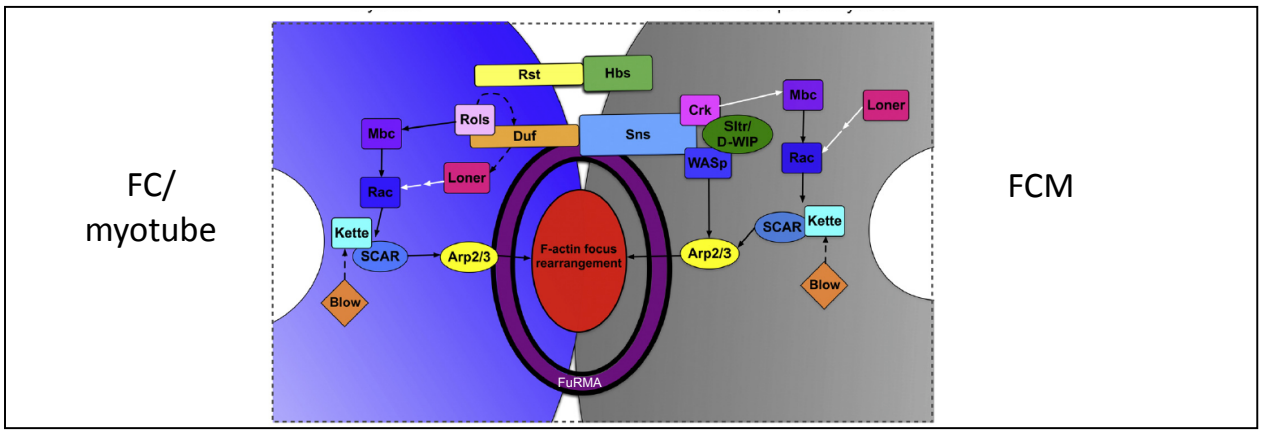


Figure 9 : Rôles des différentes protéines dans la fusion

Seules les protéines Blow ne sont pas conservées chez les vertébrés. Les protéines représentées dans un rectangle ont un rôle décrit dans la fusion chez les vertébrés alors que la contribution à la fusion des orthologues des protéines représentées dans une ellipse, n'a pas été décrite

D'après Rochlin *et al.*, 20009

et sont soit communes aux deux types de myoblastes, soit spécifiques des FC ou des FCM **(Tab. 1**).

Migration

La fusion des FC et des FCM nécessite qu'ils se trouvent à proximité. Ainsi, on assiste à un phénomène de migration des FCM qui forment des filopodes en direction des FC ou des myotubes en cours de formation avec lesquels ils vont fusionner (Richardson et al., 2007). La migration des FCM est dirigée par l 'expression de *dumbfounded* (*duf*) et *roughest* (*rst*) au niveau des FC et met en jeu des réarrangements du cytosquelette d'actine (voir ci-dessous) (Gildor et al., 2009; Ruiz-Gomez et al., 2000; Strunkelnberg et al., 2001).

Reconnaissance et adhésion FC/FCM

Les FC expriment spécifiquement la protéine Duf (Kirre) et les FCM la protéine Stick-and-Stones (Sns) (Bour et al., 2000; Ruiz-Gomez et al., 2000). En plus de leur implication dans la migration des FCM, ces protéines membranaires qui contiennent des domaines immunoglobulines interagissent directement pour permettre la reconnaissance et l'adhésion des myoblastes. Deux autres protéines à domaine immunoglobuline sont impliquées dans cette reconnaissance : Rst/Irre qui est majoritairement exprimé dans les FC et Hibris (Hbs), un paralogue de Sns qui s'exprime dans les FCM (Artero et al., 2001; Strunkelnberg et al., 2001). Cependant, à ce jour seules des analyses en culture de cellules ont montré leur potentielle capacité d'interaction (Galletta et al., 2004) **(Fig. 9)**.

Remodelage du cytosquelette et fusion

Un remodelage du cytosquelette des FC (ou du syncytium musculaire), et des FCM est ensuite nécessaire à la poursuite de la fusion (changement de forme, alignement des cellules). Au niveau des sites de fusion, on assiste notamment à la formation de foci de F-actine et de complexes protéiques appelés FuRMAS (Fusion Restricted Myogenic Adhesive Structure) qui permettent de restreindre la zone de

fusion (Kesper et al., 2007; Richardson et al., 2007) **(Fig. 9)**. Le remodelage du cytosquelette des myoblastes fait intervenir un certain nombre de protéines faisant le lien entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette. Antisocial/Rolling pebbles (Ants/Rols 7) est présente dans les FC où elle interagit avec Duf et avec la protéine Myoblast City (Mbc) (Chen and Olson, 2001) dont l'activité GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor) permet d'activer Rac1 et Rac2, des GTPases de la famille Rho (Erickson et al., 1997; Hall, 1998; Nolan et al., 1998). Ces GTPases peuvent à leur tour activer SCAR en régulant le complexe multi protéique Kette/Sra1-CYFIP-Pir121/HSPC300, constituant ainsi deux modulateurs importants du cytosquelette (Richardson et al., 2007) Ces résultats suggèrent que Ants recrute Mbc dans les FC permettant ainsi la fusion. Cependant, il a été démontré récemment que la protéine Mbc ne serait en fait requise pour la fusion que par son rôle dans les FCM, où elle est également exprimée (Haralalka et al., 2011). Elle y assure l'activation de Rac1, permettant la formation des foci de F-actine *via* le complexe Actin Regulatory Protein 2/3 (Arp2/3) (Richardson et al., 2007). La protéine Loner/Schizo, dont la localisation est dépendante de Duf, permet également la fusion des myoblastes en régulant la voie Rac (Chen et al., 2003). Loner a en effet pour fonction de réguler les GTPases Arf6 qui sont impliquées dans le recrutement des protéines Rac à la membrane, localisation indispensable à leur activation.

Régulation de la fusion muscle-spécifique

L'ensemble des gènes décrits ci-dessus est nécessaire pour la régulation générale de la fusion c'est-à-dire pour l'ensemble des muscles larvaires. Cependant, comme décrit précédemment, chaque muscle possède ses propres caractéristiques notamment en terme de nombre de noyaux. Le processus de fusion doit donc être régulé de manière plus spécifique dans chaque fibre. De récents travaux menés au laboratoire ont montré que plusieurs gènes codant des protéines du cytosquelette étaient impliqués dans la régulation muscle spécifique de la fusion (Bataillé et al., 2010). Les gènes *Muscle protein 20* (*Mp20*), *Paxillin* (*Pax*) et *m-spondin* (*mspo*), cibles des gènes d'identités *eve*, *slouch* (*S59*) et *ladybird* (*lb*), s'expriment à des niveaux différents dans cinq muscles distincts et c'est leur combinatoire d'expression

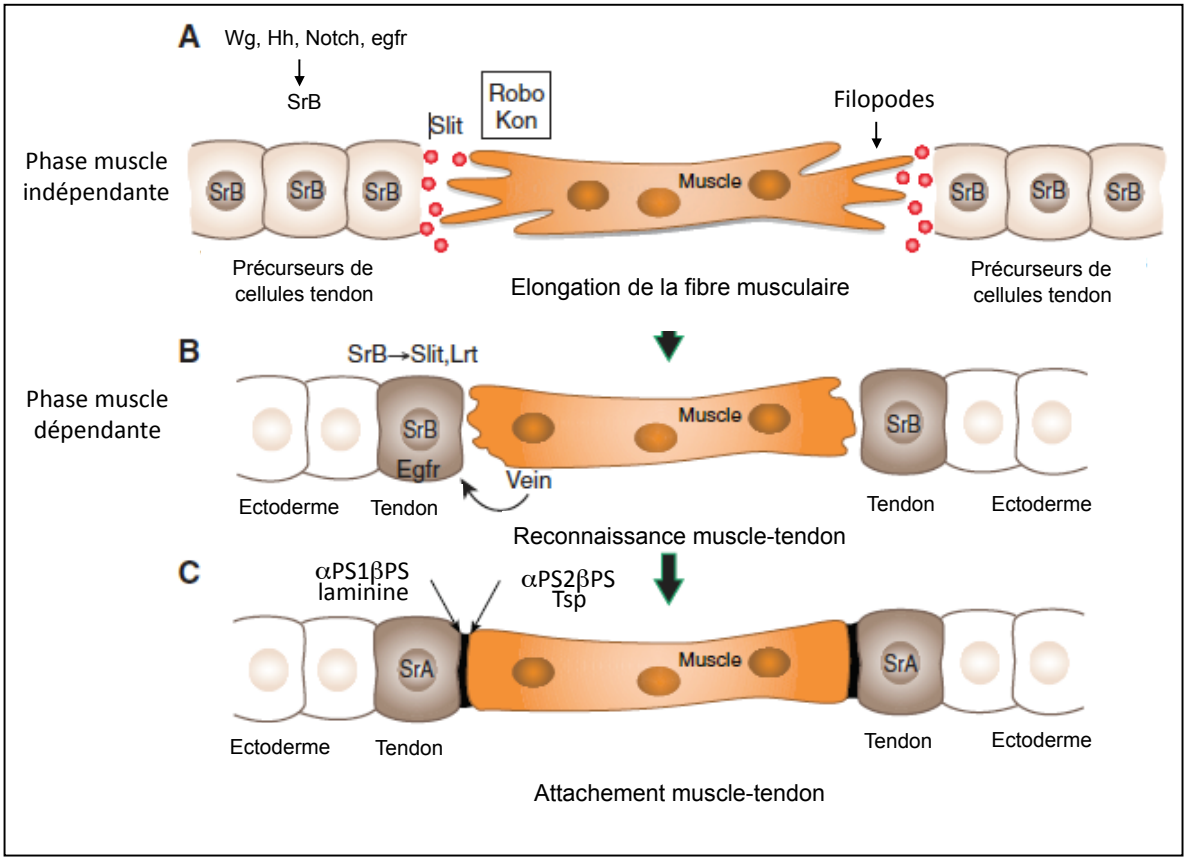


Figure 10 : Attachement des myotubes à l'épiderme

A) Les signaux Wg, Hh, Notch et Egrf permettent l'expression de *SrB* nécessaire à la détermination précoce des cellules tendon qui vont sécréter Slit permettant la migration de la fibre musculaire qui exprime Robo. B) Les cellules tendon et les extrémités des muscles expriment des gènes permettant le guidage spécifique des muscles vers les tendons. En parallèle, les tendons se différencient sous l'influence de la voie Egfr. C) Les jonctions myotendineuses sont formées pour permettre la stabilisation des points d'attachement.

D'après Schweitzer *et al.*, 2010

qui détermine le nombre d'évènements de fusion caractéristique de chacun de ces muscles. Ainsi, il a été montré pour la première fois comment les gènes d'identité participe à l'acquisition d'identité et notamment comment ils déterminent spécifiquement la fusion dans un muscle donné.

Attachement des myotubes à l'épiderme

Afin de résister aux forces de contractions et ainsi permettre la locomotion de la larve, les muscles embryonnaires de la Drosophile doivent trouver des points d'ancrage auxquels s'attacher. La Drosophile ne disposant ni d'os ni de cartilage, l'attachement des muscles se fait au niveau des cellules tendon de l'exosquelette, (Volk, 1999). L'attachement des fibres musculaires se fait en parallèle de la formation des myotubes par fusion. Il y a formation de structures appelées filopodes aux deux extrémités de la future fibre musculaire qui permettent aux myotubes lors de leur migration de trouver leurs sites d'attachement spécifiques au niveau de l'épiderme et d'entrer en contact avec les cellules tendons.

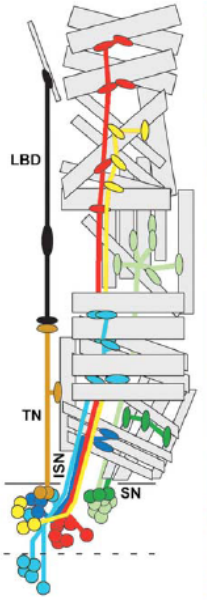
Détermination des cellules tendon

Initialement, la spécification des cellules tendons est indépendante de la formation des muscles **(Fig. 10A)**. Elle dépend de l'expression par les précurseurs de cellules tendon du gène *stripe* (*sr*) qui code pour un facteur de transcription de la famille Egr (Early Growth Response). C'est l'isoforme Stripe B (SrB) qui est produite lors de la détermination précoce des cellules tendons. Son expression est activée par les voies Wg, Hh, Notch et Egfr et permet de transformer les cellules ectodermiques en progéniteurs de tendons (Hatini and DiNardo, 2001). La différenciation et la maturation des cellules tendons sont muscle dépendantes. En effet, les muscles pendant leur élongation sécrètent la protéine Vein, un ligand de la voie EGF qui peut se fixer à son récepteur EGF présent à la surface des tendons et ainsi induire la voie EGF dans ces cellules permettant leur différenciation **(Fig. 10B)** (Yarnitzky et al., 1998). La maturation terminale des cellules tendons une fois le contact muscle-tendon établi dépend de l'expression de l'isoforme Stripe A **(Fig. 10C)**.

Attachement

Bien que la détermination initiale des cellules tendon soit muscles indépendante, le guidage des muscles vers les cellules tendons nécessite un dialogue entre ces deux types de cellules. StripeB, bien que faiblement exprimé dans les tendons suffit à activer l'expression de gènes qui vont permettre le guidage des extrémités des fibres musculaires vers les cellules tendons. Parmi ces gènes, on trouve *slit*, *Thrombospondin* (*Tsp*), *Leucine-rich tendon-specific protein* (*Lrt*) et *slowdown* (*slow*) (Gilsohn and Volk, 2010; Kramer et al., 2001; Subramanian et al., 2007; Wayburn and Volk, 2009). Un certain nombre d'autres gènes tels que *Robo*, *Derailed* et *kon-tiki* est exprimé à l'extrémité des fibres musculaires pour permettre également leur guidage spécifique (Callahan et al., 1996; Schnorrer et al., 2007; Ypsilanti et al., 2010). Néanmoins, alors que l'ensemble des fibres exprime *Robo*, *Drl* et *kon* sont exprimés respectivement par les muscles latéraux et ventraux (Callahan et al., 1996; Schnorrer et al., 2007). Tout comme pour la fusion, l'attachement des fibres à l'épiderme est donc régulé de façon générale dans tous les muscles, mais aussi à un niveau muscle spécifique.

Une fois le contact établi entre les extrémités des fibres et les cellules tendons, il y a formation de jonctions myotendineuses qui permettent de stabiliser les points d'attachement des muscles et ainsi de résister aux forces de contractions. Elles sont formées de jonctions semi-adhérentes entre des récepteurs aux intégrines présents à la surface des cellules musculaires et des cellules tendons et de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) à la jonction entre les deux (Brown, 2000). Deux types d'hétérodimères comprenant des récepteurs aux intégrines sont présents au niveau de ces jonctions. On trouve αPS1βPS au niveau des cellules tendons et αPS2βPS au niveau des cellules musculaires (Brown, 2000). Ces hétérodimères interagissent avec différentes protéines de la MEC pour former des jonctions myotendineuses fonctionnelles: l'hétérodimère tendon-spécifique αPS1βPS interagit avec la laminine (Gotwals et al., 1994; Martin et al., 1999), tandis que la forme muscle-spécifique αPS2βPS interagit avec Tsp (Chanana et al., 2007; Subramanian et al., 2007) et Tiggrin (Fogerty et al., 1994). La formation des jonctions



ISN : nerfs intersegmentaux
SN : nerfs segmentaux
TN : nerf transverse

Figure 11 : Origine des différents motoneurones innervant les muscles larvaires
Représentation schématique de l'innervation des muscles larvaires dans un segment.

D'après Landgraf et Thor 2006

myotendineuses serait également impliquée dans l'arrêt de la migration des muscles (Gilsohn and Volk, 2010).

Innervation des myotubes

Pour que le muscle soit fonctionnel, c'est-à-dire qu'il ait la capacité de se contracter, il doit être innervé par des motoneurones, qui vont lui permettre de répondre aux stimuli nerveux.

Chaque fibre musculaire est innervée par un ou plusieurs motoneurones (Bate and Broadie, 1995). L'ensemble constitué par le motoneurone et les fibres qu'il innerve est appelé unité motrice. Au total, 36 motoneurones innervant les 30 muscles larvaires de chaque hémisegment sont formés au cours de l'embryogenèse (Landgraf and Thor, 2006). Ils sont caractérisés par leur position, leur projection axonale et l'arborescence des dendrites à leur extrémité et les muscles qu'ils innervent (Landgraf et al., 1997). L'innervation des muscles larvaires nécessite donc tout d'abord la formation de l'ensemble de ces motoneurones, puis leur migration et la reconnaissance de leur muscle cible et enfin l'établissement du contact synaptique.

Formation des motoneurones

Les axones des motoneurones émergent du système nerveux central en deux nerfs principaux, les nerfs segmentaux (SN) et intersegmentaux (ISN), et un nerf mineur, le nerf transverse (TN), qui se séparent ensuite progressivement pour former des axones individuels. Les motoneurones issus des nerfs intersegmentaux innervent les muscles internes, alors que les motoneurones segmentaux et transverses innervent les muscles plus superficiels **(Fig. 11)**. La formation des nerfs dont sont issus les motoneurones est muscle-indépendante alors que l'individualisation des axones, qui se fait par un processus de défasciculation, est régulée par des signaux émis par les FC/les muscles avec lesquels ils entrent en contact (Landgraf et al., 1999).

Migration et reconnaissance muscle/motoneurone

Le processus de reconnaissance entre un motoneurone et un muscle est réciproque.

Tout d'abord au niveau cellulaire, il n'y a pas seulement migration des motoneurones au cours de l'innervation. Les cellules musculaires ont un rôle actif dans ce processus. En effet, pour permettre le contact avec les motoneurones, le muscle forme des extensions appelées myopodes (Ritzenthaler and Chiba, 2001; Ritzenthaler et al., 2000). La molécule Capricious, exprimée en premier lieu au niveau des myopodes de la cellule musculaire, permet de guider spécifiquement les axones vers le muscle qu'ils vont innerver (Kohsaka and Nose, 2009).

D'un point de vue moléculaire ensuite, un certain nombre de molécules de reconnaissance exprimées par les muscles (postsynaptique) et/ou les motoneurones (présynaptique) et impliquées dans la régulation de la spécificité d'innervation a été identifié. Elles sont soit produites par le muscle et le motoneurone qui l'innerve et forment des interactions homophiliques, soit deux molécules différentes et complémentaires s'expriment au niveau de chaque acteur, créant des interactions hétérophiliques. Ainsi, les molécules Connectin (Nose et al., 1992) et Fasciclin III (Chiba et al., 1995) sont exprimées par certains muscles et les motoneurones qui les innervent, formant des interactions homophiliques, alors que Netrin A et Netrin B, exprimées par certains muscles dorsaux permettent l'attraction des motoneurones exprimant les récepteurs de la famille Frazzled (Fra) (interactions hétérophiliques) (Kolodziej et al., 1996; Winberg et al., 1998). Les molécules de reconnaissance peuvent avoir un rôle attractif, favorisant l'interaction spécifique entre muscles et motoneurones, ou répulsif afin d'inhiber les contacts inappropriés. C'est la combinaison de l'ensemble de ces signaux qui permet la régulation spécifique de l'innervation. Bien que l'innervation se fasse de façon contrôlée en partie grâce à l'expression des molécules de reconnaissance par certains types de muscles, on ne sait pas comment cette expression est régulée et on ne sait pas notamment si les gènes d'identité qui sont spécifiques de certains muscles, peuvent intervenir. Une récente étude a cependant permis de montrer que le facteur de transcription Teyrha-Meyhra (Tey), exprimé spécifiquement dans le muscle VL1, réprime Toll afin

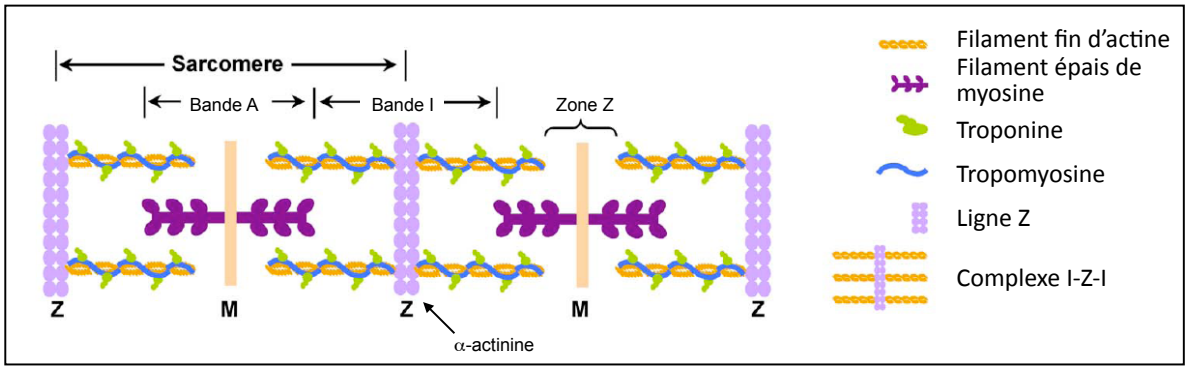


Figure 12 : Structure des sarcomères

Un sarcomère correspond à la zone comprise entre deux lignes Z. Chaque sarcomère est constitué d'un assemblage ordonné de filaments fins d'actine et de filament épais de myosine

D'après Rui *et al.*, 2010

de lever son action répulsive et permettre l'innervation du VL1 (Inaki et al., 2010). Ce travail permet pour la première fois d'établir un lien entre un facteur d'identité et la spécificité de l'innervation musculaire.

Formation de l'appareil contractile

Pour être totalement fonctionnels les muscles doivent disposer d'un appareil contractile. Pour cela, en parallèle de l'innervation des myotubes a lieu la myofibrillogenèse. Ce terme définit la formation et l'assemblage des myofibrilles qui sont des structures cylindriques présentes d'une extrémité à l'autre des cellules musculaires dont elles occupent pratiquement la totalité du volume de la cellule. L'unité de base de la composition des myofibrilles est le sarcomère, qui est aussi considéré comme l'unité contractile du muscle.

Structure des sarcomères

Les sarcomères présentent une structure très organisée et régulière donnant aux muscles squelettiques et cardiaques leurs apparences striées (visualisation des bandes A et I ainsi que des lignes Z, voir ci-dessous). Ils sont composés de myofilaments fins, constitués d'actine associée aux complexes tropomyosine et troponine, et de filament épais de myosine. Un sarcomère correspond au segment entre deux lignes Z adjacentes **(Fig. 12)**. Les filaments fins sont ancrés au niveau de ces lignes Z grâce à l'α-actinine et sont les constituants majeurs des bandes I. La bande I correspond donc à la zone où l'on trouve les filaments fins ancrés au niveau des lignes Z mais pas de filaments épais. On parle également de complexe I-Z-I pour définir la zone correspondant à la bande I et aux filaments fins dans leur intégralité. Les filaments épais sont associés aux lignes M et Z par l'intermédiaire de la protéine « géante » titin et constituent la bande A, qui peut être restreinte en zone H si on considère la région comprenant uniquement les filaments épais. La protéine géante titine/kettin entre ainsi dans la composition des sarcomères, présente de la ligne Z à la ligne M où, en plus de son rôle dans l'ancrage des filaments épais, elle permettrait de réguler la plasticité du sarcomère. La contraction musculaire se produit suite à un glissement des filaments d'actine et de myosine les uns contre les autres. Il en

résulte un rapprochement des lignes Z et donc un raccourcissement des sarcomères et plus globalement de la longueur des muscles.

À chacune de leurs extrémités, les myofibrilles s'attachent aux cellules-tendon, comme décrit précédemment. À l'intérieur d'une cellule musculaire, les myofibrilles qui se trouvent en périphérie s'attachent également à la matrice extracellulaire au niveau de leurs lignes Z par l'intermédiaire de sites d'adhésion appelés costamères, dont la constitution est proche de celle des jonctions myotendieuses (présence de nombreuses intégrines).

Formation des sarcomères

Plusieurs modèles ont émergé de différents travaux menés chez les vertébrés pour expliquer l'assemblage très ordonné des protéines et l'interdigitation des filaments lors de la formation des sarcomères et donc des myofibrilles. Un de ces modèles suggère que les complexes I-Z-I comprenant les filaments fins se formeraient avant les filaments épais de myosine et de manière totalement indépendante, s'associant ensuite pour former les sarcomères (Holtzer et al., 1997; Van der Ven et al., 1999). Selon une autre étude, il y aurait formation de pré-myofibrilles à la périphérie du muscle, caractérisées par la présence de complexes I-Z-I, d'agrégats protéiques de titine et d'α-actinine appelés Z bodies et de myosine non musculaire. Ces pré-myofibrilles se transformeraient par la suite en myofibrilles matures, notamment suite au remplacement de la myosine non musculaire par de la myosine musculaire au niveau des filaments épais et à la fusion des Z bodies en lignes Z, et seraient simultanément relocalisées à l'intérieur de la fibre (Rhee et al., 1994). La protéine titine serait également impliquée dans l'assemblage des sarcomères, sa partie amino-terminale (Nter) interagissant avec les complexes I-Z-I et sa partie carboxy terminale (Cter) avec les lignes M, ce qui permettrait aux filaments de s'intercaler (Ehler et al., 1999). Enfin, un certain nombre de travaux a mis en évidence l'implication des complexes d'adhésion médiés par les intégrines dans la polymérisation des filaments fins d'actine (Sparrow and Schock, 2009). Tous ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être coordonnés pour expliquer la formation des sarcomères. Cependant, ils reposent majoritairement sur

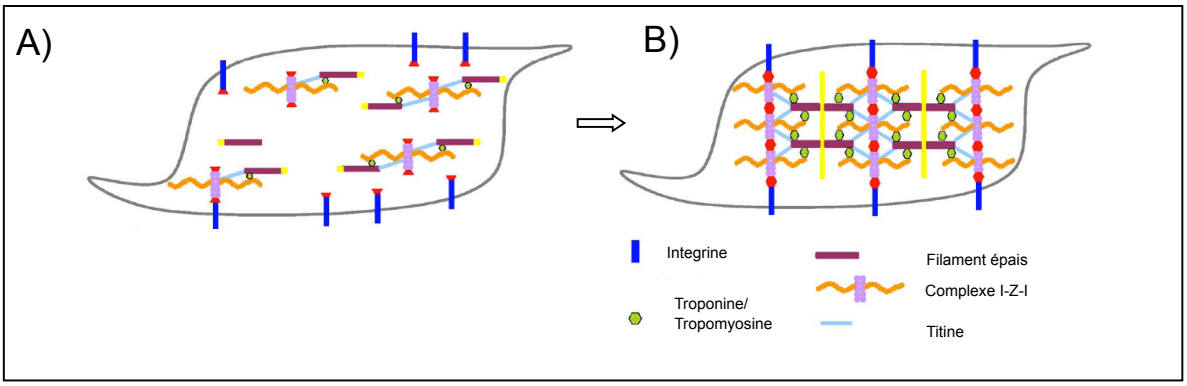


Figure 13 : Modèle de myofibrillogenèse chez la Drosophile
Ce modèle est basé sur A) la formation indépendante, dans un premier temps, des complexe I-Z-I, des filaments épais et des complexes troponine/tropomyosine, qui B) dans un second temps, s'assemblent en structures ordonnées suite notamment à l'interaction avec les intégrines

D'après Rui *et al.*, 2010

des expériences faites chez les vertébrés. Concernant la compréhension du déroulement de la myofibrillogenèse chez la Drosophile, et plus particulièrement celle des muscles larvaires, peu d'études ont à ce jour été menées. Même si le rôle des intégrines a été montré dans la formation des sarcomères (Bloor and Brown, 1998; Volk et al., 1990), les différentes étapes qui y mènent n'ont pas clairement été identifiées. Cependant, de récents travaux suggèrent un nouveau modèle selon lequel la myofibrillogenèse chez la Drosophile ne se ferait pas par étapes, comme décrit chez les vertébrés, mais plutôt que les protéines sarcomériques existeraient sous deux formes dans la cellule musculaire **(Fig. 13)**(Rui et al., 2010). Ainsi, elles seraient soit associées entre elles sous forme de complexes qui se forment indépendamment les uns des autres tels que le complexe I-Z-I, les protéines de myosines des filaments épais, les complexes troponine-tropomyosine, soit ces complexes s'assembleraient entre eux et interagiraient avec les intégrines pour former les sarcomères. Un certain nombre de régulations entre les différents complexes a lieu pour permettre la mise en place de la structure ordonnée. Aucun intermédiaire de type pré-myofibrille n'existerait chez la Drosophile et le rôle de l'orthologue drosophilien de la protéine Titine, Salimus, reste à démontrer.

Une fois les sarcomères formés, les muscles vont pouvoir se contracter. La contraction musculaire est le résultat du glissement des filaments de myosine et d'actine les uns contre les autres. Ce mécanisme est initié par l'augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme, libéré par le réticulum sarcoplasmique sous l'effet de l'influx nerveux. Il en résulte une levée de l'inhibition exercée par la troponine I sur l'interaction entre l'actine et la myosine. Pour cela, le calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique est déversé dans le cytoplasme. Lors de la relaxation musculaire, des pompes calcium ATP-dépendantes permettent de diminuer la concentration de calcium cytoplasmique en l'exportant au niveau du réticulum sarcoplasmique.

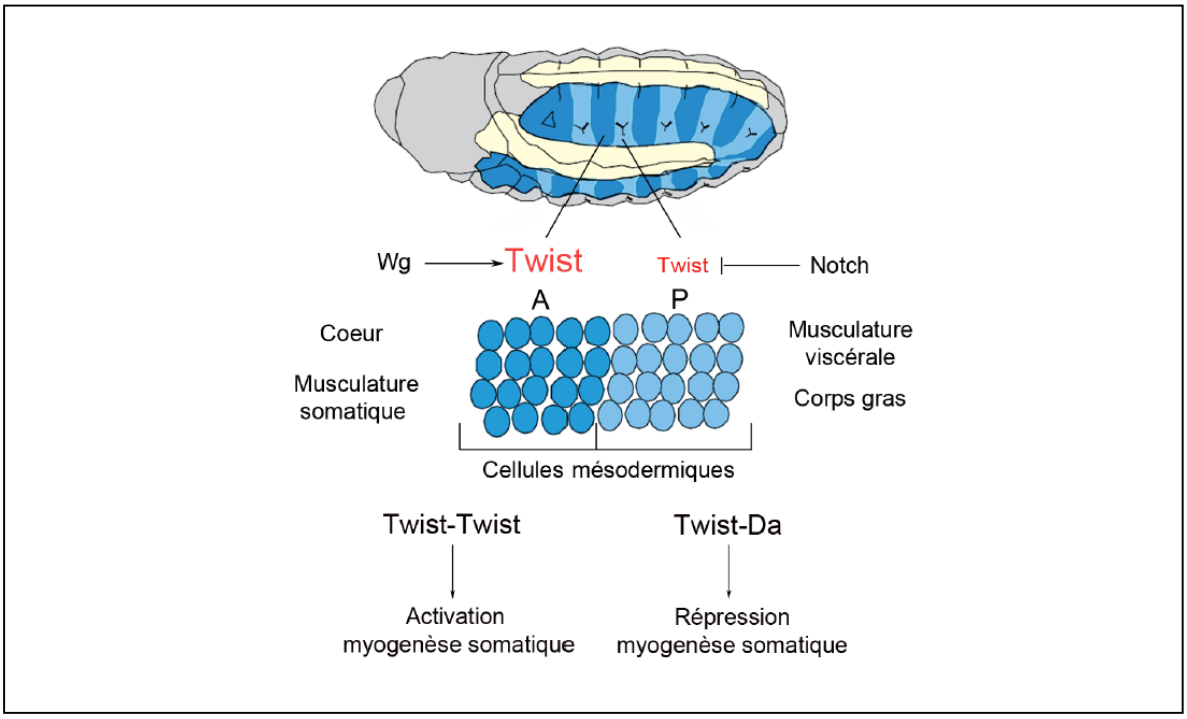


Figure 14 : Rôle de Twist dans la subdivision du mésoderme

Twist, présent en grandes quantités, forme des homodimères capables d'activer la myogenèse somatique. En faibles quantités, il s'associe avec Daughterless (Da) pour réprimer la myogenèse somatique

D'après Castanon, 2001

I.3. Facteurs de détermination myogénique et de différenciation musculaire

Les cellules mésodermiques qui participent à la formation des muscles doivent induire le programme myogénique nécessaire à la différenciation musculaire. Deux facteurs clé interviennent lors de la formation des muscles : Twi et Mef2.

twi code pour un facteur de transcription de type bHLH qui agit tout au long du développement musculaire. Selon sa concentration, il peut être présent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, associé à la protéine Daughterless (Da) (Wong et al., 2008) ce qui va déterminer son activité. En effet, les homodimères Twi/Twi induisent l'activation des gènes nécessaires à la myogenèse somatique, comme vu précédemment, alors que les hétérodimères Twi/Da induisent leur répression **(Fig. 14)** (Castanon et al., 2001). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I.2.1, *twi* est exprimé uniformément dans le mésoderme. Puis lors de la subdivision du mésoderme, cette expression est modulée par l'expression de Wg et Hh et par l'activité de la voie Notch. Dans chaque segment, on trouve ainsi un domaine à forte expression de Twi en antérieur, et à faible niveau de Twi en postérieur (Halfon et al., 2000; Tapanes-Castillo and Baylies, 2004). Précocement, sous forme d'homodimère dans le mésoderme, il induit *sna*, *htl*, *tin* et *dmef2*, gènes indispensables à la formation du mésoderme (Alberga et al., 1991; Azpiazu and Frasch, 1993; Cripps et al., 1998). Ensuite, lorsque Twi est présent en forte concentration en antérieur de chaque segment, il continue de former des homodimères qui activent l'expression des gènes myogéniques. A l'inverse, en faible quantité en postérieur de chaque segment, il s'associe à Da, réprimant des gènes tels que *l'sc*, *kr* et *dmef-2*, favorisant la formation des muscles viscéraux et du corps gras au détriment des muscle somatiques. Par la suite, lorsque les myoblastes commencent à se différencier, ils perdent progressivement l'expression de *twi*. Seules les cellules AMP maintiennent son expression, en faisant un marqueur de choix pour leur identification (Bate et al., 1991).

Il a été montré que l'expression de Twi dans l'ectoderme suffit à induire tout le programme myogénique et à former des fibres musculaires ectopiques (Baylies

and Bate, 1996). Twi est donc un gène nécessaire et suffisant pour le destin myoblastique d'une cellule et pour induire une voie de différenciation myogénique.

Le gène *D-Mef2 (Drosophila Myocyte enhancer factor 2)* code pour un facteur de transcription à MADS-box exprimé tout au long des différentes étapes de myogenèse dans les cellules qui donneront les muscles viscéraux, cardiaques et somatiques (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). Son activité au cours des différentes étapes de myogenèse dépend de son niveau d'expression (Gunthorpe et al., 1999). Il est régulé positivement par Twi au cours du développement précoce, induisant son expression dans l'ensemble du mésoderme (Cripps et al., 1998). L'analyse des gènes cibles de *D-Mef2* a permis de montrer qu'il avait un rôle au cours de ces étapes précoces du développement musculaire (Junion et al., 2007; Sandmann et al., 2007) (voir paragraphe I.5.2). De plus, contrairement à *twi*, l'expression de *D-Mef2* est maintenue pendant les stades plus tardifs lors desquels il s'autorégule positivement (Cripps et al., 2004). Au cours de ces stades, il agit au niveau des FC et FCM et est important pour activer les gènes de fusion et de croissance des myotubes. En effet, la mutation de ce gène, létale au stade embryonnaire, provoque un arrêt de la différenciation de ces trois types musculaires et l'absence de la majorité des muscles à la fin de l'embryogenèse (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995).

I.4. La myogenèse adulte

On distingue trois types de muscles chez la mouche adulte, les muscles du thorax, les muscles de la patte et les muscles abdominaux (Miller, 1950). Ils sont composés de plusieurs fibres musculaires, contrairement aux muscles larvaires, et présentent donc une structure plus proche de celle des muscles de vertébrés **(Fig. 15)**.

Au cours de la métamorphose, la majorité des muscles larvaires est histolysée. Une deuxième étape de myogenèse a donc lieu dès le stade pupal pour permettre la formation des muscles adultes. La musculature adulte se développe à partir des cellules AMP produites au cours de l'embryogenèse et restées quiescentes et indifférenciées. Au cours des stades larvaires, elles entrent en prolifération pour former une réserve de myoblastes nécessaire à la formation des muscles adultes. Au

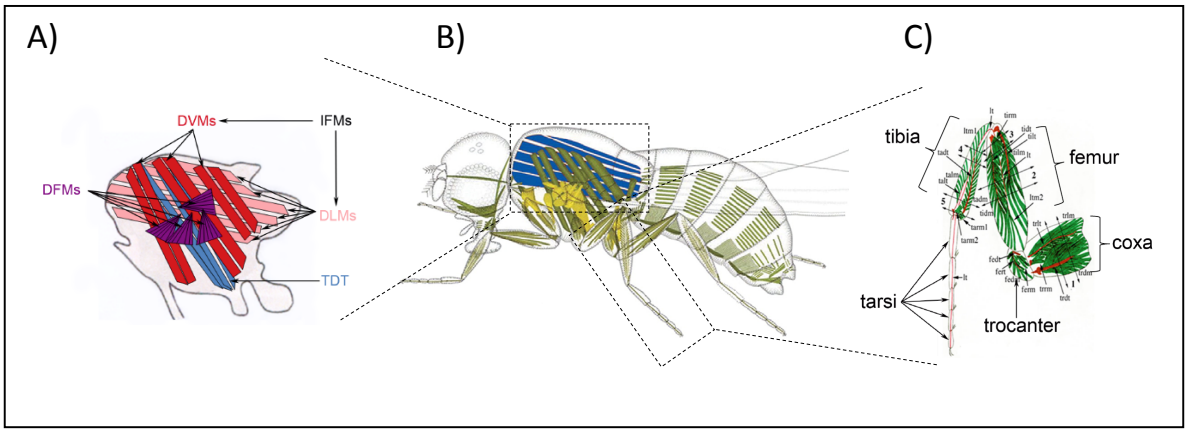


Figure 15 : Structure des muscles adultes de la Drosophile
Représentation schématique des muscles de la mouches adulte B) et détails des différents types de muscles du thorax A) et de la patte C)

D'après V. Hartenstein, 1993, Atlas of Drosophila development, Soler *et al.*, 2004

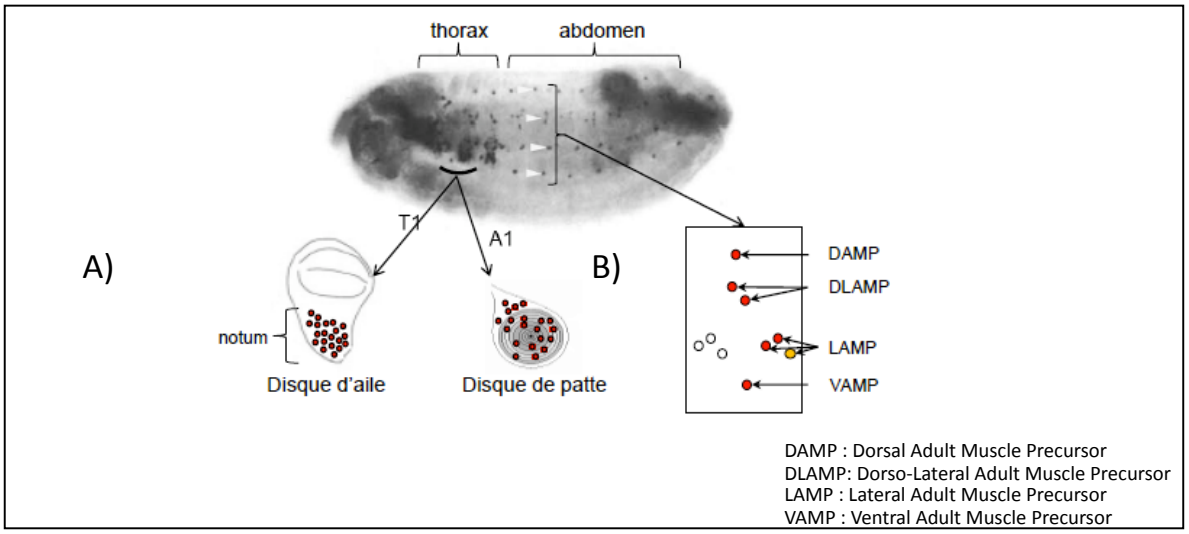


Figure 16 : Les cellules précurseur des muscles adultes (AMPs)
Au niveau du thorax, les AMP sont associées aux primordia de disques d'aile et de patte A). Dans l'abdomen, elles sont au nombre de 6 par hémisegment et associées aux nerfs périphériques

début de la métamorphose, ces myoblastes perdent l'expression de *twi* et se différencient. Ils vont ensuite soit permettre la formation des muscles adultes *de novo* (ex : muscles de la patte) soit participer à reformer des muscles à partir de la trame de muscles larvaires ayant échappé à la dégradation (ex : muscles indirects de vol) (Bate et al., 1991).

I.4.1. Les cellules précurseur des muscles adultes

Les cellules AMP sont produites au cours de l'embryogenèse par la division asymétrique des progéniteurs musculaires à la suite de laquelle une cellule fille conserve l'activité de la voie Notch ce qui contribue au maintien de l'expression de *twi* dans cette cellule (voir 1.2.2.) (Ruiz Gomez and Bate, 1997).

Au niveau du thorax, elles sont retrouvées associées aux primordias de disques d'aile et de pattes, structures à l'origine des disques imaginaux qui donneront respectivement les ailes et les pattes de la mouche **(Fig. 16A)** (Lawrence, 1982). Elles sont à l'origine des muscles du vol et des muscles appendiculaires.

Au niveau de l'abdomen, les cellules AMP sont au nombre de 6 par hémisegment : une ventrale, deux latérales, une dorsale et deux dorso-larérales et sont associées aux nerfs périphériques **(Fig. 16B)** (Bate et al., 1991). Elles permettent la formation des muscles abdominaux.

Les propriétés de ces cellules, à savoir leur capacité à rester dans un état indifférencié et quiescent puis à proliférer et se différencier pour permettre la formation des muscles adultes, sont proches de celles des cellules satellites, cellules souches musculaires existant chez les vertébrés (Figeac et al., 2007).

I.4.2. Les muscles adultes

Les muscles thoraciques

On trouve trois types de muscles au niveau du thorax de la Drosophile : les muscles indirects de vol (Indirect Flight Muscles, IFM), les muscles directs de vol (Direct Flight Muscles, DFM) (Miller, 1950) et les muscles du saut ou jump muscle, encore appelés TDT (trochanter muscles) **(Fig. 15A)**. Les IFM correspondent à de très larges fibres

musculaires fibrillaires, constituant la majeure partie de la cavité thoracique, et permettent le battement synchrone des ailes (Pringle, 1967). On distingue deux catégories d'IFM selon leur position dans le thorax et leurs mécanismes de formation:les muscles dorso-longitudinaux (Dorsal Longitudinal Muscle, DLM) au nombre de six par hémithorax, qui sont attachés à la cuticule en positions antérieure et postérieure du thorax, et les muscles dorso-ventraux au nombre de trois et attachés en dorsal et en ventral (DorsoVentral Muscle, DVM).

On trouve huit DFM par thorax situés en position dorsale, sous la cuticule. Ce sont des petits muscles de type tubulaire associés directement à la charnière de l'aile pour contrôler les mouvements nécessaires à leur positionnement.

Les muscles appendiculaires

La patte de la Drosophile est constituée de cinq parties: le coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse. Les muscles de la patte sont présents tout le long de la patte à l'exception du tarse **(Fig. 15C)**. Deux muscles principaux se forment dans chacun des quatre segments. Ils sont localisés ventralement (muscle dépresseur) et dorsalement (muscle élévateur) et sont organisés autour de tendons internes qui assurent la rigidité entre les différentes parties de la patte et la précision des mouvements (Soler et al., 2004).

Les muscles abdominaux

Les muscles abdominaux présentent un patron répété dans chaque segment. On distingue trois types de muscles abdominaux selon leur localisation: les muscles ventraux, latéraux et dorsaux **(Fig. 15B)** Miller, 1950 #232}.

I.4.3. Formation des muscles adultes

Formation de novo

La majorité des muscles adultes se forme *de novo* par fusion des myoblastes présents dans les différents segments. C'est le cas des muscles thoraciques DVM et DFM, des muscles de la patte et des muscles abdominaux **(Fig. 17A)** (Fernandes et al., 1991).

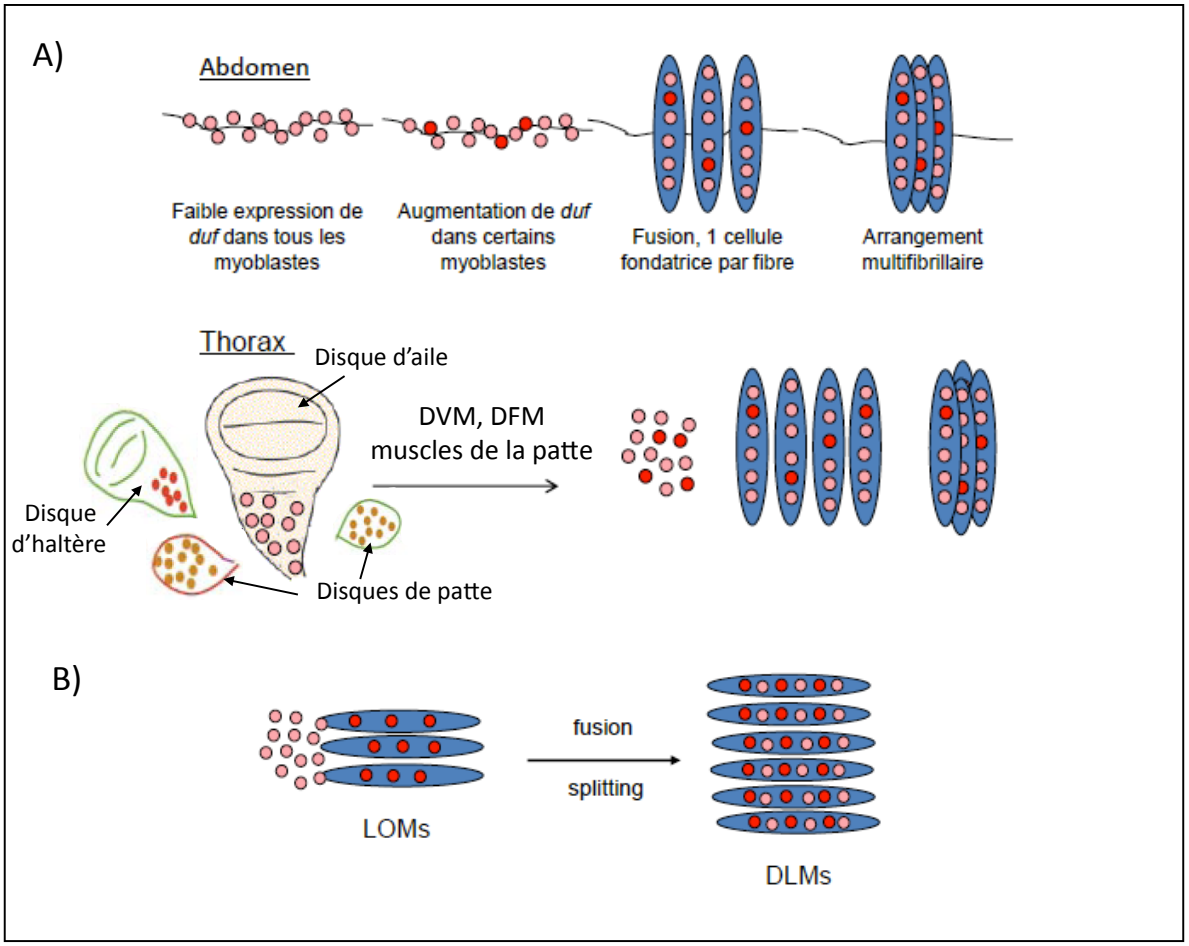


Figure 17 : Formation des muscles adultes A) *de novo* et B) à partir de la trame de muscles larvaires

La majorité des muscles adultes se forme *de novo* tandis que les muscles de vol de type DLM utilisent la trame de muscles larvaires ayant résisté à l'hystolyse

Les DVM et DFM ainsi que les muscles appendiculaires se forment à partir des myoblastes associés respectivement aux disques d'aile et aux disques de patte. Dans l'abdomen, les myoblastes migrent vers les sites de formation des muscles en utilisant les nerfs auxquels ils sont associés. Par la suite, comme chez l'embryon, certains myoblastes sont sélectionnés en tant que myoblastes fondateurs qui expriment *duf* et fusionnent avec les myoblastes restants. Ils expriment également des facteurs d'identité requis au cours de la myogenèse embryonnaire et permettant la formation de certains types de muscle. Ainsi, Vestigial (Vg) et Cut s'expriment respectivement dans les myoblastes à l'origine des IFM et des DFM alors que Lb spécifie les myoblastes à l'origine des muscles appendiculaires (Maqbool et al., 2006; Sudarsan et al., 2001). Cependant, chez l'adulte, les myoblastes fondateurs ne sont pas spécifiés par inhibition latérale médiée par la voie Notch mais par la voie des récepteurs aux FGF (Dutta et al., 2004; Dutta et al., 2005).

Formation à partir de la trame de muscles larvaires

Ce processus est à l'origine du développement des muscles thoraciques de type DLM. Dans chaque hémithorax, une partie des myoblastes associés au disque d'aile migre en direction des trois muscles larvaires obliques (Larval Oblique Muscle, LOM) qui n'ont pas été dégradés au cours de l'histolyse **(Fig. 17B)**. Ils fusionnent ensuite avec cette trame musculaire et chaque LOM se scinde en deux dans le sens de la longueur pour donner les 6 DLM (Farrell et al., 1996; Fernandes et al., 1991). Ce mécanisme de myogenèse ressemble au processus de régénération musculaire existant chez les vertébrés.

I.5. Analyses à grande échelle

I.5.1. Description des outils génétiques utilisés

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, le développement du système musculaire de la Drosophile et des vertébrés présente de nombreuses similitudes aussi bien au niveau fonctionnel qu'au niveau des gènes qui régulent la formation des muscles. La myogenèse chez la Drosophile est un système simplifié et facilement accessible à des analyses génétiques. Ainsi, de nombreux cribles

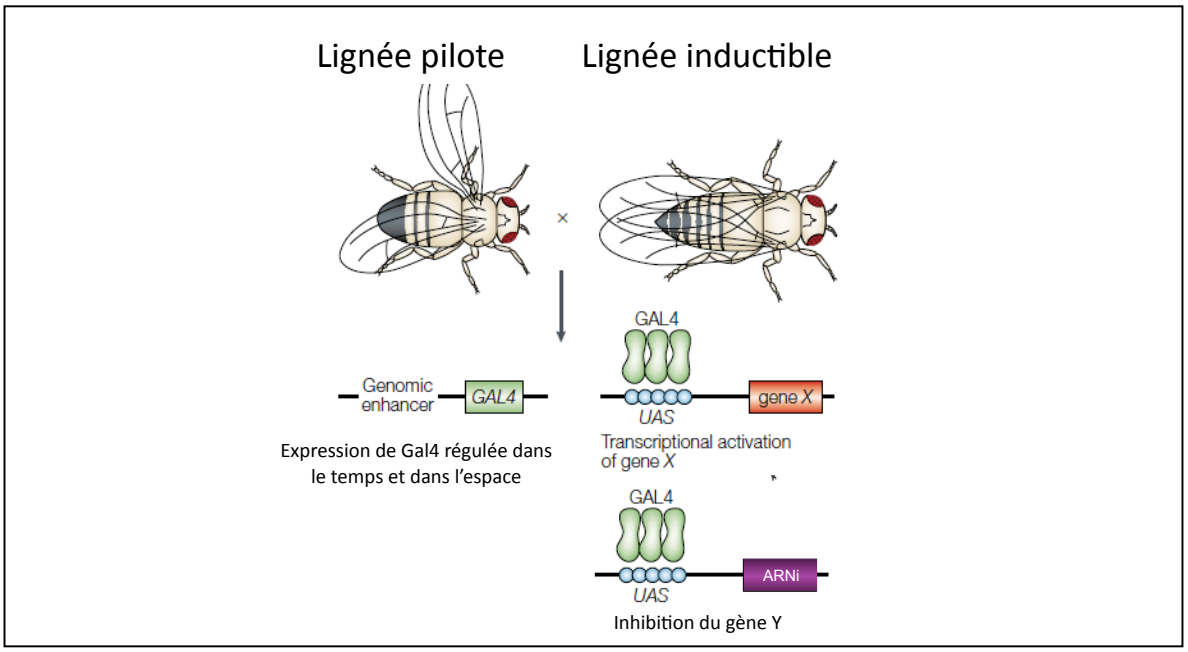


Figure 18 : Le système UAS-Gal4

L'expression de la protéine Gal4 dans la lignée pilote est dépendante du promoteur en aval duquel se trouve sa région codante. La surexpression ou l'inactivation d'un gène peut donc être dirigée de façon spatio-temporelle

D'après St Johnston, 2002

génétiques menés chez la Drosophile ont permis l'identification de gènes-clés impliqués dans des phénomènes développementaux, comme la myogenèse, et transposables aux vertébrés. Ces cribles sont basés sur l'utilisation des nombreux outils génétiques existant chez la Drosophile afin d'inactiver ou surexprimer un gène.

Un grand nombre de mutants est mis à disposition de la communauté scientifique par l'intermédiaire de plusieurs banques de lignées de Drosophiles et est largement utilisé pour réaliser des cribles génétiques. Ces banques regroupent par exemple des délétions de parties du génome (Ryder et al., 2007; Thibault et al., 2004), des mutants créés par l'agent mutagène EMS (EthylMéthane Sulfonate) (Till et al., 2003), ou encore des lignées dites «enhancer trap» qui présentent des insertions de transposons dans le génome (Bellen et al., 2004). Selon la nature et la position du transposon, ces lignées permettent d'inhiber ou d'activer spécifiquement un gène. L'inhibition repose le plus souvent sur l'interruption de la séquence promotrice du gène. L'activation est permise par l'utilisation du système UAS-Gal4 issu de la levure où le facteur de transcription Gal4 se fixe sur des séquences activatrices dérivées de promoteurs (Upstream Activation Sequences, UAS) pour permettre l'expression du gène situé en aval (Brand and Perrimon, 1993) **(Fig. 18)**. En effet, certains types de transposons possèdent des UAS et les protéines Gal4 sont apportées par croisement avec une lignée dite « pilote ». La synthèse de Gal4 est dépendante du promoteur auquel elles sont associées. Il est donc possible de contrôler de manière spatio-temporelle l'activation spécifique d'un gène grâce à la lignée Gal4. Le système UAS-Gal4 peut aussi être utilisé pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène. Pour cela, des lignées pilote sont croisées avec des lignées inductibles contenant des UAS permettant l'expression de petits ARN interférents (ARNi) qui vont cibler et inhiber spécifiquement un ARN messager (ARNm). Chez la Drosophile, d'importantes banques de lignées UAS-ARNi ont été créées offrant la possibilité d'inhiber plus de 85% de ses gènes (Dietzl et al., 2007). L'inhibition spécifique de l'expression d'un gène par ARN interférence est aussi possible par l'injection directe de petits ARN double brins (ARNdb) dans des embryons de Drosophile au stade blastoderme syncitial (Kennerdell and Carthew, 1998) (voir partie résultats) ou par mise en contact direct de ces ARNdb avec des cellules primaires (Bai et al., 2008).

I.5.2. Cribles génétiques dans la myogenèse

Ces dix dernières années, plusieurs travaux réalisés à l'échelle du génome ont permis une meilleure compréhension du déroulement et de la régulation des différentes étapes du développement musculaire chez la Drosophile, et par homologie, chez les vertébrés. La plupart de ces cribles repose sur l'utilisation combinée des outils génétiques disponibles chez la Drosophile et d'approches bioinformatiques et/ou transcriptionnelles (puces à ADN).

Concernant les étapes précoces de la myogenèse, l'établissement du programme transcriptionnel aboutissant à la formation du mésoderme embryonnaire a été entrepris par plusieurs équipes. Les résultats obtenus ont notamment permis l'identification de gènes spécifiquement exprimés dans le mésoderme (Furlong et al., 2001), responsables de la subdivision dorso-ventrale du mésoderme (Stathopoulos et al., 2002) ou encore cibles de Twi (Sandmann et al., 2007). L'analyse des gènes cibles de Twi a montré qu'il était capable de réguler 25% de la totalité des facteurs de transcription connus chez la Drosophile, permettant ainsi, en coopération avec entre autres Dorsal, Tin ou dMef2, l'activation des gènes nécessaires aux différentes étapes du développement mésodermique. L 'ensemble de ces travaux a permis d'établir le programme transcriptionnel de la formation précoce du mésoderme.

La recherche de cibles de gènes-clés comme celui codant pour le facteur de transcription D-Mef2 a permis la mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la myogenèse (Junion et al., 2005; Sandmann et al., 2006). La diversité des cibles identifiées suite à ces travaux indique que D-Mef2 joue un rôle central dans la myogenèse en participant à la régulation à chaque étape. En effet, au cours des stades précoces, D-Mef2 agit en coopération avec Twi pour réguler différentes voies de signalisation (EGFR, FGFR et Notch) importantes pour la spécification des cellules musculaires. Plus tardivement, il active des gènes impliqués dans la fusion comme *blow*, *lmd,* l'attachement des fibres à l'épiderme, tels que *egfr*, *pax* ou encore dans la différenciation terminale comme *actine*, β-*tubuline*, *tropomyosine*.

La connaissance des programmes génétiques induisant la spécification des myoblastes a été améliorée tout d'abord par Artero *et al.* en 2003 qui ont identifié

des gènes dont l'expression était spécifiquement augmentée sous l'influence des voies Ras ou Notch, qui induisent respectivement le devenir des cellules en FC et en FCM (Artero et al., 2003). Cependant, le contexte génétique ainsi que l'approche utilisés pour cette étude n'avaient permis d'identifier qu'un faible nombre de gènes. En 2006, Estrada *et al.* ont utilisé une stratégie différente pour analyser le programme génétique spécifique de chacun des deux types de myoblastes (Estrada et al., 2006). Ils ont isolé les cellules mésodermiques d'embryons de 12 contextes génétiques différents perturbant spécifiquement les voies de signalisation impliquées dans le devenir des FC ou des FCM. Les transcriptomes de ces différents contextes ont été analysés et comparés, permettant de prédire l'expression de plus de 600 gènes spécifiquement dans les FC ou les FCM et valider la plupart d'entre eux par hybridation *in situ*.

Un autre point important de la myogenèse est l'acquisition d'identité des différentes fibres musculaire grâce à l'expression d'une combinatoire de gènes d'identité par les FC et par extension par les muscles. Afin de comprendre comment les gènes d'identité relayent cette information, il est important de connaître les cibles sur lesquelles ils agissent. À ce jour, une seule étude, menée dans notre laboratoire, a permis de mettre en évidence des cibles du facteur de transcription Lb, montrant qu'il agissait à plusieurs niveaux de la myogenèse embryonnaire en régulant des gènes déterminant les propriétés morphologiques et fonctionnelles des muscles (Junion et al., 2007).

Concernant l'attachement des myotubes, un crible par surexpression de gènes spécifiquement dans les cellules tendons a mis en évidence de nouveaux de gènes ayant un rôle dans le guidage et/ou l'attachement des muscles à l'épiderme (Staudt et al., 2005). Et crible gilshon et volk en 2010 ?

Récemment, Schnorrer *et al.* ont réalisé un crible génétique visant à identifier des gènes ayant un rôle dans les étapes tardives du développement musculaire, à savoir la formation de l'appareil contractile des muscles en fin d'embryogenèse et des IFM (Schnorrer et al., 2010). En croisant systématiquement toutes les lignées ARNi disponibles dans le stock de Drosophiles transgéniques VDRC (Dietzl et al., 2007) avec une lignée pilote permettant l'atténuation des gènes spécifiquement dans les cellules musculaires (Mef2-Gal4), ils ont observé que la diminution

d'expression de plus de 2 500 gènes produisait une descendance présentant des problèmes de viabilité, de posture, de locomotion ou de vol. Pour la plupart de ces gènes, des analyses complémentaires ont montré qu'ils étaient plus précisément impliqués dans l'organisation des muscles ou des sarcomères dans les muscles larvaires ou les muscles de vol.

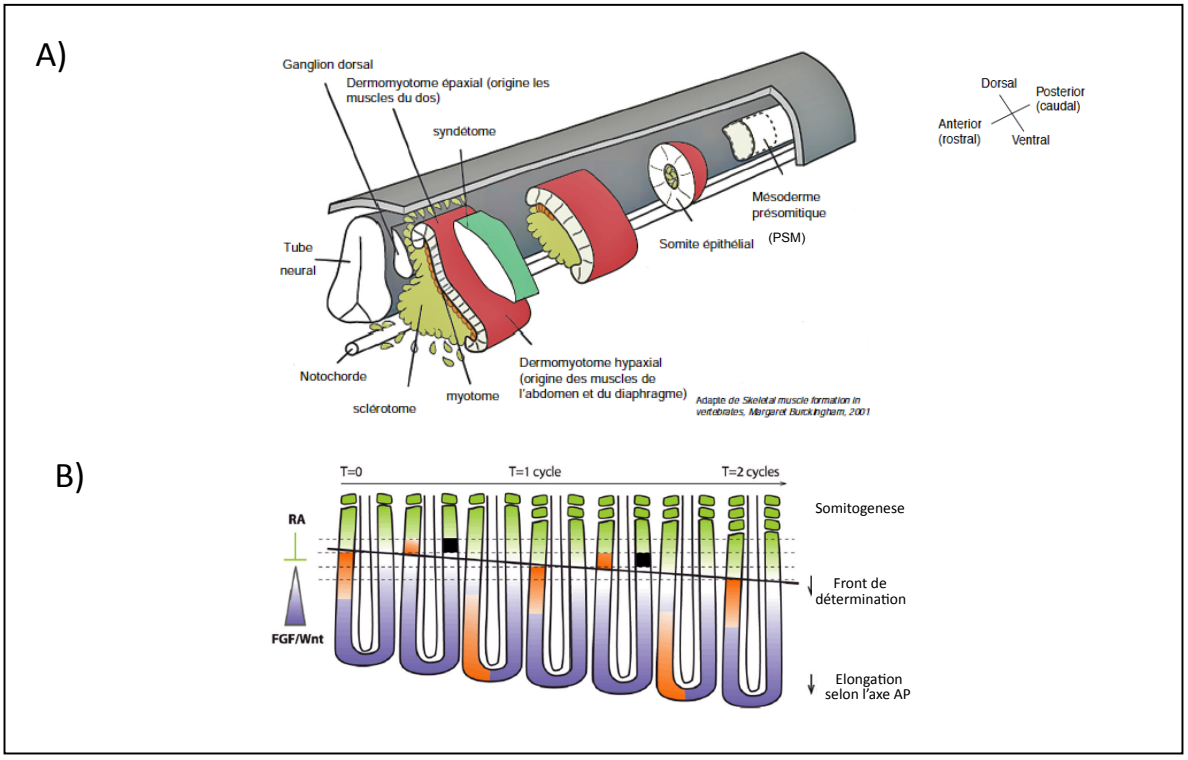


Figure 19 : Origine et formation des somites chez les vertébrés

A)Le mésoderme présomitique se segmente en somites qui se subdivisent en quatre compartiments: le dermomyotome (rouge) le myotome (orange), le sclérotome (jaune) et le syndétome (vert)

B)Modèle « clock and wavefront »:chaque paire de somites se forme après avoir passé le front de détermination engendré par l'activité notamment du gradient de FgF8

D'après Buckingham, 2001; Gomez et Pourquié, 2009

II. LA MYOGENESE SQUELETTIQUE CHEZ LES VERTEBRES

Il existe de nombreuses similarités entre la biologie de la Drosophile et des vertébrés faisant de la Drosophile un organisme modèle pour l'étude des processus de développement tel que la myogenèse. On remarque notamment une conservation des grandes étapes et des signaux conduisant à la formation des muscles. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons donc à la formation des muscles squelettiques chez les vertébrés, le but étant d'avoir une vue générale de la myogenèse squelettique chez les vertébrés afin de mettre en évidence les similarités mais aussi les différences qui existent avec la myogenèse somatique chez la Drosophile. Cette partie ne présentera donc pas de façon exhaustive la myogenèse chez les vertébrés ni les particularités inhérentes à chaque espèce de vertébré.

II.1. Somitogenèse et formation du myotome

II.1.1. L'origine des muscles squelettiques : les somites

Chez les vertébrés, les différents types musculaires sont d'origine mésodermique et les muscles squelettiques, qui sont l'équivalent des muscles somatiques de la Drosophile, dérivent du mésoderme paraxial situé de part et d'autre du tube neural (pour revue (Christ and Ordahl, 1995)). Cette partie du mésoderme adopte une structure transitoire, appelée somite, à l'origine des muscles du tronc et des membres **(Fig. 19A)**. Chaque somite se forme par paire de part et d'autre du tube neural et de façon séquentielle selon l'axe antéro-postérieur (Pourquie, 2003). La périodicité spacio-temporelle de ce phénomène s 'explique par le modèle « colock and wavefront » initialement identifié chez le poulet **(Fig. 19B)**(Dubrulle et al., 2001): de nombreux gènes s'expriment sous forme de gradient dans le mésoderme présomitique (PSM), parmi lesquels *Fgf8* qui montre une forte expression au niveau postérieur du PSM et qui décroît progressivement en antérieur. Ces différents niveaux d'expression définissent un front de détermination, au-delà duquel les somites vont pouvoir se former en réponse aux oscillations spatio-

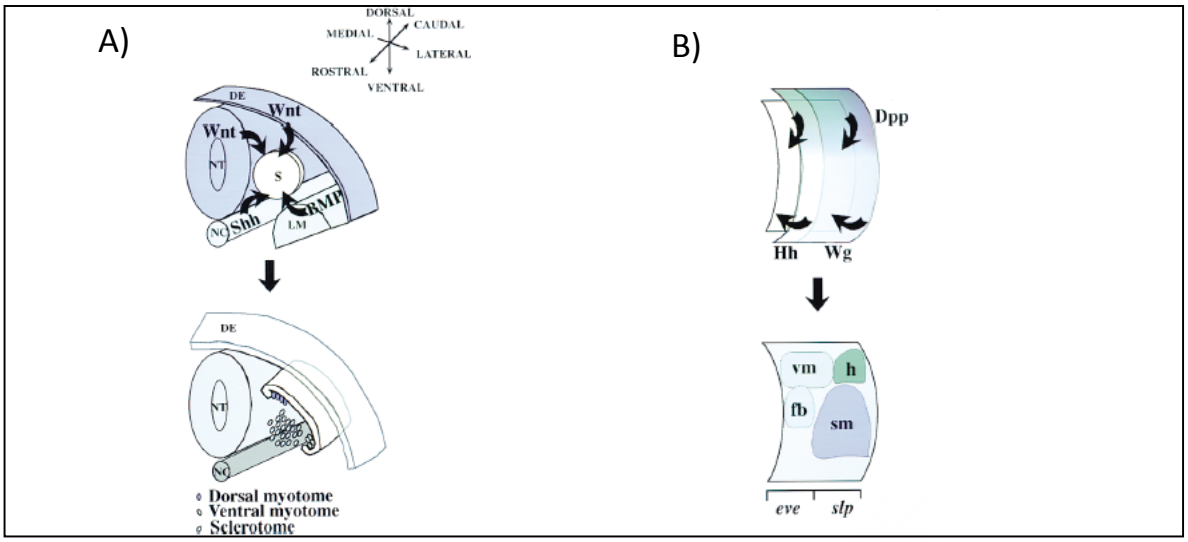


Figure 20 : Comparaison entre la subdivision des somites chez les vertébrés A) et celle du mésoderme de la Drosophile B)

Les gènes Wnt, Shh et BMP intervenant dans la subdivision des somites sont respectivement les orthologues des gènes Wg, Hh et Dpp impliqués dans la subdivision du mésoderme chez la Drosophile

D'après Baylies *et al.* 1998

temporelles de l'expression d'autres gènes appelés « gènes de l'horloge de segmentation ».

Chez la souris et le poulet, la partie ventrale des somites va ensuite subir une transition épithélio-mésenchymateuse induisant la formation du sclérotome alors que dorsalement se forme le dermomyotome qui a conservé son caractère épithélial. Ainsi, les somites subissent une subdivision selon l'axe dorso-ventral, comparable à celle observée pour le mésoderme chez la Drosophile. Le territoire déterminé dorsalement, le dermomyotome, donne les muscles squelettiques et le derme, alors que le sclérotome, déterminé ventralement, donne le cartilage et les os. Le dermomyotome est également compartimenté de façon médio-latérale. La région centrale du dermomyotome donnera le derme, la partie médiale, la plus proche du tube neural, les muscles épaxiaux et la partie latérale, la plus éloignée du tube neural, les muscles hypaxiaux. Les muscles épaxiaux correspondent aux muscles dorsaux et les muscles hypaxiaux aux muscles des membres, de la langue, de la ceinture abdominale et du diaphragme.

Ces subdivisions se produisent sous l'influence de signaux provenant du mésoderme latéral (Bone Morphogenetic Protein, BMP), de l'ectoderme (Wnt, Wingless type), du tube neural (Wnt et Sonic Hedgehog, Shh) et de la notochorde (Shh). L'action combinée des signaux BMP et Wnt (ectodermique) spécifie le développement des muscles hypaxiaux (Dietrich et al., 1998) alors que l'action de Wnt (tube neural) et Shh détermine les muscles épaxiaux (Marcelle et al., 1997) **(Fig. 20)**. Ces signaux sont codés par des gènes dont les orthologues chez la Drosophile interviennent dans la subdivision du mésoderme. En effet, les signaux BMP, Wnt et Shh correspondent respectivement aux signaux Dpp, Wg et Hh. En ce qui concerne leurs fonctions, elles sont difficiles à comparer du fait de la différence d'anatomie entre le mésoderme de la Drosophile et les somites des vertébrés. Cependant, on peut relever des similarités dans les modes d'action et les interactions entre ces signaux. Par exemple, chez la Drosophile, les signaux Wg et Hh sont antagonistes dans la division antéro-postérieure des segments mésodermiques, tout comme les signaux Wnt ectodermique et Shh s'opposent dans la division dorso-ventrale du somite (Azpiazu et al., 1996; Brent and Tabin, 2002). On observe également une similarité d'action des signaux Dpp et BMP. En effet, bien que le signal BMP ne soit

pas directement impliqué dans la dorsalisation du somite, comme l'est Dpp dans le mésoderme de la Drosophile, il a été montré que BMP active les signaux Wnt, qui eux dorsalisent les somites (Frasch, 1995; Marcelle et al., 1997). Certains de ces signaux sont aussi impliqués dans la spécification d'autres dérivés mésodermiques que ceux qui sont à l'origine des muscles squelettiques/somatiques. Ainsi, chez les vertébrés, Shh permet à lui seul le développement du sclérotome et chez la Drosophile, il est impliqué dans la formation des muscles viscéraux et du corps gras (Azpiazu et al., 1996; Fan and Tessier-Lavigne, 1994).

Les somites présents le long de l'axe antéro-postérieur ne sont pas équivalents. Ils présentent une identité différente, dépendante de la combinatoire de gènes homéotiques (Hox) qu'ils expriment et ainsi n'auront pas tous la même capacité à générer tel ou tel type musculaire (Alvares et al., 2003). Cette variation d'identité sous l'influence des gènes homéotiques est retrouvée chez la Drosophile où le patron musculaire varie selon les segments suivant l'axe antéropostérieur (Michelson, 1994).

Comme nous avons pu le voir, les premières étapes de la formation des muscles squelettiques/somatiques montrent un grand nombre de similarités. Bien que les structures desquelles émergent les fibres musculaires soient différentes, elles sont formées par des processus de subdivision impliquant l'action combinée de plusieurs facteurs, dont la majorité est conservée, et provenant pour la plupart de tissus adjacents.

II.1.2. Formation du myotome

Chez les vertébrés, deux grandes vagues de myogenèse ont lieu, la myogenèse prénatale, pendant le développement embryonnaire et fœtal, et la myogenèse périnatale et au cours de la vie adulte. La myogenèse prénatale se déroule en deux étapes, embryonnaire (myogenèse primaire) et foetale (myogenèse secondaire). La myogenèse primaire correspond à la formation des fibres primaires à partir du myotome. La première étape de ce processus est donc la formation du myotome.

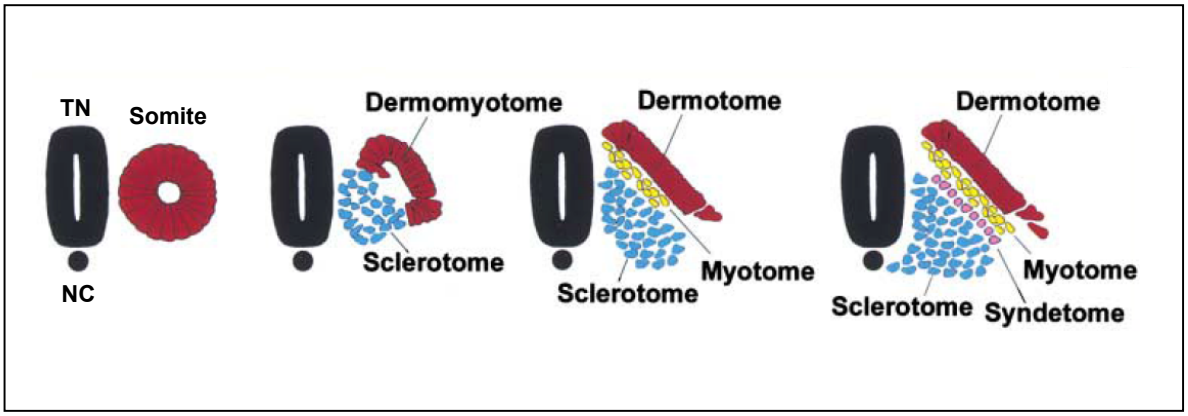


Figure 21 : Formation du myotome
Le myotome est formé à partir des cellules du dermomyotome qui délaminent entre le dermomyotome et le sclérotome

D'après Brent *et al.*, 2003

Sous l'influence de facteurs sécrétés par les structures adjacentes (tube neural, notochorde et ectoderme), les cellules des bordures du dermomyotome délaminent entre le dermomyotome et le sclérotome pour former le myotome (Brent and Tabin, 2002). Un quatrième compartiment, appelé syndétome est également formé. Il correspond en réalité à un sous-domaine du sclérotome et est à l'origine des progéniteurs de tendons des muscles du tronc **(Fig. 21)** (Brent et al., 2003).

Chez le poulet, les mouvements cellulaires qui accompagnent la formation du myotome sont à l'origine de différents modèles controversés (Kahane et al., 2001; Ordahl et al., 2001). Les travaux réalisés par l'équipe de C. Marcelle ont permis de démontrer que la formation du myotome se réalise en deux étapes (Gros et al., 2004). La première étape correspond à la formation du myotome primaire par l'addition des myocytes issus uniquement du bord médial/épaxial du dermomyotome. Après le processus de délamination, ces cellules post-mitotiques mononucléées appelées myocytes s'étendent selon l'axe antéropostérieur sur toute la longueur du somite et expriment des gènes spécifiquement musculaires, formant ainsi des fibres musculaires. La deuxième étape induit la croissance du myotome suite à la production de myocytes à partir des 4 bords du dermomyotome (caudal, rostral, latéral et dorsal). Les bords épaxiaux et hypaxiaux du dermomyotome contribuent respectivement uniquement à la formation des régions épaxiales et hypaxiales du dermomyotome alors que les régions rostrales et caudales participent à la formation de l'intégralité du myotome.

Chez la souris, la formation du myotome est également initiée par la migration de cellules situées au niveau de la bordure épaxiale du dermomyotome donnant le myotome épaxial. Ensuite, les cellules des autres bordures (hypaxiale, rostrales et caudales) du dermomyotome délaminent pour permettre la formation de l 'ensemble du myotome, sachant que ce sont les cellules de la bordure hypaxiale qui donnent naissance à la majorité des cellules du myotome (pour revue (Buckingham, 2006)).

II.2. Spécification des progéniteurs musculaires

Comme énoncé précédemment, les cellules à l'origine des muscles squelettiques proviennent des somites.

Les muscles du tronc se développent à partir du myotome suite à la délamination des cellules du dermomyotome. Les myoblastes qui délaminent de la partie épaxiale donneront les muscles du dos et ceux qui dérivent de la partie hypaxiale sont à l'origine des muscles de la ceinture abdominale. La délamination, la spécification et la différenciation des myoblastes à l'origine des muscles du tronc est sous le contrôle de quatre facteurs de transcription myogéniques dits MRFs (Myogenic Regulatory Factors) à savoir MyoD, Myf5, Myogénine et Mrf4 (voir II.5). La détermination des myoblastes des muscles du tronc est dépendante de l'expression des deux MRFs, MyoD et Myf5. Ce sont les molécules Wnt et Shh sécrétées respectivement par l'ectoderme dorsal, la partie dorsale du tube neural et la partie ventrale du tube neural et la notochorde qui permettent l'activation de MyoD et Myf5. Il a été montré que Mrf4 contrôle également la formation des myoblastes. La différenciation des myoblastes en myocytes est quant à elle sous le contrôle de Mrf4, MyoD et Myogénine (Kassar-Duchossoy et al., 2004). De récents travaux ont montré que la différenciation des myoblastes nécessitait l'activation de la voie Notch (Rios et al., 2011). En effet, au niveau du dermomyotome épaxial, les cellules se différencient progressivement lors des premiers jours de la myogenèse embryonnaire, une partie demeurant épithéliale. Cette balance entre cellules qui se différencient et celles qui restent au niveau du dermomyotome est contrôlée par la voie Notch. Des cellules des crêtes neurales exprimant le ligand Delta1 migrent au niveau de la bordure épaxiale du dermomyotome afin d'activer la signalisation Notch dans une sous-population de cellules qui se différencieront en précurseur musculaire (Rios et al., 2011).

Les précurseurs des muscles des membres délaminent de la partie hypaxiale du dermomytome et migrent ensuite vers les territoires où seront formés les membres (bourgeons de membre). Contrairement aux précurseurs des muscles du tronc, les précurseurs des muscles appendiculaires délaminent avant d'exprimer les MRFs. La délamination s'effecute sous la dépendance d 'un récepteur tyrosine kinase

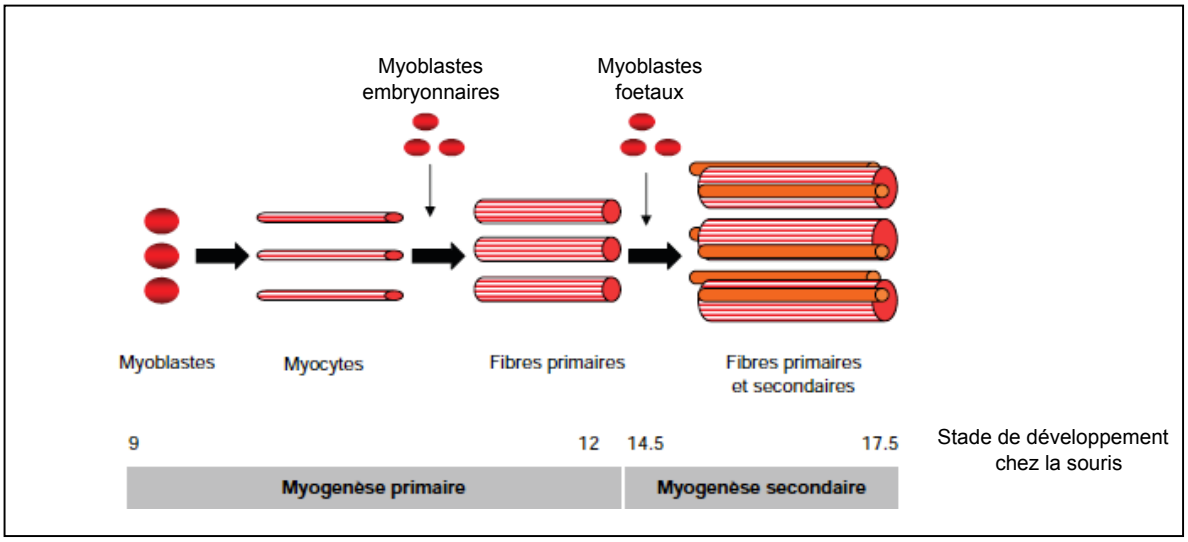


Figure 22 : Etapes de la formation des muscles au cours de la myogenèse prénatale chez la souris

Les fibres primaires sont formées par la fusion des myoblates embryonnaires alors que les fibres secondaires sont issues de la fusion de myoblastes foetaux

appelé C-met qui s'exprime au niveau du dermomyotome hypaxial sous le contrôle de Pax3 (Paired box) (Bladt et al., 1995; Epstein et al., 1996). Après la délamination, les précurseurs musculaires migrent vers les territoires de membres. La migration de ces précurseurs à longue distance rappelle la migration des myoblastes des disques imaginaux vers les sites de formation des muscles lors de la myogenèse adulte chez la Drosophile (Fernandes et al., 1991). Chez les vertébrés, ce processus est dépendant du facteur de transcription Lbx1 (Ladybird-like homeobox), orthologue du facteur d'identité Lb chez la Drosophile, dont l'expression est induite par Pax3 (Bober et al., 1994; Brohmann et al., 2000). Une fois au niveau des bourgeons de membres, les précurseurs expriment les MRFs et prolifèrent pour donner le primordium musculaire. Le facteur de transcription à homéodomaine Msx1, orthologue du facteur d'identité msh chez la Drosophile, serait impliqué dans la prolifération accrue de ces myoblastes (Houzelstein et al., 1999). La différenciation des myoblastes dépend des MRFs (Kablar et al., 1997). L'induction des MRFs dans les bourgeons de membres reste peu connue, mais l'ectoderme des membres semble impliqué dans leur expression (Geetha-Loganathan et al., 2005).

II.3. Formation des myotubes et acquisition de l'identité musculaire

II.3.1. Fusion

Une fois spécifiés, et de façon similaire à la Drosophile, les myoblastes fusionnent pour permettre la formation des myotubes multinucléés qui vont ensuite s'assembler, s'attacher aux tendons et être innervés pour donner des muscles fonctionnels. Une étape supplémentaire, n'ayant lieu que dans les muscles adultes de Drosophile, se produit, aboutissant à la formation de muscles multifibrillaires, les muscles embryonnaires de Drosophile étant formés d'une seule fibre musculaire.

Chez les mammifères, la formation des fibres musculaires se fait en deux temps **(Fig. 22)** (Rochlin et al.). Tout d'abord, lors de la myogenèse primaire les myoblastes embryonnaires issus du dermomyotome envahissent le myotome et fusionnent, donnant naissance aux myotubes dits primaires puis les fibres secondaires sont formées suite à la fusion des myoblastes produits au cours de la vie

fœtale entre eux et avec les fibres primaires (Dunglison et al., 1999; Evans et al., 1994). Les fibres primaires vont ainsi servir d'échafaudage aux fibres secondaires.

Chacune de ces deux périodes de fusion peut être divisée en deux phases, comme chez la Drosophile :la première résulte de la fusion des myoblastes entre eux afin de générer une myofibre syncitiale avec quelques noyaux, puis lors d'une deuxième phase, cette myofibre croit par fusion avec d'autres myoblates et commence à se différencier sous l'influence notamment des MRF (voir partie II.5) (Kelly and Zacks, 1969). Au cours de cette différenciation, les myofibres s'attachent aux tendons, sont innervées, les sarcomères sont formés, le cytosquelette se réarrange et les noyaux se localisent à la périphérie de la fibre musculaire (Duxson et al., 1989; Ross et al., 1987). Les fibres primaires donnent généralement des muscles au phénotype lent et les fibres secondaires des muscles rapides (Wigmore and Evans, 2002; Zhang and McLennan, 1998). Au cours de la réparation et de la croissance musculaires, on observe également des évènements de fusion en post-natal entre des myofibres multinucléées et des myoblastes mononucléés, les cellules satellites.

Chaque processus de fusion se fait suivant les mêmes grandes étapes que chez la Drosophile : les cellules qui vont fusionner migrent l'une vers l'autre, se reconnaissent puis adhèrent. Il y a ensuite alignement des membranes des cellules, régulation du cytosquelette d'actine et formation de pores membranaires au niveau du site de fusion, rupture des membranes et enfin la fusion elle-même (voir paragraphe 1.2.3 et **(Fig. 8)**.

En ce qui concerne les similarités entre les vertébrés et la Drosophile, il est important de noter qu'en plus de la conservation des grandes étapes de fusion, la grande majorité des gènes régulant ce processus chez la Drosophile ont un orthologue chez les vertébrés, même si leur conservation fonctionnelle n'a été que très peu évaluée du fait de la difficulté à étudier la fusion *in vivo* chez les vertébrés **(Tab. 1 et Fig. 9)**. Comme indiqué précédemment, chez la Drosophile, les gènes *duf*, *rst*, *sns* et *hbs* codent pour des protéines qui contrôlent la reconnaissance entre les cellules qui fusionnent. Chez le poisson-zèbre l'orthologue de *duf*, le gène *Kirrel* (*Kirre-like*) est impliqué dans la fusion des myoblastes qui donnent les fibres rapides (Srinivas et al., 2007). La diminution de l'expression de *Kirrel* bloque la fusion des

myoblastes et de manière similaire à la mutation de Duf/Kirre et Rst/Irre chez la Drosophile, on observe des myoblastes non fusionnés qui se différencient en muscle rapides mononucléés (Strunkelnberg et al., 2001). Actuellement le mode d'action de Kirrel au cours de la fusion reste méconnu notamment concernant sa potentielle interaction avec la protéine codée par l'orthologue de *sns*, à savoir Nephrin même si cette dernière semble avoir un rôle dans le développement musculaire (Sohn et al., 2009). Cependant, chez la souris, il a été montré que Nephrin était impliquée dans la fusion de manière asymétrique. L'expression de Nephrin serait en effet requise dans les myoblastes mais pas dans les myotubes, rappelant le rôle de Sns chez la Drosophile (Bour et al., 2000; Sohn et al., 2009).

Concernant les gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine, l'inhibition de l'expression de Rac1 chez le poisson-zèbre conduit à des défauts de fusion comme chez le mutant Rac1/Rac2 chez la Drosophile. Cependant sa surexpression induit des phénotypes d'hyper-fusion non observés pour le gain de fonction Rac chez la Drosophile, suggérant une fonction sensiblement différente (Srinivas et al., 2007). Chez la souris, les mutants conditionnels Rac1 présentent des fibres musculaires petites et fines consécutives à des défauts de fusion (Vasyutina et al., 2009). La fonction de Mbc est conservée chez les vertébrés. Ses orthologues Dock1 et Dock5 sont en effet impliqués dans la fusion aussi bien chez la souris que chez le poisson-zèbre (Laurin et al., 2008; Moore et al., 2007). Enfin, bien que les foci d'actine présents au niveau des sites de fusion chez la Drosophile n'aient pas été mis en évidence chez les vertébrés, plusieurs travaux suggèrent l'existence d'une structure équivalente (Duan and Gallagher, 2009; Nowak et al., 2009).

Enfin, les dernières étapes de fusion aboutissent à la formation du syncytium musculaire et notamment la relocalisation appropriée des protéines de surface pour permettre des évènements de fusion supplémentaire. Bien que ce processus soit conservé, il est impossible de savoir si les mécanismes impliqués dans sa régulation le sont aussi car ils sont à l'heure actuelle très peu connus que ce soit chez la Drosophile ou chez les vertébrés.

II.3.2. Acquisition de l'identité musculaire

Chez la Drosophile, les propriétés inhérentes à chaque muscle sont déterminées par la combinatoire de facteurs de transcription exprimés initialement dans les cellules fondatrices (FC) puis dans les fibres musculaires (voir paragraphe 1.2.2). De plus, la localisation des FC embryonnaires détermine la position des futurs précurseurs musculaires et par la suite des muscles de la larve de Drosophile. Chez les vertébrés, les fibres primaires formées au cours de la myogenèse pré-natale peuvent être apparentées aux cellules fondatrices de la Drosophile. En effet, de façon similaire la position des fibres primaires préfigure le site de formation des fibres secondaires ainsi que leur taille (Bate, 1990; Patel et al., 2002). De la même façon, on peut établir un parallèle entre les fibres primaires des vertébrés et la trame résiduelle de muscles larvaires à partir de laquelle se forment les muscles de vol de type DLM. En effet, c'est l'emplacement des muscles larvaires ayant résisté à l'histolyse qui va déterminer la position des DLM rappelant la mise en place des fibres secondaires des vertébrés à partir des fibres primaires. Enfin, les FC de la Drosophile ont la capacité de s'attacher aux cellules tendons et d'être innervées en l'absence d'événement de fusion formant des mini-muscles comparables aux fibres primaires (Rushton et al., 1995).

Les gènes d'identité sont en grande majorité conservés chez les vertébrés et certains d'entre eux présentent même une expression spécifique de certains muscles (Tixier et al., 2010). C'est le cas notamment de *sax2,* l'orthologue de *slou* chez le poisson-zèbre et de *Msx1*, orthologue mammifère de *msh* (Bae et al., 2004; Houzelstein et al., 1999). Pour d'autres, il a même été montré qu'ils intervenaient dans le développement musculaire de certains types de muscles. C'est le cas par exemple des orthologues de *Pitx*, *msh* et *lb* chez la souris. En effet, *Pitx1* est impliqué dans la détermination de la morphologie des membres postérieurs alors que *Pitx2* est indispensable au bon développement des muscles de la tête (DeLaurier et al., 2006; Shih et al., 2008). *Msx1* et *Msx2* participent quant à eux à la formation des muscles de la paroi abdominale (Ogi et al., 2005) et *Lbx1* est impliqué dans la migration des progéniteurs des muscles appendiculaires (Brohmann et al., 2000).

II.3.3. Attachement, innervation et formation de l'appareil contractile

De la même façon que chez la Drosophile, pour être fonctionnels, les muscles des vertébrés doivent s'attacher de façon à résister aux forces de contractions, être innervés et disposer d'un appareil contractile.

Attachement

Chez les vertébrés, les muscles s'attachent à l'endosquelette par l'intermédiaire des tendons. La formation de ce système musculo-squelettique, qui comprend les muscles, les tendons et les os se fait différemment selon les types de muscles (du tronc, des membres et de la face) et l'origine des tendons auxquels ils s'attachent n'est pas la même. Cependant, les grandes étapes qui interviennent dans ce processus sont communes aux différents muscles et rappellent les évènements décrits précédemment pour l'attachement des fibres chez la Drosophile. Tout d'abord, il y a spécification, migration puis différenciation des tendons, et enfin les jonctions myotendineuses se forment. Cependant une étape supplémentaire permet également l'attachement des tendons aux os en des sites appelés enthèses. Quelle que soit leur origine, les progéniteurs de tendon expriment le gène *Scx* (*scleraxis*) qui code pour un facteur de transcription à domaine bHLH en faisant un marqueur de choix pour l'identification des cellules tendon (Schweitzer et al., 2001). Il a permis de mettre en évidence que la spécification des progéniteurs de tendons dépendait de leur interaction avec d'autres tissus. En effet, dans les futurs tendons des muscles du tronc, l'expression de *Scx* est liée à la sécrétion de facteurs de croissance aux fibroblastes (FGF) par le myotome, tandis que dans les bourgeons de membres cette expression serait dépendante de l'ectoderme (Schweitzer et al., 2001; Tozer and Duprez, 2005). Ainsi l'induction précoce des progéniteurs de tendons est muscle-dépendante pour les tendons des muscles du tronc et muscle indépendante, comme chez la Drosophile, pour les muscles des membres. L'analyse des mutants *Scx* a montré qu'il n'était pas directement responsable de la spécification des tendons et à ce jour les acteurs moléculaires mis en jeu dans ce processus restent à découvrir (Murchison et al., 2007). L'étape suivante de différenciation des cellules tendon est, quelle que soit leur origine, majoritairement dépendante des muscles chez les

vertébrés, comme chez la Drosophile, bien que les acteurs moléculaires impliqués dans le dialogue muscles-tendons à cette étape restent peu connus (Schweitzer et al., 2001). Une récente étude a mis en évidence le rôle des facteurs de transcription EGR1 et EGR2, homologues de Stripe chez la Drosophile, dans la différenciation des cellules tendons (Lejard et al., 2011). L'expression de *Egr1* et *Egr2* dans les cellules tendon est dépendante des signaux FGF4 provenant des extrémités des muscles et est suffisante pour induire l'expression des gènes de différenciation des tendon comme le fait Stripe chez la Drosophile. Ces résultats mettent en évidence le dialogue qui s'opère entre les muscles et les tendons ainsi que la conservation fonctionnelle du gène *Stripe* chez les vertébrés. Enfin, de récentes études ont permis de montrer le rôle des protéines Talin 1, Talin 2 et des récepteurs aux intégrines $\alpha 7\beta 1D$ et $\alpha 7B\beta 1D$ dans la formation des jonctions myotendineuses chez les vertébrés. Le rôle de ces protéines semble donc être conservé entre les vertébrés et la Drosophile (Conti et al., 2008; Conti et al., 2009).

Formation de l'appareil contractile

La structure des sarcomères est très fortement conservée entre les espèces. Ainsi, chez les vertébrés, les sarcomères sont également délimités par les lignes Z, formés de filaments fins constitués d'actine et de complexes troponine-tropomyosine qui s'associent aux lignes Z par l'intermédiaire de protéines d'α-actinine et de filaments épais de myosine qui s 'associent au niveau des lignes M **(Fig. 12)**. Comme exposé dans la partie I.2.3, les modèles expliquant la formation de l'appareil contractile chez les vertébrés ont des points communs avec celui proposé pour la formation des sarcomères chez la Drosophile.

Innervation

Bien que l'innervation des muscles chez les vertébrés ait été largement décrite, peu de travaux ont été réalisés chez la Drosophile, rendant difficile l'évaluation de la conservation de ce phénomène. Cependant, il a été montré que la majorité des gènes impliqués dans la détermination des motoneurones était conservée, bien que le processus lui-même soit différent, la Drosophile et le nématode utilisant un mécanisme qui leur est propre et n'est pas retrouvé chez les

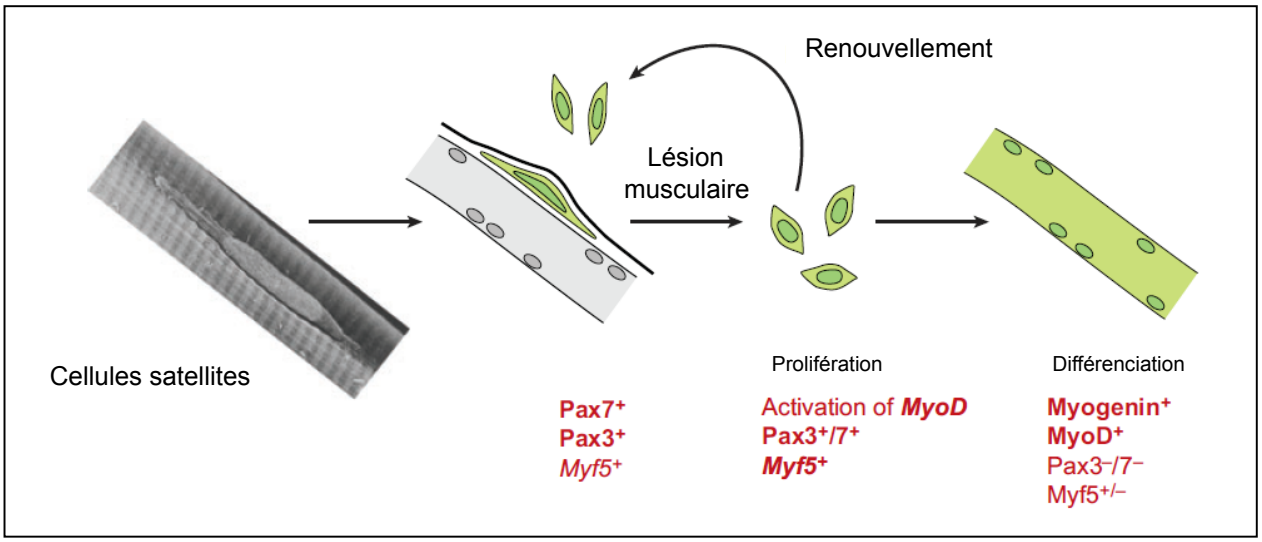


Figure 23 : Les cellules satellites des vertébrés

Les cellules satellites, présentes dans un état de quiescence sous la lame basale du muscle vont une fois activées, prolifèrer et se différencier sous l'influence des MRF MyoD, Myf5 et Myogénine

D'après Buckingham et Relaix, 2007

vertébrés (Thor and Thomas, 2002). Concernant la régulation du guidage spécifique des motoneurones vers les muscles, le peu de molécules de reconnaissance identifiées à ce jour sont issues d'études réalisées chez la Drosophile. Bien que la plupart d'entre elles aient un orthologue chez les vertébrés, leur rôle dans la détermination de la trajectoire des motoneurones demeure inconnu (Bonanomi and Pfaff, 2010).

II.4. Les cellules satellites

Comme chez la Drosophile, certaines cellules reste indifférenciées au cours de la formation des muscles chez les vertébrés. Les cellules satellites en sont les représentantes majeures. On peut assimiler les cellules satellites aux cellules AMP de la Drosophile. En effet, elles ont la capacité de proliférer et se différencier pour participer à la myogenèse. Les cellules satellites sont mises en place à la fin de la vie fœtale, localisées sous la lame basale en périphérie des muscles et sont dans un état de quiescence **(Fig. 23)**(Mauro, 1961). Chez la souris et chez le poulet, la quasi-totalité des cellules satellites de la musculature du tronc dérive du dermomyotome central (Gros et al., 2005; Relaix et al., 2005). Les cellules satellites en état de quiescence sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Pax7 et dans certains cas de Pax3 également (Relaix et al., 2006). Elles sont activées après la naissance afin d'assurer la croissance des muscles adultes (Moss and Leblond, 1971). Elles peuvent également être activées en cas d'effort musculaire ou suite à une lésion pour permettre la régénération des fibres et ainsi maintenir l'intégrité du tissu musculaire (Schultz et al., 1978). Ainsi, les cellules satellites sont des cellules souches musculaires. Une fois activées, les cellules satellites prolifèrent se différencient et fusionnent entre elles pour former de nouvelles fibres ou fusionnent avec les fibres existantes afin d'assurer leur rétablissement. La prolifération des cellules satellites est caractérisée par une augmentation rapide de l'expression régulateurs myogéniques MyoD et Myf5 puis lorsqu'elles se différencient, elles n'expriment plus les gènes *Pax7/Pax3* mais maintiennent l'expression de *MyoD* et induisent celle de *Myogénine* (Le Grand and Rudnicki, 2007).

Enfin, de façon à maintenir une réserve de cellules souches musculaires, une partie des cellules satellites ne se différencie pas mais s'autorenouvelle (Le Grand and Rudnicki, 2007).

II.5. Facteurs de détermination myogénique et de différenciation musculaire

Chez les vertébrés, les facteurs majeurs de détermination myogénique MyoD, Myf5, myogenine et MRF4 appartiennent à la famille des myogenic regulatory factors (MRFs) (Braun et al., 1989; Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Rhodes and Konieczny, 1989). Ces facteurs de transcription à domaine bHLH sont capables d'induire *in vitro* la myogenèse à partir de cellules indifférenciées : Myf5, Myf6 et MyoD sont essentiels pour la détermination des cellules musculaires et Myogénine, MyoD et Myf6 pour leur différenciation (Perry and Rudnick, 2000). Au niveau du tronc, la myogenèse est initiée par l'activation de l'expression de MyoD et Myf5 en réponse aux signaux issus de l'ectoderme dorsal et de la partie dorsale du tube neural. Pour les muscles des membres, l'induction des MRFs dépend de signaux provenant de l'ectoderme du bourgeon des membres. Le domaine b-HLH des MRFs leur permet de se fixer à l'ADN afin d'activer les gènes musculaires mais également de former des homodimères (MRF/MRF) ou des hétérodimères aves les proteines E (Puri and Sartorelli, 2000). D'un point de vue fonctionnel, l'action des MRFs est semblable à celle du facteur Twi. En effet, il a été montré en culture cellulaire que le facteur MyoD est capable de convertir de nombreux types cellulaires en myoblastes (Weintraub et al., 1991). Ce rôle instructif rappelle la fonction de Twi, dont l'expression dans l'ectoderme est suffisante pour induire la formation de fibres musculaires ectopiques (Castanon et al., 2001). De plus, Twi est capable de s'homodimériser ou de former des hétérodimères avec des protéines Daughterless (Da) qui sont les orthologues des protéines E. Enfin, Notch est un régulateur négatif de Twi lors de la subdivision du mésoderme chez la Drosophile et est également capable d'inhiber MyoD chez les vertébrés (Hirsinger et al., 2001; Tapanes-Castillo

and Baylies, 2004). À l'opposé, Wg active l'expression de *twi* et régule positivement MyoD (Lee and Frasch, 2000; Tajbakhsh et al., 1998).

En ce qui concerne le facteur de différenciation Mef2, il existe quatre gènes *Mef2* chez les vertébrés (*Mef2 a-d*), alors qu'il n'y en a qu'un chez la Drosophile. Les analyses faites en culture cellulaire ont montré que contrairement aux MRFs, ces protéines ne sont pas capables d'activer la myogenèse dans des cellules indifférenciées mais potentialisent l'action des MRFs grâce à la formation d'hétérodimères MRF/Mef2 qui accroît le pouvoir myogénique des MRFs (Molkentin et al., 1995). L'existence de quatre gènes chez les vertébrés et leur redondance fonctionnelle rend les expériences d'invalidation des gènes et donc la mise en évidence de leur rôle *in vivo* difficiles. Cependant, le rôle du gène *Mef2c*, qui est exprimé le plus précocement des quatre gènes, a été analysé. Bien que les mutants *Mef2c* soient létaux aux stades embryonnaires, des défauts de différenciation des fibres musculaires ont pu être observés montrant que *Mef2c* a un rôle dans la différenciation, comme son homologue chez la Drosophile (Lin et al., 1998). On note également une conservation de la régulation de l'expression de *Mef2*. En effet, chez la Drosophile *Mef2* est activé par Twi et chez les vertébrés, l'expression des quatre gènes est induite par les MRFs (Black et al., 1998).

D'autres facteurs de transcription interviennent dans la myogenèse chez les vertébrés. On peut citer notamment les protéines Pax3 et Pax7 précédemment décrites et les facteurs de transcription de la famille SIX (Sine Oculis homeobox). Les protéines Pax3 et 7 sont exprimées dans les myoblastes embryonnaires et foetaux ainsi que dans les cellules satellites qui fusionnent avec le muscle en formation. Elles ont des fonctions redondantes et c'est l'analyse des doubles mutants qui a permis de comprendre leur rôle dans la myogenèse. Dans les doubles mutants *Pax3*/*Pax7*, la formation des myocytes n'est pas affectée mais les myoblastes ne fusionnent pas, entraînant une létalité tardive au cours du développement et la formation de muscles atrophiés (Relaix et al., 2006). Il a également été montré que Pax3 et Pax7 régulent l'expression de MyoD. Il n'existe pas d'équivalent fonctionnel de ces gènes

chez la Drosophile mais le gène *pox meso* décrit précédemment, qui fait partie de la famille des gènes *Pax*, participe néanmoins à la myogenèse (Duan et al., 2007).
Les facteurs SIX et plus précisément SIX1 et SIX4 jouent également un rôle important au cours du développement musculaire chez les vertébrés. Ils interviennent en effet au niveau des parties épaxiales et hypaxiales du dermomyotome en régulant respectivement les gènes *Myf6*, *MyoD* et *Myogénine,* et les gènes *Pax3* et *Myf5* (Bryson-Richardson and Currie, 2008). Leur implication dans la myogenèse est retrouvée chez la Drosophile. En effet, le gène *D-six4* déjà décrit et orthologue de *Six4* participe à la détermination des muscles latéraux et ventraux, et des résultats obtenus au laboratoire suggèrent une implication du gène *SO*, orthologue de *Six1*, au cours des étapes tardives de la différenciation musculaire ((Clark et al., 2006) et données non publiées).

Au final, il existe de nombreuses similarités au niveau des mécanismes génétiques et moléculaires qui contrôlent les différentes étapes de la myogenèse chez la Drosophile et chez les vertébrés. Ainsi, avec la Drosophile, nous disposons d'un excellent système modèle pour explorer *in vivo* les mécanismes d'action des gènes qui contrôlent la détermination et la différenciation des cellules musculaires.

III. METABOLISME ET DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

III.1. Diversité des fibres musculaires

Chez les vertébrés, les muscles squelettiques correspondent à un assemblage hétérogène de fibres dont les capacités contractiles et métaboliques sont différentes, allant des fibres les plus rapides au métabolisme glycolytique (anaérobie) aux fibres les plus lentes au métabolisme oxydatif (aérobie). Ces caractéristiques sont déterminées par les propriétés biochimiques de la myosine exprimée par la fibre musculaire et par son contenu en enzymes métaboliques. En effet, plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC pour Myosin Heavy Chain), issues d'une famille multigénique, sont exprimées au cours du développement des mammifères. Les isoformes rapides de MyHC de type IIa, IIb, et IIx/d, de même que l'isoforme lente Iβ prédominent dans les muscles squelettiques de mammifères et permettent de classifier les fibres musculaires en deux catégories principales (Pette and Staron, 1990; Schiaffino and Reggiani, 1996). Les fibres de type I ou fibres «rouges» sont dites «lentes» : ce sont les fibres de l'endurance. Elles expriment des chaînes lourdes de myosine de type Iβ et possèdent un métabolisme oxydatif, aérobie. Elles sont également riches en myoglobine, protéine permettant le transport d'oxygène dans les muscles, et en mitochondries, qui produisent l'ATP nécessaire à la contraction. Les fibres de type II sont des fibres «rapides». Elles expriment les chaînes lourdes de myosine de type IIa, IIx et IIb. Les fibres de type IIb, blanches, présentent un métabolisme anaérobie, glycolytique et sont moins denses en mitochondries et en myoglobine que les fibres lentes. Les fibres de type IIa, à métabolisme aérobie, riches en mitochondries et qui apparaissent rouges tout comme les fibres de type I, sont des intermédiaires entre ces dernières et les fibres IIx et IIb. Les fibres de type IIx sont moins denses en mitochondries et en myoglobine : ce sont les fibres les plus rapides chez l'Homme. Elles se contractent rapidement mais ne peuvent soutenir des efforts prolongés. Elles présentent un métabolisme oxydo-glycolytique. L'acquisition des isoformes adultes de type I et de type II a lieu tout au long de la vie foetale, ce qui permet d'obtenir, à la naissance, des muscles

différenciés de type lent, mixte ou rapide, selon les proportions et la qualité des fibres qui les composent. Les MRF sont impliqués dans la détermination et la régulation des phénotypes lent et rapide. Ainsi, MyoD est principalement exprimé dans les fibres rapides alors que la myogénine est préférentiellement retrouvée dans les fibres lentes (Hughes et al., 1993). L'activité électrique est également essentielle à la détermination du phénotype musculaire et favorise l'établissement des fibres lentes (Schiaffino et al., 2007). Ces effets sont médiés par le calcium qui active notamment la voie de signalisation des protéines kinases calmoduline-dépendantes, CaMK, qui elles-mêmes activent la calcineurine (Chin et al., 1998). Deux facteurs de transcription agissent en aval de la calcineurine, NFAT et Mef2 qui régulent l'expression de gènes définissant le phénotype lent (Friday et al., 2003; Friday and Pavlath, 2001). La voie de signalisation Ras/MAPK/ERK, activée suite à l'innervation, participerait elle aussi à différenciation des fibres lentes (Murgia et al., 2000). Ainsi, la dénervation des fibres induit une transition du phénotype lent vers rapide, alors que l'électrostimulation, favorise la transition inverse. Enfin, il a aussi été montré que lors d'exercices physiques particuliers ou en cas de pathologies, des transitions entre fibres lentes et fibres rapides pouvaient avoir lieu.

Chez la Drosophile, on trouve également deux types de muscles ayant des propriétés contractiles et métaboliques distinctes. En effet, de la même façon que chez les vertébrés, les muscles de la Drosophile expriment des isoformes de myosines spécifiques et ont des propriétés métaboliques différentes. Ainsi, la première catégorie contient les muscles de vol qui sont généralement considérés comme ayant un métabolisme oxydatif et expriment une isoforme de la myosine leur donnant la propriété de se contracter rapidement. À l'inverse, les muscles embryonnaires et les muscles adultes autres que ceux du vol ont de faibles capacités oxydatives et ont une vitesse de contraction faible (Feala et al., 2007; Swank et al., 2002). Comme chez les vertébrés, l'innervation des fibres musculaires est impliquée dans la détermination du type de muscles. En effet, chez la mouche adulte la détermination des muscles de vol de type DVM (oxydatif) est dépendante de leur association avec les motoneurones (Fernandes and Keshishian, 2005).

III.2. Le métabolisme musculaire

III.2.1. Plasticité musculaire

Les muscles remplissent des fonctions vitales pour l'organisme comme la locomotion, la respiration, la thermogenèse, la régulation du métabolisme des lipides et des glucides. Il est donc primordial d'assurer le maintien d'une masse musculaire adéquate pour répondre aux besoins de l'individu. Ainsi, le muscle est un organe doté d'une grande plasticité lui permettant de s'adapter à la plupart des situations physiologiques ou pathologiques (Stewart and Rittweger, 2006). Il va en effet au cours de son développement être soumis à différents stress énergétiques, tels que des déficits en apport énergétique (déficit en glucose, en oxygène…) et/ou des augmentations en demande énergétique (croissance, contraction intense…). Pour faire face à ces perturbations, il utilise différentes stratégies comme la modification de la taille des fibres musculaires en régulant la synthèse protéique, le changement d'un type métabolique vers un autre (fibre lente vers fibre rapide ou l'inverse) ou la régénération musculaire à partir des cellules satellites. L'altération de ces fonctions de régulation entraîne d'importants désordres métaboliques à l'origine de pathologies, comme le diabète de type 2 ou les myopathies métaboliques.

III.2.2. Régulation du métabolisme musculaire

Métabolisme énergétique

Toutes les cellules d'un organisme ont besoin d'énergie pour remplir leurs fonctions et notamment les cellules musculaires qui vont être sujetes à une demande énergétique très importante lors de la contraction musculaire. Cette énergie est apportée par l'hydrolyse de molécules d'ATP (Adénosine TriPhosphate). L'ATP va permettre le glissement relatif des filaments d'actine et de myosine, ainsi que l'activation des transporteurs de calcium ATP-dépendants dans la cellule musculaire au cours de la contraction. On distingue 3 sources principales à partir desquelles la cellule musculaire produit de l'ATP: le système créatine-phosphate, la glycolyse anaérobie et les phosphorylations oxydatives mitochondriales. Chez les vertébrés, la phosphocréatine est la principale forme de stockage de l'ATP dans le

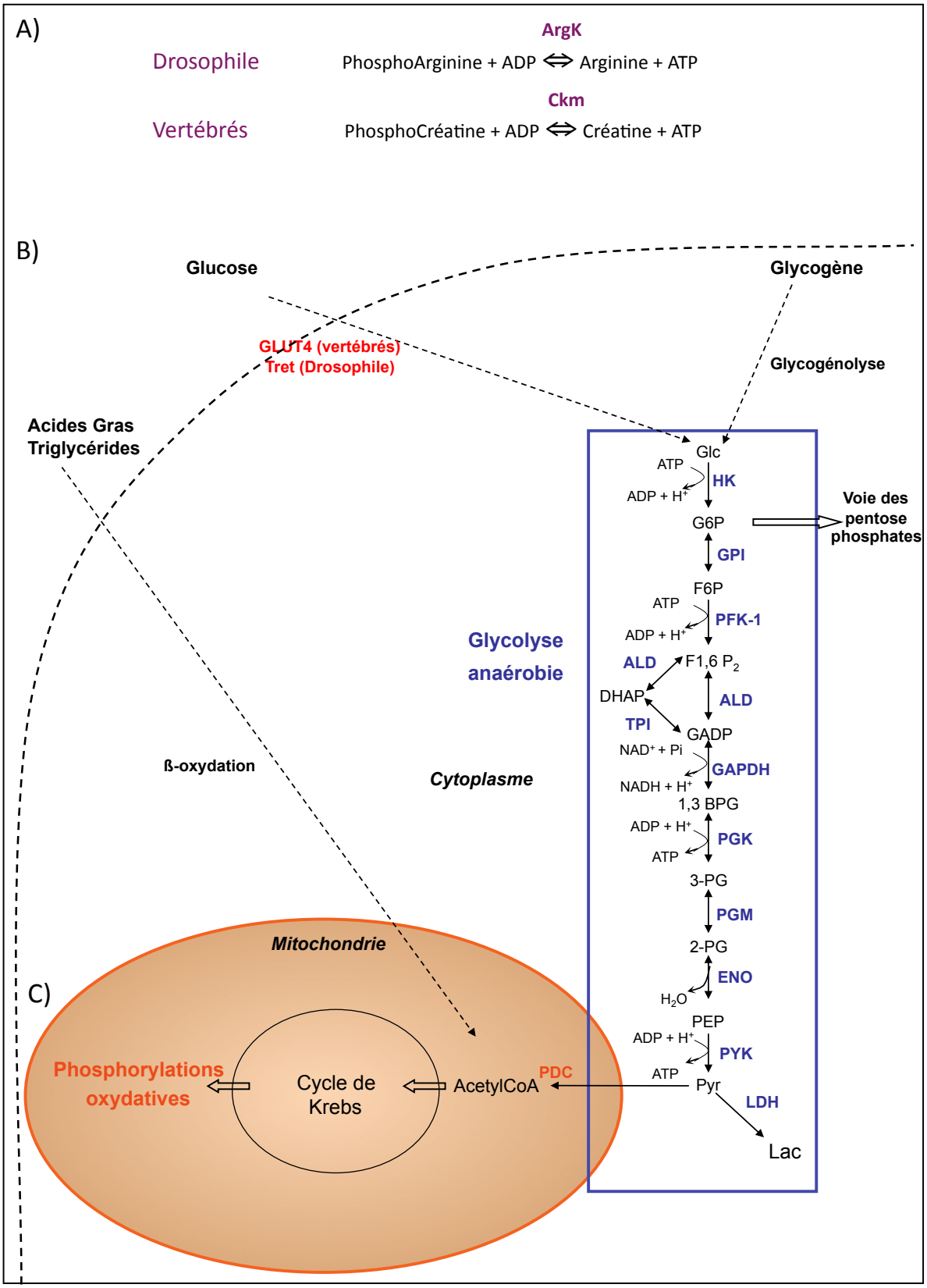


Figure 24 : Principales sources d'ATP musculaire

L'ATP est stocké sous forme de phosphocréatine chez les vertébrés, et de phosphoarginine chez la Drosophile A). Il peut également être généré par B) la glycolyse anaérobie ou par les phosphorylations oxydatives mitochondriales

muscle qui va pouvoir être libérée par l'action de la créatine kinase et fournir rapidement de l'énergie pendant les premières secondes de la contraction. L'équivalent de la phosphocréatine chez la Drosophile est la phosphoarginine qui permet la formation d'ATP grâce à l'arginine kinase **(Fig. 24A)** La glycolyse anaérobie correspond à la dégradation du glucose en pyruvate suivie de sa conversion en lactate:deux molécules d'ATP sont générées suite à la dégradation d'une molécule de glucose **(Fig. 24B)**. Enfin, les phosphorylations oxydatives permettent la production d'ATP dans les mitochondries à partir de molécules d'Acétyl-CoA, provenant soit de la conversion du pyruvate issu de la glycolyse (anaérobie), soit de la β-oxydation des acides gras (aérobie) **(Fig. 24C)**. L'oxydation complète d'une molécule de glucose (dégradation par la glycolyse, transformation en Acétyl-CoA et cycle de Krebs/phosphorylations oxydatives) génère 36 à 38 molécules d'ATP (dont 2 provenant de la glycolyse).

Des mutations dans une grande partie des gènes codant pour les enzymes de la glycogénolyse ou de la glycolyse ont été retrouvées associées à des myopathies métaboliques, appelées glycogénoses, montrant l'importance du métabolisme énergétique, et plus particulièrement d'origine glucidique, dans le fonctionnement musculaire (Tein, 1996). La glycolyse est une voie métabolique comprenant une suite de 10 réactions enzymatiques permettant de générer de l'ATP à partir de molécules de glucose **(Fig. 24AB)**. Elle se déroule dans le cytoplasme des cellules et son produit final est le pyruvate. Si la glycolyse a lieu en conditions aérobies, le pyruvate peut entrer dans les mitochondries et être converti en Acétyl-CoA par le complexe Pyruvate Deshydrogenase (PDC) afin de permettre la formation de molécules d'ATP supplémentaires par l'intermédiaire du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Dans une situation où la cellule est en carence d'oxygène, le pyruvate est préférentiellement métabolisé en lactate par fermentation pour permettre le recyclage des coenzymes indispensables à la poursuite de la glycolyse. Le métabolisme essentiellement glycolytique (suivi de la fermentation du lactate) est caractéristique des fibres rapides de type II.

La glycolyse se divise en deux phases :la première utilise de l'énergie alors que la deuxième en produit. Trois des dix réactions enzymatiques sont irréversibles et parmi elles, deux sont régulées par l'insuline chez les vertébrés (voir partie III.2).

De façon intéressante, la première réaction de la glycolyse qui aboutit à la formation du glucose-6-phosphate (G6P), n'est pas spécifique de la glycolyse, le G6P pouvant entrer dans la voie des pentoses phosphates. Le glucose peut provenir de la dégradation des stocks de glycogène par la glycogénolyse ou bien de l'entrée de glucose sanguin dans la cellule musculaire. Chez les vertébrés, le transporteur de glucose principal dans les muscles squelettiques est GLUT4 (GLUcose Transporter 4) qui est stocké dans des vésicules intracellulaires et dont la translocation à la membrane est stimulée par l'insuline (Klip et al., 1990). Chez la Drosophile, le principal sucre qui circule dans l'hémolymphe n'est pas du glucose mais du tréhalose qui va pouvoir entrer dans les cellules , très probablement grâce au transporteur de tréhalose Tret-1 où il sera converti en deux molécules de glucose par l'action de la tréhalase (Kanamori et al., 2010). Les étapes et enzymes qui interviennent dans la suite de la glycolyse sont conservées entre les vertébrés et la Drosophile.

Contrôle de la masse musculaire

La régulation de la masse musculaire résulte de la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires. L'augmentation de la synthèse protéique conduit à l'hypertrophie musculaire, observée lors de la croissance ou à l'âge adulte, lors d'une activité musculaire soutenue, alors que l'atrophie musculaire, observée lors du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, résulte d'une dégradation protéique accrue.

Rôle de la voie insuline

Une des voies fondamentale impliquée dans la régulation de la croissance musculaire est la voie PI3K/Akt qui est activée par les facteurs de croissance de type insuline (IGF, Insulin like Growth Factors) et l'insuline elle-même (Schiaffino and Mammucari, 2011). En effet, la voie PI3K/Akt joue un rôle central dans le contrôle de la masse musculaire, pouvant à la fois stimuler la synthèse protéique et inhiber leur dégradation. Elle favorise donc le développement de l'hypertrophie musculaire (Rommel et al., 2001).

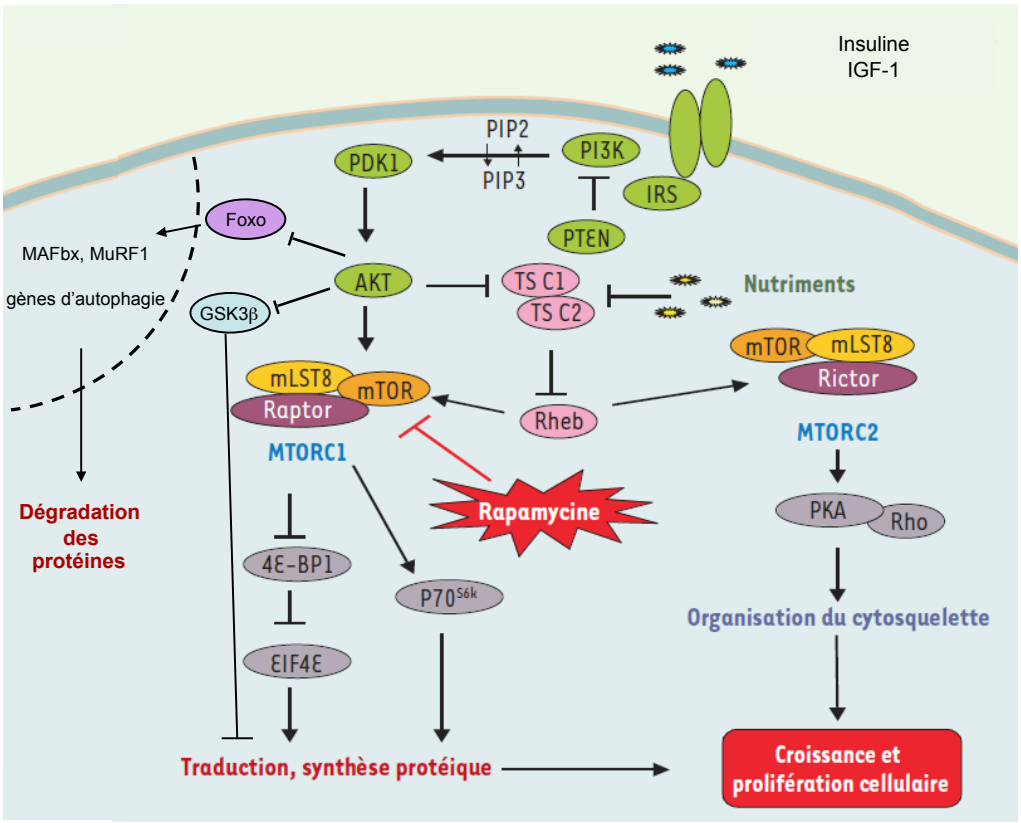


Figure 25 : Régulation de la croissance musculaire par la voie insuline chez les vertébrés

D'après Pallet, Anglicheau, 2006

Chez les vertébrés, on regroupe sous le terme « signalisation insuline » les voies de signalisation faisant intervenir l'insuline elle-même mais également les IGF **(Fig. 25)**. Les effets de ces peptides résultent de leur liaison aux récepteurs de l'insuline (RI) ou au récepteur de l'IGF (IGF-RI) présents à la surface des cellules. Les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 sont structurellement très proches, ainsi l'insuline peut se lier au IGF-RI1 et l'IGF-1 au RI. De plus ils sont tous les deux capables d'activer la voie PI3K/Akt. Cependant, l'association de l'IGF-1 sur son récepteur IGF-RI1 est le plus puissant inducteur de la voie PI3K/Akt1, capable d'induire une hypertrophie musculaire, alors que l'insuline via sa liaison au RI active Akt2, important pour la régulation de l'homéostasie du glucose (Cho et al., 2001a; Cho et al., 2001b). Ces deux récepteurs sont particulièrement exprimés dans le foie et les muscles (Bailyes et al., 1997).

Suite à la fixation de l'IGF-1 sur son récepteur, ce dernier va s'autophosphoryler et phosphoryler les protéines IRS (Insulin receptor substrate) présentes dans le cytoplasme. Deux grandes voies de signalisation vont alors pouvoir être activées : la voie PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase), impliquée dans la croissance musculaire et que nous décrirons plus particulièrement, mais également la voie MAPK/RAF/MEK/ERK, nécessaire à la prolifération des myoblastes (mitogen-activated protein kinase) (Kim and Kahn, 1997; Rommel et al., 2001). Les IRS phosphorylés recrutent et activent PI3K qui va phosphoryler le phospholipide membranaire PIP2 en PIP3, permettant l'activation d'Akt/PKB (Protein Kinase B). Les trois effecteurs des propriétés hypertrophiques de la voie PI3K/AKT sont les kinases mTOR (Target Of Rapamycin), et GSK3β (Glycogène Synthase Kinase 3β) qui contrôlent la synthèse protéique et les facteur de transcriptions de la famille FoxO qui régulent la dégradation des protéines. Akt phosphoryle et inhibe le complexe protéique TSC1-TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex) induisant l'activation de la protéine G Rheb (Ras homolog enriched in brain) qui à son tour active la kinase mTOR. mTOR va alors pouvoir former le complexe protéique TORC1 en s'associant avec Raptor (Kim et al., 2002). Ce complexe stimule la traduction des protéines, d'une part en inactivant par phosphorylation 4E-BP1 (4 eIF4E Binding Protein), répresseur du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, et d'autre part en activant la kinase des protéines ribosomales S6, S6K, qui régule la traduction des protéines

ribosomales et la biogenèse des ribosomes (Bjornsti and Houghton, 2004). GSK3β bloque l'action du facteur d'initiation eIF2B et est inhibée par Akt, activant également la synthèse protéique (Rommel et al., 2001). Enfin, Akt inhibe l'activité des facteurs de transcription FoxO par phosphorylation, provoquant leur exclusion du noyau. Les facteurs FoxO agissent sur la protéolyse en activant deux voies de dégradation des protéines. Tout d'abord, ils stimulent le système ubiquitine-protéasome en activant la transcription des gènes codant les ubiquitine-ligases atrogin-1 (ou MAFbx) et MuRF1 (Muscle Ring Finger 1) (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). De plus, ils sont capables d'induire la voie de dégradation des protéines par autophagie en activant l'expression des gènes *LC3* et *Bnip3* (Mammucari et al., 2007). Enfin, FoxO est capable d'activer la transcription de 4E-BP et donc d'empêcher l'initiation de la traduction.

L'insuline joue également un rôle important dans l'homéostasie glucidique. Tout d'abord, elle favorise l'entrée du glucose dans les cellules musculaires en stimulant la translocation des vésicules contenant les transporteurs GLUT-4 de l'intérieur des cellules au niveau de la membrane. Ce processus est permis par l'activation de PI3K en réponse à la liaison de l'insuline sur son récepteur. PI3K active d'une part Akt et les PKC ζ et λ (Protein Kinase C) et d'autre part Rac1 permettant à la fois de lever le signal qui maintenait les vésicules à l'intérieur de la cellule et de permettre la polymérisation de l'actine. Les vésicules vont alors pouvoir migrer le long des faisceaux d'actine et fusionner à la membrane plasmique (Randhawa et al., 2008). Les transporteurs de glucose se retrouvent alors exposés à la membrane où ils vont pouvoir prendre en charge le glucose circulant. L'insuline favorise également l'utilisation du glucose à l'intérieur des cellules. En effet, elle est capable de stimuler le stockage du glucose sous forme de glycogène (augmentation de la glycogenogenèse et diminution de la glycogenolyse) et favorise sa dégradation par la glycolyse. L'activation de la glycogénogenèse est le résultat de l'activation de la glycogène synthase et de l'inhibition de la GSK3β (connue pour inactiver la glycogène synthase), tandis que l'inhibition de la glycogène phosphorylase empêche la glycogénolyse. L'activation de la glycolyse par l'insuline se fait par la régulation positive de l'hexokinase et de la phosphofructokinase (Dimitriadis et al., 2011).

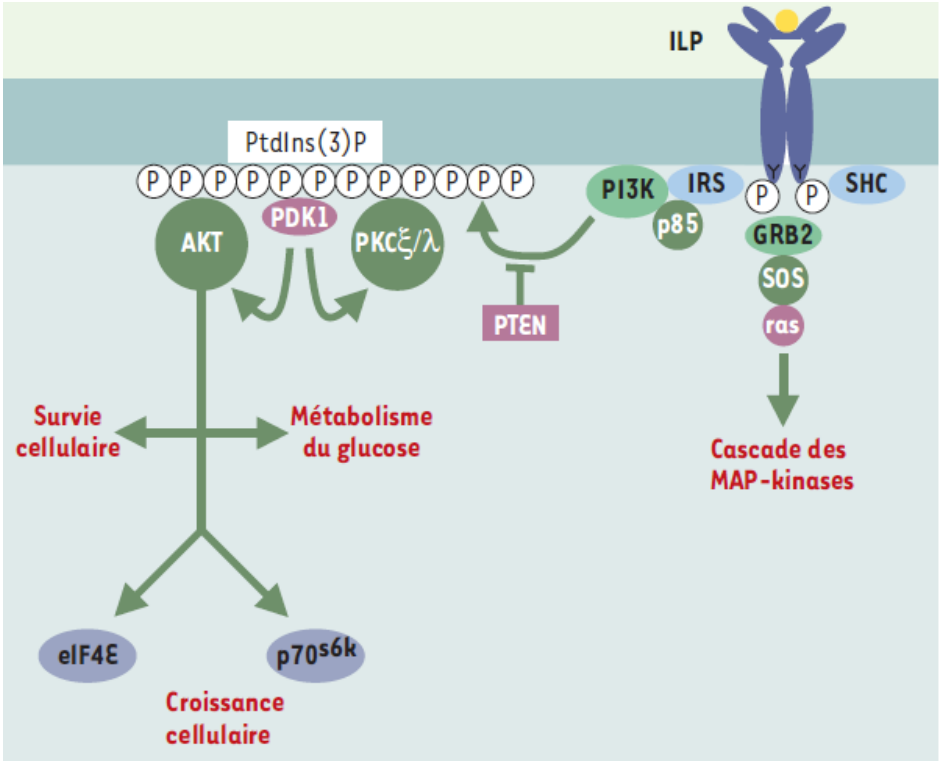


Figure 26 : Conservation la voie insuline chez la Drosophile

D'après Raisin, Pantalacci et Léopold, 2002

La voie insuline est, comme la plupart des grandes voies métaboliques, hautement conservée chez la Drosophile **(Fig. 26)** (Garofalo, 2002). En réponse à des concentrations élevées de sucres dans l'hémolymphe, il y a sécrétion de molécules de type insuline appelées DILP (Drosophila Insulin-Like Peptides). Ces molécules sont sécrétées par deux groupes de neurones appelés IPC (Insulin Producing Cells), chacun localisé dans un hémisphère du système nerveux (Rulifson et al., 2002) et agissent sur un récepteur unique InR (Insulin Receptor). Après fixation de ces peptides sur leur récepteur, les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt pourront être induites, de la même façon que chez les vertébrés. Ainsi, la voie MAPK serait responsable des effets proliératifs observés lors d'une surexpression de l'InR alors que la voie PI3K/Akt contrôlerait la croissance et le métabolisme. Contrairement au différentiel observé chez les vertébrés dans la contribution de l'insuline et des IGF à la voie PI3K/Akt, les DILP relaient donc à la fois les fonctions métaboliques et les fonctions de croissance de la voie insuline. En effet, chaque acteur de la voie insuline chez les vertébrés ne possède qu'un orthologue chez la Drosophile, rendant indissociable la régulation de ces deux processus. L'activation de la voie PI3K/Akt régule positivement la croissance en augmentant la synthèse des protéines en contrôlant 4E-BP et S6K, et en diminuant leur dégradation en inhibant l'activation de 4E-BP par FoxO, comme il a été montré lors de la croissance des muscles larvaires (Demontis and Perrimon, 2009). Elle régulerait également le métabolisme du glucose *via* GSK3. Cependant, à ce jour aucun rôle de l'insuline sur la régulation de l'entrée de glucose/tréhalose dans les cellules n'a été mis en évidence chez la Drosophile.

Implication de la glycolyse dans la synthèse protéique

Le rôle le plus communément admis de la glycolyse est, comme nous l'avons vu précédemment, la production d'énergie. La glycolyse a cependant un deuxième rôle non négligeable dans la formation des précurseurs nécessaires à la formation des protéines. Elle participe en effet à la synthèse des nucléotides, par l'intermédiaire de la voie des pentoses phosphate, et des acides aminés. Les acides aminés sont les briques de construction des protéines. Leur synthèse exige un squelette carboné et une source de groupements aminés. Le squelette carboné des

acides aminés est fourni par des intermédiaires des grandes voies métaboliques notamment la glycolyse, la voie des pentoses phosphate et le cycle de Krebs. Au cours de la glycolyse, il a formation du phosphoenolpyruvate, du 3-phosphoglycerate et du pyruvate. Le 3-phosphoglycerate fournit le squelette carboné nécessaire à la formation de la sérine, elle-même précurseur de la glycine. Le phosphoenolpyruvate permet la formation de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Le pyruvate intervient dans la structure da l'alanine, la valine et la leucine. La voie des pentoses phosphate permet la formation du ribose-5-P et de l'erythrose-4-phosphate, nécessaires respectivement à la formation de l'histidine et de la phénylalanine, la tyrosine et du tryptophane.

PROJET DE THESE

Projet de thèse

Les mécanismes aboutissant à la formation des muscles et les gènes impliqués dans leur régulation ont été intensément étudiés, cependant il subsiste de nombreuses zones d'ombre dans la compréhension du développement musculaire. Comme nous avons pu le voir, le développement du système musculaire chez les vertébrés et chez les invertébrés, notamment la Drosophile, montre de nombreuses similitudes. Or, la myogenèse chez la Drosophile est un système simplifié et facilement accessible à des analyses génétiques. En tenant compte de l'importante conservation des voies myogéniques au cours de l'évolution et étant donné les avantages que présente la Drosophile en terme, par exemple, d'outils génétiques, nous nous proposons d'étudier le rôle de gènes conservés entre la Drosophile et les vertébrés dans le développement musculaire. L'originalité de cette étude réside dans l'approche multi-organismes ainsi que sur le crible fonctionnel basé sur une technique mettant en jeu l'ARN interférence (ARNi).

La première partie de mon travail de thèse avait pour but de réaliser un crible à grande échelle afin de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la myogenèse. Pour cela, j'ai tout d'abord utilisé une approche *in silico* à partir des bases de données du poisson-zèbre (Zfin) et de la Drosophile (BDGP) afin d'établir une liste de gènes conservés et exprimés dans les compartiments musculaires chez ces deux espèces. J'ai ensuite regroupé ces gènes par catégories et testé l'implication d'une partie d'entre eux dans la myogenèse embryonnaire de la Drosophile. Pour cela, j'ai utilisé une approche basée sur l'ARN interférence et permettant l'observation du développement musculaire *in vivo*.

L'analyse fonctionnelle plus approfondie des gènes les plus pertinents identifiés au cours du crible a ensuite été effectuée. Pour cela, les profils d'expression des gènes ayant donné des phénotypes après ARN i ont été établis afin de sélectionner ceux qui étaient exclusivement exprimés dans les compartiments musculaires. Ainsi, cinq gènes ont été choisis suivant ce critère et également en fonction du phénotype

musculaire observé après ARN interférence et de données de la littérature. J'ai tout d'abord confirmé les résultats obtenus lors du crible en utilisant des lignées hypomorphes, perte de fonction ou UAS-ARNi. Les phénotypes musculaires ont également été décrits plus précisément dans le but de mettre en évidence l'étape de la myogenèse qui était affectée

Un des gènes sur lesquels l'analyse fonctionnelle a été approfondie est le gène *Pglym78* impliqué dans le métabolisme et plus précisément dans la glycolyse. Ce gène nous a semblé particulièrement intéressant car il est exprimé spécifiquement dans les muscles somatiques et, lorsqu'il est atténué, donne des défauts de différenciation musculaire caractérisés par un blocage de la fusion des myoblastes et la formation de fibres musculaires plus fines. De manière plus générale, j'ai mis en évidence que l'ensemble des gènes de la glycolyse était impliqué dans la poursuite du développement musculaire. De plus, ce phénomène semble dépendant de la voie insuline révélant ainsi l'existence d'un lien entre le métabolisme et le développement musculaires.

RESULTATS

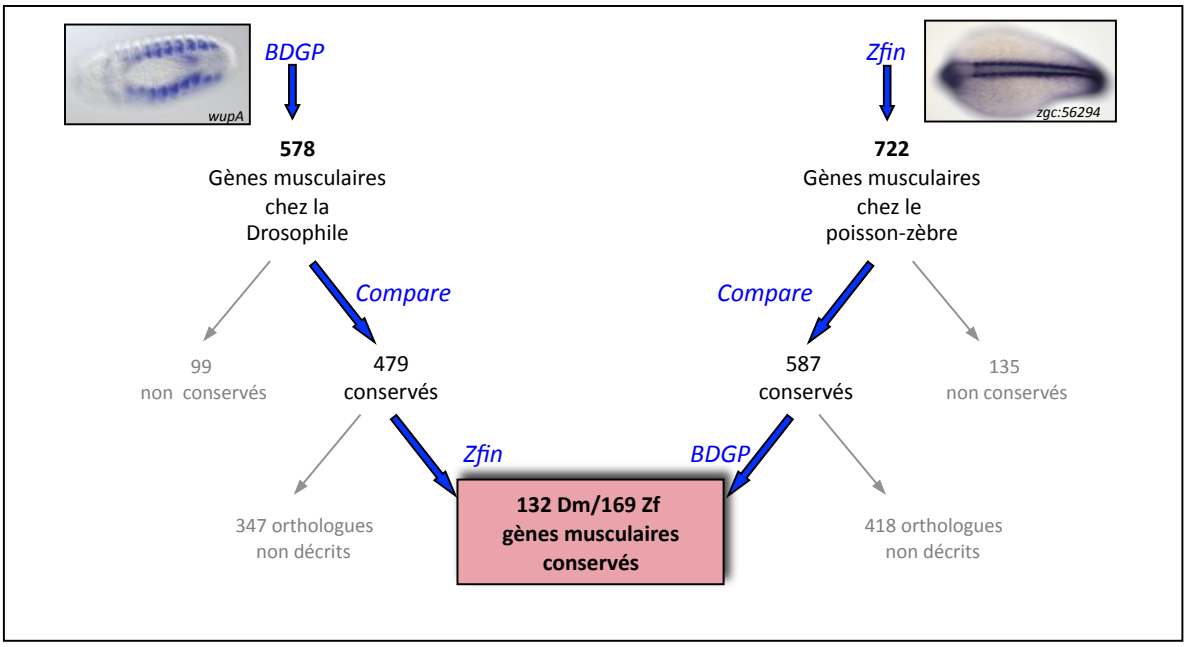


Figure 27 : Stratégie de sélection des gènes candidats

Les bases de données de profils d'expression BDGP et Zfin ont été utilisées pour sélectionner l'ensemble des gènes exprimés dans des compartiments musculaires et le logiciel compare pour rechercher les orthologues

RESULTATS

I. RECHERCHE DE NOUVEAUX GENES IMPLIQUES DANS LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE PAR CRIBLE RNAi

I.1. Sélection des gènes candidats par une approche *in silico*

La première étape de mon travail a été de sélectionner des gènes candidats conservés en termes de séquences et qui s'expriment au cours du développement musculaire chez l'embryon de la Drosophile et du poisson zèbre. Cette sélection a été faite *in silico* à partir de plusieurs bases de données. J'ai tout d'abord utilisé les bases de données BDGP (http://www.fruitfly.org/) et Zfin (http://zfin.org) qui donnent respectivement accès aux profils d'expression de gènes chez la Drosophile et le poisson-zèbre, afin de sélectionner l'ensemble des gènes exprimés dans des compartiments musculaires pour chacune des deux espèces. Dans la base de données BDGP, l'ensemble des gènes répondant aux termes « somatic muscle primordium » « embryonic/larval muscle system » et « embryonic/larval somatic muscle » ont été sélectionnés. En parallèle, chez le poisson-zèbre, les gènes dont l'expression dans Zfin était décrite par le terme « somite » aux stades embryonnaires ont été ressortis. Ainsi, les profils d'expression disponibles en juillet 2011 permettent de discriminer 722 gènes musculaires chez le poisson-zèbre et 578 chez la Drosophile **(Fig. 27)**. L'étape suivante a consisté à rechercher les orthologues de chacun de ces gènes dans l'autre espèce, c'est-à-dire rechercher les orthologues des 578 gènes drosophiliens chez le poisson-zèbre et *vice versa*. Pour cela, j'ai utilisé la base de données Compare (http://compare.ibdml.univ-mrs.fr). Je n'ai alors sélectionné que les gènes qui étaient conservés et pour chaque orthologue trouvé, j'ai utilisé la base de données appropriée (BDGP pour la Drosophile et Zfin pour le poisson-zèbre) pour savoir si leurs profils d'expression étaient décrits. Ainsi, dans la majorité des cas, j'ai retrouvé les mêmes gènes dans les deux listes, ce qui conforte la sélection, donnant au final un total de 132 gènes candidats chez la Drosophile, correspondant à 169 gènes chez le poisson-zèbre **(voir SuppTab. 1 de l'article)**. Il est à noter que les données contenues dans BDGP et Zfin évoluent très rapidement. Ainsi, ce chiffre fait référence aux données actuellement disponibles dans les bases

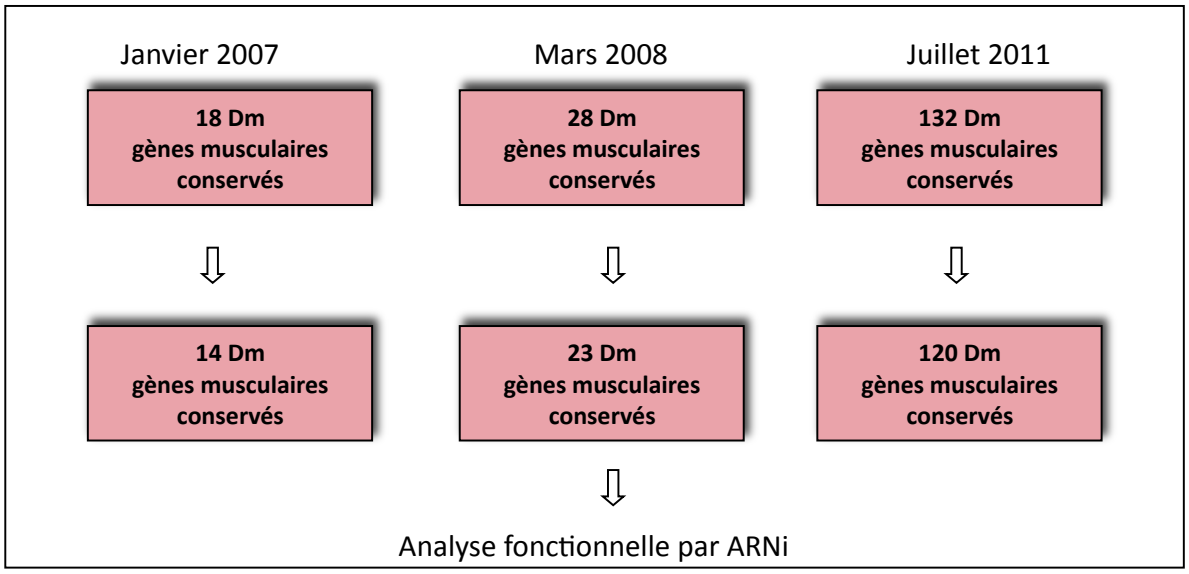


Figure 28 : Evolution du nombre de gènes candidats sélectionnés selon les mises à jour des bases de données

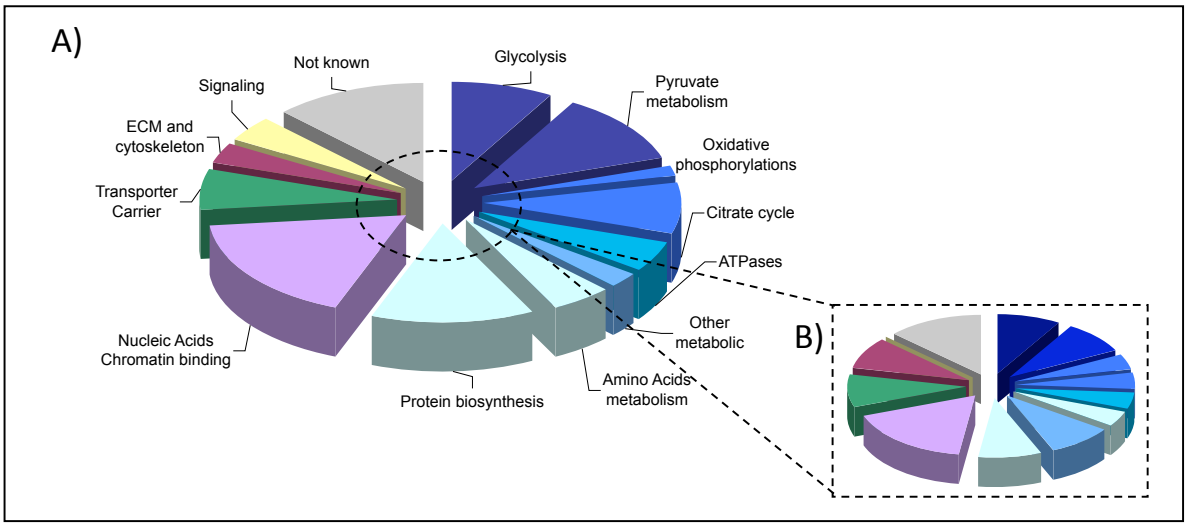


Figure 29 : Classification des gènes candidats

A) Classification de l'ensemble des 132 gènes candidats drosophiliens sélectionnés en juillet 2011 et B) des 23 sélectionnés en mars 2008 et analysés par ARN interférence

de données, mais la première analyse *in silico* que j'avais réalisée avant le début de ma thèse, ne m'avait permet de sélectionner que 18 gènes candidats chez la Drosophile (version de janvier 2007) puis en refaisant la sélection en mars 2008 j'en avais obtenu 28 **(Fig. 28)** (gènes sur fond rouge en **SuppTab 1 de l'article**).

Parmi les 132 candidats, 12 ont une fonction musculaire connue chez la Drosophile (gènes* en **SuppTab 1 de l'article**). On retrouve notamment les gènes *Mef2, Actn, Pax, rst* et *NetA* montrant que la sélection *in silico* que nous avons réalisée permet d'identifier des gènes impliqués dans la myogenèse. Les 120 gènes n'ayant pas de fonction musculaire décrite ont pu être classés en différentes catégories selon les processus dans lesquels ils seraient impliqués. Pour réaliser cette classification, j'ai utilisé l'outil Kegg Mapper qui permet de replacer l'ensemble des gènes impliqués dans les différentes voies décrites par KEGG et Brite (http://www.genome.jp/kegg/mapper.html). Pour les gènes qui ne ressortaient pas de cette analyse, je me suis basée sur les informations de Gene Ontology disponibles dans la base de données Flybase (http://flybase.org/). Les catégories ainsi créées m'ont permis de mettre en évidence une forte proportion de gènes impliqués dans le métabolisme **(Fig. 29A)**. Le muscle étant un tissu nécessitant beaucoup d'énergie, notamment pour la contraction, ce résultat n'apparaît à première vue pas surprenant. Néanmoins, comme nous le verrons par la suite, il semblerait que certains d'entre eux aient également un rôle au cours du développement musculaire.

Comme l'analyse fonctionnelle a été réalisée au début de ma thèse, je n'ai en réalité testé que 23 de ces 120 gènes. En effet, l'analyse *in silico* faite en 2008 n'avait permis de sélectionner que 28 gènes conservés, dont 5 étaient connus. Cependant, la classification de ces 23 gènes est représentative de celle obtenue pour les 120 gènes avec une forte proportion de gènes métaboliques **(Fig. 29B)**.

I.2. Analyse fonctionnelle des gènes candidats par ARN interférence

Afin d'étudier l'implication éventuelle de chacun des 23 gènes candidats au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile, j'ai utilisé une technique basée sur le principe d'ARN interférence (ARNi) (Kennerdell and Carthew, 1998). Elle repose sur l'injection directe

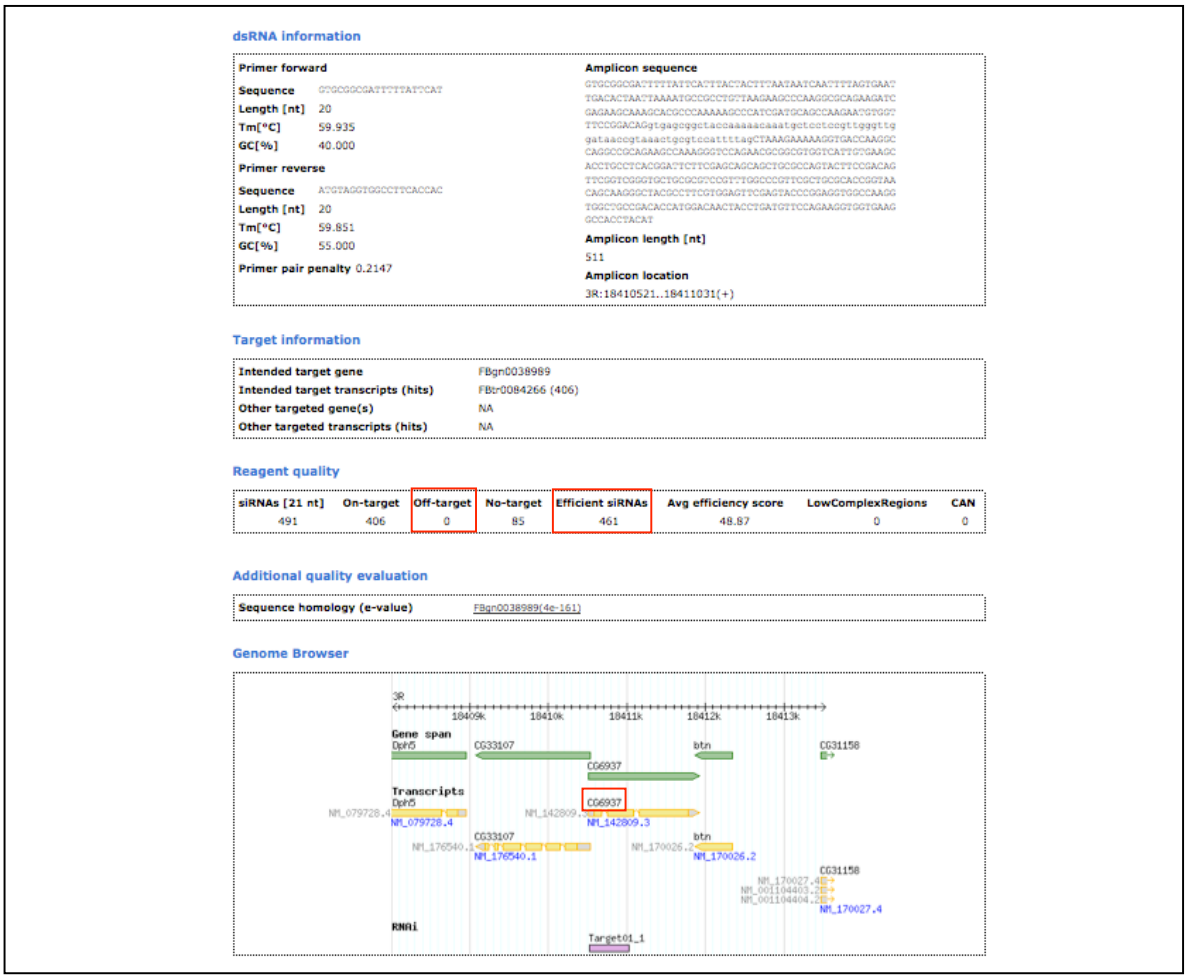


Figure 30 : Evaluation de la spécificité des ARNdb vis-à-vis des gènes candidats grâce au site E-RNAi

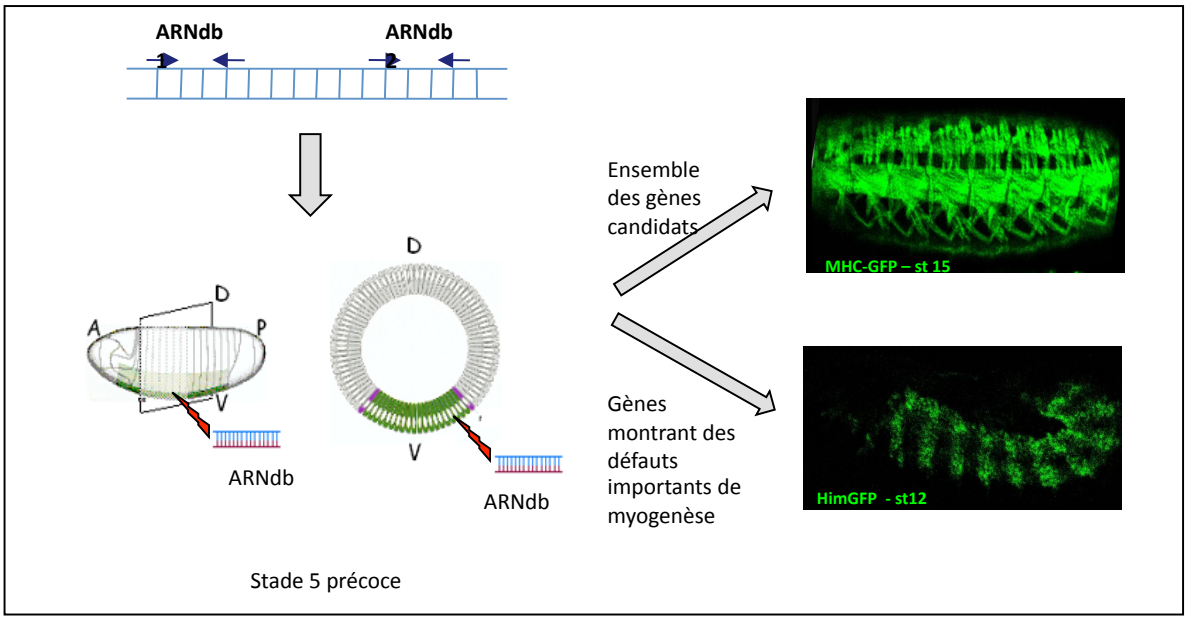


Figure 31 : Stratégie d'analyse des gènes candidats par injection d'ARNdb

Pour chaque gène candidat, deux ARN double brin (ARNdb) différents ont été synthétisés et injectés ventralement dans des embryons transgéniques MHC-GFP au stade blastoderme syncitial. L'observation des phénotypes musculaires était réalisée au stade 15

Pour les gènes induisant des phénotypes importants suite à leur inhibition, les ARNdb ont également été injectés dans des lignées Him-GFP et observés au stade 12

d'ARN double brins (ARNdb) dans des embryons de Drosophile afin d'atténuer l'expression d'un gène donné.

I.2.1. Synthèse des ARN double brin

Pour chaque gène candidat, j'ai dessiné deux couples d'amorces permettant la synthèse de deux ARNdb différents, d'environ 500 paires de bases, ciblant des régions transcrites communes à tous les variants d'épissage prédits et n'ayant pas plus de 18 paires de bases successives en commun avec un autre gène. Ainsi, ces ARNdb pourront être injectés séparément et la comparaison des phénotypes musculaires obtenus dans les deux cas permettra de s'affranchir de tout effet non-spécifique (voir ci-dessous). Afin de valider les séquences choisies pour la synthèse des ARNdb, j'ai utilisé le site E-RNAi (http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/) qui permet d'évaluer la spécificité des ARNdb vis-à-vis du gène ciblé et de rechercher l'existence de potentielles cibles non désirées (similarité de séquence de plus de 18pb avec un autre gène = off-target) **(Fig. 30)**. Une fois les séquences validées j'ai, pour chaque amorce, ajouté à leur extrémité 5' la séquence correspondant au promoteur T7 de façon à permettre la transcription des ARNdb.

I.2.2. Injection des ARNdb

Principe

Les ARN double-brins ciblant chacun des gènes candidats ont été synthétisés puis injectés dans des embryons transgéniques MHC-*tau*GFP exprimant la GFP sous l'influence du promoteur de la myosine musculaire (Chen and Olson, 2001), permettant ainsi de suivre le développement musculaire *in vivo* **(Fig. 31)**. Les injections ont été faites en position ventrale des embryons (zone de début de développement du mésoderme) au stade blastoderme syncitial, avant cellularisation, et chaque embryon injecté a été observé au microscope à fluorescence après environ 12h de développement afin de détecter la structure des muscles au stade 15. Pour chaque ARNdb, un minimum de 50 embryons a été injecté. Pour les gènes induisant l'apparition de défauts musculaires importants comme des anomalies de développement du

mésoderme (voir ci-dessous et **Fig. 32)**, des injections d'ARNdb ont également été réalisées dans des lignées Him-GFP où le développement musculaire est détectable plus tôt. Dans ce cas, les embryons sont observés au stade 12. Ainsi, les gènes requis précocement dans le développement du mésoderme donneront aussi des phénotypes suite à l'injection d'ARNdb dans les embryons Him-GFP. Au contraire, ceux qui sont requis pour la spécification des myoblastes et pouvant engendrer le même type de défauts en MHC-*tau*GFP ne donneront pas de phénotypes en Him-GFP.

Injections contrôle

Pour tester l'efficacité et la spécificité de la technique d'injection, j'ai synthétisé et injecté des ARNdb contrôle. Tout d'abord, en tant que contrôle négatif, j'ai injecté des ARNdb ciblant le gène *LacZ* exogène à la Drosophile. Le but de ces injections était d'estimer la mortalité due à l'injection d'ARNdb et de vérifier qu'elles n'induisaient pas de phénotypes chez les embryons MHC-*tau*GFP. La majorité des embryons est sauvage, certains présentant des anomalies également observées chez des embryons non injectés. La mortalité est de 23% or une mortalité inférieure à 50% est considérée comme satisfaisante pour assurer la validité de cette technique (Estrada et al., 2006).

En ce qui concerne les contrôles positifs, plusieurs gènes connus pour intervenir à différents niveaux de la myogenèse ont été testés, permettant d'observer plusieurs classes de phénotypes. Ainsi, par exemple, l'atténuation de l'expression du gène *lateral muscle specific* (*lms*), gène d'identité intervenant dans la formation des muscles latéraux, provoque une perte des fibres latérales (LT) (Muller et al., 2010). L'inhibition de *myoblast city* (*mbc*), qui est impliqué dans la fusion des myoblastes, provoque des défauts de fusion similaires à ceux observés dans les mutants *Mbc,* caractérisés par des fibres plus fines et la présence de myoblastes non fusionnés **(Supp Fig. 1 de l'article)**(Rushton et al., 1995).

Effet de l'atténuation d'expression des gènes candidats

Comme évoqué précédemment, deux ARNdb distincts on été synthétisés pour chaque gène puis injectés séparément afin de s'assurer que l'effet observé est bien du à l'atténuation du gène ciblé et, dans la plupart des cas, les injections ont été réalisées par deux manipulateurs

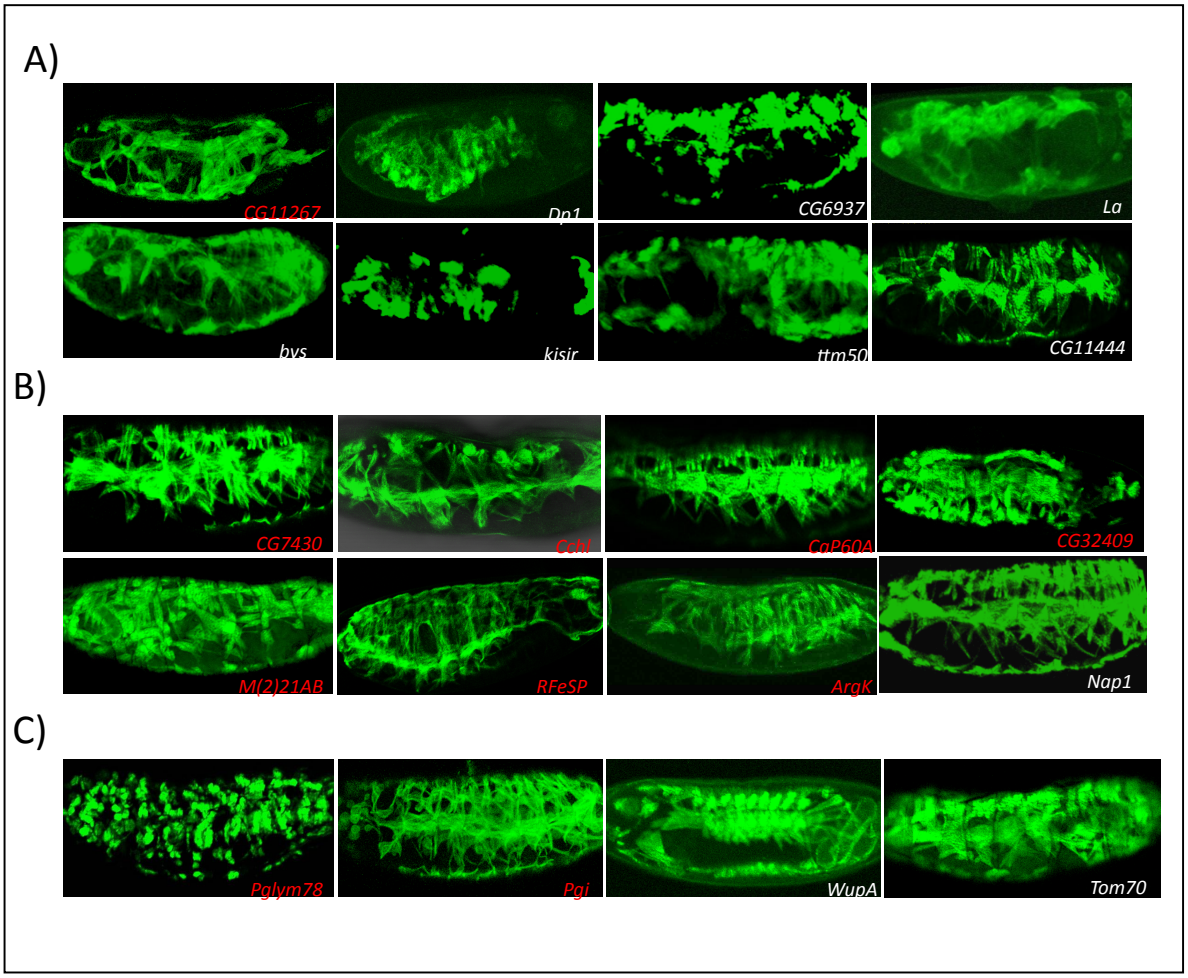


Figure 32 : Phénotypes observés suite à l'injection des ARNdb ciblant les gènes candidats

Suite à l'injection des ARNdb, trois catégories de phénotypes ont été observées au stade 15 suggérant un rôle des gènes dans les étapes A) précoces, B) intermédiaires et C) tardives de la myogenèse embryonnaire de la Drosophile (classification réalisée selon les étapes définies dans l'introduction
Les gènes *CG11267, CG7430, Cchl, Ca-P60A, CG32409, M(2)21AB, RFeSP, ArgK, Pglym78* et *Pgi* sont mzrqués en rouge car ils appartiennent à la catégorie des gènes musculaires (pour détails, voir Supp Tab.1 de l'article)

différents afin d'évaluer les phénotypes sans *a priori*. Les travaux précédemment publiés ont démontré que la technique de microinjections permet d'obtenir des phénotypes dans environ 30% des embryons vivants injectés (Estrada et al., 2006). Pour chaque ARNdb, la létalité, le nombre d'embryons présentant des phénotypes et le nombre d'embryons sauvages ont donc été comptabilisés et les résultats obtenus pour un gène n'ont été validés que si les phénotypes étaient similaires avec les deux ARNdb. Dans le cas contraire, un troisième ARNdb différent était synthétisé et injecté. Suite à l'injection des ARNdb en MHC-*tau*GFP, nous avons pu mettre en évidence l'implication de 20 des 23 gènes candidats dans la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile, les 3 autres gènes ne donnant pas de phénotype. L'analyse des phénotypes observés pour ces 20 gènes a permis de les classer en 3 catégories.

La première catégorie regroupe les gènes dont l'atténuation en MHC-*tau*GFP donne des phénotypes forts, où tous les muscles sont affectés. La majeure partie des muscles n'est pas formée et les quelques fibres qui se développent présentent des défauts de taille et de position **(Fig. 32A)**. Dans certains cas, ces phénotypes sont associés à une forte mortalité embryonnaire. Ces gènes induisent également des phénotypes musculaires après injection dans la lignée Him-GFP (résultats non montrés). L'absence de nombreux muscles, sans spécificité particulière, pourrait être due à des problèmes intervenant lors de la spécification du mésoderme somatique qui donnera toutes les futures fibres musculaires, plutôt qu'à des perturbations plus tardives, qui n'affecteraient que certaines fibres. On parle donc de phénotypes « précoces ».

Une deuxième classe regroupe les gènes qui présentent des phénotypes caractérisés par des défauts de certaines fibres musculaires (**Fig. 32B)**. Suite à l'atténuation de l'expression de *Nap1* par exemple, le nombre de fibres latérales transverses LT, qui sont normalement au nombre de quatre, est réduit. De manière similaire, l'injection d'ARNdb contre le gène *Ca-P60A* provoque majoritairement des défauts dans la musculature ventrale. Ces phénotypes, qui ne touchent que certaines fibres musculaires, sont typiques de problèmes ayant lieu lors de la spécification des myoblastes qui sont à l'origine de ces fibres musculaires. Ils peuvent être assimilés aux phénotypes observés lors de l'atténuation de l'expression du gène contrôle *lms* décrite précédemment. Il est donc possible que ces phénotypes résultent d'une expression anormale

des gènes d'identité qui contrôlent l'acquisition des caractéristiques de la future fibre musculaire. Ainsi, certaines fibres vont manquer ou alors elles vont acquérir une identité différente avec des caractéristiques morphologiques aberrantes. Certaines fibres pourront même adopter l'identité d'une autre et alors on observe des fibres dupliquées. Dans le cas présent, la résolution et le marqueur musculaire utilisés ne nous permettent pas de distinguer les fibres plus larges de celles qui sont dupliquées, mais les effets observés laissent néanmoins supposer que les gènes de cette catégorie auraient un rôle dans la spécification des myoblastes.

Enfin, dans la troisième, on trouve des gènes dont l'atténuation conduit à des défauts de l'ensemble des muscles (**Fig. 32C)**. Contrairement aux phénotypes d'identité spécifiques à certaines fibres, dans cette catégorie, toutes les fibres sont présentes, mais présentent des défauts. Pour le gène *Pgi* par exemple, toutes les fibres sont formées correctement, mais il semblerait qu'elles soient incapables de reconnaître correctement leurs points d'insertion à l'épiderme. Pour *Pglym78* et *WupA,* on observe des muscles arrondis pouvant être le résultat d'un défaut de croissance ou d'attachement des fibres à l'épiderme ou encore de muscle ne parvenant pas à maintenir ces points d'ancrage suite aux premières contractions musculaires. Pour *Tom70*, toutes les fibres sont élargies pouvant résulter d'anomalies de fusion des myoblastes. L'ensemble de ces phénotypes serait donc la conséquence de perturbations ayant lieu lors des étapes tardives du développement musculaire (fusion, attachement, croissance). Ces résultats sont cohérents avec l'expression des 4 gènes de cette catégorie qui est fortement augmentée au cours de ces étapes.

Ce crible par ARNi nous a ainsi permis de mettre en évidence l'implication de 20 nouveaux gènes au cours des différentes étapes du développement musculaire, parmi lesquels un grand nombre de gènes liés au métabolisme est retrouvé (gènes en rouge dans la Figure 30), ce qui suggère un rôle important du métabolisme dans le développement musculaire.

Le but de ce travail était de cribler des gènes candidats par rapport à la sévérité et la spécificité des phénotypes musculaires induits par la diminution de leur niveau d'expression, mais cela ne permet pas d'identifier leur rôle précis au cours de ce processus. Ainsi, des analyses

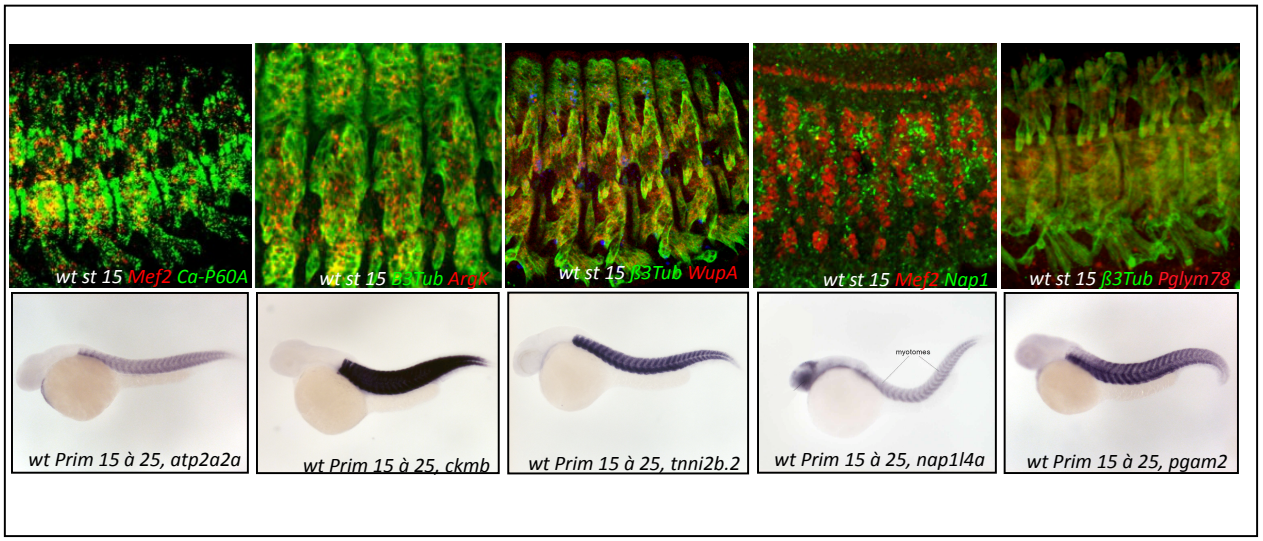


Figure 33 : Expression muscle spécifique des gènes *Ca-P60A, ArgK, WupA, Nap1 et Pglym78* chez la Drosophile et de leurs orthologues chez le poisson zèbre

L'expression des gènes chez la Drosophile a été déterminée par hybridation *in situ* fluorescente couplée à un marquage musculaire (Mef2 ou ßtubuline).
Les profils d'expression des gènes chez le poisson zèbre sont issus de la base de données Zfin

fonctionnelles plus approfondies ont été menées pour identifier le rôle de certains des candidats.

I.3. Établissement des profils d'expression

Suite à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile, nous avons souhaité réaliser une analyse fonctionnelle plus approfondie de certains d'entre eux. Afin de faire un choix parmi les 20 gènes mis en évidence lors du crible, nous avons tenu compte notamment de ce qui était déjà décrit dans la littérature, mais également de leurs profils d'expression chez la Drosophile et les vertébrés. En effet, nous avons voulu privilégier les gènes exprimés exclusivement dans les compartiments musculaires chez les deux espèces car lors de l'injection des ARNdb chez la Drosophile (et de morpholinos chez le poisson-zèbre), bien que celle-ci soit réalisée en position ventrale pour maximiser la probabilité d'atténuer les gènes exprimés au niveau mésodermique, il est possible que l'on affecte également la fonction de ces gènes dans d'autres compartiments. La sélection *in silico* des gènes candidats a été réalisée de façon à prendre en compte les gènes exprimés *au moins* dans les compartiments musculaires, ce qui ne veut pas dire que cette expression soit restreinte à ces tissus. En sélectionnant des gènes exprimés uniquement dans ces compartiments, on s'assure que le phénotype observé est bien le reflet d'une fonction musculaire. Or, les données disponibles dans BDGP ne permettent pas de déterminer précisément l'expression d'un gène. J'ai donc réalisé pour les 20 gènes présentant des phénotypes des expériences d'hybridations *in situ* (Junion et al., 2007) qui, grâce à une colocalisation avec un marqueur musculaire (β3-tubuline ou Mef2) m'ont permis de mettre en évidence que 7 des 20 gènes ont une expression «muscle spécifique». De plus, cinq d'entre eux semblent aussi présenter une expression exclusive dans les compartiments musculaires chez le poisson zèbre d'après Zfin. Ce sont les gènes *Pglym78, Nap1, Ca-P60A, ArgK* et *WupA* que nous avons donc entrepris d'analyser chez la Drosophile et, lorsque cela était possible, chez une autre espèce afin d'évaluer leur conservation fonctionnelle (**Fig. 33)**.

II. ANALYSE FONCTIONELLE DE *Pglym78* ET MISE EN EVIDENCE D'UNE TRANSITION METABOLIQUE NECESSAIRE POUR LA POURSUITE DE LA MYOGENESE

II.1. Présentation de l'Article

La majeure partie de mon travail a été de réaliser l'analyse fonctionnelle approfondie du gène *Pglym78,* travail dont les résultats sont actuellement soumis à la publication.

Pglym78 code pour une enzyme impliquée dans la glycolyse. Ce gène nous a semblé particulièrement intéressant du fait des phénotypes observés après injections d'ARNdb caractérisés par des muscles arrondis et parce qu'il est exprimé spécifiquement dans les muscles somatiques à partir du stade 14 chez la Drosophile (11h après la ponte), comme son orthologue, *pgam2,* qui présente un profil d'expression tardif et muscle-spécifique chez le poisson-zèbre (**Fig. 33)**. De plus, un grand nombre de gènes de la glycolyse est impliqué dans des pathologies musculaires chez l'homme, sans que leur rôle au cours de la myogenèse n'ait été clairement établi (DiMauro and Lamperti, 2001).

Dans l'article ci-après, nous décrivons dans un premier temps le crible *in silico* et l'analyse par ARN interférence de la fonction des gènes candidats dans la myogenèse embryonnaire qui ont conduit à l'identification du gène *Pglym78* **(Fig.1 de l'article,** détaillée dans la partie I).

Par la suite, nous avons établi les profils d'expression de la majorité des gènes de la glycolyse, montrant que, comme *Pglym78,* ils présentent un profil d'expression muscle spécifique à partir du stade 14. Ces résultats sont confortés par le fait que l'activité enzymatique de la dernière enzyme de la glycolyse, la pyruvate kinase (PyK), augmente également au stade 14 **(Fig.2 de l'article)**. Il y a donc au moment des étapes tardives du développement musculaire emrbyonnaire, une augmentation de la glycolyse. De plus, l'inhibition de l'expression de ces gènes, qui conduit à un blocage de la glycolyse, comme le montre la diminution de l'activité PyK en contexte Mef>ARNi*Pglym78* **(Fig.4 de l'article)**, induit des phénotypes musculaires similaires caractérisés par des fibres visuellement plus fines **(Fig.2 de l'article)**, indiquant des défauts probables de différenciation musculaire terminale. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la glycolyse au stade 14 est nécessaire pour la poursuite de la myogenèse. De plus,

l'inhibition de l'orthologue de la lactate déshydrogénase, le gène *Impl3,* conduit aux mêmes types de phénotypes musculaires que le blocage des gènes de la glycolyse, montrant l'implication de la fermentation lactique et donc de la glycolyse anaérobie dans la myogenèse. Ce « switch » métabolique n'est pas sans rappeler celui qui se produit dans les cellules cancéreuses afin de permettre leur prolifération. On qualifie ce phénomène d'effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009) : afin de supporter les importantes demandes métaboliques indispensables à leur prolifération, les cellules cancéreuses augmentent la dégradation du glucose par la glycolyse anaérobie (suivie de la fermentation lactique), alors que la sollicitation des mitochondries est diminuée. On pense que cette transition métabolique intervient pour favoriser la synthèse de la biomasse nécessaire à la production de nouvelles cellules. Dans le cas du développement musculaire chez la Drosophile, un changement métabolique similaire en faveur de la glycolyse anaérobie aurait lieu afin de permettre la synthèse de la biomasse nécessaire à la poursuite du développement musculaire. Ceci expliquerait les défauts observés, caractérisés par des fibres plus fines, lorsqu'on bloque la glycolyse.

Afin de mettre en évidence les étapes précises affectées suite à l'inhibition des gènes de la glycolyse, nous avons voulu décrire plus précisément ces phénotypes musculaires. Les fibres fines laissant penser à des problèmes de fusion des myoblastes, nous avons, suite à l'inhibition de l'expression de *Pglym78* (lignée ARNi) comptabilisé les noyaux dans deux muscles distincts : ceux exprimant le gène d'identité Lb dans le SBM et ceux exprimant Eve dans le DA1. Cela nous a permis d'observer une diminution du nombre de noyaux dans ces fibres en fin d'embryogenèse, reflétant un défaut de fusion des myoblastes. De plus, les muscles SBM et DA1 ont été mesurés et ils sont significativement plus fins **(Fig.3 de l'article)**. En suivant le recrutement du nombre de noyaux au cours du temps, on constate que dès lors que la glycolyse est inhibée, il y a arrêt de la fusion **(Fig.4 de l'article)**, suggérant que le switch métabolique vers la glycolyse agirait comme un point de contrôle signalant à la cellule musculaire qu'elle est dans des conditions métaboliques favorables à la poursuite de sa différenciation.

Pour comprendre comment la glycolyse intervient dans les étapes tardives du développement musculaire et comment s'opère ce switch métabolique, nous nous sommes intéressés aux signaux connus pour induire la glycolyse et notamment à la voie insuline, décrite

pour stimuler l'entrée de glucose dans les muscles et sa dégradation par la glycolyse. Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec Laetitia Bataillé au CBD de Toulouse. L'inhibition de la voie insuline, et plus particulièrement de la voie PI3K/Akt/dTOR, donne des phénotypes similaires à ceux observés lorsqu'on bloque la glycolyse, avec un arrêt de la fusion et la formation de fibres plus fines. De plus, il y a une diminution significative de l'activité enzymatique de la pyruvate kinase (PyK), dernière enzyme de la glycolyse suite à l'inhibition de la voie insuline, confirmant le contrôle positif de la glycolyse par la voie insuline et pouvant expliquer les phénotypes observés. Cependant, on sait que la voie PI3K/Akt/TOR est également requise dans le contrôle de la croissance cellulaire et notamment musculaire où elle permet *via* ses effecteurs S6K et 4EBP de contrôler la synthèse des protéines. Lorsque l'on agit sur ces effecteurs dans le sens d'un blocage de la voie insuline, on observe des phénotypes similaires à ceux obtenus dans les contextes de blocage de la glycolyse et de la voie insuline (arrêt de la fusion et fibres plus fines). De même, la voie PI3K/Akt est connue pour inhiber FoxO qui induit la dégradation des protéines. Lorsque qu'on augmente l'expression de cet effecteur pour mimer le blocage de la voie insuline, on a encore une fois un arrêt du de fusion des myoblastes.

L'ensemble de ces résultats nous laisse penser qu'au cours de la différenciation musculaire dans l'embryon de Drosophile, les facteurs de croissance de type insuline augmenteraient de façon à activer la voie de signalisation insuline/PI3K/Akt/dTOR qui, à son tour, permettrait l'entrée du tréhalose dans la cellule et stimulerait la glycolyse. La glycolyse permettrait d 'une part de fabriquer de l'ATP et d'autre part de fournir, au moyen de ses intermédiaires, les nucléotides (grâce à la voie des pentoses phosphate) et les squelettes carbonés nécessaire à la synthèse de certains acides aminés. La voie PI3K/Akt/dTOR, quant à elle permettrait de stimuler la synthèse protéique, notamment *via* dTOR, afin de promouvoir la croissance musculaire.

En parallèle de cette analyse et en collaboration avec l'équipe de Uwe Strähle au KIT à Karlsruhe, l'analyse fonctionnelle de *pgam2,* l'orthologue de *Pglym78* chez le poisson-zèbre a été réalisée par perte de fonction suite à l'injection de morpholinos (MO). Pour cela, j'ai déterminé les séquences des MO afin d'inhiber spécifiquement la traduction des ARNm de *pgam2*. Après injection des MO dans des larves de poisson, on observe de sévères défauts

musculaires, affectant spécifiquement les fibres rapides et caractérisés par des fibres plus fines **(Fig.3 de l'article)**. Les phénotypes musculaires restreints aux fibres rapides qui sont les seules à avoir un caractère syncitial chez le poisson zèbre suggèrent une implication de *pgam2* dans la fusion des myoblastes. Ces premiers résultats sont donc en faveur de la conservation fonctionnelle de *Pglym78* dans le développement musculaire au cours de l'évolution.

Pour conclure, ce travail met en évidence l'existence d'une transition métabolique vers la glycolyse anaérobie, médiée au moins en partie par la voie insuline afin de permettre l'augmentation de la synthèse de biomasse dans le muscle syncitial, nécessaire à la poursuite de se fusion et de sa différenciation. Il révèle ainsi l'existence d'un lien entre le métabolisme et le développement musculaires.

A metabolic switch to glycolysis in mid-embryogenesis supports muscle growth by promoting myoblast fusion

Vanessa Tixier, Laetitia Bataillé*, Christelle Etard#, Teresa Jagla, Jean Philippe Da Ponte, Thomas Dickmeiss#, Uwe Straehle# and Krzysztof Jagla§

GReD, INSERM U 931, CNRS UMR 6247, Clermont-Ferrand University, France

 # Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany

** present address: Developmental Biology Centre, Toulouse, France*

§ author for correspondance: christophe.jagla@u-clermont1.fr

Abstract

Key developmental processes are often regulated by orthologous genes with conserved expression profiles. We thus reasoned that new developmental regulators can be identified by screening for orthologous genes belonging to syn-expression groups in evolutionarily distant species. Such a "syn-expression-evo-devo" approach applied to muscle development has led to the identification of more than hundred genes with unknown muscle functions conserved from *Drosophila* to zebrafish.
Among candidates are genes coding for glycolytic enzymes whose expression is activated in mid-embryogenesis in a synchronous manner and is predominantly muscular. This prompted us to investigate why glycolytic genes are specifically activated in developing muscles. Functional analyses of several glycolytic genes in *Drosophila* including *Pglym78*, revealed their role in promoting formation of syncytial muscle fibres. Indeed, in *Drosophila* embryos deficient for *Pglym78,* myoblast fusion is compromised and muscle are thinner, a phenotype also observed in morphants of *pgam2*, the zebrafish orthologue of *Pglym78*. As muscle specific attenuation of other glycolytic genes results in similar reduced size muscle phenotypes, we conclude that metabolic switch to glycolysis in mid-embryogenesis ensures embryonic muscle growth by promoting myoblast fusion. Since fusion arrest is also observed in embryos with affected insulin and TOR pathways we propose that glycolysis provides an adequate levels of carbon backbones for biomass synthesis, whereas TOR ensures that the biomass production machinery is adapted to the increased demand of syncytial myotubes.

A classical example of developmental processes controlled by orthologous genes is the regulation of the anterior-posterior identity of body segments by *Hox* genes, which is conserved from worms to human [1]. However, the same rule also applies for master genes of organ development, such as the *Drosophila* homeobox gene *tinman (tin)* and its mammalian orthologue *Nkx2.5,* which are both expressed in cardiac precursors and are required for heart development [2]. Here we performed search for orthologous genes expressed in developing muscles and conserved from *Drosophila* to zebrafish. We used *Drosophila* (www.fruitfly.org/insitu.pl) and zebrafish (www.zfin.org) gene expression databases (Fig. 1a and Supplementary Table 1). Among the 578 muscle-expressed genes referenced in *Drosophila* 132 have zebrafish orthologues with conserved expression in developing muscles. Within this pool are some known regulators of muscle development such as *Mef2, msh or Mlc1* (Supplementary Tab. 1*)*. However, the myogenic roles of the majority of candidates (120 genes) remain unknown. GO enrichment analysis reveals that more than half of them encode proteins with enzymatic activity including metabolic enzymes involved in protein synthesis or in glycolysis (Fig. 1a and Supplementary Tab.1). To assess whether this syn-expression-evo-devo based selection indeed identified genes that function in muscle development, we analyzed a randomly chosen representative sample of 23 genes from different functional classes. We first validated their expression in embryonic muscles using fluorescent *in situ* hybridization combined with a muscle-specific antibody staining (not shown) and then designed dsRNA to attenuate both their maternal and zygotic transcripts. These dsRNAs were injected at the blastoderm stage into embryos carrying a Myosin Heavy Chain-tauGFP transgene that allows visualization of developing muscles *in vivo* (Fig.1b), an approach that has previously been used for the evaluation of gene function during embryonic myogenesis [3,4]. As a positive control, we performed dsRNA injections to knockdown genes with known muscle phenotypes and as a negative control dsRNA targeting exogenous yeast *β-galactosidase* gene (Supplementary Fig. 1). 20 out of the 23 candidates show muscle phenotypes when attenuated (Fig. 1c) and only 3 do not affect muscle development. The phenotypes match three categories: type i) exhibits large gaps in the musculature, which indicates that the determination of somatic mesoderm is affected; type ii) shows a lack or duplication of some muscles, suggesting an abnormal specification of muscle sub-types; in type iii), all muscles are present, but have abnormal shapes, implying that the acquisition of muscle properties or muscle differentiation is

affected. These phenotypes therefore suggest implication of the candidate genes in early (type i), middle (type ii) or late (type iii) aspects of muscle development. Among candidates involved in metabolism (indicated on blue background in Fig. 1c) knockdown of *Phosphoglycerate mutase* (*Pglym78)* [5] encoding a glycolytic enzyme, and classified to third category, leads to striking small/rounded muscle phenotypes (Fig. 1c).

Intriguingly, in addition to *Pglym78,* 7 other genes encoding glycolytic enzymes are in the pool of 120 conserved muscle genes identified by our screen (Genes in bold in Supplementary Tab.1). Expression profiles available via BDGP-in situ database and ModEncode transcriptional profiling data (summarized in Supplementary Fig. 2) suggested that all 8 glycolytic genes display similar spatio-temporal embryonic expression patterns: high ubiquitous maternal expression and then zygotic expression preferentially in developing embryonic muscles. The finding that nearly all glycolytic genes belong to an evolutionarily conserved muscle syn-expression group suggested that they may contribute to embryonic muscle development and/or underlie potential muscle-specific functions. Glycolysis is a major metabolic pathway that metabolizes glucose to pyruvate, which can then be oxidized in the mitochondria or, especially under hypoxic conditions, be reduced to lactate by lactic acid fermentation [6]. It occurs in virtually all eukaryotic cells and is a major source of carbon backbones for biomass synthesis [7]. However, the role of glycolysis in embryonic development has not yet been address. Here, the phenotypes resulting from the attenuation of maternal and zygotic expression of one of glycolytic genes, *Pglym78* (Fig. 1c) resulted in phenotypes suggesting that the elongation and the increase in size of myotubes were affected. This phenotype might reflect a requirement for the *Pglym78* function in glycolysis or a potential non-glycolysis related function. To distinguish between these possibilities, we attenuated two other glycolytic gene, *Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1* (*Gapdh 1*) and *Pyruvate kinase* (*PyK*) by dsRNA injection and examined the embryos for muscle related phenotypes. Furthermore, we blocked glycolysis pharmacologically by treating the embryos with the GAPDH inhibitor Iodoacetate (IAA) [8] or with 2-deoxy D-glucose (2-DG) [9] a non-metabolizable analogue of glucose. All three experiments lead to phenotypes similar to the *Pglym78* knockdown (Supplementary Fig. 3). Thus, glycolysis as such appears to be important for proper muscle development.

We then asked whether loss of only zygotic expression of glycolytic genes (which is mainly muscular) or muscle-specific attenuation would be sufficient to affect muscle development. The *Pglym78* deficiency, *Pglym78*$^{P(EP)}$ allele, transheterozygous context or muscle-specific RNAi attenuation of *Pglym78* all lead to phenotypes characterized by the reduced size/thin myofibres (Fig. 2 a-e;q). The rounded-shape muscle phenotype is however lost (Fig. 2) indicating that the maternal expression of *Pglym78* can rescue some aspects of the glycolytic function at the time when its embryonic muscle expression becomes important. At the same time, loss of zygotic *Pglym78* function does not result in any obvious CNS and PNS phenotype (Supplementary Fig. 4).

Like *Pglym78*, expression of 5 other glycolytic genes tested is initiated in developing muscles in mid-embryogenesis between 10 and 12 h AEL (Fig.2 and Supplementary Fig. 2*)*. Consistent with this transcriptional activity, enzymatic activity of Pyruvate Kinase (PyK), the last enzyme in the glycolytic pathway is high in early embryos due to maternal expression, then drops down and finally increases starting from 12 h AEL providing further evidence that glycolysis is functional in developing muscles (Fig. 2f). We thus tested effects of loss or muscle-specific attenuation of 5 other glycolytic genes. In all cases analysed, muscle pattern is affected and muscles appear thinner. Furthermore, inhibition of *Impl3* gene encoding lactate dehydrogenase induces similar muscle phenotypes suggesting that, to promote embryonic muscle development, the generated by glycolysis pyruvate is preferentially converted into lactate.

An important question that arises is why do developing muscles need to switch their metabolism to glycolysis.

One property that makes muscle cells different from other cell types is their syncytial character. In mid-embryogenesis muscle precursors increase their size by fusing with surrounding fusion competent myoblasts [10]. This process coincides with activation of glycolytic genes in muscles and prompted us to test whether the observed phenotypes are due to perturbed myoblast fusion. If fusion is disturbed, one would expect a reduced number of nuclei per myofibre and a diminished fibre thickness. We therefore counted the number of nuclei and measured the thickness of two muscles, the laterally located SBM and the dorsally located DA1, at the time the fusion is completed (stage 16) in both wild type embryos and embryos expressing RNAi construct targeting *Pglym78* in muscles. Compared to the control and whatever the muscle driver used (*duf-Gal4* or *Mef2-Gal4*), both *Pglym78* deficient muscles contain

less nuclei and display a significantly reduced size (Fig. 3a-g) showing that myoblast fusion is compromised.

This observation prompted us to check whether a similar switch to glycolysis also promotes muscle development in vertebrates. Like *Pglym78* its zebrafish orthologue *pgam2* displays muscle specific expression in embryos (www.zfin.org). We attenuated *pgam2* expression by morpholino-mediated knockdown and examined muscle integrity in the living embryos by measuring birefringence under polarized light [11]. Compared with control morpholino injected embryos, *pgam2* morpholino injected embryos (*pgam2* morphants) exhibit strongly reduced birefringence, indicating a perturbation of fibre structure or arrangement (Fig.3h and Supplementary Fig. 5a). Phalloidin staining of fast muscle fibres revealed that the sarcomere structure within the fibres is intact. However, the arrangement of the fibres is perturbed, with large gaps between the fibres, and their diameter is reduced (Fig. 3i-j). Interestingly, slow muscle fibres, which do not undergo fusion [12], are not perturbed in the morphants (Fig. 3k-l). Since control mismatch morpholino doesn't lead to fibre defect, muscle phenotypes observed in *pgam2* morphants can be associated with *pgam2* specific attenuation (Supplementary Fig. 5b). Together, these findings would be consistent with a perturbation of myoblast fusion by attenuated glycolysis also in zebrafish embryos and suggest a conserved role for glycolysis in muscle development over large evolutionary distances.

The observed phenotypes raise the question of how the action of the glycolytic genes is coordinated with pathways controlling cell size. The Insulin pathway regulates glucose metabolism in vertebrates [13]. We thus tested whether this pathway also regulates glycolysis and itself controls the size of embryonic muscles in *Drosophila*. PyK activity drops down in embryos expressing dominant negative form of Insulin receptor (InR-DN) in muscles (Fig. 4i) providing evidence for the role of insulin pathway in promoting glycolytic metabolism. Moreover, muscle specific expression of InR-DN or negative effector of Insulin pathway FoxO using either *duf-Gal4* or *Mef2-Gal4* drivers, and loss of Akt1 function, all result in phenotypes that are reminiscent of those of glycolytic genes (Fig. 4, Supplementary Fig. 6, Supplementary Tab. 3). Indeed, in each of these cases, muscles display a reduced size and reduced number of nuclei. In contrast, targeting expression of positive regulators of the insulin pathway (Akt1 and PI3K) to the embryonic muscles does not lead to their increased

size (Fig. 4c, Supplementary Fig. 6) indicating that in contrast to larval muscles [14] embryonic muscles are not sensitive to high Insulin activity.

Insulin pathway is also known to control muscle growth *via* the regulation of Target Of Rapamycin (TOR) [15]. TOR forms two protein complexes TORC1 by binding to Raptor and TORC2 by binding to Rictor. TORC1 is involved in ribosome biogenesis and stimulation of protein synthesis by activating S6 Kinase (S6K) and inhibiting 4E-BP whereas TORC2 plays a role in actin organization and in modulating AKT signaling [16] .

Muscle-specific knockdown of TOR, gain of function of TORC1 or its negative effector 4E-BP, or attenuation of positive TORC1 effector S6K, lead to InR-DN-like thin muscles phenotypes (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6). In contrast mutants for *rictor* have no muscle defects, demonstrating that phenotypes observed when TOR is attenuated specifically depend on TORC1 activity. Given that loss or gain of function of ATP sensor AMPK do not affect muscle development (Supplementary Fig. 6), we conclude that TOR and its effectors act downstream insulin pathway and that observed phenotypes do not result from energy depletion. Examinations of the kinetics of fusion in *InR-DN*, *UAS Foxo, S6K RNAi, UAS 4E-BP* and *Pglym78 RNAi* contexts reveal, in all cases, a premature fusion arrest (Fig. 4n-q, Supplementary Fig. 8, Supplementary Tab. 3), which timely coincides with muscle-specific burst of zygotic expression of *Pglym78* and other glycolytic genes. This suggests that glycolytic pathway and nutrient-sensing TOR pathway, both acting downstream of InR signaling, are required to complete the fusion programs in developing muscles.

One scenario we favor is that glycolysis ensures an adequate levels of components such as amino acids for increased biomass production in syncytial muscle cells whereas TOR, by repressing inhibitor of translation 4E-BP and by activating translational enhancer S6K, ensures that the biomass production machinery is efficient (Fig. 4r). An increased demand for biomass production in rapidly proliferating cancer cells results in metabolic switch to aerobic glycolysis known as Warburg effect [7]. Here, we provide evidence that a similar switch to glycolysis occurs in developing muscles in mid-embryogenesis in *Drosophila*. Developing muscle cells do not proliferate at that time, but by fusion increase the number of nuclei. In consequence, the copy number of transcriptionally active genes increases resulting in a higher biomass production. Thus metabolic requirements of muscle precursors that

undergo fusion and become syncytial differ from that of mono-nucleated cells and it is conceivable that a nutritional checkpoint exists in developing muscles, which leads to transcriptional activation of glycolytic genes. In embryos deficient for glycolysis, myoblast fusion stops to adapt muscle cells to a metabolic state with a lower rate of biomass production. Importantly, function of glycolysis in promoting fusion during muscle development appears conserved since in zebrafish embryos morpholino knockdown of *pgam2*, an orthologue of *Pglym78,* results in a reduced size of syncytial fast muscle fibers without affecting mono-nucleated slow fibres. As efficient myoblast fusion is not only required to build muscles during development but also to regenerate diseased muscles, the presented here data open an interesting perspective for testing whether metabolic state of muscle influences its capacity of regeneration.

Acknowledgements

This work was supported by European FP6 grant to network of excellence Myores, by the ANR grant "MYO-ID", the FRM grant "Equipe FRM" and the AFM grants. We are thanking collaborating teams from Myores network and Stefano Schiaffino (Univ Padova) for stimulating discussion.

References

1 Gellon, G. and McGinnis, W., Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of Hox expression patterns. *Bioessays* **20** (2), 116 (1998); Veraksa, A., Del Campo, M., and McGinnis, W., Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* **69** (2), 85 (2000).

2 Harvey, R. P., NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol* **178** (2), 203 (1996); Jagla, K., Bellard, M., and Frasch, M., A cluster of Drosophila homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays* **23** (2), 125 (2001).

3 Estrada, B. et al., An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS Genet* **2** (2), e16 (2006).

4 Junion, G. et al., Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors. *Genes Dev* **21** (23), 3163 (2007).

5 Sullivan, D. T. et al., Analysis of glycolytic enzyme co-localization in Drosophila flight muscle. *J Exp Biol* **206** (Pt 12), 2031 (2003).

6 Kresge, N., Simoni, R. D., and Hill, R. L., Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J Biol Chem* **280** (4), e3 (2005).

7 Warburg, O., On the origin of cancer cells. *Science* **123** (3191), 309 (1956).

8 Sabri, M. I. and Ochs, S., Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mammalian nerve by iodoacetic acid. *J Neurochem* **18** (8), 1509 (1971).

9 Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I., and Wolfe, J. B., Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* **224** (2), 963 (1957).

10 Bate, M., The embryonic development of larval muscles in Drosophila. *Development* **110** (3), 791 (1990).

11 Felsenfeld, A. L. et al., Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development* **108** (3), 443 (1990).

12 Simionescu, A. and Pavlath, G. K., Molecular mechanisms of myoblast fusion across species. *Adv Exp Med Biol* **713**, 113 (2011).

13 Zhang, W. et al., FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **281** (15), 10105 (2006).

14 Demontis, F. and Perrimon, N., Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in Drosophila. *Development* **136** (6), 983 (2009).

15 Manning, B. D. and Cantley, L. C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129** (7), 1261 (2007).

16 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307** (5712), 1098 (2005).

17 Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W., Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95** (7), 1017 (1998).

[18] Jagla, T. et al., Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in Drosophila. *Development* **129** (4), 1037 (2002).

[19] Robu, M. E. et al., p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* **3** (5), e78 (2007).

[20] Ertzer, R. et al., Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Dev Biol* **301** (2), 578 (2007).

[21] Crow, M. T. and Stockdale, F. E., Myosin expression and specialization among the earliest muscle fibers of the developing avian limb. *Dev Biol* **113** (1), 238 (1986).

[22] Costa, M. L. et al., Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech Dev* **116** (1-2), 95 (2002).

Figure Legends

Figure 1: Syn-expression eve-devo approach reveals a high number of metabolic genes involved in muscle development conserved from *Drosophila* to zebrafish

a, Venn diagram of muscle-expressed genes conserved between *Drosophila* and zebrafish and their classification according to Gene Ontology.
b, RNAi-based approach used to analyse functions of candidate genes in *Drosophila* embryonic myogenesis. dsRNA targeting candidate genes are injected in transgenic MHC-tauGFP embryos to follow muscle development
c, Classification of genes according to the observed muscular phenotypes. Blue background highlights genes encoding proteins involved in metabolism.

Figure 2: Glycolytic genes are specifically expressed in developing muscles and required for proper muscle developement

a-e, Muscular phenotypes observed after *Pglym78* inhibition.
f, PyK activity during Drosophila embryogenesis
g, Diagram representing the 10 steps of glycolysis
h-s, Expression profiles of glycolytic genes and phenotypes observed in muscle-specific knockdown or in loss of function contexts.
t-u, *Impl3 (LDH)* expression profile and muscular phenotypes observed after muscle specific attenuation of *Impl3.*
Lateral views of stage 15 embryos stained for RNA probe (red) and b3-Tub are shown (green).

Figure 3: Loss of *Pglym78* function leads to myoblast fusions defect and reduced muscle size in Drosophila and in zebrafish embryos

a-c, Phenotypes observed in *Pglym78* loss of function mutants are similar to those observed in muscle specific RNAi knockdown situation with duf-Gal4 and Mef-Gal4 drivers.
d-e', An enlarged view of DA1 and SBM muscles in wt and in Pglym78 RNAi contexts
f-g, Number and nuclei and fibre sizes of DA1 and SBM
h-h', Injection of morpholino against *pgam2* leads to a decrease in birefringence
i-l', Muscle phenotype caracterised by disturbance in fibre arrangement and reduced diameters are only observed in fast muscle (i-j')

Figure 4: Insulin pathway regulates glycolysis and is required for myoblast fusion.

a-h, Inhibition of insulin pathway (b, d, e, f, g) leads to muscular defects, and neither the activation of this pathway(c), nor the activation of AMPK (h) lead to obvious phenotype.
Lateral views of stage 15 embryos stained for β3-Tub (green) and Lbe (blue) are shown.
i, PyK activity is compromised in embryos expressing dominant negative form of InR
j-m, Number of Eve nuclei in DA1and Lb nuclei in SBM in stage 15 embryos (j-k) and their relative sizes (l-m).
n-q, Kinetics of fusion in DA1 and SBM in wt, insulin mutant contexts and *Pglym78* mutant context. Mean values are used to visualize the number of nuclei according to time AEL.
r, Model : Insulin/PI3K/Akt pathway positively regulates glycolysis and nutrient sensing TOR pathway and in parallel represses growth inhibitor FoxO. Glycolysis provides carbone backbone components for biomass synthesis whereas TOR pathway, via S6K and 4E-BP, stimulates translation. This allows to fullfil increased demand for biomass synthesis in syncytial muscle and create permissive metabolic context for myoblast fusion.

Figure 1

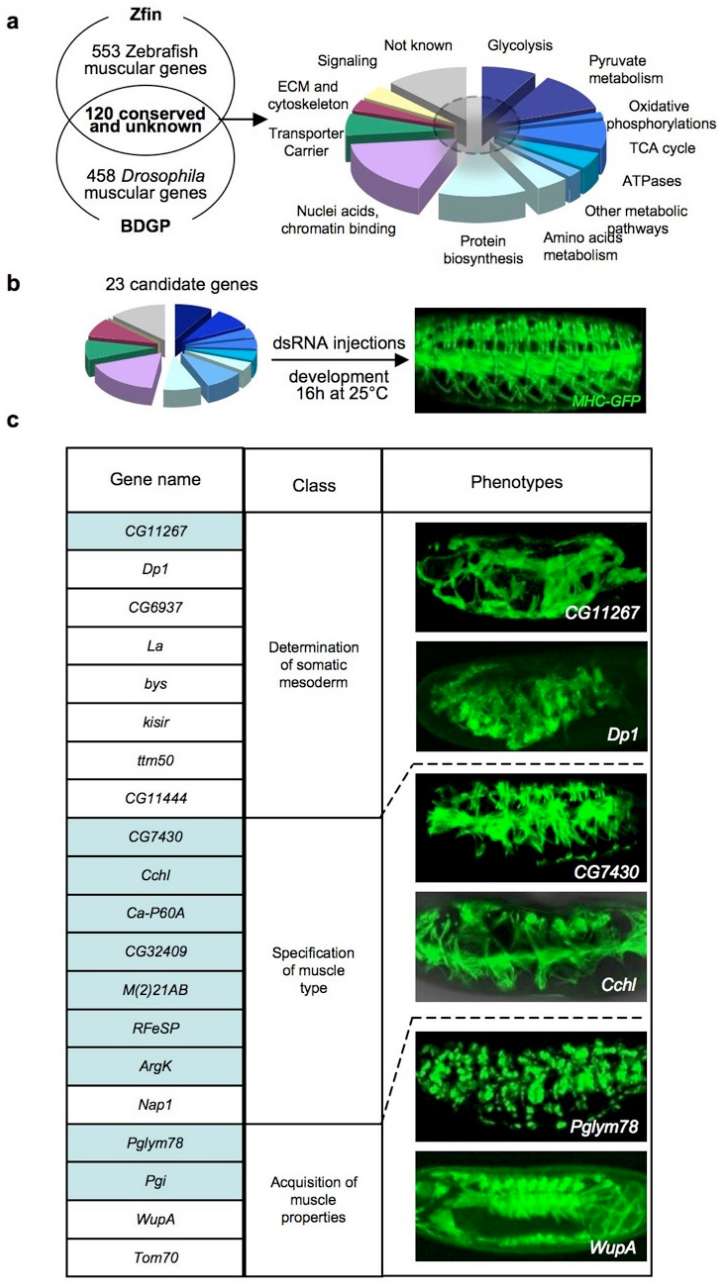

a
Zfin
553 Zebrafish muscular genes
120 conserved and unknown
458 Drosophila muscular genes
BDGP
Not known
Glycolysis
Signaling
Pyruvate metabolism
ECM and cytoskeleton
Oxidative phosphorylations
Transporter Carrier
TCA cycle
ATPases
Nuclei acids, chromatin binding
Other metabolic pathways
Protein biosynthesis
Amino acids metabolism
b
23 candidate genes
dsRNA injections
development 16h at 25°C
MHC-GFP
c
Gene name
Class
Phenotypes
CG11267
Dp1
CG6937
La
bys
kisir
ttm50
CG11444
CG7430
Cchl
Ca-P60A
CG32409
M(2)21AB
RFeSP
ArgK
Nap1
Pglym78
Pgi
WupA
Tom70
Determination of somatic mesoderm
Specification of muscle type
Acquisition of muscle properties
CG11267
Dp1
CG7430
Cchl
Pglym78
WupA

Figure 2

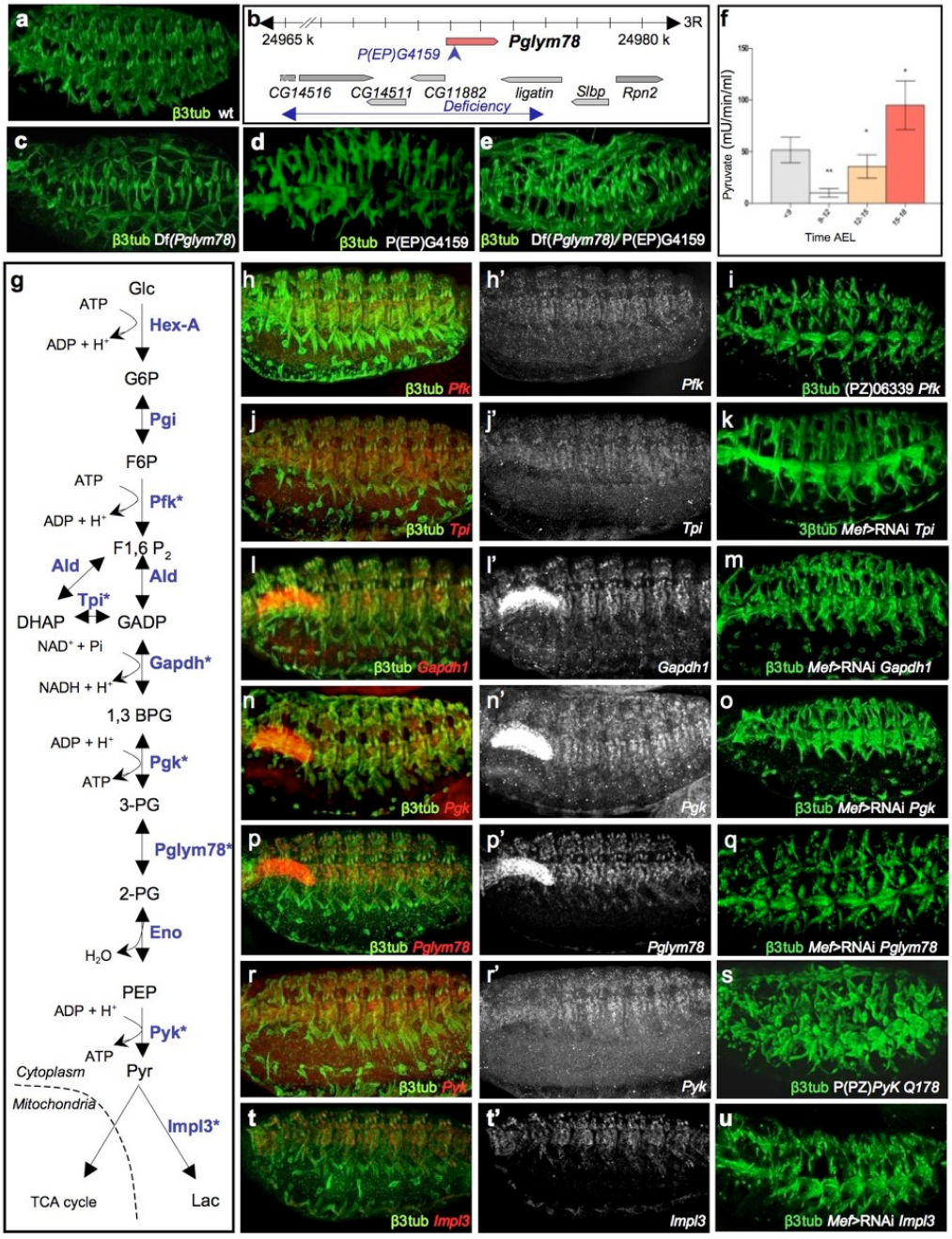

a
β3tub wt
b
24965 k
3R
24980 k
Pglym78
P(EP)G4159
CG14516
CG14511
CG11882
ligatin
Slbp
Rpn2
Deficiency
f
Pyruvate (mU/min/ml)
Time AEL
c
β3tub Df(Pglym78)
d
β3tub P(EP)G4159
e
β3tub Df(Pglym78)/ P(EP)G4159
g
Glc
ATP
Hex-A
ADP + H+
G6P
Pgi
F6P
ATP
Pfk*
ADP + H+
F1,6 P2
Ald
Ald
Tpi*
DHAP
GADP
NAD+ + Pi
Gapdh*
NADH + H+
1,3 BPG
ADP + H+
Pgk*
ATP
3-PG
Pglym78*
2-PG
Eno
H2O
PEP
ADP + H+
Pyk*
ATP
Cytoplasm
Pyr
Mitochondria
Impl3*
TCA cycle
Lac
h
β3tub Pfk
h'
Pfk
i
β3tub (PZ)06339 Pfk
j
β3tub Tpi
j'
Tpi
k
3βtub Mef>RNAi Tpi
l
β3tub Gapdh1
l'
Gapdh1
m
β3tub Mef>RNAi Gapdh1
n
β3tub Pgk
n'
Pgk
o
β3tub Mef>RNAi Pgk
p
β3tub Pglym78
p'
Pglym78
q
β3tub Mef>RNAi Pglym78
r
β3tub Pyk
r'
Pyk
s
β3tub P(PZ)PyK Q178
t
β3tub Impl3
t'
Impl3
u
β3tub Mef>RNAi Impl3

Figure 3

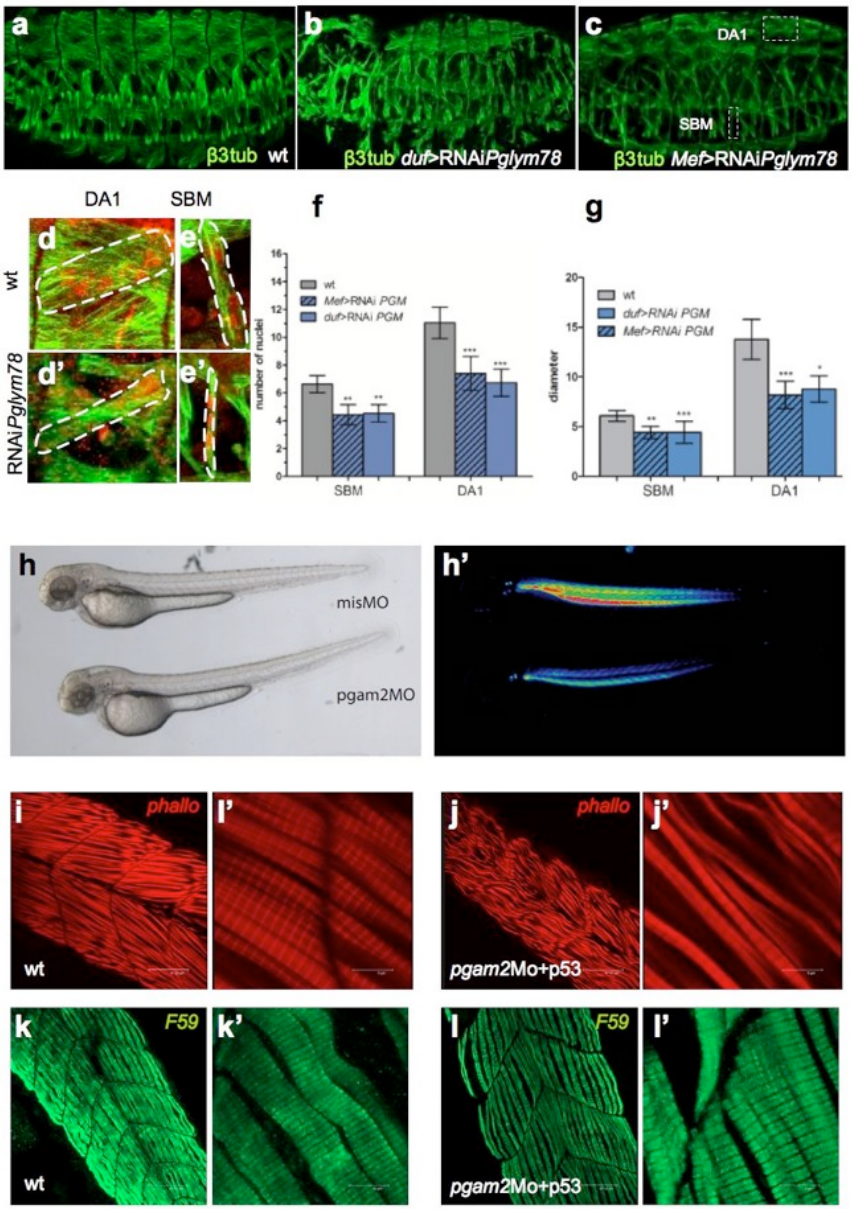
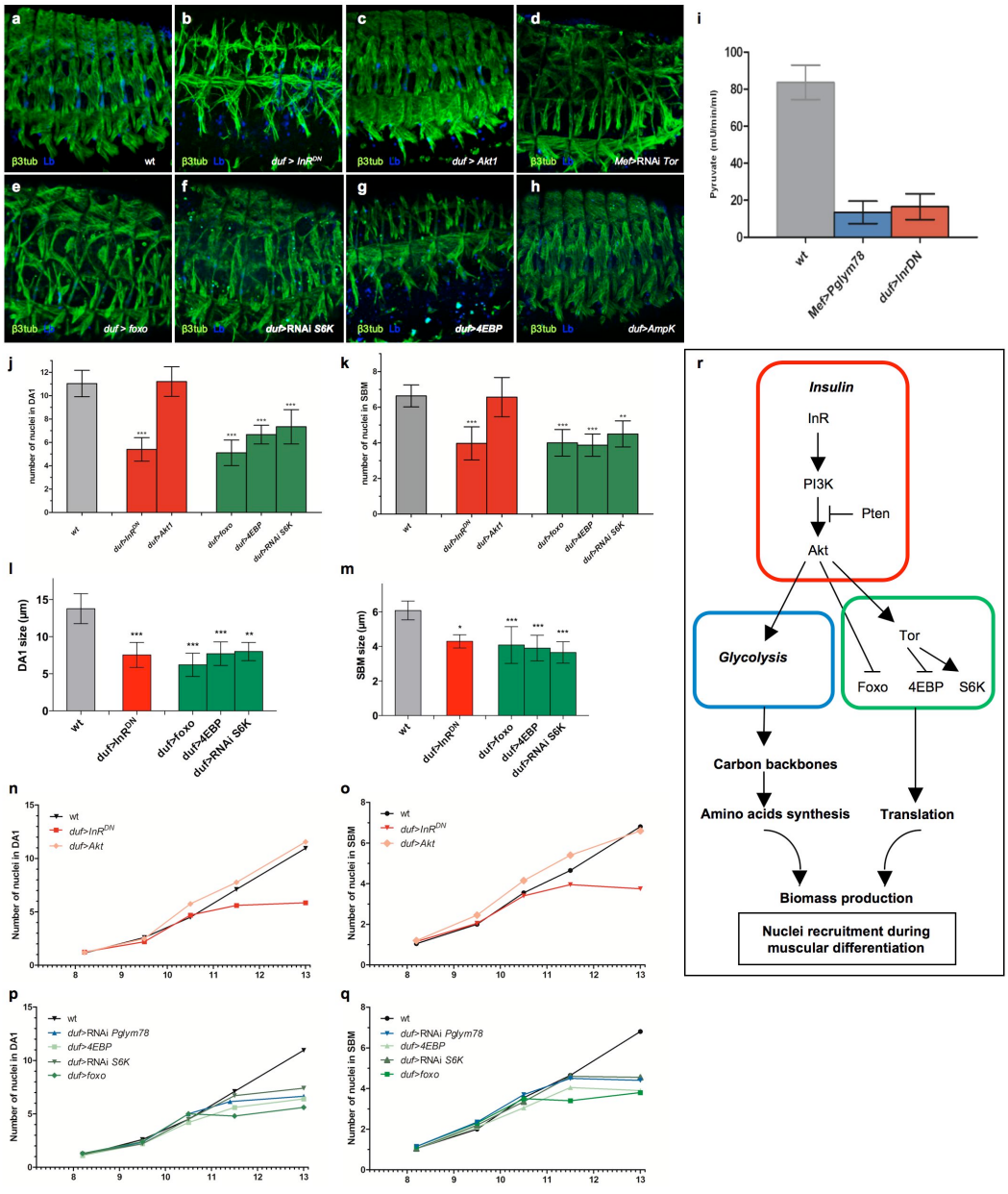

a
β3tub wt
b
β3tub duf>RNAiPglym78
c
DA1
SBM
β3tub Mef>RNAiPglym78
DA1
SBM
wt
RNAiPglym78
d
e
d'
e'
f
wt
Mef>RNAi PGM
duf>RNAi PGM
number of nuclei
SBM
DA1
g
wt
duf>RNAi PGM
Mef>RNAi PGM
diameter
SBM
DA1
h
misMO
pgam2MO
h'
i
phallo
wt
l'
j
phallo
pgam2Mo+p53
j'
k
F59
wt
k'
l
F59
pgam2Mo+p53
l'

Figure 4


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
β3tub Lb
wt
duf > InR^DN
duf > Akt1
Mef>RNAi Tor
duf > foxo
duf>RNAi S6K
duf>4EBP
duf>AmpK
Pyruvate (mU/min/ml)
wt
Mef>Pglym78
duf>InrDN
number of nuclei in DA1
number of nuclei in SBM
DA1 size (µm)
SBM size (µm)
duf>InR^DN
duf>Akt1
duf>foxo
duf>4EBP
duf>RNAi S6K
Number of nuclei in DA1
Number of nuclei in SBM
duf>InR^DN
duf>Akt
duf>RNAi Pglym78
duf>4EBP
duf>RNAi S6K
duf>foxo
Insulin
InR
PI3K
Pten
Akt
Glycolysis
Tor
Foxo
4EBP
S6K
Carbon backbones
Amino acids synthesis
Translation
Biomass production
Nuclei recruitment during muscular differentiation

Supplementary methods

Fly stocks

All *D. melanogaster* stocks were grown on standard medium at 25 °C. The following strains were used: *duf-Gal4* (gift of K. Vijayraghavan, TIFR, India), UAS-Ampk (JK Chung, Korea), $AMPK_{\alpha}^{3}$ (V.Mirouse, GReD, France), TOR^{2l1} (E.Hafen, Germany), $rictor_{\Delta}^{2}$ (S. Cohen, Singapor). P(EP)Pglym78^{G4159}, P(PZ)Pfk^{06339}, P(PZ)PyK^{G178}, Mef-Gal4, UAS-InR^{DN}, UAS-Akt1, UAS-foxo, UAS-4EBP, UAS-InR^{wt}, InR^{355}, UAS-PI3K92E^{CAAX}, UAS-TOR, S6K^{l1}, TSC2^{MIET}, were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center. All UAS-RNAi lines come from the VDRC collection. Mutants were balanced using FM7c,P{*act-LacZ*}, CyO, P{*wg^{en11} LacZ*}, TM3, *Ser*, P{*twi-LacZ*} and homozygotes were identified by the absence of LacZ staining. Crosses and embryo collections were performed at 25°C.

Injection

For each candidate gene, two distinct dsRNA targeting all mRNA isoforms were produced. MHC-GFP embryos were injected as decribed previously [17] and after 16hours of development they were put on a slide, covered with oil and observed with a fluorescent miscroscope (Olympus FV 300). For each dsRNA RNA, at least 50 embryos were injected. Lethality and phenotypes xaere scored and data were considered as positive result if lethality was less than 50% and if muscular phenotypes were the same with the two dsRNA for each gene and observed in at least 25% of the alive embryos.

Drugs incorporation

Drsophila MHC-GFP embryos were collected at 9h AEL, dechorionated in 25% bleach for 1min, washed in PBT (PBS-Tween 0,05%), washed in H_2O, rinse in isopropanol air dry for 15 sec, incubated in octane/PBT v/v for 30sec, dried on paper towels for 3min and then put in Schneider medium +/- drug for 2h hours at 25 degrees in the dark. After incubation, embryos were rinsed with H_2O, aligned on a slide, covered with oil and observed with a fluorescent microscope (Olympus FV 300). 2-DG (2-deoxyglucose, SIGMA) was used at 50mM, IAA (Sodium IodoAcetate, Invitrogen) at 1mM.

In situ hybridization and antibody staining

Fluorescent *in situ* hybridization with TSA amplification system (Perkin-Elmer) and immunohistochemistry was done as described previously [4]. Gold collection clones GH12192, GH10864, RE69448, GH07208, GH13304, SD06874, RE54418 was used to generate RNA probe for glycolytic genes. For fluorescent staining, the following antibodies were used: guinea pig anti-Eve (1:1000; from D. Kosman, University of California, USA), mouse anti-Lbe (1:2500; [18], rabbit anti-β3-Tubulin (1:5000; from R. Renkawitz-Pohl, Philipps Univ., Germany), rabbit anti-LacZ (1:1000; Sigma). Cy3, Cy5 and 488 conjugated secondary antibodies were used (1:300; Jackson Immuno-Research). Embryos were mounted in Fluoromount-G antifade reagent (Southern Biotech). Labeled embryos were analyzed using an LSM510 Meta (Zeiss) confocal microscope or SP5 RS MP (Leica) with a 40x objective. Images were processed with ImageJ and Photoshop.

Pyruvate kinase activity

Drosophila embryos were collected at different time points, homogenized in 5 volumes of assay buffer with a dounce homogenizer. Samples were gently centrifuged and supernatant was directly used for pyruvate kinase activity detection. Pyruvate assay kit (K609-100) was a BioVision Research Product. The optical density at 570 nm (OD_{570nm}) was measured on a microplate reader (ThermoLabsystems). For each sample, protein concentration was determined according to Bradford assay

Staging embryos and nuclei counting

In addition to embryonic morphology, the dorsal closure and gut morphology was used for precise staging all embryos. Staining against the identity genes were used to determine the number of nuclei in specific muscles: Eve in DA1 and Lbe in SBM muscles. Nuclei were counted using 40x objective on a Zeiss LSM510 Meta confocal microscope or SP5 RS MP (Leica). For each muscle/mutant condition analyzed, 30 abdominal hemisegments at stages 15 were counted (minimum 10 embryos) (Supplementary Table 2). For kinetics analyses, 20 hemisegments were counted at stage 12 (7.20-9.20h AEL), 13 (9.20-10.20 h AEL), 14 (10.20-11.20h AEL) and at early (11.20-12h AEL) and late stage 15 (12-13h AEL) (Supplementary Table 3). Data plots and statistical analyses were performed with Prism 5.0 using Kruskal-Wallis and Dunns post-tests.

Fiber diameter measurement

DA1 and SBM size were measured thanks to the Volocity software. Data plots and statistical analyses were performed with Prism 5.0 using t-student test.

Zebrafish morpholinos design and injections

Morpholino oligonucleotides (GeneTools) targeted against the zebrafish pgam2 ATG region (ATGAAAAGGATATTTGGGTTTCACT) or control 5 mismatch morpholinos (ATCAAAACGATATTTCGGTATGACT) were coinjected with a morpholino targeting P53 (GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG) to suppress unspecific morpholino induced apoptosis [19]. A reporter construct for testing knockdown specificity was generated by inserting the ATG region of pgam2 (tactgtagtgaaacccaaatatccttttcata ATG GCT GCT GCT CAT CGT CTA GTG ATT GT) into the EcoRI/NcoI sites of the pCS2:GFP reporter vector [20]. Coinjection of either control or mismatch morpholino with the anti-P53 morpholino and the reporter construct revealed specific loss of GFP fluorescence in the pgam2 morpholino (Supplementary Figure 5). Immunohistochemistry with phalloidin and the F59 antibody [21] was carried out as described[22] .

Supplemental Figures and Tables legends

Figure S1 : Control injections

Muscle pattern observed after dsRNA injection against known muscles genes (positive control) and exogenous gene LacZ gene (negative control).

Figure S2: Similar temporal expression profiles of glycolytic genes revealed by ModEncode high throughput transcriptional profiling data

Glycolytic genes show a strong maternal expression then decrease and are upregulated since 12h AEL

Figure S3: Glycolysis is required for muscle development

Phenotypes observed in MHC-GFP embryos after incorporation of drugs blocking glycolysis or injection of dsRNA against two glycolytic genes.

Figure S4: *Pglym78* loss of function doesn't affect development of embryonic nervous systems.

CNS and PNS neurons are detected using Elav antibody

Figure S5 : Control morpholino experiments in zebrafish

a- Percentage of larvae showing reduction in birefringence after morpholinos injections.
b- Injection of negative control morpholinos carrying 5 mismatch with morpholinos against *pgam2* doesn't lead to any obvious phenotype. Coinjection of *pgam2* morpholino and a construct carrying a GFP reporter of *pgam2* expression revealed loss of GFP compared to injection of either control or mismatch morpholino.

Figure S6: Phenotypes observed in insulin pathway mutants

a-p, Activation of insulin pathway in muscle specific overexpression contexts for InR (b), Akt (f), PI3K (h), Tor (i, j) or in foxo mutant (o) do not affect muscle pattern. Inactivation of insulin pathway in loss of function mutant contexts for InR (c), Akt (e), Tor (k) and S6K (m), or in muscle muscle specific overexpression of InRDN (d), Pten (g), 4EBP (n) and foxo (p), leads to muscular defects. Similar phenotypes are observed with Mef-Gal4 and duf-Gal4 drivers (see Figure 4). The absence of muscular defects in Rictor mutant compared to the Tor2L1 mutant, show that only the activity of Tor-C1 is imply during embryonic myogenesis. Lateral views of stage 15 embryos stained for β3-Tub (green) and Lbe (blue) are shown.
q-r, Number of nuclei present in DA1 and SBM in stage 15 embryos in insulin pathway context. Bar graphs show the mean number of nuclei and asterisks indicate the significance of variation compared to the wt. Notices that the loss of function of InR induces an increase of nuclei number in the SBM, due to duplications of some fibers in each segment, suggesting that insulin pathway is also required for the earlier specification of founder cells.

Figure S7: AMPK and TSC2 mutants

No phenotypes.

Figure S8: Kinetics of fusion

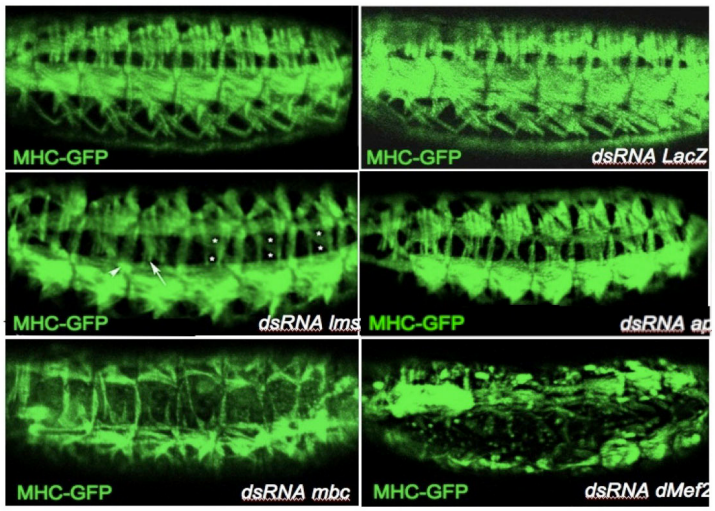
Same data than in Figure 4, showing the mean number of nuclei and error bars showing standard deviation from the mean.

Table S1. **List of identified Drosophila and zebrafish muscle genes**
List of the 132 orthologs expressed in developing muscles (first sheet). All Drosophila and zebrafish genes from BDGP and Zfin in situ databases showing expression in developing embryonic muscles (second and third sheets).

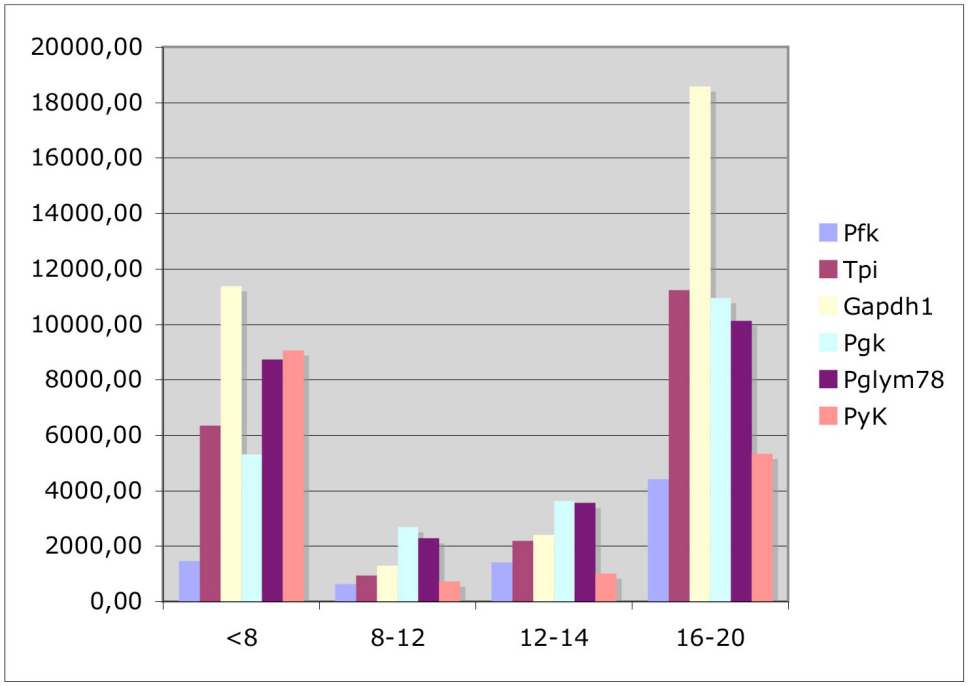
Table S2. Number of nuclei in DA1 and SBM muscles in wild type stage 15 embryos and in *Pglym78* and insulin mutant conditions (related to Figure 3, Figure 4 and Figures S5 and S6).
For each genotype, the average number of nuclei ± standard deviation is shown (n=30).

Table S3. Kinetic of fusion process in wild type condition and in *Pglym78* and insulin mutant conditions (related to Figure 4 and Figure S7).
For each stage and each genotype, the average number of nuclei ± standard deviation is shown (n=20).

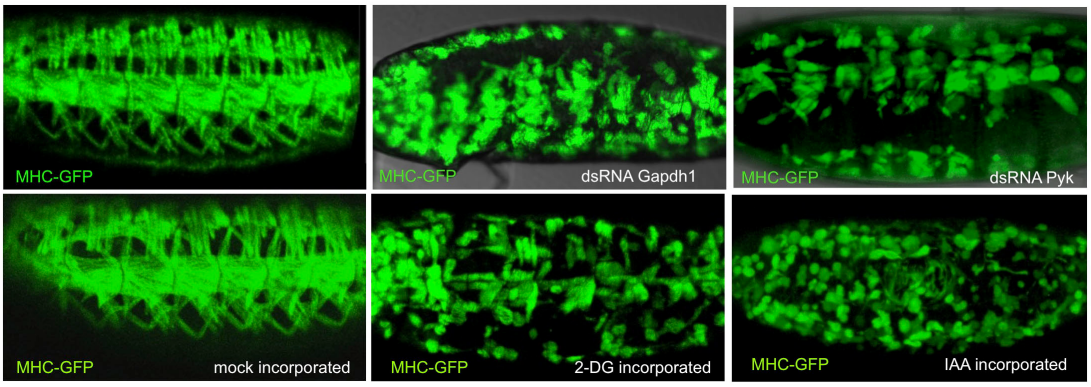
Supplementary Figure 1



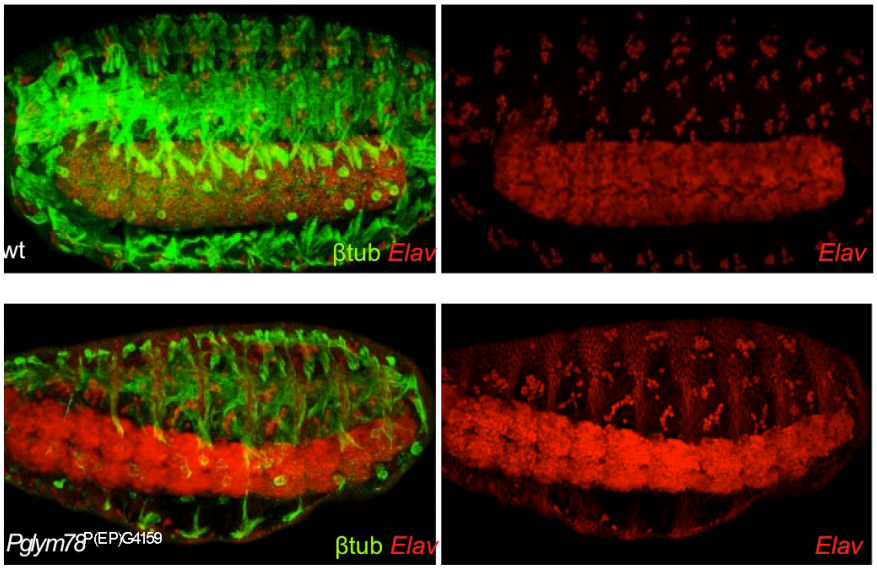
Supplementary Figure 2



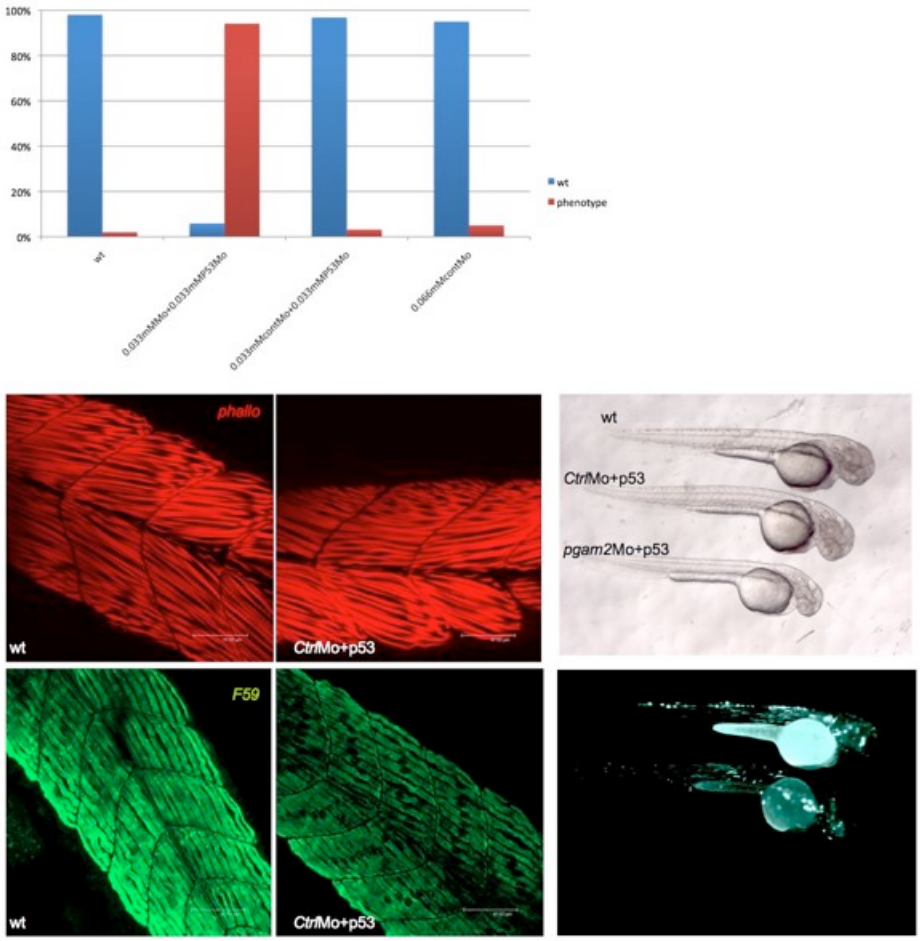
Supplementary Figure 3



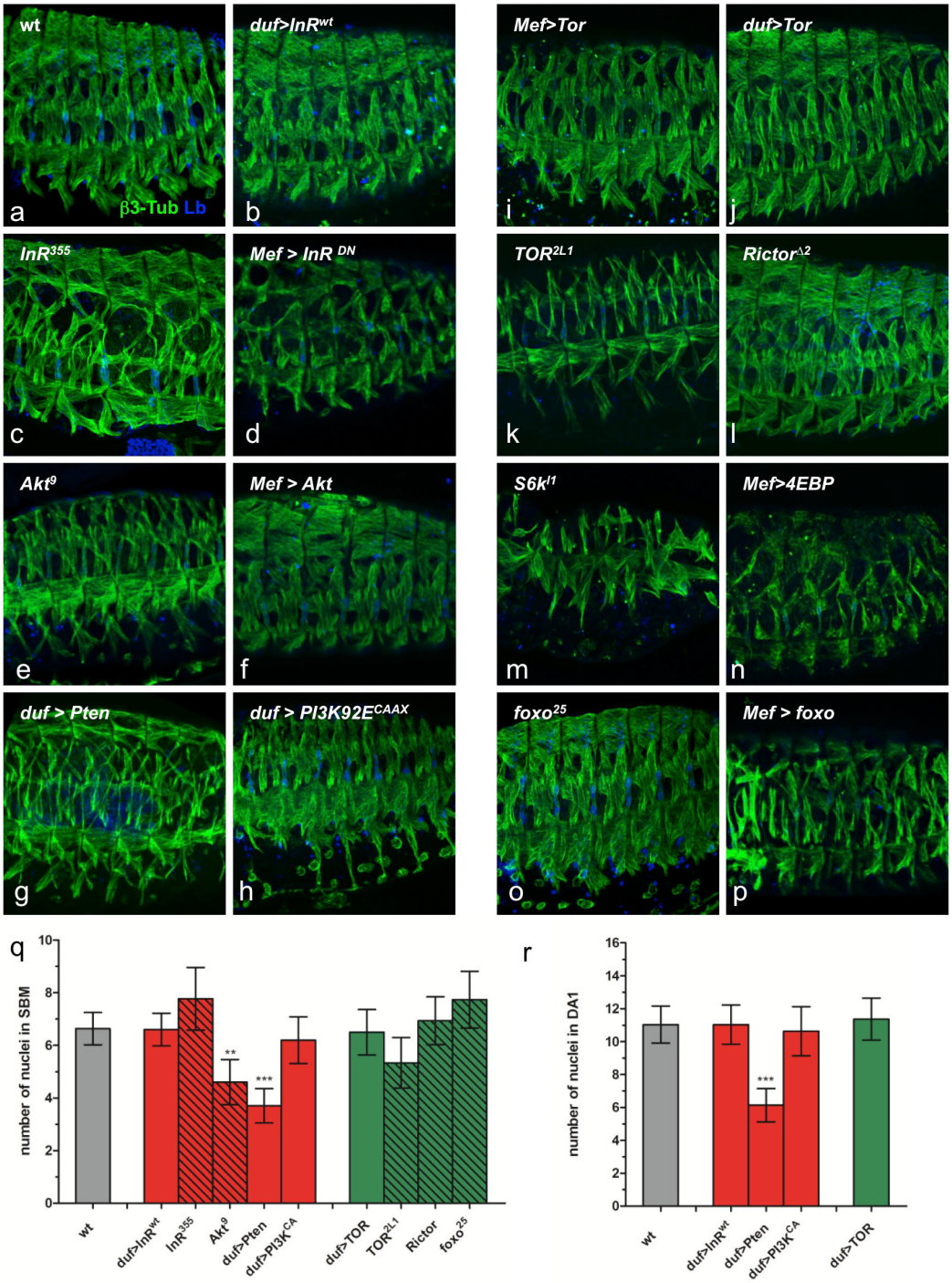
Supplementary Figure 4



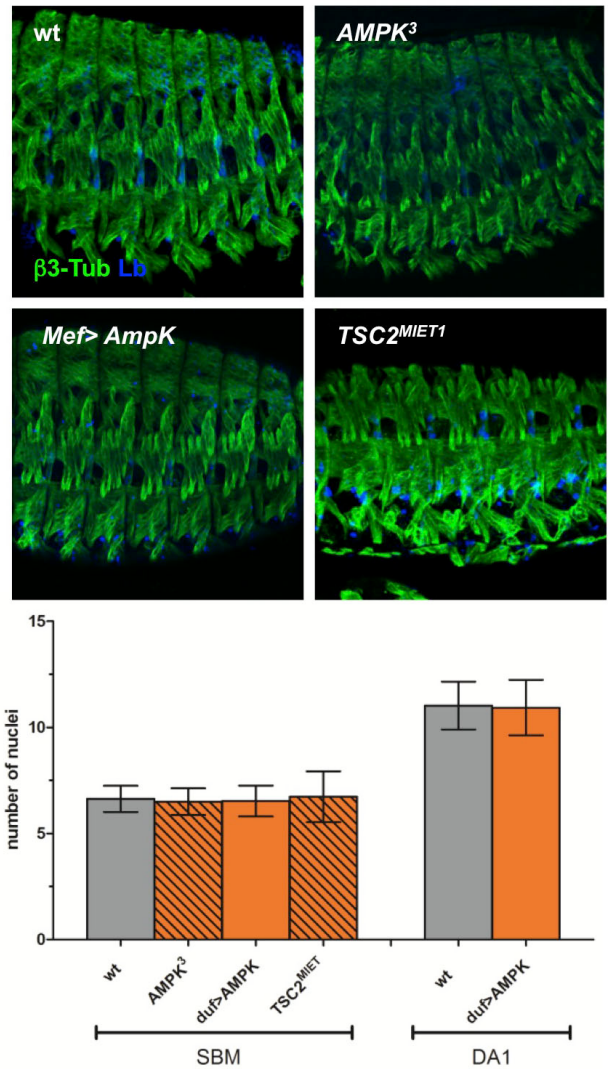
Supplementary Figure 5



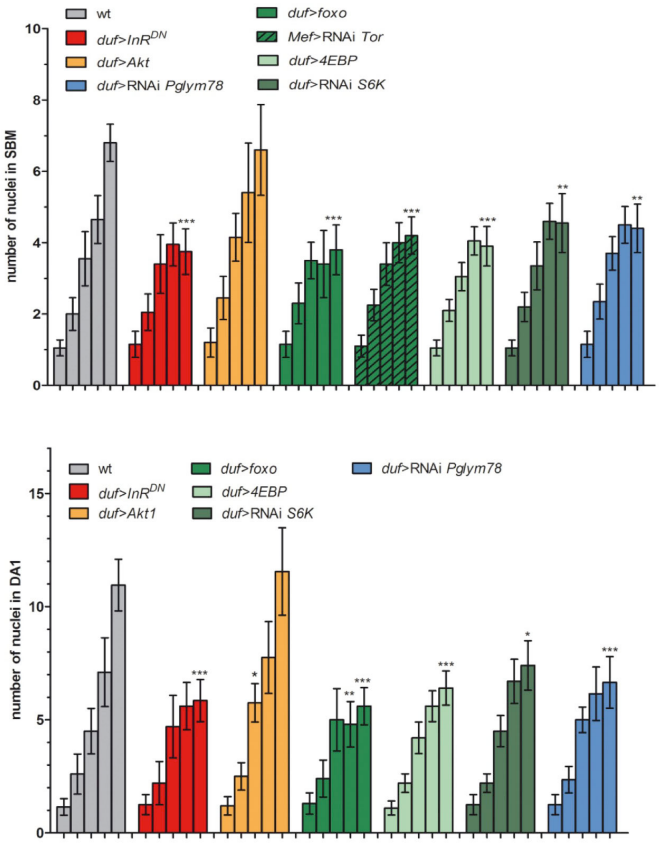
Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 8



Supplementary Table 1

Conserved muscle genes			
Drosophila melanogaster			Danio Rerio
GO category	CG number	Gene name	
Glucose metabolism	CG1721	Pglym78	pgam2
	CG8251	Pgi	gpia
	CG3001	Hex-A	zgc:55926
	CG4001	Pfk	pfkma
	CG2171	Tpi	tpi1b
	CG12055	Gapdh1	gapdh
	CG3127	Pgk	pgk1
	CG7070	PyK	pkm2b
	CG31692	fbp	fbp2
	CG6767		prps1a
	CG7254	GlyP	pygma
Pyruvate metabolism	CG10160	ImpL3	ldhb, ldha
	CG7430		didh
	CG10120	Men	me2, me3
	CG11876		pdhb
Oxidative phosphorylations	CG7361	RFeSP	uqcrfs1
	CG17246	Scs-fp	sdha
	CG17280	levy	cox6a1
	CG1746		atp5g
	CG2968		atp5d
	CG10664		cox4i1
	CG3283	SdhB	sdhb
	CG3683		ndufa8
	CG4307	Oscp	atp5o
	CG4769		cyc1
	CG6020		ndufa9
	CG6030	ATPsyn-d	atp5h
	CG6343	ND42	ndufa10
	CG9140		ndufv1
Citrate cycle	CG7998		zgc:64133
	CG12233	l(1)G0156	idh3a
ATPases	CG3725	Ca-P60A	atp2a1, atp2a2a
	CG1416		ahsa1
	CG1746		zgc:73293
	CG31045	Mhcl	myo18l1
	CG5525		cct4
	CG5596	Mlc1*	zgc:77231, mylz3, zgc:66286
Other metabolic pathways	CG6022	Cchl	hccs
	CG7356		tqm2
	CG8353		zgc:103586

Nucleic Acids/ Chromatin binding	CG5330	Nap1	nap1l1, nap1l4a
	CG10922	La	ssb
	CG5170	Dp1	hdlbp, wu:fa07b03
	CG6937		mki67ip
	CG1429	Mef2*	mef2a
	CG9809		ppargc1al, ppargc1b
	CG8545		im:6893299
	CG8542	Hsc70-5	hspa9b
	CG7006		nip7
	CG6388		im:7150454
	CG6375	pit	ddx18, pit
	CG5441	dei*	mespa, mespb
	CG5258	NHP2	nhp2
	CG4882		zgc:100970
	CG4033	Rpll35	zgc:66298
	CG3800		zff9
	CG3249	vu	akap1b
	CG1897	Msh*	msxe
	CG17334	lin-28	lin28
	CG12792	l(2)09851	qrwd1
	CG1234		noc3l
	CG12101	Hsp60	hspd1
	CG11738		zgc:65782
	CG10565		dnajc2

Amino Acids metabolism	CG2674	M(2)21AB	mat1a
	CG32031	Argk	ckma, ckmt2, zgc:56085, ckb
	CG11654	Ahcy13	ahcy
	CG3267		si:ch211-198n5.11, pccb
	CG4233	Got2	got2b
	CG5320	Gdh	glud1a, glud1b

Protein biosynthesis	CG11267		hspe1
	CG32409		rrs1
	CG10206	nop5	nop58
	CG12131	Adam	zgc:55443
	CG12141	Aats-lys	kars
	CG17611	eIF6	itgb4bp4
	CG4008	und	metap2, metap2l
	CG3633	mRpS29	dap3
	CG4533	l(2)efl	hspb1, hspb8
	CG4859	Mmp1	mmp14a
	CG5033		bop1
	CG9020		rars
	CG6382	Elf	gspt1
	CG2173	Rs1	ddx27
	CG5012	mRpL7-L12	mrpl12
	CG8443		zgc:152873

Transporter/carrier	CG6756	Tom70	tomm70a
	CG2713	ttm50	timm50
	CG4994	Mpcp	slc25a3, slc25a3l
	CG9480	Glycogenin	gyg1, gygl
	CG6647	porin	vdac2, vdac3
	CG7654		tomm20
	CG9297		LOC571928, srl
	CG4239		tmem38a

ECM and cytoskeleton	CG4843	Tm2	tpm3, tpma, tpm2
	CG7178	WupA	tnni2a.1, tnni2a.2, tnni2a.3, tnni2a.4, tnni2b.2
	CG4376	Actn*	actn3a
	CG4027	Act5C*	acta1a, acta1b, acta2
	CG18290	Act87E*	acta1a, acta1b, acta2
	CG10067	Act57B*	acta1a, acta1b, acta2
	CG10504	Ilk*	ilk
	CG18250	Dg*	dag1
	CG1915	sls*	mybpc3, ttna, ttnb, ttnl
	CG3299	Vinc	vcl
	CG3960		smtnl
	CG31794	Pax*	pxn
	CG7107	up*	tnnt1, tnnt3a, tnnt3b
	CG33149	Mlp60A*	csrp3

Signaling	CG7223	htl*	fgfrl1a, fgfrl1b
	CG17348	drl*	met
	CG11255		adkb
	CG6148	Past1	ehd1
	CG7981	trol	hspg2, sid4
	CG8556	Rac2	rac3
	CG9811	Rgk1	rem1
	CG18657	NetA*	ntn1a
	CG4125	rst*	kirrel, kirrel3

Not known	CG9131	kisir	slmo2
	CG11444		pdap1
	CG1430	bys	bysl
	CG11158		si:dkey-98p3.7
	CG14786		lrpprc
	CG17041		ldb3a, ldb3b, zgc:56116
	CG4405	jp	jph2
	CG5886		si:dkey-34f16.1
	CG6724		wdr12
	CG7519		zgc:92611
	CG7638		tmem161a
	CG7993		bxdc1
	CG8461		si:dkey-
	CG6455	Motor-protein	immt
	CG6459		zgc:110137

Supplementary Table 2

	wt	*Mef*>RNAi *Pglym78*	*duf*>RNAi *Pglym78*	*duf>InRwt*	*InR355*	*duf>InRDN*	*duf>PI3KCA*
SBM	6,63 ± 0,61	4,43 ± 0,73	4,53 ± 0,63	6,6 ± 0,62	7,77 ± 1,19	3,97 ± 0,93	6,2 ± 0,89
DA1	11,03 ± 1,13	7,4 ± 1,22	6,74 ± 0,98	11,03 ± 1,19	n.d.	5,40 ± 1,00	10,63 ± 1,50

	Akt1 9	*duf>Akt1*	*duf>Pten*	*foxo25*	*duf>foxo*	*AMPK3*	*duf>AMPK*
SBM	4,6 ± 0,86	6,57 ± 1,10	3,70 ± 0,65	7,73 ± 1,08	4,00 ± 0,74	6,50 ± 0,63	6,53 ± 0,73
DA1	n.d.	11,20 ± 1,27	6,13 ± 1,01	11,77 ± 1,07	5,10 ± 1,09	n.d.	10,93± 1,31

	TSC2 MIET	*TOR 2L1*	*Rictor*	*Mef>RNAi TOR*	*duf>TOR*	*duf>RNAi S6K*	*duf>4EBP*
SBM	6,73 ± 1,20	5,33 ± 0,96	6,93 ± 0,91	4,17 ± 0,53	6,5 ± 0,86	4,5 ± 0,73	3,87 ± 0,63
DA1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,37 ± 1,27	7,33 ± 1,47	6,67 ± 0,80

For each genotype, the average number of nuclei ± standard deviation is shown (n=30).

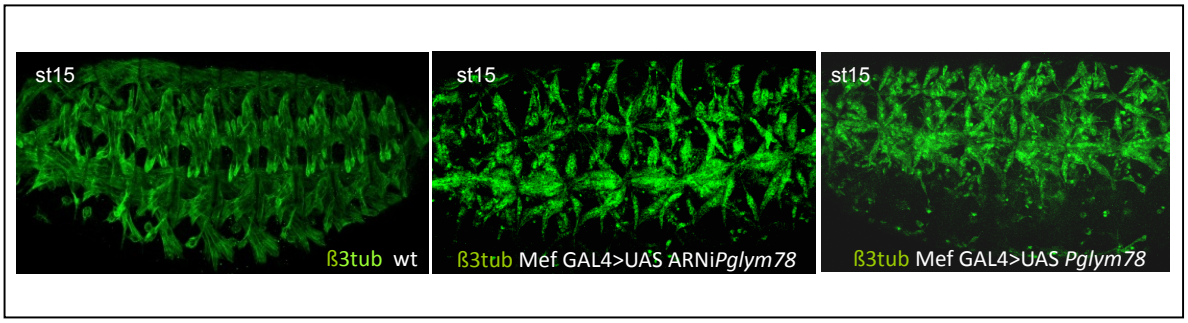


Figure 34 : Phénotypes musculaires observés suite au gain de fonction de *Pglym78*

L'augmentation musculaire de l'expression de *Pglym78* conduit à des phénotypes similaires à sa perte de fonction

II.2. Résultats complémentaires

II.2.1. Résultats non publiés sur le rôle de Pglym78 au cours de la myogenèse embryonnaire

Les résultats présentés pour *Pglym78* dans l'article ont tous été obtenus suite à une diminution d'expression du gène. Cependant, j'ai construit une lignée permettant la surexpression de ce gène. Les phénotypes obtenus après augmentation de l'expression de *Pglym78* dans les muscles sont similaires à ceux observés en perte de fonction **(Fig. 34)**. À première vue, ce résultat pourrait surprendre, mais étant donné que nous affectons ici un gène codant pour une enzyme, même si on augmente son expression ce n'est pas le cas des autres enzymes de la voie. En augmentant Pglym78, il y a consommation importante du substrat de cette enzyme qui finit par manquer puisque les enzymes en amont Pglym78 ne fonctionnement pas aussi rapidement et au final, cela conduirait à un déséquilibre puis au blocage de l'ensemble de la voie. Les résultats de cette expérience confortent le rôle de *Pglym78* décrit en perte de fonction.

Afin de mettre en évidence les gènes/voies métaboliques dérégulés lorsqu'on bloque la glycolyse, nous avons entrepris d'utiliser la technologie des puces à ADN. L'idée était de comparer le transcriptome d'embryons Mef2Gal4>UAS-LacZ (contrôle) à celui d'embryons Mef2Gal4>ARNi*Pglym78* au moment de la différenciation musculaire. J'ai donc extrait des ARN de ces deux génotypes à partir d'embryons âgés de plus de 10h (stade 13). Trois extractions différentes sont réalisées par génotype, puis hybridées deux à deux (un contrôle/une condition expérimentale) afin d'être comparées par la suite. Les ARN ont été pris en charge par la plateforme de séquençage et de puces à ADN de l'IGBMC de Strasbourg. Bien que les ARN aient été de bonne qualité et que les hybridations se soient déroulées avec succès, nous n'avons malheureusement pas pu interpréter les résultats obtenus après hybridation sur puce Agilent à cause d'une trop grande variabilité d'une des 3 conditions. Il serait donc nécessaire de refaire des extractions d'ARN afin de recommencer l'expérience.

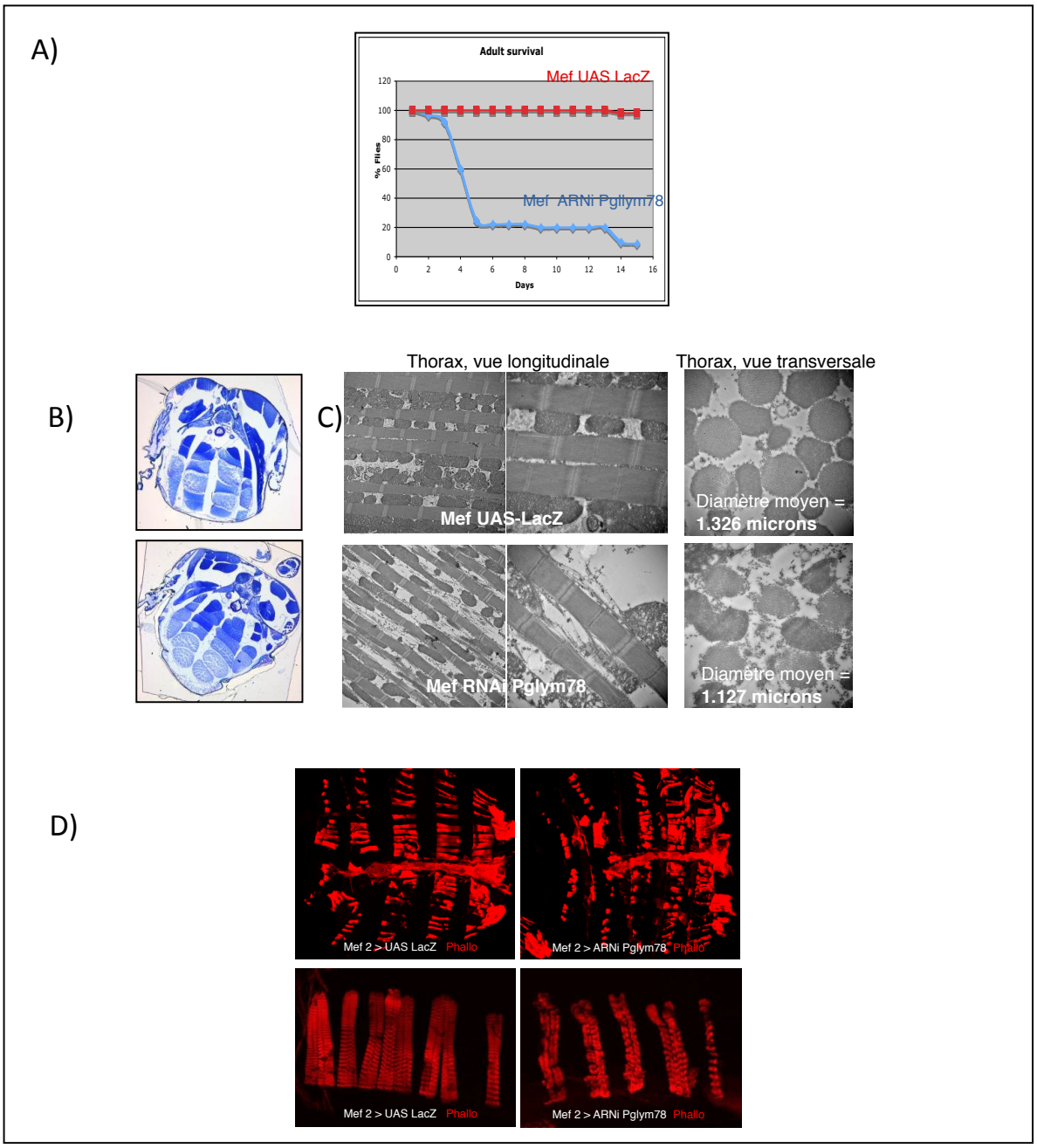


Figure 35 : Rôle de *Pglym78* au cours de la myogenèse adulte chez la Drosophile

A) Survie des mouches adultes suite à l'inhibition de l'expression musculaire de *Pglym78*
B) C) Phénotypes observés au niveau des muscles de vol. Des coupes de thorax B) semi-fines et C) ultrafines de mouches dont l'expression musculaire de *Pglym78* a été inhibée ont été réalisées et observées après B) marquage à la toluidine et C) au microscope électronique
D) Phénotypes observés au niveau des muscles abdominaux après dissection d'abdomens de mouches adultes dont l'expression musculaire de *Pglym78* a été inhibée et coloration à la phalloidine-cy3

II.2.2. Rôle de Pglym78 au cours de la myogenèse adulte

Le crible par ARNi avait pour issue l'identification de nouveau gènes impliqués dans la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile. Nous n'avions donc pas comme objectif l'analyse fonctionnelle de *Pglym78* au cours de la formation des muscles adultes. Cependant, nous avons été surpris d'observer que les mouches adultes issues du croisement Mef2>ARNi *Pglym78* avaient beaucoup de difficultés à voler et présentaient une diminution importante de leur durée de vie. J'ai donc dans un premier temps réalisé un test de survie qui m'a permis de mettre en évidence que la majorité des mouches mourrait dans les cinq jours **(Fig. 35A)**. Afin de comprendre ce phénomène ainsi que les problèmes de vol, nous avons ensuite observé la structure des muscles adultes de vol et des muscles abdominaux. Pour les muscles de vol, nous avons fait appel au Centre Imagerie Cellulaire Santé de la faculté de Médecine de Clermont-Ferrand. Les muscles de vol, plus précisément les IFM, ont été observés dans un premier temps après des coupes transversales semi-fines de 1 µm et coloration au bleu de toluidine. On peut noter la présence de l'ensemble des IFM laissant penser que l'inhibition de *Pglym78* n'affecte pas le développement de ces muscles **(Fig. 35B-C)**. Cependant, des observations en microscopie électronique ont également été réalisées suite à des coupes transversales ultrafines de 50 nm. À ce niveau d'observation, on peut distinguer les myofilaments et les sarcomères. Nous pouvons remarquer d'importantes différences entre le contexte contrôle (Mef2>UAS-LacZ) et le contexte Mef2>ARNi*Pglym78*. Les mouches déficientes pour *Pglym78* présentent en effet un détachement des myofilaments à la périphérie des myofibres induisant une réduction significative de leurs diamètres (1,1 µm contre 1,3 µm chez le contrôle). On note également des mitochondries moins denses et avec des formes très allongées, signe d'un changement métabolique par rapport à la condition contrôle **(Fig. 35C)** (Hackenbrock, 1968). Concernant les muscles abdominaux, des mouches adultes ont été disséquées et marquées à la phalloïdine couplée à la cyanine 3 afin de permettre leur observation. Il s'avère que l'inhibition de *Pglym78* conduit à la formation de muscles plus fins avec une désorganisation des sarcomères **(Fig. 35D)**. Ces résultats montrent que *Pglym78* serait réutilisé pendant la myogenèse adulte où il aurait un rôle important au cours du développement et/ou du fonctionnement des muscles adultes.

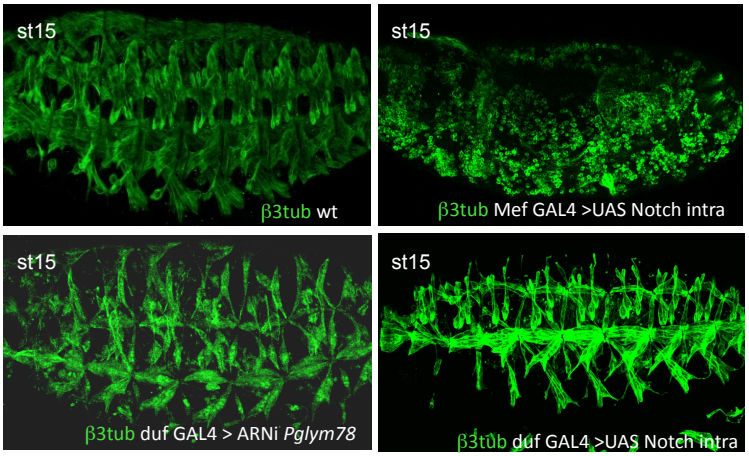


Figure 36 : Phénotypes musculaires observés suite à l'activation de la voie Notch dans les cellules musculaires

L'augmentation artificielle de la voie Notch dans les muscles somatiques embryonnaires bloque la différenciation lorsqu'elle est induite par la lignée pilote Mef2Gal4 A). Elle induit des phénotypes similaires à ceux observés lorsque l'on bloque la glycolyse quand elle est dirigée par la lignée dufGal4 B)

II.2.3. Régulation de la voie Notch par la glycolyse

En parallèle de l'analyse de la voie insuline, nous nous sommes demandé si des effecteurs, en aval de la glycolyse pouvaient également intervenir pour promouvoir la différenciation. Des travaux publiés par Saj *et al.* en 2010 ont mis en évidence, suite à un crible par ARNi chez la Drosophile, un réseau d'interaction de gènes intervenant dans la régulation de la voie Notch (Saj et al., 2010). Parmi les candidats identifiés, on trouve plusieurs gènes codant pour des enzymes de la glycolyse qui agiraient comme des régulateurs négatifs de la voie Notch.

Dans le contexte de nos travaux, nous observons une augmentation de la glycolyse au moment des étapes tardives du développement musculaire. Nous émettons donc l'hypothèse que cela pourrait permettre d'inhiber la voie Notch dans les cellules musculaires afin de permettre leur différenciation, la voie Notch étant associée au maintien des cellules dans un état indifférencié. Pour tester cette théorie, nous avons voulu étudier l'impact d'une surexpression de la voie Notch dans les cellules musculaires au moment de la différenciation.

La voie Notch est activée suite à la fixation sur le récepteur transmembranaire Notch de ses ligands Delta ou Serrate. Cela provoque deux clivages du récepteur : le premier permet la libération de la partie extracellulaire de Notch et le deuxième libère une partie intracellulaire qui est la partie effectrice de la voie. En effet une fois libérée, elle est transportée dans le noyau où elle s'associe notamment avec les protéines Suppressor of hairless (Su(H)) pour agir sur la transcription de plusieurs gènes cibles. Pour induire l'expression de la voie Notch dans les cellules musculaires j'ai donc utilisé une lignée inductible permettant l'expression de la partie intracellulaire du récepteur Notch (UAS-Notch^{intra}). Je l'ai tout d'abord croisée avec la lignée pilote Mef2-Gal4 qui induit l'expression de la protéine Gal4 dans l'ensemble des myoblastes. Après immunomarquage anti-β3tubuline, aucune fibre musculaire n'est identifiable, on observe uniquement des myoblastes non fusionnés, conséquence d'un blocage drastique de la différenciation **(Fig. 36)**. J'ai donc ensuite utilisé la lignée pilote duf-Gal4 qui, contrairement à la lignée Mef2-GAL4, n'induit l'expression de la protéine Gal4 que dans les cellules fondatrices et les fibres en développement. On peut ainsi observer la formation de fibres musculaires très fines, comme celles obtenues lorsqu'on bloque les gènes de la glycolyse.

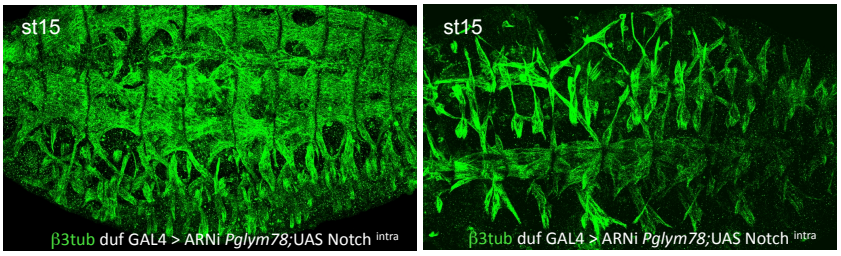


Figure 37: Interaction entre la voie Notch et la glycolyse dans les cellules musculaires
L'augmentation de l'activité de la voie Notch associée à la diminution de l'expression *Pglym78* dans les muscles conduit à d'importants phénotypes musculaires

Si la voie Notch est réellement inhibée (directement ou indirectement) par la glycolyse, on devrait pouvoir observer l'activité de la voie Notch dans les cellules musculaires où l'on aurait bloqué la glycolyse. Ainsi, j'ai réalisé des immuno-marquages contre Zfh1 et Twist qui sont des cibles connues de Notch, notamment dans les cellules AMP. Cependant, ces anticorps étant assez difficiles à détecter, je n'ai pas pu mettre en évidence d'expression des protéines Zfh1 et Twist dans les muscles des embryons duf>ARNi*Pglym78*. Dans le même but, j'ai tenté de détecter directement l'expression de la protéine Notch, mais l'anticorps utilisé n'a pas fonctionné que ce soit en condition ARNi ou dans des embryons sauvages.

Afin de mettre en évidence l'interaction potentielle entre la glycolyse et la voie Notch, j'ai construit plusieurs lignées afin de réaliser des tests d'épistasie. Ainsi, j'ai recombiné la lignée ARNi *Pglym78* avec *1)* une lignée ARNi dirigée contre Notch et 2) la lignée UAS-Notch^{intra}. Si la glycolyse a bien pour effet d'inhiber la voie Notch, on devrait avoir, après croisement avec une lignée pilote musculaire, dans la première lignée, une atténuation des phénotypes musculaires observés en duf>UAS-Notch^{intra} et dans le deuxième cas, on pourrait s'attendre à observer des phénotypes plus graves. Je n'ai à ce jour testé que le deuxième contexte. On observe effectivement d'importants défauts musculaires **(Fig. 37)**. Cependant, ils ne semblent pas plus sévères que ceux obtenus suite à la seule augmentation de la voie Notch. Même si ces résultats pourraient à première vue paraître en défaveur d'une interaction entre la glycolyse et la voie Notch, on peut légitimement penser que l'augmentation virtuelle de la voie Notch par l'UAS-Notch^{intra} est maximale et que l'augmentation putative de la forme endogène de la voie suite à l'inhibition de la glycolyse n'a pas d'effet supplémentaire sur la myogenèse

II.2.4. Rôle de Pglym78 chez le nématode

Afin d'évaluer la conservation fonctionnelle des 5 gènes candidats sélectionnés, des analyses ont été menées chez le nématode. Elles ont été réalisées par Caroline Borrel au CGPMC de Villeurbanne sous la direction de Laurent Ségalat et de Kathrin Gieseler. Le rôle de l'orthologue de *Pglym78* chez *C.elegans, Ce-PGM,* a été analysé par injection directe d'ARNdb dans de jeunes adultes (Zhang et al., 2004). L'atténuation de l'expression de *Ce-PGM*, provoque un arrêt du développement des vers mais sans aucun phénotype apparent. Il serait intéressant

de répéter cette expérience avec une lignée de vers permettant de suivre le développement musculaire *in vivo* car ces résultats ne permettent pas de savoir si l'arrêt de développement est une conséquence de l'effet musculaire de *Ce-PGM.*

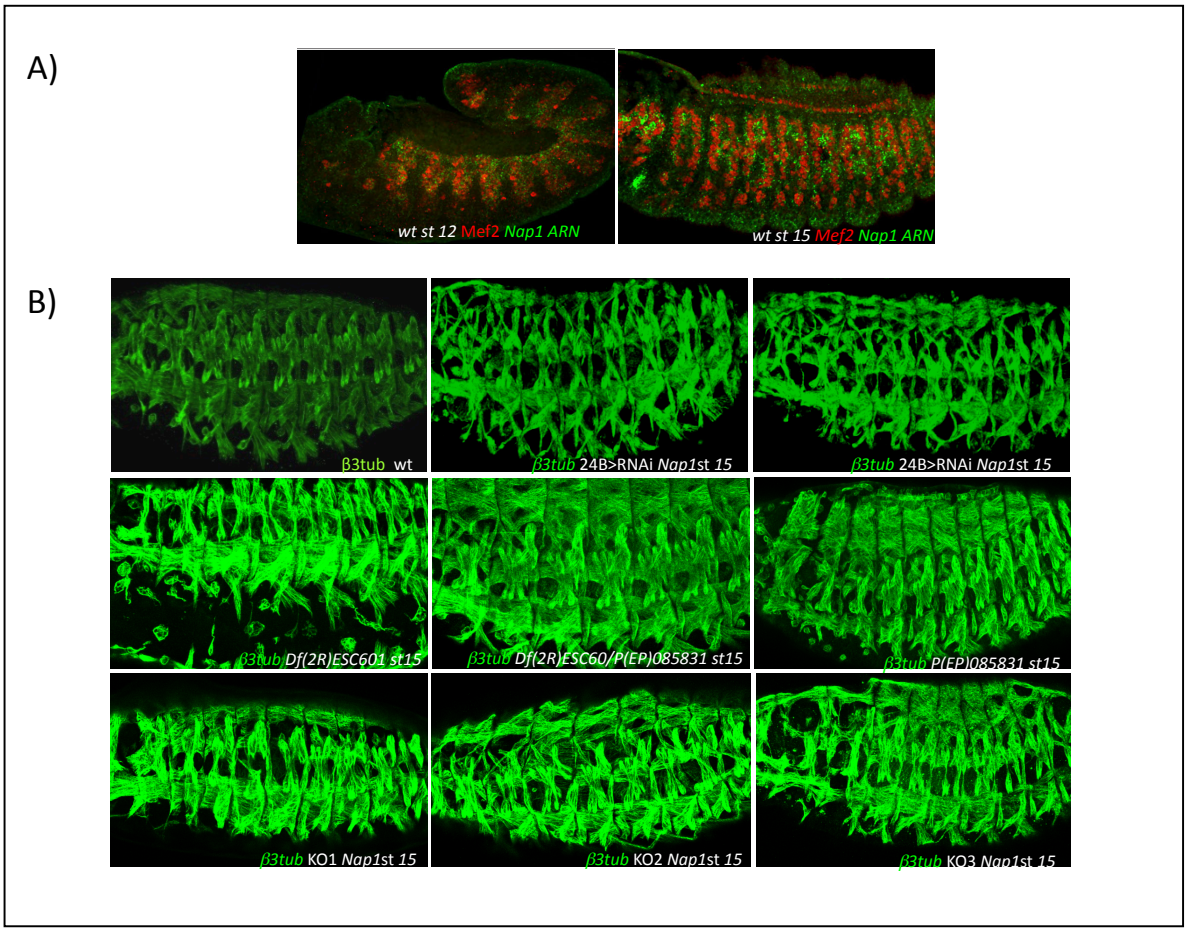


Figure 38 : Profil d'expression de *Nap1* et phénotypes musculaires obtenus après inhibition de son expression embryonnaire chez la Drosophile

A) *Nap1* est spécifiquement exprimé dans les compartiments musculaires chez l'embryon de Drosophile dès le stade 12

B) Phénotypes musculaires obtenus suite à l'inhibition de l'expression de *Nap1* dans les fibres embryonnaires

III. ANALYSES FONCTIONELLES D'AUTRES GENES « MUSCLE-SPECIFIQUES » AU COURS DE LA MYOGENESE EMBRYONNAIRE

III.1. Analyse fonctionnelle de *Nap1*

En plus des analyses réalisées sur les trois gènes décrits précédemment, nous nous sommes particulièrement intéressés au gène *Nap1.* Le gène *Nap1* code pour une chaperonne d'histones impliquée dans le remodelage de la chromatine, plus particulièrement dans le positionnement des histones H2A et H2B (Ito et al., 1996). L'expression exclusivement musculaire de *Nap1* chez la Drosophile et le poisson-zèbre est particulièrement intéressante car elle suggère un rôle de *Nap1* dans la régulation des gènes de façon muscle spécifique.

Les premiers résultats obtenus pour *Nap1* montrent que ce gène est exprimé dans les compartiments musculaires de l'embryon de Drosophile du stade 12 de développement (de 7.20 à 9.20 après la ponte) jusqu'à la fin de l'embryogenèse avec une expression plus forte dans les muscles latéraux et dorsaux **(Fig. 38A)**. L'atténuation de l'expression de *Nap1* par injection d'ARNdb donne des phénotypes intermédiaires caractérisés par des défauts importants au niveau des fibres latérales et dorsales **(Fig. 32)**, ce qui est cohérent avec son profil d'expression. La forme des fibres est fortement affectée et certaines semblent absentes. Ce type de défauts peut être la conséquence d'une dérégulation de l'acquisition d'identité des myoblastes. Afin de confirmer ces résultats, j'ai tout d'abord réalisé des marquages anti-β3tubuline sur la lignée Df(2R)ESC601, portant une délétion du gène *Nap1* **(Fig. 38B)**. De forts phénotypes affectant majoritairement les muscles latéraux et dorsaux sont observés, mais ils sont plutôt caractérisés par des changements de forme et de taille que par des défauts d'identité, toutes les fibres étant présentes. Cependant, cette délétion couvre d'autres gènes. J'ai donc réalisé un croisement avec une lignée portant un élément P dans la séquence de *Nap1* (P(EP)*Nap1*^{08583}) en émettant l'hypothèse qu'elle était hypomorphe pour ce gène. Les transhétérozygotes obtenus ne montrent aucun phénotype laissant envisager que les défauts musculaires observés dans la lignée Df(2R)ESC601 pourraient être dus à la délétion d'autre(s) gène(s) que *Nap1*. Néanmoins, les embryons homozygotes pour l'élément P ne montrent pas non plus de problème de développement musculaire. Il est donc possible que l'insertion de l'élément P n'interfère pas

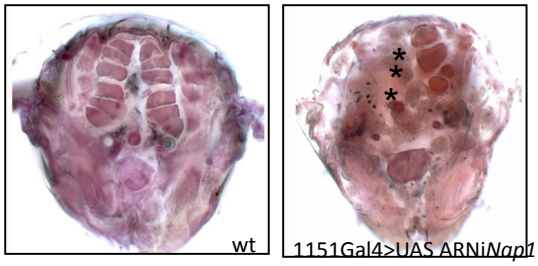


Figure 39 : Implication de *Nap1* dans la formation des muscles de vol chez la Drosophile

L'inhibition de l'expression de *Nap1* dans les myoblastes adultes induit un défaut de formation des muscles de vol (coupes transversales de thorax)

avec la transcription de *Nap1.* J'ai donc ensuite utilisé des lignées perte de fonction inductibles UAS-ARNi croisées avec une lignée pilote 24B-Gal4 permettant l'atténuation de l'expression des gènes dans les compartiments musculaires uniquement, ainsi que des lignées perte de fonction pour *Nap1* (KO *Nap1)* obtenues de D. Lankenau (Lankenau et al., 2003). Pour l'ensemble de ces génotypes, les embryons observés montrent des phénotypes similaires à ceux obtenus avec la lignée portant dans la délétion, confirmant l'implication de *Nap1* dans la myogenèse embryonnaire avec l'éventualité qu'il intervienne dans les étapes tardives du développement musculaire plutôt que dans la spécification des myoblastes.

Certains gènes impliqués dans la myogenèse embryonnaire sont « réutilisés » lors de la myogenèse adulte, comme nous l'avons observé pour *Pglym78*. Nous avons donc voulu tester le rôle de *Nap1* au cours de la seconde vague de myogenèse aboutissant à la formation des muscles adultes. Grâce à une collaboration avec Cédric Soler dans l'équipe de Mike Taylor à l'Université de Cardiff, le développement des muscles de vols, et plus précisément des IFM, après inhibition de l'expression de *Nap1* a été étudié. Bien que le profil d'expression de *Nap1* chez l'adulte n'ait pas été décrit, la diminution de son expression dans les myoblastes adultes conduit à des défauts de développement des IFM **(Fig. 39)**. En effet, des lignées ARNi pour *Nap1* ont été croisées avec une lignée pilote 1151-Gal4 qui permet l'expression de la protéine Gal4 dans les myoblastes adultes (Roy and VijayRaghavan, 1997) et on observe, dans les mouches issues de ce croisement, de forts phénotypes au niveau des muscles de vol avec une malformation voire une absence totale de plus de la moitié des IFM. Ce résultat montre que *Nap1* a également rôle important au cours de la myogenèse adulte chez la Drosophile.

Des expériences d'ARNi chez le nématode ont également été réalisées pour tester le rôle de l'orthologue de *Nap1*, le gène *D2096.8.* L'atténuation d'expression de ce gène sur 48h n'a pas d'effet sur le développement musculaire alors que sur 7 jours (Voir **annexe 4** pour le détail des expériences), elle induit une diminution de la longévité des vers qui présentent également une taille réduite. Chez le nématode, *Nap1* serait donc impliqué dans la croissance, qui pourrait être la conséquence d'un retard de développement, et dans la longévité mais aucun rôle musculaire n'a été mis en évidence suite aux différentes analyses.

Drosophila melanogaster	Gallus gallus	Ciona intestinalis	Caenorhabditis elegans
Ca-P60A	ATP2A2 ATP2A3	ci0100137099* ci0100139628 ci0100136464* ci0100154411	*sca-1*
WupA	TNNI1 TNNI2	ci0100137955*	*tni-1*
ArgK	KCRU KCRB KCRS	ci0100149576* ci0100152156 ci0100131809 ci0100130283* ci0100141878* ci0100143086	*ZC434.8*

Tableau 2 : Conservation des gènes *Ca-P60A*, *ArgK,*et *WupA* chez le poulet, l'ascidie et le nématode

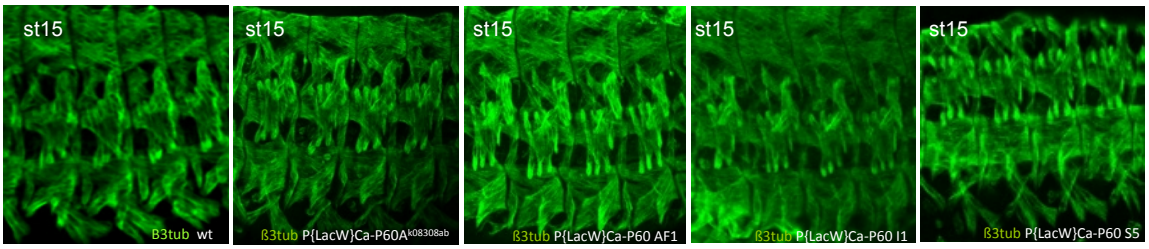


Figure 40 : Rôle de *Ca-P60A* au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile
Quatre allèles hypomorphes ont été testés mais aucun phénotype n'a été observé.

III.2. Analyses fonctionnelles de Ca-P60A, ArgK et WupA

Les analyses fonctionnelles des gènes *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* ont été réalisées simultanément et en suivant les mêmes approches. En effet, au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité, notamment grâce au réseau MYORES, de participer à des collaborations qui ont permis d'analyser la fonction des gènes *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* chez le poulet (C.Marcelle), l'ascidie (P.Lemaire) et le nématode (L.Ségalat) (**Tab. 2, Annexes 2, 3 et 4)**. Pour chacune de ces espèces, l'objectif était, autant que possible, de déterminer l'expression des orthologues des 3 gènes drosophiliens et si ces derniers étaient musculaires, d'analyser leur fonction au cours de la myogenèse. Ils seront donc présentés dans un même chapitre.

III.2.1. Chez la Drosophile

J'ai tout d'abord cherché à confirmer l'implication des gènes *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* dans la myogenèse embryonnaire de la Drosophile. Pour cela, j'ai recherché pour chacun d'entre eux des lignées de Drosophiles disponibles permettant d'inhiber leur fonction.

Ca-P60A est un gène codant pour une pompe calcium ATP dépendante. Comme décrit précédemment, la contraction musculaire nécessite l'augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme. Cependant, les résultats obtenus après injection d'ARNdb contre *Ca-P60A* suggèrent que ce gène serait impliqué dans les étapes intermédiaires mais également tardives du développement musculaire embryonnaire. On observe en effet des problèmes d'identité musculaire mais aussi des défauts d'attachement des fibres à l'épiderme. Afin de préciser ces résultats, j'ai observé la structure des muscles embryonnaires par des immunomarquages anti-β3tubuline (Junion et al., 2007) dans plusieurs lignées mutantes pour ce gène. La lignée P{LacW}*Ca-P60A*^{k08308ab} présente une insertion d'un élément transposable dans la séquence du gène, interférant très probablement avec son expression, néanmoins je n'ai observé aucun défaut musculaire dans les embryons portant cet élément **(Fig. 40)**. J'ai donc ensuite utilisé des lignées mutantes EMS obtenues de M. Fortini et déjà décrites comme hypomorphes pour ce gène (Periz and Fortini, 1999). Les trois mutations AF1, S5 et I1 ne sont pas viables à l'état homozygote chez l'adulte montrant l'importance du gène *Ca-P60A* au cours du développement. Cependant je n'ai détecté aucune anomalie musculaire dans les embryons

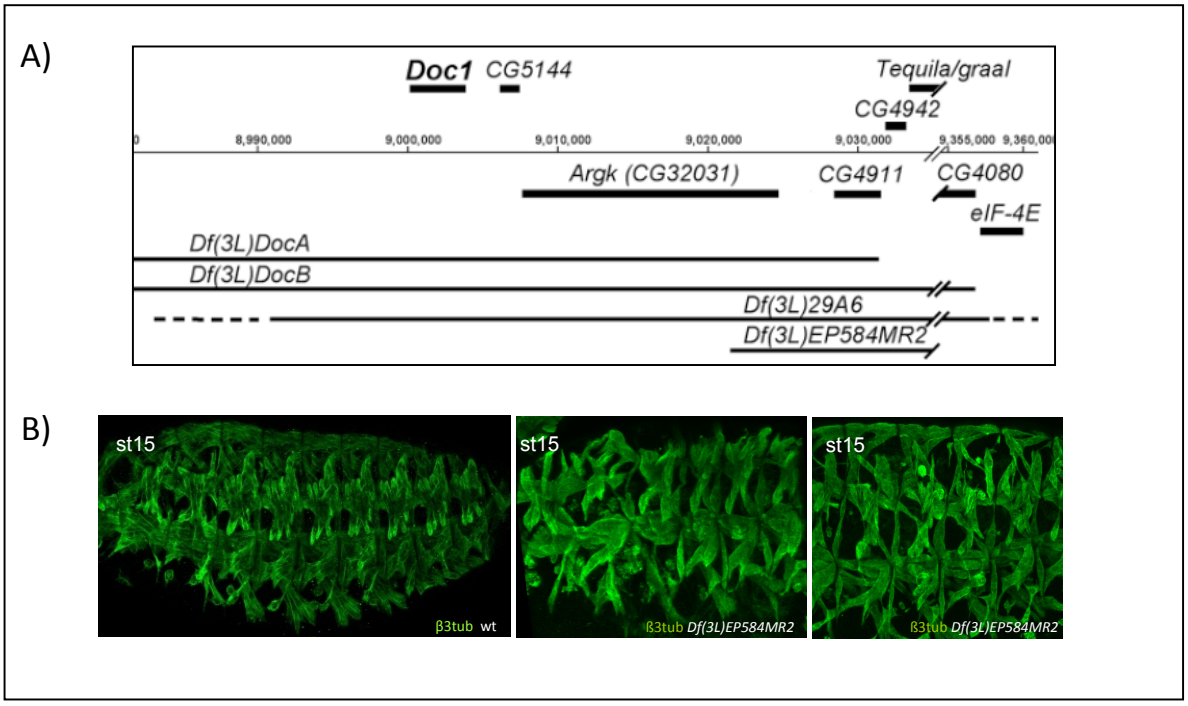


Figure 41 : Rôle de *ArgK* au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile

A) Représentation schématique de la délétion couverte le la lignée Df(3L)EP584

B) Phénotypes musculaires observés suite à la délétion de *ArgK*

D'après Reim *et al.*, 2003

homozygotes en fin d'embryogenèse. Nous pouvons donc penser que ces lignées hypomorphes n'induisent pas une diminution suffisante de l'expression de *Ca-P60A* pour perturber la myogenèse.

Le gène ArgK code pour l'enzyme Arginine kinase qui catalyse, selon les besoins énergétiques de la cellule, soit la conversion de l'arginine en phosphoarginine, impliquant la conversion d'une molécule d'ATP en ADP, soit la réaction inverse **(Fig. 41)**. Lors de la contraction musculaire, la demande en énergie est très importante et lors des premières secondes l'ATP est fourni par la conversion de la phosphoarginine en arginine permettant de reformer de l'ATP à partir de l'ADP. Ainsi, suite au crible par ARNi, nous avons été surpris d'obtenir des phénotypes suggérant l'implication d'*ArgK* dans la spécification des fibres musculaires. Nous avons donc souhaité savoir si ce gène avait une fonction plus précoce dans le muscle en développement que celle déjà décrite lorsqu'il commence à contracter. Pour cela, nous avons recherché l'existence de lignées mutantes pour *ArgK.* Nous avons obtenu par M. Frasch la lignée Df(3L)EP584MR2 qui comprend la délétion du gène *ArgK* (Reim et al., 2003) **(Fig. 41A)** et nous avons aussi étudié la lignée P(SUP)ArgK^{KG10020} de Bloomington qui présente une insertion d'un élément P dans la séquence du gène *ArgK*. J'ai ainsi réalisé des immunomarquages anti-β3tubuline sur ces deux lignées **(Fig. 41B)**. On peut observer d'importants défauts musculaires dans les embryons portant la déficience, caractérisés par l'absence de certaines fibres latérales et une modification notable de la forme de l'ensemble des muscles. Certains semblent même présenter des défauts d'attachement à l'épiderme, comme les muscles ventraux dont la surface des points d'attachement aux deux extrémités des muscles est fortement réduite par rapport à un embryon sauvage. Ce résultat laisse penser que *ArgK* serait impliqué dans la spécification des fibres musculaires, confortant les résultats obtenus par injection, mais également au cours des étapes plus tardives de la myogenèse comme l'attachement. Cependant, la délétion utilisée ne couvre pas uniquement le gène *ArgK,* mais elle supprime également l'intégralité de la séquence des *CG4911* et *CG4942* et une partie du gène *Tequila.* Ces gènes n'ont pas de fonction décrite dans la myogenèse, mais on ne peut pas exclure qu'ils soient impliqués dans les phénotypes observés.

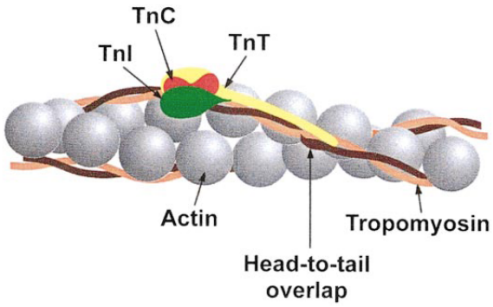


Figure 42 : Localisation de la troponine I au sein du complexe troponine-tropomyosine associé aux filaments fins d'actine

D'après Gordon *et al.*, 2000

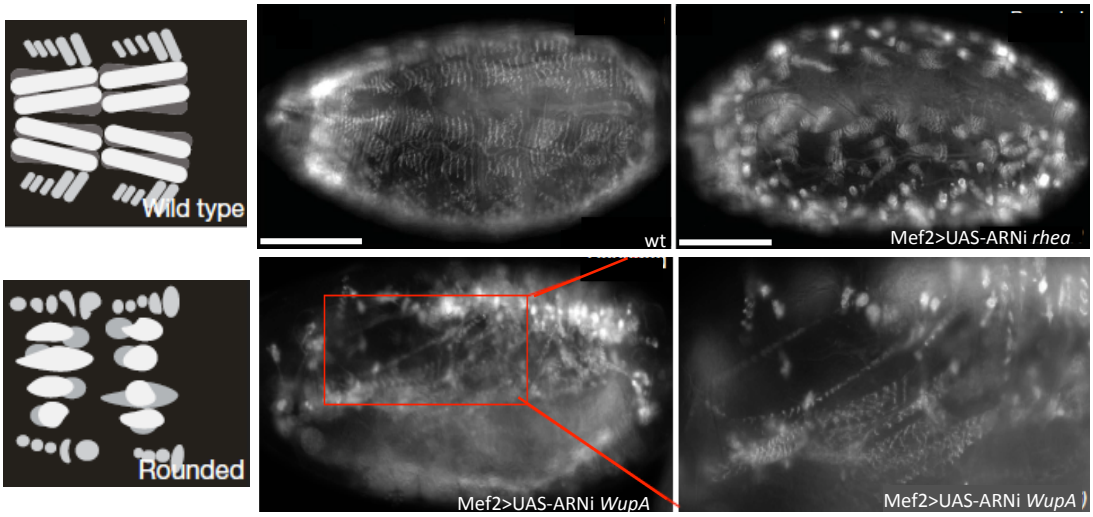


Figure 43 : Rôle de *WupA* au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile

Les phénotypes observés en fin d'embryogenèse après inhibition de l'expression de *WupA* sont similaires à ceux observés après inhibition du gène *rhea*, impliqué dans l'attachement musculaire

D'après données non publiées et Schnorrer *et al.*, 2010

Le troisième gène qui nous a intéressé est *WupA* qui code pour la sous-unité I de la troponine, impliquée dans la relaxation musculaire par son action inhibitrice sur la liaison entre les protéines d'actine et de myosine **(Fig. 42)** (Gordon et al., 2000). Nos résultats montrent que ce gène s'exprime dès le stade 7, soit bien avant la contraction musculaire, et l'inhibition de son expression au cours du développement embryonnaire par injection d'ARNdb provoque d'importants défauts musculaires évoquant des problèmes d'attachement des fibres à l'épiderme. Franck Schnörrer (MPI, Munich) dont l'équipe a testé l'ensemble des lignées ARNi disponibles avec une lignée pilote musculaire *Mef2-Gal4,* travaux qui ont été publiés l'an dernier (Schnorrer et al., 2010) a accepté de nous transmettre les résultats obtenus pour *WupA*. Tout d'abord, il a été observé que les embryons issus du croisement *Mef2*-Gal4>UAS-ARNi*WupA* meurent en fin d'embryogenèse, soulignant l'importance de *WupA* dans le muscle. De plus, la lignée *Mef2*-Gal4 qui a été utilisée avait été préalablement recombinée avec une lignée permettant d'observer directement les lignes Z et donc la structure des sarcomères et des muscles. Ainsi, ils ont observé que les muscles se concentrent au centre de l'embryon, comme ce que nous avons pu observer après injection d'ARNdb, et qu'ils sont beaucoup plus courts que chez un embryon sauvage **(Fig. 43)**. Des muscles d'apparence ronde ont également été observés. Ils sont caractéristiques de muscles qui se développent normalement mais ne parviennent pas à former des sites d'attachement stables comme ce qui est observé après inhibition de l'orthologue de Talin, le gène *rhea*. Ces résultats suggèrent que *WupA* est impliqué dans l'attachement des fibres à l'épiderme et les phénotypes que l'on observe après injection d'ARNdb ou dans les lignées ARNi seraient le résultat d'un détachement des muscles suite aux premières contractions. Cependant, compte tenu de l'expression précoce de *WupA* on ne peut pas exclure une fonction au cours des étapes précédentes.

III.2.2. Chez les autres espèces

Le poulet a été choisi comme modèle vertébré pour analyser la conservation fonctionnelle des gènes identifiés chez la Drosophile car c'est un modèle facilement accessible à des expériences de perte/gain de fonction grâce à la technique d'électroporation. Chez le poulet, il a été montré que les orthologues de *Ca-P60A* et *WupA* sont exprimés spécifiquement

dans les myotomes alors que l'orthologue de *ArgK* est exprimé dans les myotomes et le tube neural **(Annexe 2)**. Ces résultats montrent une conservation importante de l'expression musculaire de ces trois gènes. Cependant, les analyses fonctionnelles n'ont pas été réalisées.

Les travaux sur l'asidie avaient pour but de tester le rôle des orthologues de *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* dans le développement musculaire de l'ascidie, qui est un système relativement simple. De plus, grâce à sa position phylogénétique, l'ascidie est couramment utilisée comme modèle pour étudier l'évolution des gènes entre les vertébrés et les invertébrés. Les profils d'expression des orthologues de ces trois gènes, décrits dans la base de données Aniseed (http://www.aniseed.cnrs.fr/index.php) montraient une conservation importante de l'expression musculaire chez l'ascidie, renforçant la pertinence de conduire des analyses fonctionnelles chez cette espèce **(Annexe 3)**. Cependant, les analyses fonctionnelles par injections de morpholinos n'ont donné aucun résultat.

C. elegans est un modèle largement utilisé pour réaliser des cribles génétiques et notamment pour la recherche de gènes impliqués dans le développement musculaire **(Annexe 4)**. En effet, il présente un système musculaire simplifié et l'approche par ARN interférence chez le nématode est très rapide à mettre en œuvre puisque la plupart des clones permettant d'inhiber les gènes de *Caenorhabditis elegans* existent déjà et n'ont donc pas besoin d'être systématiquement clonés.

L'inactivation du gène *sca-1*, orthologue de *Ca-P60A* sur 48h conduit à la formation de l'ensemble des cellules musculaires, suggérant qu'il n'a pas d'effet sur la myogenèse. Cependant, lors de l'expérience de ARNi sur 7 jours, l'inhibition de *sca-1* provoque une létalité importante des vers et très peu de descendants survivent. Des tests de survie ont montré qu'en moyenne près de 9% des œufs pondus par ces adultes sont retrouvés morts 24h après la ponte, suggérant que *sca-1* joue un rôle au cours du développement embryonnaire du nématode.

De la même façon, après inhibition de l'expression de *tni1,* orthologue de *WupA*, sur 48h, les vers ne présentent pas de dégénérescence musculaire. Cependant, l'expérience sur 7 jours induit une diminution de la longévité des vers et des défauts musculaires.

Pour *sca-1* et *tni-1*, un troisième test a été réalisé afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de ces gènes sur la contraction musculaire des larves. L'inhibition de l'expression de *sca-1* donne des larves présentant un nombre de contractions plus faible.

Concernant l'orthologue du gène *ArgK, ZC434*, l'expérience d'ARNi sur 48h n'a pas non plus montré de défaut musculaire. L'ARNi sur 7 jours donne des vers au phénotype sauvage, sans aucune fibre musculaire dégénérée mais présentant une diminution significative de leur durée de vie.

Pour conclure, les analyses sur le nématode nous ont permis de montrer que l'implication des orthologues des 3 gènes drosophiliens sur le développement du ver (effet sur la longévité et la survie). Cependant, on ne peut pas affirmer qu'elle soit la conséquence d'un rôle de ces gènes dans le muscle. En effet, les profils d'expression de *sca-1*, *tni-1* et *ZC434* ne sont pas connus et suite à l'ingestion des clones, le phénomène d'ARNi se propage à toutes les cellules de l'organisme, sans spécificité tissulaire. On ne peut donc pas exclure que les effets observés reflètent un rôle dans d'autres tissus que le muscle. L'analyse des fibres musculaires ne nous a pas non plus permis de déterminer le rôle des orthologues de *Ca-P60A* et *ArgK* dans la myogenèse chez *C.elegans*, puisqu'aucun défaut musculaire n'a été observé pour *ZC434* et parce que les vers inhibés pour *sca-1* ne survivent pas. Concernant *tni-1,* la détection de défauts au niveau des fibres musculaires est en faveur d'une conservation du rôle de *WupA* dans la myogenèse. Cependant, les muscles chez *C. elegans* étant mononucléés, un certain nombre de processus myogéniques, notamment la fusion, ne peuvent être comparés avec la Drosophile. Ce modèle reste donc très attractif pour tester rapidement l'implication d'un gène dans le développement et les effets de son atténuation sur la dégénérescence musculaire, mais ne peut être utilisé pour analyser précisément sa conservation fonctionnelle.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Sélection de gènes conservés et analyse de leur rôle myogénique par ARNi

Au cours des dix dernières années, en plus du séquençage de plusieurs génomes, un nombre important de données sur l'expression des gènes est devenu accessible *via* des bases de données spécialisées. Pour mettre en place ce crible nous avons tiré profit d'un accès aux bases de données contenant les profils d'expression des gènes du poisson-zèbre (www.zfin.org) et de la Drosophile (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl). Ainsi, nous avons sélectionné les gènes conservés entre la Drosophile et le poisson-zèbre et exprimés dans les compartiments musculaires au cours du développement embryonnaire. Deux autres raisons qui étaient à la base de ce projet sont la conservation évolutive des grandes étapes de la myogenèse et des gènes qui la contrôlent et la possibilité d'atténuer l'expression des gènes par ARN interférence chez la Drosophile, ce qui permet l'analyse rapide de leurs fonctions.

Résultats du crible génétique

Le crible fonctionnel basé sur l'ARN interférence a permis de mettre en évidence l'implication de 20 gènes dans les différentes étapes de formation des muscles somatiques de la Drosophile. Si on compare les niveaux d'expression décrits par ModENCODE pour ces 20 gènes avec les phénotypes obtenus par injection d'ARNdb, on constate qu'ils sont exprimés pendant l'étape de la myogenèse au cours de laquelle ils semblent impliqués et de façon intéressante, les gènes de la catégorie « tardive » tels que *Pglym78*, *WupA* ou encore *Pgi* sont spécifiquement exprimés en fin d'embryogenèse. Ces observations montrent la cohérence des phénotypes obtenus et renforcent l'idée que cette technique est efficace.

Pour certains gènes, comme *Impl3*, l'injection d'ARNdb n'a donné aucun phénotype musculaire apparent. Pourtant, l'atténuation de l'expression de ce gène dans le muscle grâce à une lignée UAS-ARNi conduit à des défauts musculaires (voir article), montrant que ce gène est requis au cours de la myogenèse. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ce gène est exprimé uniquement tardivement (pas

d'expression maternelle) et de façon très intense. Il est donc possible qu'il y ait une dilution des ARNdb entre le moment où ils sont injectés dans l'embryon et l'activité de *Impl3*, rendant inefficace le phénomène d'ARNi.

Avantages et limites de la technique d'injection d'ARN double brins

La technique d'injection directe d'ARN double brins a été utilisée à plusieurs reprises et avec succès pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la cardiogenèse (Kim et al., 2004), pour tester fonctionnellement les gènes candidats exprimés spécifiquement dans les FC et dans les FCM (Estrada et al., 2006), ou encore pour valider des gènes identifiés en culture cellulaire et impliqués dans l'attachement musculaire, ou encore des cibles de Lb (Bai et al., 2008; Junion et al., 2007). Nous avons choisi d'injecter les ARNdb dans les embryons transgéniques MHC-*tau*GFP afin d'observer les phénotypes musculaires directement dans les embryons vivants, ce qui facilite le crible et le rend assez rapide. Il est connu que dans certains cas, les ARNdb injectés peuvent atténuer des gènes de manière non-spécifique, via un effet de « off-target » (Kulkarni et al., 2006). Pour éviter cet effet et s'assurer de la spécificité d'atténuation, nous avons utilisé deux ARNdb distincts pour chaque gène analysé. Les gènes pour lesquels les effets d'injection étaient similaires avec les deux ARNdb ont été validés. En cas de discordance entre les deux ARNdb, un troisième ARNdb était injecté.

Un autre aspect important lié à l'injection directe d'ARNdb est la variabilité des phénotypes observés suite à l'atténuation des gènes candidats. Cette variabilité se manifeste plus particulièrement pour les gènes exprimés au cours des différentes étapes de la myogenèse et évoque très probablement leurs multiples fonctions au cours de ce processus. C'est le cas par exemple du gène *Ca-P60A* qui, en plus des phénotypes de spécification décrits dans la partie résultats, donne également des phénotypes tardifs de défauts d'attachement à l'épiderme. Il n'est pas possible d'observer une telle gamme de phénotypes dans les mutants nuls des gènes qui ont plusieurs fonctions au cours des différentes étapes du développement et, de ce point de vue, la technique d'injection d'ARNdb est avantageuse. Dès l'injection des ARNdb, l'expression des gènes est atténuée, mais pas complètement éteinte. Cela permet de voir des effets précoces de perte de fonction, mais assure également la

survie d'une partie des embryons ce qui permet la détection de phénotypes plus tardifs. La variabilité de phénotypes obtenus suite à l'atténuation de l'expression d'un candidat peut également s'expliquer par la variabilité de l'atténuation elle-même, due à une légère variation de la quantité d'ARN injectée selon les embryons et de la concentration plus élevée d'ARN à la proximité du site d'injection. L'atténuation de l'expression des gènes par ARNi est donc une approche rapide mais qui nécessite l'observation d'un grand nombre d'embryons afin d'évaluer la significativité des résultats obtenus.

Enfin, la principale limite de cette technique est qu'elle ne permet pas de cibler un tissu en particulier donc pour un gène exprimé de façon ubiquitaire, on ne peut pas être sûr que l'effet observé sur la myogenèse est le résultat unique de l'atténuation de la fonction musculaire de ce gène. De même, l'observation des phénotypes est limitée à l'expression de la MHC qui ne permet pas de décrire précisément les phénotypes.

II. *Ca-P60A, ArgK, WupA* et *Nap1*, nouveaux gènes conservés impliqués dans la myogenèse embryonnaire

Chez l'homme, des mutations dans le gène SERCA1, orthologue de *Ca-P60A* sont à l'origine de la maladie de Brody, une atteinte musculaire récessive, caractérisée par des crampes douloureuses et des contractures à l'effort (MacLennan, 2000). Cependant, son rôle précis demeure inconnu et l'identification de la fonction de *Ca-P60A* au cours de la myogenèse chez la Drosophile pourrait apporter des informations importantes dans la compréhension des mécanismes impliqués dans ce type de myopathies. On sait notamment que le gène *Ca-P60A* pourrait avoir un rôle dans la voie Notch. En effet, il a été montré, en culture cellulaire, que le produit du gène *Ca-P60A* permet de maintenir un niveau élevé de Ca^{2+} dans la lumière du réticulum endoplasmique, important pour le trafic intracellulaire de Notch, en réponse à la liaison du ligand Delta (Periz and Fortini, 1999). À ce jour, le lien entre *Ca-P60A* et Notch n'a pas été montré au cours de la myogenèse, mais on peut penser que les effets d'atténuation de *Ca-P60A* observés, sont liés aux défauts de cette voie de signalisation.

Les analyses fonctionnelles réalisées pour *ArgK* n'ont pas permis de déterminer si ce gène était impliqué dans le développement musculaire, en plus de sa fonction plus tardive au cours de la contraction. En effet, nous avons observés des phénotypes musculaires dans une lignée portant une délétion de *ArgK* mais également de trois autres gènes. Nous ne pouvons donc pas associer ces phénotypes à *ArgK.* Afin de confirmer la contribution unique de *ArgK* à ces phénotypes, des expériences de sauvetage devraient être réalisées. Si en réintroduisant le gène *ArgK* dans la lignée déficiente les muscles ne présentent pas de phénotype, cela confirmerait le rôle de *ArgK* dans les étapes de spécification et d'attachement des muscles. Des mouches ARNi ciblant *ArgK* pourraient également être croisées avec un lignée *Mef2*-Gal4 afin d'induire spécifiquement l'inhibition de l'expression de *ArgK* dans les cellules musculaires.

Bien que son rôle dans la contraction musculaire ait été largement étudié, peu de travaux évoquent la possibilité d'un rôle de *WupA* dans le développement musculaire. Seules deux études montrent son rôle dans la formation des sarcomères et la myofibrillogenèse dans les muscles de vol de la mouche adulte (Marin et al., 2004; Nongthomba et al., 2003). De plus, comme nous avons pu l'observer suite aux hybridations *in situ* et comme l'ont décrit Marin *et al.*, *WupA* s'exprime dès le stade 7 dans les primordia de muscle, soit bien avant la fusion des myoblastes appuyant fortement l'hypothèse d'un rôle dans le développement musculaire (Marin et al., 2004). Un autre point intéressant concernant ce gène est qu'il a été mis en évidence comme cible des gènes *Mef2* et *Lb* au cours du développement embryonnaire (Junion et al., 2007; Sandmann et al., 2006). Ainsi, des expériences plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires relatifs à l'attachement des fibres et aussi pour mettre en évidence un éventuel rôle plus précoce de *WupA*. Concernant les phénotypes caractérisés par un regroupement des muscles au centre de l'embryon et l'hypothèse d'un détachement des fibres de l'épiderme, il serait intéressant de suivre au cours du temps (jusqu'à la contraction) le développement musculaire d'embryons MHC-*tau*GFP injectés avec des ARNdb contre *WupA.* On pourrait également mettre en évidence des protéines impliquées dans l'attachement

en contexte hypomorphe pour *WupA*. En parallèle, la fonction plus précoce de *WupA* devra être testée.

Chez les mammifères, il a été montré que la modulation de la structure de la chromatine est importante pour la régulation de gènes impliqués, notamment, dans le développement musculaire. On peut par exemple citer l'implication du complexe de remodelage de la chromatine SWI-SNF dans la différenciation musculaire dépendante de MyoD (de la Serna et al., 2001). L'existence de chaperonne d'histones ayant une spécificité tissulaire a déjà été décrite chez la souris, notamment pour le gène *Nap1l2* qui est exclusivement exprimé dans les neurones en développement où son produit permet de réguler la transcription des gènes en contrôlant l'acétylation dans les neurones lors de la différenciation (Attia et al., 2007; Rogner et al., 2000). Il a également été montré en culture de cellules que les protéines NAP interagissent avec les co-activateurs transcriptionnels p300/CBP (CREB Binding Protein) pour activer la transcription de gènes cibles de p300 et promouvoir l'assemblage de la chromatine (Asahara et al., 2002; Shikama et al., 2000). Or, p300/CBP serait, grâce à son activité histone acetyltransférase (HAT), impliqué dans les étapes terminales de différenciation musculaire au cours desquelles il permettrait notamment la transcription de gènes spécifiques de la fusion (Polesskaya et al., 2001). L'identification du rôle de *Nap1* chez la Drosophile semble donc intéressante pour comprendre le rôle des chaperonnes d'histones dans le développement musculaire.

III. Mise en évidence d'une transition métabolique permettant la poursuite du développement musculaire

Switch métabolique et effet Warburg

L'analyse fonctionnelle du rôle de *Pglym78* au cours de la myogenèse embryonnaire chez la Drosophile nous a conduit à étudier l'implication de l'ensemble des gènes de la glycolyse au cours de ce processus. Nous avons pu mettre en évidence que ces gènes étaient fortement exprimés maternellement puis que leur

transcription était diminuée en milieu d'embryogenèse et qu'elle ré-augmentait 11h après la ponte des œufs (stade 14) spécifiquement dans les compartiments musculaires. Cette expression « tardive » coïncide avec une augmentation de l'activité de la PyK. Ainsi, la glycolyse est très fortement augmentée dans les muscles au cours de la différenciation. Nous avons montré que le blocage de cette voie induit un arrêt de la fusion des myoblates en fin de stade 14 et la formation de fibres plus fines. En conditions aérobies, le pyruvate généré par la glycolyse est préférentiellement prise en charge par les mitochondries où il est converti en Acétyl-CoA par le complexe Pyruvate Deshydrogenase (PDC) afin d'être utilisé au cours du cycle de Krebs et des phosphorylations oxydatives. A l'inverse, la lactate déshydrogénase catalyse la conversion du pyruvate en lactate en absence d'oxygène (Abu-Shumays and Fristrom, 1997). Or, nous avons mis en évidence que l'inhibition de l'expression du gène *tend,* impliqué dans les phosphorylations oxydatives, ne donnait aucun phénotype (données non montrées), tandis que l'inhibition de *Impl3,* codant pour la lactate déshydrogénase, donnait des phénotypes similaires à ceux observés lorsque la glycolyse est diminuée. Ces résultats montrent donc qu'au cours de la différenciation des muscles embryonnaires, il y a augmentation de la glycolyse suivie de la fermentation lactique du pyruvate. Ce type de changement métabolique rappelle le phénomène mis en évidence pour la première fois en 1924 par Otto Warburg au cours de la prolifération des cellules cancéreuses et qualifié d'effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009). Il a pu observer qu'au cours de la prolifération de certaines cellules cancéreuses, celles-ci adoptaient un métabolisme passant par la glycolyse suivie de la fermentation du pyruvate en lactate, même si la quantité d'oxygène disponible est suffisante pour permettre le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. On parle de glycolyse aérobie. Les origines de ces détournements métaboliques ont été largement étudiées du fait du paradoxe qu'ils semblaient représenter. En effet, le catabolisme d'une molécule de glucose par la glycolyse étant moins efficace pour produire de l'ATP que les phosphorylations oxydatives (2 molécules d'ATP/molécule de glucose *vs* 34), l'augmentation de la glycolyse suivie de la fermentation ne permettrait pas d'augmenter le rendement énergétique. Pourquoi les cellules utiliseraient-elles donc une voie métabolique moins efficace pour former de l'ATP et pourquoi le pyruvate est-il majoritairement

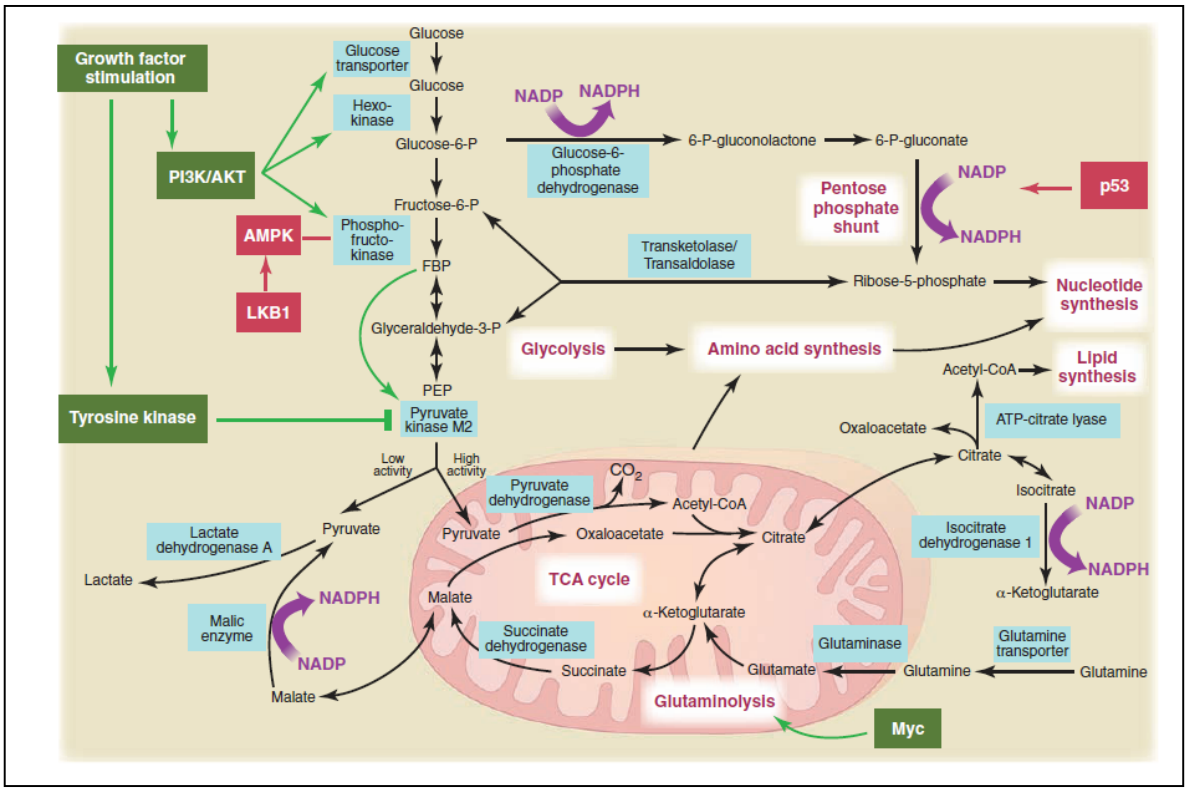


Figure 44 : Détournements métaboliques observés au cours de l'effet Warburg

D'après Vander Heiden *et al.*, 2009

converti en lactate malgré la présence d'oxygène? L'augmentation importante de l'activité de la glycolyse aurait en fait plusieurs avantages pour les cellules.

De prime abord, nous pouvons effectivement penser que la quantité d'ATP produite suite à la fermentation lactique est plus faible que lorsque les voies mitochondriales sont sollicitées. Cependant, si on considère l'importante quantité de glucose captée par les cellules et catabolisée, et si la vitesse de la glycolyse est suffisamment importante, l'énergie produite pourrait être égale voire supérieure à celle générée par les voies mitochondriales. De plus, la glycolyse produit des intermédiaires qui pourront permettre la synthèse des protéines. Le Glucose-6-P va également pouvoir être utilisé dans la voie des pentoses phosphate pour produire des molécules de ribose, nécessaires à la synthèse des nucléotides et du NADH utilisé dans d'autres voies anaboliques **(Fig. 44)**. La forte activité glycolytique permet d'alimenter ces voies annexes à faible activité tout en continuant de former du pyruvate. Enfin, la fermentation du pyruvate en lactate est utilisée plutôt que sa conversion en Acétyl-CoA (et donc que le cycle de Krebs) pour permettre une reoxydation plus rapide du NADH en NAD^+ et donc la poursuite de la glycolyse. Une partie du pyruvate peut néanmoins être convertie en Acetyl-CoA dans les mitochondries. Cependant, dans ce contexte, les intermédiaires du cycle de Krebs vont servir à synthétiser des lipides, des nucléotides et des acides aminés plutôt que la production d'ATP. Ainsi, au cours de l'effet Warburg, il y a donc détournement des processus métabolique en faveur de la synthèse de matériel biologique nécessaire à la prolifération cellulaire.

Nos résultats montrent donc un processus de transition métabolique similaire dans les muscles embryonnaires de la Drosophile. Cependant, ces muscles ne prolifèrent pas mais ils sont formés et croissent suite à la fusion entre plusieurs myoblastes. Le recrutement d'un nouveau myoblaste au sein du syncytium est suivi d'une augmentation de la transcription de la fibre musculaire. L'ADN du noyau nouvellement incorporé va en effet être transcrit et traduit, nécessitant entre autres des nucléotides et des acides aminés. L'augmentation de la glycolyse permettrait donc de subvenir aux besoins de la cellule musculaire néoformée suite à la fusion et l'arrêt de la fusion observé suite au blocage de la glycolyse ou de la voie insuline pourrait résulter d'un manque de disponibilité en molécules de synthèse. Ce type de

transition métabolique, également dépendant de la voie insuline, a été récemment mis en évidence au cours de l'activation de certaines cellules immunitaires chez la souris, montrant comme nous l'avons fait, qu'il est utilisé dans d'autres contextes que la prolifération cellulaire (Krawczyk et al., 2010). De plus, l'équipe de C. Thummel avait déjà montré la forte augmentation de la glycolyse suivie de la fermentation du pyruvate en milieu d'embryogenèse chez la Drosophile (Tennessen et al., 2011). Ils ont mis en évidence que l'augmentation de l'expression des gènes de glycolyse, *d'Impl3* et *des* pentoses phosphate était dépendante de l'orthologue drosophilien du récepteur aux oestrogènes (dERR) et que ce switch métabolique, ayant lieu chez l'embryon, était nécessaire pour permettre la production de l'importante biomasse nécessaire à la croissance larvaire. Cependant, ils n'émettent pas d'hypothèse quant au rôle de cette transition chez l'embryon.

Ainsi, nos résultats montrent pour la première fois la fonction biologique de ce changement métabolique chez l'embryon et plus particulièrement pour la croissance musculaire. Contrairement aux cellules cancéreuses, nous montrons ici que ce switch métabolique n'est pas lié à la prolifération cellulaire et que ce n'est pas un phénomène pathologique.

Régulation par la voie insuline

La voie insuline est impliquée dans la croissance d'un grand nombre de tissus et notamment des muscles. De plus, elle régule positivement le métabolisme du glucose. Nous avons montré que chez la Drosophile également, la voie insuline, qui est fortement conservée, active la glycolyse. De plus, les phénotypes observés lorsque cette voie est inhibée sont similaires à ceux observés après blocage de la glycolyse. On aurait donc pu penser que ces phénotypes étaient la seule conséquence de la diminution de la glycolyse et d'un manque de disponibilité des biomolécules. Or, lorsque l'on s'intéresse aux effecteurs de la voie insuline, à savoir dTOR et FoxO et qu'on modifie leur expression dans le sens d'une diminution de la voie insuline, on observe là encore des phénotypes identiques à ceux précédemment mis en évidence. Ces effecteurs permettent de moduler la quantité de protéines.

FoxO, qui est régulé négativement par l'insuline, active la dégradation des protéines en stimulant la voie du protéasome et l'autophagie. A l'inverse, dTOR, régulé positivement par l'insuline, stimule la synthèse protéique en activant S6K et en inhibant 4E-BP. Pour que la croissance musculaire ait lieu, la synthèse protéique doit être supérieure à la protéolyse. Les phénotypes observés après inhibition de la voie insuline seraient donc la conséquence d'un défaut de croissance musculaire par manque de protéines. Ces résultats nous permettent d'établir un modèle dans lequel l'insuline i) régulerait positivement la glycolyse afin de permettre la construction des « briques » nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines suite à la fusion, et la production d'ATP ii) permettrait l'assemblage de ces briques en protéines en stimulant la voie TOR et iii) contrôlerait la croissance musculaire en empêchant la protéolyse par la voie FoxO, augmentant ainsi la quantité de protéines dans le muscle. Ainsi, l'insuline coordonne le métabolisme cellulaire avec la disponibilité des molécules biologiques. Ce modèle est en accord avec le rôle de la signalisation PI3K/Akt/TOR au cours de l'effet Warburg. En effet, de nombreuses cellules deviennent cancéreuses suite à des mutations des gènes régulateurs de cette voie, tel que PTEN, induisant une augmentation de son activité (DeBerardinis et al., 2008). L'activation d'Akt est suffisante pour induire une augmentation de la glycolyse et de la fermentation lactique (Elstrom et al., 2004). La voie insuline est donc requise pour induire cette transition métabolique en faveur de la synthèse de biomolécules.

Conservation du switch métabolique chez les vertébrés

Les analyses menées chez le poisson-zèbre ont montré un rôle important de l'orthologue de *Pglym78*, *pgam2*, au cours du développement musculaire. Les fibres qui montrent des défauts suite à l'inhibition de l'expression de *pgam2* par injection de morpholinos sont les fibres rapides. Or, ces fibres présentent un métabolisme majoritairement glycolytique, c'est-à-dire qu'elles fabriquent leur ATP en utilisant préférentiellement la glycolyse par opposition aux fibres lentes oxydatives qui tirent leur énergie des phosphorylations oxydatives mitochondriales suite à une glycolyse plus modérée. De plus, les fibres rapides du poisson-zèbre fusionnent pour former des fibres syncitiales contrairement aux fibres lentes qui sont mononuclées (Rochlin et al.). Ainsi, dans ces fibres, l'importante activité glycolytique permettrait, comme

chez la Drosophile, de fabriquer le matériel nécessaire à la fibre en croissance. Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle de la glycolyse dans la myogenèse du poisson-zèbre et suggèrent une conservation fonctionnelle de cette voie chez les vertébrés dans la formation des fibres multinucléées.

Rôle de la transition métabolique dans la production d'ATP

Comme le suggèrent nos résultats, le détournement métabolique effectué par les cellules musculaires aurait pour but la production de matériel nécessaire à leur croissance. Cependant, nous pouvons nous demander si l'augmentation de la taille des muscles nécessite également de l'énergie. Tout d'abord, étant donné la forte augmentation de la glycolyse, nous pouvons supposer que la synthèse d'ATP est aussi, voire plus importante que dans le cas des phosphorylations oxydatives. Ainsi, le blocage de la glycolyse devrait avoir pour conséquence une production d'ATP diminuée et on pourrait s'attendre, suite à l'élévation du rapport intracellulaire AMP/ATP, à une activation de l'AMPKinase. L'AMPK est le senseur métabolique incontournable permettant le maintien de l'homéostasie énergétique de la cellule. Elle stimule notamment les voies cataboliques génératrices d'ATP, telles que l'oxydation des acides gras et la glycolyse, mais surtout limite les voies anaboliques consommatrices d'ATP, comme la lipogenèse et la synthèse des protéines. On pourrait donc penser que les phénotypes observés suite au blocage de la glycolyse sont induits par l'AMPK. Or, lorsqu'on surexprime l'AMPK dans le muscle embryonnaire de la Drosophile, aucun défaut similaire à ceux précédemment obtenus après inhibition des gènes de glycolyse n'est observé. Ce résultat suggère que la contribution énergique de la glycolyse n'est pas essentielle au développement musculaire. Par conséquent après blocage de la glycolyse, l'AMPK n'est pas activée ou alors des mécanismes de contrôle existent à ce stade afin d'empêcher les effets d'une éventuelle augmentation de l'AMPK sur la synthèse protéique et permettre le bon déroulement de la myogenèse.

Métabolisme musculaire avant la transition métabolique et cas des autres cellules

Nos résultats montrent une augmentation de la glycolyse spécifiquement dans les muscles au stade 14. Ainsi, on peut se demander comment les cellules

musculaires assurent leur développement jusqu'au stade 14 et notamment la fusion des myoblastes, qui commence dès 7h30 après la ponte, et également comment les autres cellules produisent de l'énergie et synthétisent les molécules nécessaires à leur développement. Les expériences d'injection d'ARNdb contre les gènes de la glycolyse ainsi que l'utilisation de drogues pour bloquer cette voie, ont révélé d'importants phénotypes, beaucoup plus sévères que ceux observés en lignées ARNi. Or, ces approches, contrairement à l'utilisation de lignées ARNi ou hypomorphes, permettent d'inhiber l'expression maternelle dans l'ensemble de l'embryon. Ces résultats montrent donc l'importance de la contribution maternelle, notamment pour le développement musculaire. Ainsi, on peut penser que l'expression maternelle des gènes glycolytiques est suffisante pour assurer les étapes précoces du développement musculaire et que c'est seulement en milieu d'embryogenèse que les besoins de production de biomasse par les cellules musculaires syncitiales deviennent tels que les quantités de protéines maternelles sont limitantes. De la même façon, cette expression maternelle pourrait être suffisante pour le développement, et particulièrement la prolifération, des autres cellules, non musculaires. Dans le cas contraire, on pourrait penser que les premiers évènements de fusion ne sont pas dépendants de la quantité de biomolécules disponibles. Dans ce cas, il y aurait fusion jusqu'à un certain stade même si la quantité de biomasse apparaît limitante pour la poursuite de la fusion afin de former des petits muscles. Ce phénomène de contrôle indépendant de la quantité de nutriments a été récemment mis en évidence au cours de la croissance des neuroblastes chez la Drosophile (Cheng et al., 2011).

Mise en place du « switch »

Nos résultats mettent en évidence une augmentation de la glycolyse à 12h de développement, médiée au moins en partie par la voie insuline. Cependant, nous ne connaissons pas l'expression de la voie insuline au cours de l'embryogenèse et notamment nous ne savons pas quel(s) ligand(s) (Dilp) sont impliqués dans l'activation de cette voie dans le muscle. Il serait donc intéressant de mettre en évidence la dynamique d'expression de cette voie dans les muscles de l'embryon de Drosophile.

S'il s'avère que la voie insuline est activée juste avant la glycolyse, on peut penser qu'elle est à l'origine de l'augmentation de la glycolyse. Si la voie insuline est activée pendant toute l'embryogenèse, sans synchronisation particulière avec le moment de l'activation de la glycolyse, on peut penser que i) l'augmentation initiale de la glycolyse serait régulée par d'autres facteurs tandis que l'insuline en permettrait ensuite le maintien ou alors ii) des acteurs intermédiaires permettant l'augmentation de la glycolyse par l'insuline seraient spécifiquement activés au moment du « switch » (Fernandez et al., 1995). Il est à noter que la deuxième hypothèse n'est pas incompatible avec une activation de l'insuline au moment de la différenciation musculaire.

Une piste intéressante à explorer est celle des récepteurs dERR. En effet, bien que les travaux de Tennessen *et al.* aient montré que dans les mutants dERR, l'expression des gènes de glycolyse était abolie, leurs travaux étaient concentrés sur la mise en évidence des voies dérégulées dans les différents tissus larvaires et leur contribution pour la croissance de la larve mais pas sur l'analyse des phénotypes des embryons mutants dERR. De plus, ils montrent que ces récepteurs sont exprimés dans les muscles embryonnaires, ce qui est en faveur de notre hypothèse. Cependant, ces récepteurs semblent réguler d'autres voies dans d'autres tissus, il faudrait donc diminuer l'expression musculaire des dERR plutôt qu'analyser les mutants. Si les phénotypes observés sont similaires à ceux que l'on obtient en bloquant la glycolyse, on pourrait fortement penser que le « switch » métabolique vers la glycolyse est médié par les ERR.

L'ecdysone aurait également pu intervenir dans cette transition métabolique. En effet, le récepteur à l'ecdysone est fortement activé au stade 12 (9 à 10h de développement) soit juste avant le « switch » métabolique et il a été montré que l'expression d'*Impl3* et de *PyK* était dépendante de l'ecdysone dans les disques imaginaux chez la Drosophile (Abu-Shumays and Fristrom, 1997; Kozlova and Thummel, 2003). De plus, l'ecdysone induirait la transcription du gène de différenciation musculaire *Mef2* dans les myoblastes adultes de la mouche (Lovato et al., 2005). On pourrait donc penser qu'en plus de participer à la transition métabolique, l'ecdysone permettrait aux muscles de poursuivre leur différenciation.

Cependant, aucun phénotype musculaire n'est observé suite à l'expression d'une forme dominante négative du récepteur de l'ecdysone dans les muscles, écartant l'hypothèse de son implication.

Chez les mammifères, lorsque les cellules subissent de fortes baisses de concentration en oxygène (hypoxie), elles changent leur métabolisme en augmentant leur consommation de glucose et de lactate. Cette adaptation est dépendante de l'activité du facteur inductible par l'hypoxie HIF-1 qui active la transcription des gènes codant pour les transporteurs de glucose, pour les enzymes de glycolyse et pour la lactate déshydrogénase et inhibe le cycle de Krebs (Gordan and Simon, 2007; Kim et al., 2006). Ce facteur est constitué de deux sous-unités HIF-α et HIF-β conservés chez la Drosophile où l'on trouve les protéines Similar (Sima) et Tango (Tgo) (Lavista-Llanos et al., 2002). Alors que la sous-unité HIF-β est constitutive, HIF-α est régulée par le niveau d'oxygène. En présence d'oxygène, HIF-α est modifié par des prolyl hydroxylases, induisant son association avec le complexe ubiquitine ligase comprenant la protéine VHL et est dégradée par le protéasome. En cas d'hypoxie, les prolyl hydroxylases sont inhibées, permettant la stabilisation de HIF-α et l'activité du complexe HIF-1 (Maxwell et al., 1999). Chez la Drosophile, en conditions de normoxie, la sous-unité Sima est dégradée par l'action de la prolyl hydroxylase Fatiga (Lavista-Llanos et al., 2002). Cependant, bien que l'hypoxie soit le facteur majeur d'induction de HIF-1, il pourrait également être activé en conditions de normoxie. Un des stimuli non-hypoxiques capables d'activer HIF-1 est la voie insuline/PI3K/TOR, qui augmente la traduction la sous-unité HIF-α, (Maynard and Ohh, 2007). Cette régulation est conservée chez la Drosophile (Dekanty et al., 2005). Une voie indépendante de l'hypoxie est donc aussi capable d'induire l'activité du complexe HIF-1. Nos résultats ne permettent pas de savoir si au moment de leur différenciation, les muscles disposent d'une quantité importante d'oxygène. Dans le cadre de nos travaux, nous pouvons penser qu'une activation de HIF-1 en réponse à la voie insuline et éventuellement de la quantité d'oxygène serait capable d'induire l'activation de la glycolyse.

Un autre acteur pouvant intervenir dans l'initiation du switch métabolique est le gène suppresseur de tumeur p53. En effet, ce gène permet d 'empêcher le

développement tumoral en inhibant la glycolyse et en stimulant les phosphorylations oxydatives. À l'inverse, lorsqu'il est muté, les cellules mettent en place un switch métabolique en faveur d'une glycolyse aérobie comme celui que nous observons dans les muscles de Drosophile (Matoba et al., 2006). Nous pouvons penser qu'il s'exprime avant la transition métabolique et que son expression s'arrête pour permettre sa mise en place (Feng and Levine, 2010; Puzio-Kuter, 2011). Ainsi, il contrôlerait négativement la transition métabolique. Cependant, ce gène s'exprime plutôt en réponse à un stress ce qui ne doit pas être le cas dans l'embryon qui se développe. Néanmoins, il pourrait avoir un rôle dans les phénotypes que l'on observe après blocage de la glycolyse et de la voie insuline. En effet, on pourrait penser que son expression est activée suite à la détection de la carence en nutriments après inhibition de la glycolyse ou de la voie insuline. En réponse à son activation, p53 inhibe entre autre la voie insuline en activant l'expression de régulateurs négatifs de la voie PI3K/Akt/TOR, à savoir Pten, IGF-BP3, AMPK, TSC2 et les sestrines qui activent AMPK (Budanov and Karin, 2008; Feng et al., 2007). De plus, il est capable d'inhiber la transcription des gènes codant pour les transporteurs de glucose ainsi que celle de *pgm (Pglym78)* (Kondoh et al., 2005; Schwartzenberg-Bar-Yoseph et al., 2004). La carence en nutriments consécutive à l'inhibition de la glycolyse ou de la voie insuline induirait donc l'activation de p53 qui par rétrocontrôle négatif entretiendrait le faible niveau d'activité de ces deux voies, inhibant la synthèse protéique.

Régulation de la fusion

Nous avons mis en évidence l'impact du blocage de la glycolyse et de la voie insuline sur la fusion des myoblastes dans les muscles DA1 et SBM. Cependant, il est difficile d'assurer que cet arrêt de la fusion se fait simultanément dans l'ensemble des muscles. De la même façon, les profils d'expressions des gènes de glycolyse établis par hybridations *in situ* ne permettent pas de savoir si la glycolyse est active de manière synchrone dans toutes les fibres musculaires et surtout s'il y a une différence d'activation selon la taille des muscles (et donc le nombre d'événement de fusion). Il serait donc intéressant d'analyser précisément l'activation de la glycolyse selon les fibres musculaires.

Il serait également intéressant de comprendre comment s'opère l'arrêt de la fusion. Deux types de mécanismes peuvent être imaginés: soit la quantité de biomolécules produites est limitante et dans ce cas la fusion s'arrêterait après épuisement de ces molécules (phénomène muscle-indépendant), ou alors la cellule musculaire disposerait d'un senseur lui permettant de poursuivre ou non la fusion selon la quantité de molécules disponibles. Quel que soit le mécanisme adopté, il serait important de comprendre comment la fusion est bloquée. Dans le contexte du blocage de la voie insuline, nous avons pu observer une diminution de l'expression des gènes *Mp20* et *Pax* qui sont des modulateurs de la fusion muscle-spécifique (Bataillé et al., 2010). Cette diminution d'expression reflèterait une diminution de l'expression des facteurs d'identité qui les régulent à savoir Lb et Eve (résultats non montrés). Bien qu'on ignore le lien entre l'expression des gènes généraux de fusion et celle des modulateurs de la fusion muscle spécifique, on peut penser que leurs expressions sont diminuées de la même façon. Ces résultats préliminaires suggèrent que le blocage de la fusion passerait par une diminution de l'expression des gènes de fusion.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Concernant le crible

Les résultats obtenus suite à l'atténuation de l'expression des gènes candidats par injection d'ARNdb montrent que la probabilité d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la myogenèse en se basant sur leur conservation de séquence et de profil d'expression est très forte. Etant donné la constante évolution des bases de données, il sera intéressant de mettre à jour régulièrement notre liste actuelle de gènes conservés afin d'identifier et de tester fonctionnellement de nouveaux gènes candidats. De plus, l'analyse par ARNi ayant été réalisée sur 23 des gènes candidats sélectionnés, il serait intéressant de tester l'implication dans la myogenèse des candidats restants. Ainsi, nous pourrions identifier des gènes myogéniques supplémentaires.

Contribution de la glycolyse au développement musculaire

Nous avons montré qu'une augmentation de la glycolyse suivie de la fermentation lactique et régulée au moins en partie par la voie insuline permettait la poursuite de la fusion à partir du stade 14. Cependant, au cours d'autres étapes que la fusion des myoblastes sont associées à la différenciation des muscles. Les fibres vont en effet s'attacher à l'épiderme, être innervées et former un appareil contractile afin de donner des muscles fonctionnels, ayant la capacité de se contracter. En observant les phénotypes embryonnaires obtenus après blocage de la glycolyse ou de la voie insuline, on remarque qu'un nombre important de fibres musculaires présente des défauts d'attachement, suggérant que d'autres évènements que la fusion sont affectés. Il serait donc intéressant de mieux caractériser ces phénotypes et d'observer également la formation des sarcomères. Ainsi, nous pourrions savoir si c'est le développement musculaire dans son ensemble qui est affecté ou seulement la fusion.

Le blocage de la fusion est-il fibre autonome ?

Nous avons observé un arrêt de la fusion suite à une diminution de la glycolyse dans l'ensemble des muscles. Nous pourrions utiliser des lignées pilote fibre spécifiques afin d'observer la répercussion de l'inhibition de la glycolyse dans une muscle sur les autres. On pourrait ainsi savoir si le blocage de la fusion est fibre-autonome ou s'il y a un dialogue entre les fibres musculaires.

Afin de comprendre comment s'opère le blocage de la fusion, il faudrait observer l'expression de différents gènes de fusion généraux, intervenant à des étapes spécifiques du processus de fusion, dans les contextes mutant pour la glycolyse et l'insuline afin de voir si elle est diminuée par rapport à un contexte sauvage. Pour cela, les résultats d'analyses transcriptomiques seraient essentiels. Si la régulation se fait au niveau post-transcriptionnel, il faudrait quantifier directement les protéines. Cependant, bien que nous ne sachions pas si les régulateurs de la fusion subissent des modifications post-traductionnels, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la régulation de la fusion se fasse également par ce biais. Il serait également intéressant d'approfondir résultats préliminaires obtenus avec le voie Notch. En effet, il semblerait qu'il y ait, suite à l'augmentation de la voie Notch dans les muscles, un arrêt de la différenciation similaire à celui observé lorsqu'on bloque la glycolyse.

Lien entre l'activité glycolytique et la taille des muscles

La glycolyse est activée dans l'ensemble des muscles où elle permet leur fusion. Il serait intéressant de pouvoir quantifier la glycolyse dans chaque muscle afin de savoir si elle est plus fortement augmentée dans les muscles qui fusionnent le plus. Si tel est le cas, et si la transition métabolique est muscle dépendante, on peut supposer que l'induction de la glycolyse dépend du nombre de noyaux recrutés. Si le niveau de glycolyse est le même dans tous les muscles, on peut penser, toujours selon l 'hypothèse d'une transition muscle dépendante, que l'induction de la glycolyse se fait en réponse à une proportion de noyaux recrutés. L'utilisation de la méthode d'imagerie par TEP Scan pourrait permettre de quantifier les niveaux de glycolyse dans les fibres musculaires. Ces résultats pourraient également permettre

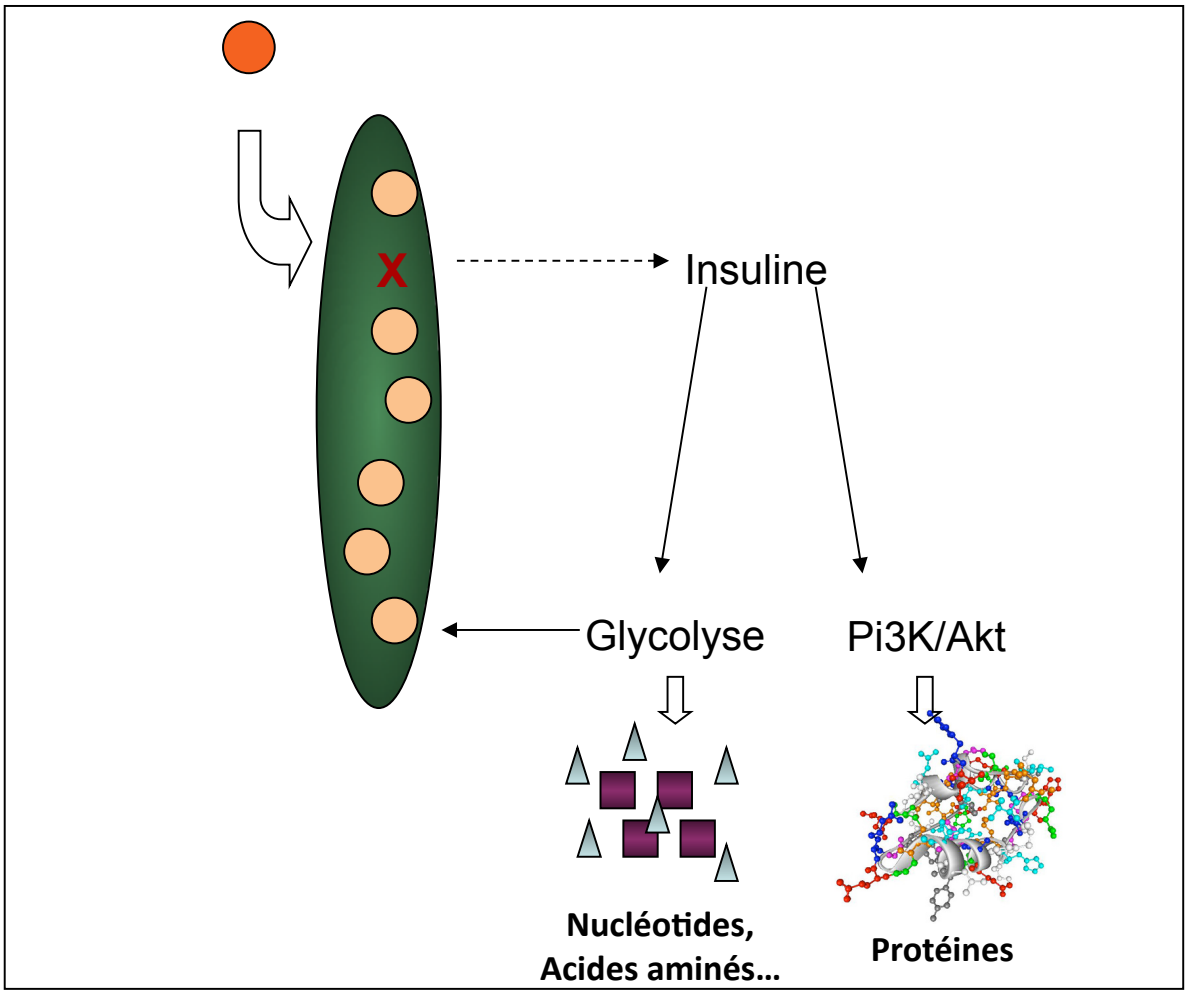


Figure 45 : Modèle suggérant l'existence d'un senseur métabolique musculaire permettant la poursuite de la différenciation

Suite au recrutement d'un nouveau noyau, la fibre musculaire atteint un seuil où elle nécessite plus de pour pouvoir subvenir à l'augmentation de la transcription.
En réponse à cette importante demande de biomasse, un senseur X est activé afin de mettre en place la transition métabolique. Celle-ci pourrait se faire par augmentation de l'insuline qui à son tour augmenterait la glycolyse. Ainsi, la synthèse protéique est augmentée, permettant au muscle de poursuivre son développement.

de savoir si cette induction se fait de façon synchronisée dans l'ensemble des muscles.

Induction du « switch » muscle-dépendante ?

Tous les muscles de l'embryon de Drosophile effectuent une transition métabolique pour permettre leur développement. Cependant, nous ne savons pas si cette transition est induite individuellement dans chaque muscle ou si elle se fait en réponse à un programme générique de différenciation. Dans le premier cas, que nous privilégions, cela suggère l'existence d'un senseur qui permettrait au muscle de détecter la carence en molécules nécessaires à la poursuite de son développement et d'augmenter la glycolyse en conséquence, peut-être en induisant la voie insuline **(Fig. 45)**. Ce senseur aurait également pour but de permettre la fusion elle-même si les conditions y sont favorables. L'analyse du transcriptome d'embryons dans lesquels la glycolyse ou la voie insuline auraient été inhibées pourrait permettre de savoir si ces contextes modifient l'expression de senseur de nutriments connus et peut-être d'identifier celui qui est responsable de la transition métabolique que nous observons. Dans le cas où ce processus serait muscle indépendant, on pourrait penser que des gènes de différenciations généraux, tels que *Mef2* induiraient la transition métabolique quel que soit « l'environnement métabolique » du muscle à ce moment là.

Induction du switch par la voie insuline

Dans les muscles, la glycolyse est régulée positivement par la voie insuline et le blocage indépendant de ces deux voies donne des phénotypes similaires. Cependant, l'activité de la voie insuline dans l'embryon de Drosophile n'est pas connue et ne nous permet pas de savoir si elle est à l'origine de l'augmentation de la glycolyse. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression au cours du développement embryonnaire des différents acteurs de cette voie en réalisant des westerns blot et également en établissant les profils d'expression des différentes Dilp connues pour activer la voie insuline. On pourrait également tenter de mettre en évidence l'inhibition de la transition métabolique dans les différents mutants Dilp

afin d'identifier le ligand qui est spécifiquement requis pour activer la voie insuline dans les muscles.

Afin d'analyser la conservation du rôle de la voie insuline dans la myogenèse on pourrait également tester son implication dans le développement des fibres rapides chez le poisson zèbre.

Lien entre la glycolyse et les ERR

Les récepteurs ERR sont impliqués dans la transcription des gènes de la glycolyse. Afin de savoir s'ils participent à la transition métabolique, on pourrait analyser le comportement des muscles suit à la diminution de leur expression musculaire. Il serait également intéressant d'analyser l'activité de la voie insuline dans ce contexte. L'utilisation de complexes transhétérozygotes entre des mutations des récepteurs aux ERR et des mutants glycolytiques pourrait également permettre de mettre en évidence le lien entre ces deux voies.

Régulation de la transition métabolique par les facteurs induits par l'hypoxie

Les HIF ont la capacité d'induire les gènes de glycolyse, de la fermentation lactique et la voie nsuline. Il serait donc intéressant d'observer la dynamique d'expression de HIF dans les muscles embryonnaires de la Drosophile afin de savoir si elle peut coïncider avec le début de l'augmentation de la glycolyse. De plus, il serait intéressant de déterminer si le « switch » métabolique a toujours lieu après inhibition de ce facteur dans les muscles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abmayr, S. M., et al., 2008. Myoblast fusion in Drosophila. Methods Mol Biol. 475, 75-97.

Abu-Shumays, R. L., Fristrom, J. W., 1997. IMP-L3, A 20-hydroxyecdysone-responsive gene encodes Drosophila lactate dehydrogenase: structural characterization and developmental studies. Dev Genet. 20, 11-22.

Alberga, A., et al., 1991. The snail gene required for mesoderm formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. Development. 111, 983-92.

Alvares, L. E., et al., 2003. Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. Dev Cell. 5, 379-90.

Anant, S., et al., 1998. Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in Drosophila. Development. 125, 1361-9.

Artero, R., et al., 2003. Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during Drosophila myogenesis. Development. 130, 6257-72.

Artero, R. D., et al., 2001. The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. Development. 128, 4251-64.

Asahara, H., et al., 2002. Dual roles of p300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with nucleosome assembly protein 1 in vitro. Mol Cell Biol. 22, 2974-83.

Attia, M., et al., 2007. Nap1l2 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation. Mol Cell Biol. 27, 6093-102.

Azpiazu, N., Frasch, M., 1993. tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila. Genes Dev. 7, 1325-40.

Azpiazu, N., et al., 1996. Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm. Genes Dev. 10, 3183-94.

Bae, Y. K., et al., 2004. Expression of sax1/nkx1.2 and sax2/nkx1.1 in zebrafish. Gene Expr Patterns. 4, 481-486.

Bai, J., et al., 2008. RNA interference screening in Drosophila primary cells for genes involved in muscle assembly and maintenance. Development. 135, 1439-49.

Bailyes, E. M., et al., 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. Biochem J. 327 (Pt 1), 209-15.

Balagopalan, L., et al., 2001. Loss-of-function mutations reveal that the Drosophila nautilus gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. Dev Biol. 231, 374-82.

Bassel-Duby, R., Olson, E. N., 2006. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. Annu Rev Biochem. 75, 19-37.

Bataillé, L., et al., 2010. Downstream of identity genes: muscle-type specific regulation of the fusion process. Dev Cell. (in press).

Bate, M., 1990. The embryonic development of larval muscles in Drosophila. Development. 110, 791-804.

Bate, M., Broadie, K., 1995. Wiring by fly: the neuromuscular system of the Drosophila embryo. Neuron. 15, 513-25.

Bate, M., Rushton, E., 1993. Myogenesis and muscle patterning in Drosophila. C R Acad Sci III. 316, 1047-61.

Bate, M., et al., 1991. Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in Drosophila. Development. 113, 79-89.

Baylies, M. K., Bate, M., 1996. twist: a myogenic switch in Drosophila. Science. 272, 1481-4.

Baylies, M. K., et al., 1998. Myogenesis: a view from Drosophila. Cell. 93, 921-7.

Beckett, K., Baylies, M. K., 2006. The development of the Drosophila larval body wall muscles. Int Rev Neurobiol. 75, 55-70.

Beckett, K., Baylies, M. K., 2007. 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. Dev Biol. 309, 113-25.

Bellen, H. J., et al., 2004. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes. Genetics. 167, 761-81.

Bjornsti, M. A., Houghton, P. J., 2004. The TOR pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 4, 335-48.

Black, B. L., et al., 1998. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. Mol Cell Biol. 18, 69-77.

Bladt, F., et al., 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature. 376, 768-71.

Bloor, J. W., Brown, N. H., 1998. Genetic analysis of the Drosophila alphaPS2 integrin subunit reveals discrete adhesive, morphogenetic and sarcomeric functions. Genetics. 148, 1127-42.

Bober, E., et al., 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. Development. 120, 603-12.
Bonanomi, D., Pfaff, S. L., 2010. Motor axon pathfinding. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2, a001735.
Bour, B. A., et al., 2000. Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. Genes Dev. 14, 1498-511.
Bour, B. A., et al., 1995. Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. Genes Dev. 9, 730-41.
Bourgouin, C., et al., 1992. Apterous is a Drosophila LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. Neuron. 9, 549-61.
Brand, A. H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development. 118, 401-15.
Braun, T., et al., 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. EMBO J. 8, 701-9.
Brent, A. E., et al., 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. Cell. 113, 235-48.
Brent, A. E., Tabin, C. J., 2002. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. Curr Opin Genet Dev. 12, 548-57.
Brohmann, H., et al., 2000. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. Development. 127, 437-45.
Brown, N. H., 2000. Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. Matrix Biol. 19, 191-201.
Bryson-Richardson, R. J., Currie, P. D., 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. Nat Rev Genet. 9, 632-46.
Buckingham, M., 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. Curr Opin Genet Dev. 11, 440-8.
Buckingham, M., 2006. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. Curr Opin Genet Dev. 16, 525-32.
Buckingham, M., 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, 645-73.
Budanov, A. V., Karin, M., 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. Cell. 134, 451-60.
Buff, E., et al., 1998. Signalling by the Drosophila epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. Development. 125, 2075-86.
Callahan, C. A., et al., 1996. derailed is required for muscle attachment site selection in Drosophila. Development. 122, 2761-7.
Capovilla, M., et al., 2001. Direct regulation of the muscle-identity gene apterous by a Hox protein in the somatic mesoderm. Development. 128, 1221-30.
Carmena, A., et al., 1995. Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila embryogenesis. Genes Dev. 9, 2373-83.
Carmena, A., et al., 2002. Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the Drosophila embryonic mesoderm. Dev Biol. 244, 226-42.
Carmena, A., et al., 1998a. Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the Drosophila embryonic mesoderm. Genes Dev. 12, 3910-22.
Carmena, A., et al., 1998b. Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis. Genes Dev. 12, 304-15.
Castanon, I., et al., 2001. Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during Drosophila mesoderm development. Development. 128, 3145-59.
Chanana, B., et al., 2007. AlphaPS2 integrin-mediated muscle attachment in Drosophila requires the ECM protein Thrombospondin. Mech Dev. 124, 463-75.
Chen, E. H., Olson, E. N., 2001. Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in Drosophila. Dev Cell. 1, 705-15.
Chen, E. H., et al., 2003. Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. Cell. 114, 751-62.
Cheng, L. Y., et al., 2011. Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in Drosophila. Cell. 146, 435-47.
Chiba, A., et al., 1995. Fasciclin III as a synaptic target recognition molecule in Drosophila. Nature. 374, 166-8.
Chin, E. R., et al., 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. Genes Dev. 12, 2499-509.
Cho, H., et al., 2001a. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). Science. 292, 1728-31.
Cho, H., et al., 2001b. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. J Biol Chem. 276, 38349-52.
Christ, B., Ordahl, C. P., 1995. Early stages of chick somite development. Anat Embryol (Berl). 191, 381-96.
Clark, I. B., et al., 2006. D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the Drosophila mesoderm. Dev Biol. 294, 220-31.
Conti, F. J., et al., 2008. Progressive myopathy and defects in the maintenance of myotendinous junctions in mice that lack talin 1 in skeletal muscle. Development. 135, 2043-53.

Conti, F. J., et al., 2009. Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions. Development. 136, 3597-606.
Corbo, J. C., et al., 2001. The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology. Cell. 106, 535-8.
Cripps, R. M., et al., 1998. The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during Drosophila myogenesis. Genes Dev. 12, 422-34.
Cripps, R. M., et al., 2004. Positive autoregulation of the Myocyte enhancer factor-2 myogenic control gene during somatic muscle development in Drosophila. Dev Biol. 267, 536-47.
Crozatier, M., Vincent, A., 1999. Requirement for the Drosophila COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signalling. Development. 126, 1495-504.
Davis, R. L., et al., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell. 51, 987-1000.
de la Serna, I. L., et al., 2001. Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. Nat Genet. 27, 187-90.
DeBerardinis, R. J., et al., 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 7, 11-20.
Dekanty, A., et al., 2005. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in Drosophila by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. J Cell Sci. 118, 5431-41.
DeLaurier, A., et al., 2006. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. Dev Biol. 299, 22-34.
Delsuc, F., et al., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. Nature. 439, 965-8.
Demontis, F., Perrimon, N., 2009. Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in Drosophila. Development. 136, 983-93.
Dietrich, S., et al., 1998. Specification of the hypaxial musculature. Development. 125, 2235-49.
Dietzl, G., et al., 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. Nature. 448, 151-6.
DiMauro, S., Lamperti, C., 2001. Muscle glycogenoses. Muscle Nerve. 24, 984-99.
Dimitriadis, G., et al., 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res Clin Pract. 93 Suppl 1, S52-9.
Ding, M., et al., 2004. The cytoskeleton and epidermal morphogenesis in C. elegans. Exp Cell Res. 301, 84-90.
Doberstein, S. K., et al., 1997. Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. J Cell Biol. 136, 1249-61.
Duan, H., et al., 2001. Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. Development. 128, 4489-500.
Duan, H., et al., 2007. A key role of Pox meso in somatic myogenesis of Drosophila. Development. 134, 3985-97.
Duan, R., Gallagher, P. J., 2009. Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. Dev Biol. 325, 374-85.
Dubrulle, J., et al., 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. Cell. 106, 219-32.
Dunglison, G. F., et al., 1999. Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibres while later myogenic populations are pluripotent. Mech Dev. 87, 11-9.
Dutta, D., et al., 2004. Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in Drosophila. Development. 131, 3761-72.
Dutta, D., et al., 2005. Drosophila Heartless acts with Heartbroken/Dof in muscle founder differentiation. PLoS Biol. 3, e337.
Duxson, M. J., et al., 1989. The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. Development. 107, 743-50.
Edmondson, D. G., 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, 628-40.
Ehler, E., et al., 1999. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. J Cell Sci. 112 (Pt 10), 1529-39.
Eisen, J. S., Smith, J. C., 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. Development. 135, 1735-43.
Elstrom, R. L., et al., 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res. 64, 3892-9.
Enriquez, J., et al., 2010
. Multi-step control of muscle diversity by Hox proteins in the Drosophila embryo. Development. 137, 457-66.
Epstein, J. A., et al., 1996. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 4213-8.

Erickson, M. R., et al., 1997. Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. J Cell Biol. 138, 589-603.
Estrada, B., et al., 2006. An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. PLoS Genet. 2, e16.
Evans, D., et al., 1994. During fetal muscle development, clones of cells contribute to both primary and secondary fibers. Dev Biol. 162, 348-53.
Fan, C. M., Tessier-Lavigne, M., 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. Cell. 79, 1175-86.
Farrell, E. R., et al., 1996. Muscle organizers in Drosophila: the role of persistent larval fibers in adult flight muscle development. Dev Biol. 176, 220-9.
Feala, J. D., et al., 2007. Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in Drosophila flight muscle: metabolomic and computational systems analysis. Mol Syst Biol. 3, 99.
Feng, Z., et al., 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. Cancer Res. 67, 3043-53.
Feng, Z., Levine, A. J., 2010. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. Trends Cell Biol. 20, 427-34.
Fernandes, J., et al., 1991. Development of the indirect flight muscles of Drosophila. Development. 113, 67-77.
Fernandes, J. J., Keshishian, H., 2005. Motoneurons regulate myoblast proliferation and patterning in Drosophila. Dev Biol. 277, 493-505.
Fernandez, R., et al., 1995. The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. EMBO J. 14, 3373-84.
Figeac, N., et al., 2007. Muscle stem cells and model systems for their investigation. Dev Dyn. 236, 3332-42.
Fogerty, F. J., et al., 1994. Tiggrin, a novel Drosophila extracellular matrix protein that functions as a ligand for Drosophila alpha PS2 beta PS integrins. Development. 120, 1747-58.
Fox, R. M., et al., 2007. The embryonic muscle transcriptome of Caenorhabditis elegans. Genome Biol. 8, R188.
Frasch, M., 1995. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early Drosophila embryo. Nature. 374, 464-7.
Friday, B. B., et al., 2003. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. Differentiation. 71, 217-27.
Friday, B. B., Pavlath, G. K., 2001. A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells. J Cell Sci. 114, 303-10.
Furlong, E. E., et al., 2001. Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development. Science. 293, 1629-33.
Galletta, B. J., et al., 2004. SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. Mech Dev. 121, 1455-68.
Garofalo, R. S., 2002. Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila. Trends Endocrinol Metab. 13, 156-62.
Geetha-Loganathan, P., et al., 2005. Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. Dev Biol. 288, 221-33.
Gildor, B., et al., 2009. The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate Drosophila myoblast fusion. EMBO Rep. 10, 1043-50.
Gilsohn, E., Volk, T., 2010. Slowdown promotes muscle integrity by modulating integrin-mediated adhesion at the myotendinous junction. Development. 137, 785-94.
Gomez, C., Pourquie, O., 2009. Developmental control of segment numbers in vertebrates. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 312, 533-44.
Gordan, J. D., Simon, M. C., 2007. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. Curr Opin Genet Dev. 17, 71-7.
Gordon, A. M., et al., 2000. Regulation of contraction in striated muscle. Physiol Rev. 80, 853-924.
Gotwals, P. J., et al., 1994. Drosophila PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 11447-51.
Gros, J., et al., 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature. 435, 954-8.
Gros, J., et al., 2004. A two-step mechanism for myotome formation in chick. Dev Cell. 6, 875-82.
Gunthorpe, D., et al., 1999. Different levels, but not different isoforms, of the Drosophila transcription factor DMEF2 affect distinct aspects of muscle differentiation. Dev Biol. 215, 130-45.
Guo, M., et al., 1996. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. Neuron. 17, 27-41.
Hackenbrock, C. R., 1968. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. Proc Natl Acad Sci U S A. 61, 598-605.
Halfon, M. S., et al., 2000. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. Cell. 103, 63-74.
Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. 279, 509-14.

Haralalka, S., et al., 2011. Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in Drosophila. Development. 138, 1551-62.
Hatini, V., DiNardo, S., 2001. Distinct signals generate repeating striped pattern in the embryonic parasegment. Mol Cell. 7, 151-60.
Hirsinger, E., et al., 2001. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. Development. 128, 107-16.
Holtzer, H., et al., 1997. Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. Cell Struct Funct. 22, 83-93.
Houzelstein, D., et al., 1999. The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. Development. 126, 2689-701.
Hughes, S. M., et al., 1993. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development. 118, 1137-47.
Inaki, M., et al., 2010. Drosophila Tey represses transcription of the repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. Development. 137, 2139-46.
Ip, Y. T., et al., 1992. dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo. Genes Dev. 6, 1518-30.
Ito, T., et al., 1996. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. Mol Cell Biol. 16, 3112-24.
Jagla, T., et al., 1998. ladybird determines cell fate decisions during diversification of Drosophila somatic muscles. Development. 125, 3699-708.
Jagla, T., et al., 2002. Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in Drosophila. Development. 129, 1037-47.
Junion, G., et al., 2007. Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors. Genes Dev. 21, 3163-80.
Junion, G., et al., 2005. Mapping Dmef2-binding regulatory modules by using a ChIP-enriched in silico targets approach. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 18479-84.
Kablar, B., et al., 1997. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. Development. 124, 4729-38.
Kahane, N., et al., 2001. The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. Development. 128, 2187-98.
Kamath, R. S., Ahringer, J., 2003. Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans. Methods. 30, 313-21.
Kanamori, Y., et al., 2010. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. Insect Biochem Mol Biol. 40, 30-7.
Kassar-Duchossoy, L., et al., 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. Nature. 431, 466-71.
Kelly, A. M., Zacks, S. I., 1969. The histogenesis of rat intercostal muscle. J Cell Biol. 42, 135-53.
Kennerdell, J. R., Carthew, R. W., 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell. 95, 1017-26.
Kesper, D. A., et al., 2007. Myoblast fusion in Drosophila melanogaster is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). Dev Dyn. 236, 404-15.
Kim, D. H., et al., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell. 110, 163-75.
Kim, J. W., et al., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. 3, 177-85.
Kim, S. J., Kahn, C. R., 1997. Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. Biochem J. 323 (Pt 3), 621-7.
Kim, Y. O., et al., 2004. A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing Drosophila embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 159-64.
Klip, A., et al., 1990. Recruitment of GLUT-4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 172, 728-36.
Knirr, S., et al., 1999. The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning. Development. 126, 4525-35.
Knirr, S., Frasch, M., 2001. Molecular integration of inductive and mesoderm-intrinsic inputs governs even-skipped enhancer activity in a subset of pericardial and dorsal muscle progenitors. Dev Biol. 238, 13-26.
Kohsaka, H., Nose, A., 2009. Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of Capricious. Development. 136, 1127-35.
Kolodziej, P. A., et al., 1996. frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. Cell. 87, 197-204.
Kondoh, H., et al., 2005. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. Cancer Res. 65, 177-85.
Kozlova, T., Thummel, C. S., 2003. Essential roles for ecdysone signaling during Drosophila mid-embryonic development. Science. 301, 1911-4.

Kramer, S. G., et al., 2001. Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. Science. 292, 737-40.
Krawczyk, C. M., et al., 2010. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. Blood. 115, 4742-9.
Kulkarni, M. M., et al., 2006. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in Drosophila melanogaster cell-based assays. Nat Methods. 3, 833-8.
Landgraf, M., et al., 1999. Muscle founder cells regulate defasciculation and targeting of motor axons in the Drosophila embryo. Curr Biol. 9, 589-92.
Landgraf, M., et al., 1997. The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motorneurons of Drosophila. J Neurosci. 17, 9642-55.
Landgraf, M., Thor, S., 2006. Development of Drosophila motoneurons: specification and morphology. Semin Cell Dev Biol. 17, 3-11.
Lankenau, S., et al., 2003. Knockout targeting of the Drosophila nap1 gene and examination of DNA repair tracts in the recombination products. Genetics. 163, 611-23.
Laurin, M., et al., 2008. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 15446-51.
Lavista-Llanos, S., et al., 2002. Control of the hypoxic response in Drosophila melanogaster by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. Mol Cell Biol. 22, 6842-53.
Lawrence, P. A., 1982. Cell lineage of the thoracic muscles of Drosophila. Cell. 29, 493-503.
Le Grand, F., Rudnicki, M. A., 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. Curr Opin Cell Biol. 19, 628-33.
Lee, H. H., Frasch, M., 2000. Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target sloppy paired. Development. 127, 5497-508.
Lejard, V., et al., 2011. EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. J Biol Chem. 286, 5855-67.
Leptin, M., 1991. twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. Genes Dev. 5, 1568-76.
Leptin, M., Grunewald, B., 1990. Cell shape changes during gastrulation in Drosophila. Development. 110, 73-84.
Lilly, B., et al., 1995. Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in Drosophila. Science. 267, 688-93.
Lin, Q., et al., 1998. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. Development. 125, 4565-74.
Lovato, T. L., et al., 2005. Transcription of Myocyte enhancer factor-2 in adult Drosophila myoblasts is induced by the steroid hormone ecdysone. Dev Biol. 288, 612-21.
MacLennan, D. H., 2000. Ca2+ signalling and muscle disease. Eur J Biochem. 267, 5291-7.
Mammucari, C., et al., 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab. 6, 458-71.
Maqbool, T., et al., 2006. Shaping leg muscles in Drosophila: role of ladybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis. PLoS One. 1, e122.
Marcelle, C., et al., 1997. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. Development. 124, 3955-63.
Marin, M. C., et al., 2004. Transcription of Drosophila troponin I gene is regulated by two conserved, functionally identical, synergistic elements. Mol Biol Cell. 15, 1185-96.
Martin, D., et al., 1999. wing blister, a new Drosophila laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. J Cell Biol. 145, 191-201.
Matoba, S., et al., 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. Science. 312, 1650-3.
Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol. 9, 493-5.
Maxwell, P. H., et al., 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature. 399, 271-5.
Maynard, M. A., Ohh, M., 2007. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. Cell Mol Life Sci. 64, 2170-80.
Michelson, A. M., 1994. Muscle pattern diversification in Drosophila is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. Development. 120, 755-68.
Michelson, A. M., et al., 1998. Dual functions of the heartless fibroblast growth factor receptor in development of the Drosophila embryonic mesoderm. Dev Genet. 22, 212-29.
Miller, A., 1950. The internal anatomy of the imago of *Drosophila melanogaster*. Biology of Drosophila. 420-531.
Molkentin, J. D., et al., 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. Cell. 83, 1125-36.
Moore, C. A., et al., 2007. A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. Development. 134, 3145-53.
Moss, F. P., Leblond, C. P., 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. Anat Rec. 170, 421-35.
Muller, D., et al., 2010. Regulation and functions of the lms homeobox gene during development of embryonic lateral transverse muscles and direct flight muscles in Drosophila. PLoS One. 5, e14323.

Murchison, N. D., et al., 2007. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. Development. 134, 2697-708.
Murgia, M., et al., 2000. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. Nat Cell Biol. 2, 142-7.
Nolan, K. M., et al., 1998. Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. Genes Dev. 12, 3337-42.
Nongthomba, U., et al., 2003. Suppression of muscle hypercontraction by mutations in the myosin heavy chain gene of Drosophila melanogaster. Genetics. 164, 209-22.
Nose, A., et al., 1992. Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in Drosophila. Cell. 70, 553-67.
Nowak, S. J., et al., 2009. Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. J Cell Sci. 122, 3282-93.
Nyamsuren, O., et al., 2007. A mutation in CHN-1/CHIP suppresses muscle degeneration in Caenorhabditis elegans. Dev Biol. 312, 193-202.
Oda, H., et al., 1998. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation. Dev Biol. 203, 435-50.
Ogi, H., et al., 2005. Ventral abdominal wall dysmorphogenesis of Msx1/Msx2 double-mutant mice. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 284, 424-30.
Ordahl, C. P., et al., 2001. The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. Development. 128, 1731-44.
Passamaneck, Y. J., et al., 2007. Dynamic and polarized muscle cell behaviors accompany tail morphogenesis in the ascidian Ciona intestinalis. PLoS One. 2, e714.
Patel, K., et al., 2002. Control of muscle size during embryonic, fetal, and adult life. Results Probl Cell Differ. 38, 163-86.
Periz, G., Fortini, M. E., 1999. Ca(2+)-ATPase function is required for intracellular trafficking of the Notch receptor in Drosophila. EMBO J. 18, 5983-93.
Perry, R. L., Rudnick, M. A., 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. Front Biosci. 5, D750-67.
Pette, D., Staron, R. S., 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 116, 1-76.
Polesskaya, A., et al., 2001. CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. EMBO J. 20, 6816-25.
Pourquie, O., 2003. The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. Science. 301, 328-30.
Pringle, J. W., 1967. Evidence from insect fibrillar muscle about the elementary contractile process. J Gen Physiol. 50, Suppl:139-56.
Puri, P. L., Sartorelli, V., 2000. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. J Cell Physiol. 185, 155-73.
Puzio-Kuter, A. M., 2011. The Role of p53 in Metabolic Regulation. Genes Cancer. 2, 385-91.
Randhawa, V. K., et al., 2008. GLUT4 vesicle recruitment and fusion are differentially regulated by Rac, AS160, and Rab8A in muscle cells. J Biol Chem. 283, 27208-19.
Reim, I., et al., 2003. The T-box-encoding Dorsocross genes function in amnioserosa development and the patterning of the dorsolateral germ band downstream of Dpp. Development. 130, 3187-204.
Relaix, F., et al., 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. J Cell Biol. 172, 91-102.
Relaix, F., et al., 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. Nature. 435, 948-53.
Rhee, D., et al., 1994. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. Cell Motil Cytoskeleton. 28, 1-24.
Rhodes, S. J., Konieczny, S. F., 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. Genes Dev. 3, 2050-61.
Richardson, B. E., et al., 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. Development. 134, 4357-67.
Rios, A. C., et al., 2011. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. Nature. 473, 532-5.
Ritzenthaler, S., Chiba, A., 2001. Multiple personalities: synaptic target cells as introverts and extroverts. Dev Growth Differ. 43, 503-8.
Ritzenthaler, S., et al., 2000. Postsynaptic filopodia in muscle cells interact with innervating motoneuron axons. Nat Neurosci. 3, 1012-7.
Rochlin, K., et al., 2009. Myoblast fusion: when it takes more to make one. Dev Biol. 341, 66-83.
Rogner, U. C., et al., 2000. Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. Nat Genet. 25, 431-5.
Rommel, C., et al., 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol. 3, 1009-13.
Ross, J. J., et al., 1987. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. Development. 100, 383-94.

Roy, S., VijayRaghavan, K., 1997. Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in Drosophila. Development. 124, 3333-41.
Rui, Y., et al., 2010. Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. PLoS Genet. 6, e1001208.
Ruiz Gomez, M., Bate, M., 1997. Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb. Development. 124, 4857-66.
Ruiz-Gomez, M., et al., 2000. Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. Cell. 102, 189-98.
Ruiz-Gomez, M., et al., 1997. Specific muscle identities are regulated by Kruppel during Drosophila embryogenesis. Development. 124, 3407-14.
Rulifson, E. J., et al., 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. Science. 296, 1118-20.
Rushton, E., et al., 1995. Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for Drosophila muscle development. Development. 121, 1979-88.
Ryder, E., et al., 2007. The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource. Genetics. 177, 615-29.
Saj, A., et al., 2010. A combined ex vivo and in vivo RNAi screen for notch regulators in Drosophila reveals an extensive notch interaction network. Dev Cell. 18, 862-76.
Sandmann, T., et al., 2007. A core transcriptional network for early mesoderm development in Drosophila melanogaster. Genes Dev. 21, 436-49.
Sandmann, T., et al., 2006. A temporal map of transcription factor activity: mef2 directly regulates target genes at all stages of muscle development. Dev Cell. 10, 797-807.
Sandri, M., et al., 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell. 117, 399-412.
Schiaffino, S., Mammucari, C., 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. Skelet Muscle. 1, 4.
Schiaffino, S., Reggiani, C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev. 76, 371-423.
Schiaffino, S., et al., 2007. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. Physiology (Bethesda). 22, 269-78.
Schnorrer, F., et al., 2007. The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in Drosophila. Dev Cell. 12, 751-66.
Schnorrer, F., et al., 2010. Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in Drosophila. Nature. 464, 287-91.
Schultz, E., et al., 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. J Exp Zool. 206, 451-6.
Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., et al., 2004. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. Cancer Res. 64, 2627-33.
Schweitzer, R., et al., 2001. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. Development. 128, 3855-66.
Schweitzer, R., et al., 2010. Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. Development. 137, 2807-17.
Shih, H. P., et al., 2008. Muscle development: forming the head and trunk muscles. Acta Histochem. 110, 97-108.
Shikama, N., et al., 2000. Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. Mol Cell Biol. 20, 8933-43.
Shishido, E., et al., 1997. Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific Drosophila FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. Development. 124, 2119-28.
Smallhorn, M., et al., 2004. The epithelial-mesenchymal transition of the Drosophila mesoderm requires the Rho GTP exchange factor Pebble. Development. 131, 2641-51.
Sohn, R. L., et al., 2009. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 9274-9.
Soler, C., et al., 2004. Coordinated development of muscles and tendons of the Drosophila leg. Development. 131, 6041-51.
Sparrow, J. C., Schock, F., 2009. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. Nat Rev Mol Cell Biol. 10, 293-8.
Srinivas, B. P., et al., 2007. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. Nat Genet. 39, 781-6.
St Johnston, D., 2002. The art and design of genetic screens: Drosophila melanogaster. Nat Rev Genet. 3, 176-88.
Stathopoulos, A., et al., 2004. pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of Drosophila embryos. Genes Dev. 18, 687-99.
Stathopoulos, A., et al., 2002. Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. Cell. 111, 687-701.

Staudt, N., et al., 2005. Gain-of-function screen for genes that affect Drosophila muscle pattern formation. PLoS Genet. 1, e55.
Stewart, C. E., Rittweger, J., 2006. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. J Musculoskelet Neuronal Interact. 6, 73-86.
Stitt, T. N., et al., 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol Cell. 14, 395-403.
Strunkelnberg, M., et al., 2001. rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in Drosophila. Development. 128, 4229-39.
Su, M. T., et al., 1999. The Drosophila homeobox genes zfh-1 and even-skipped are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision. Development. 126, 3241-51.
Subramanian, A., et al., 2007. Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in Drosophila. Development. 134, 1269-78.
Sudarsan, V., et al., 2001. Myoblast diversification and ectodermal signaling in Drosophila. Dev Cell. 1, 829-39.
Swank, D. M., et al., 2002. The myosin converter domain modulates muscle performance. Nat Cell Biol. 4, 312-6.
Tajbakhsh, S., et al., 1998. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. Development. 125, 4155-62.
Tapanes-Castillo, A., Baylies, M. K., 2004. Notch signaling patterns Drosophila mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist. Development. 131, 2359-72.
Tein, I., 1996. Metabolic myopathies. Semin Pediatr Neurol. 3, 59-98.
Tennessen, J. M., et al., 2011. The Drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. Cell Metab. 13, 139-48.
Thibault, S. T., et al., 2004. A complementary transposon tool kit for Drosophila melanogaster using P and piggyBac. Nat Genet. 36, 283-7.
Thisse, C., et al., 1991. Sequence-specific transactivation of the Drosophila twist gene by the dorsal gene product. Cell. 65, 1191-201.
Thor, S., Thomas, J. B., 2002. Motor neuron specification in worms, flies and mice: conserved and 'lost' mechanisms. Curr Opin Genet Dev. 12, 558-64.
Till, B. J., et al., 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. Genome Res. 13, 524-30.
Tixier, V., et al., 2010. Diversification of muscle types: recent insights from Drosophila. Exp Cell Res. 316, 3019-27.
Tozer, S., Duprez, D., 2005. Tendon and ligament: development, repair and disease. Birth Defects Res C Embryo Today. 75, 226-36.
Van der Ven, P. F., et al., 1999. Thick filament assembly occurs after the formation of a cytoskeletal scaffold. J Muscle Res Cell Motil. 20, 569-79.
Vander Heiden, M. G., et al., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 324, 1029-33.
Vasyutina, E., et al., 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 8935-40.
Volk, T., 1999. Singling out Drosophila tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. Trends Genet. 15, 448-53.
Volk, T., et al., 1990. A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. Cell. 63, 525-36.
Wayburn, B., Volk, T., 2009. LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo. Development. 136, 3607-15.
Weintraub, H., et al., 1991. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. Science. 251, 761-6.
Wigmore, P. M., Evans, D. J., 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. Int Rev Cytol. 216, 175-232.
Winberg, M. L., et al., 1998. Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. Cell. 93, 581-91.
Wong, M. C., et al., 2008. Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis. Dev Biol. 317, 417-29.
Yarnitzky, T., et al., 1998. An interplay between two EGF-receptor ligands, Vein and Spitz, is required for the formation of a subset of muscle precursors in Drosophila. Mech Dev. 79, 73-82.
Ypsilanti, A. R., et al., 2010. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. Development. 137, 1939-52.
Zhang, M., McLennan, I. S., 1998. Primary myotubes preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibers. Dev Dyn. 213, 147-57.
Zhang, Y., et al., 2004. Cofactor-independent phosphoglycerate mutase has an essential role in Caenorhabditis elegans and is conserved in parasitic nematodes. J Biol Chem. 279, 37185-90.

ANNEXES

Annexe 1 :

Correspondance entre les stades embryonnaires et les temps de développement chez la Drosophile

Stade embryonnaire	Temps AEL (h)
1	0 - 0:25
2	0:25 - 1:05
3	1:05 - 1:20
4	1:20 - 2:10
5	2:10 - 3
6	3 - 3:15
7	3:15 - 3:20
8	3:20 - 3:50
9	3:50 - 4:20
10	4:20 - 5:20
11	5h20 -7h30
12	7:30 - 9:20
13	9:20 - 10:30
14	10:30 - 11:30
15	11:30 - 13
16	13 - 16
17	16 jusqu'à éclosion

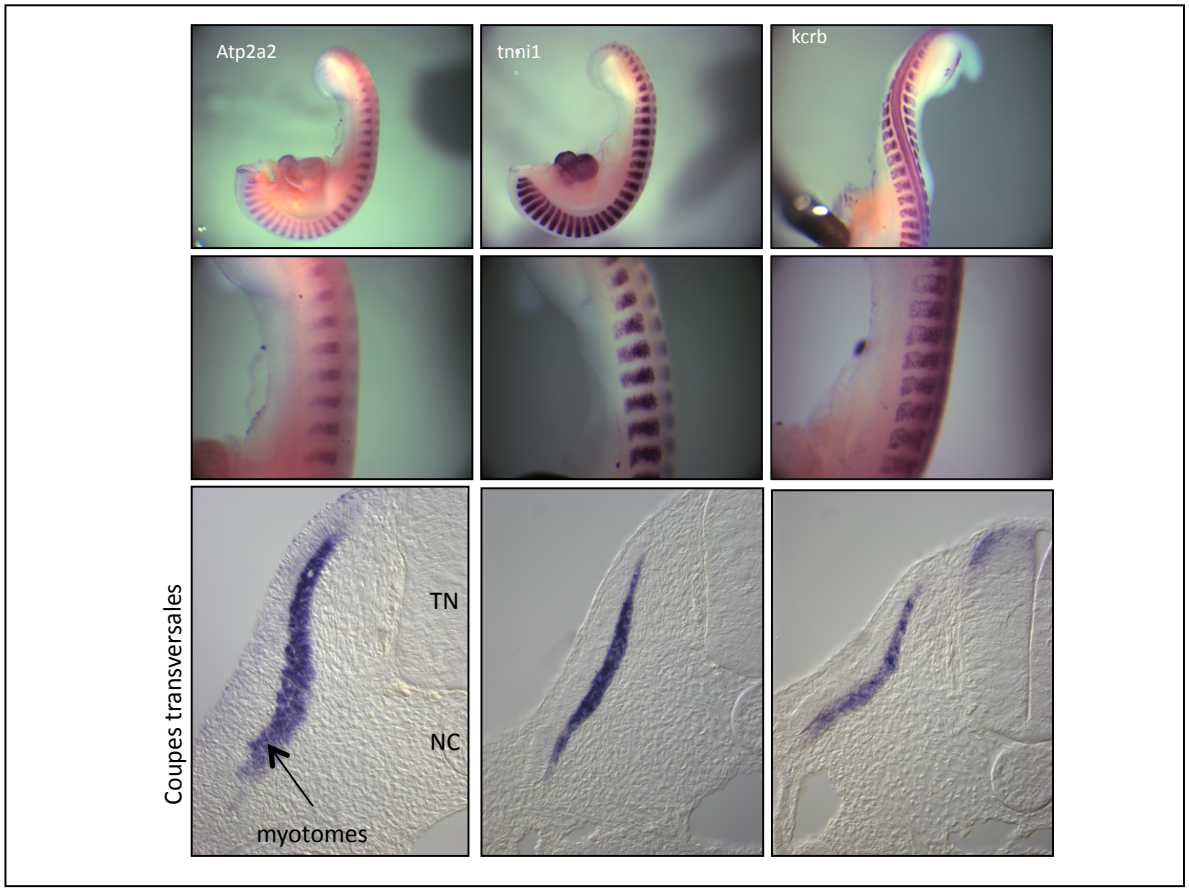


Figure 1' : Expression des orthologues de Ca-P60A, WupA *et* ArgK chez l'embryon de poulet au stade 22

TN: tube neural;NC:Notochorde

Annexe 2 : Résultats obtenus chez le poulet

Ces résultats ont été obtenus par Olivier Serralbo grâce à une collaboration avec l'équipe de Christophe Marcelle à l'IBDML à Marseille.

Afin de déterminer le profil d'expression des orthologues de *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* chez le poulet, il a conduit des expériences d'hybridations *in situ*. Les résultats qu'il a obtenu pour les gènes *Atp2a2* (orthologue de *Ca-P60A)*, *kcrb* (*ArgK*) et tnni1 (*WupA*) ont permis de conclure qu'au stade embryonnaire 22 (3,5 jours), les orthologues de *Ca-P60A* et *WupA* sont spécifiquement exprimés dans les myotomes alors que l'orthologue de *ArgK* est exprimé dans les myotomes et le tube neural **(Fig. 1')**. Ces résultats montrent une conservation importante de l'expression musculaire de ces trois gènes entre la Drosophile et une espèce de vertébré. Cependant, l'analyse fonctionnelle de ces gènes chez le poulet n'a pas pu être poursuivie malgré les profils d'expression très intéressants.

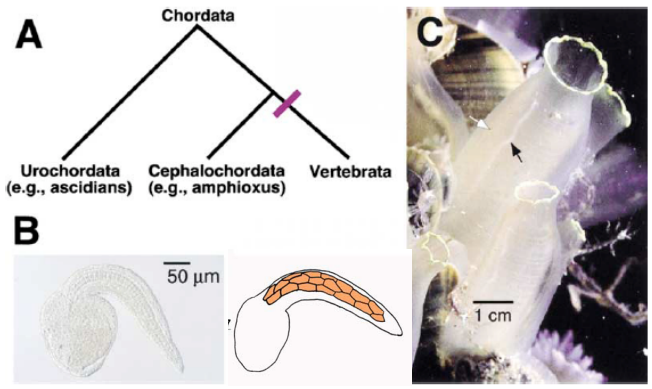


Figure 2' : L'ascidie comme système modèle pour étudier l'évolution des gènes dans la myogenèse

D'après Corbo *et al.,* 2001 et Passamaneck *et al.,* 2007

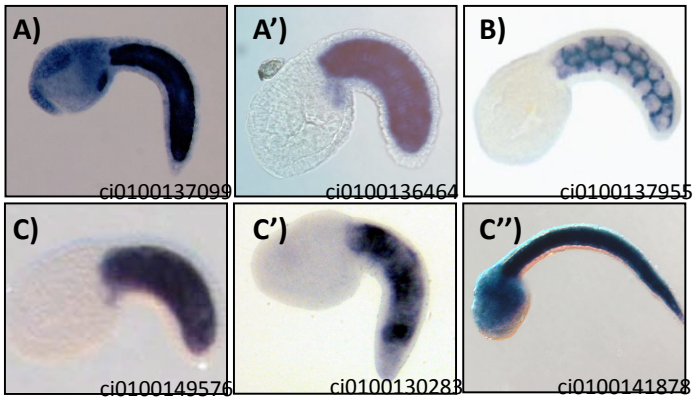


Figure 3' : Profils d'expression des orthologues de A) A')*Ca-P60A*, B) *WupA* et C) C') C'') *ArgK* chez l'ascidie

D'après Aniseed

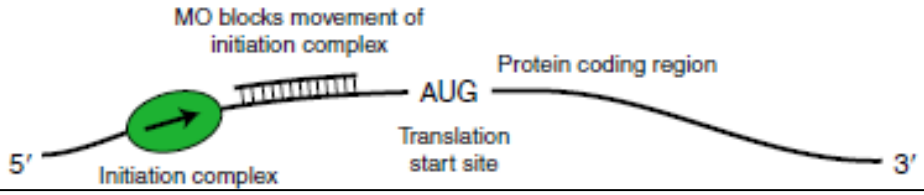


Figure 4' : Mode d'action des morpholinos utilisés pour inhiber l'expression des orhtologues de *Ca-P60A*, *WupA et ArgK* chez l'ascidie

D'après Eisen et Smith, 2008

Annexe 3 : Résultats obtenus chez l'ascidie

Les travaux sur l'ascidie *Ciona intestinalis* ont été réalisés à l'IBDML, au sein de l'équipe de Patrick Lemaire et avec l'aide de Ute Rothbächer. Le système musculaire de l'ascidie est un modèle relativement simple puisqu'on ne distingue que 36 cellules musculaires mononucléées chez la larve de la cione (sur un total de 2600 cellules), toutes présentes au niveau de la queue de l'animal **(Fig. 2')** (Corbo et al., 2001). L'ascidie est un animal marin hermaphrodite invertébré appartenant à l'embranchement des chordés et au sous-embranchement des tuniciers, considérés comme les parents les plus proches des vertébrés (Delsuc et al., 2006). Chacun des trois gènes drosophilien *Ca-P60A, ArgK* et *WupA* possède plusieurs orthologues chez *Ciona intestinalis* et pour certains d'entre eux, les profils d'expression ont été décrits et sont disponibles dans la base de données Aniseed (http://www.aniseed.cnrs.fr/index.php) **(Fig. 3')**. On remarque ainsi, comme chez le poulet, une conservation importante de l'expression musculaire chez l'ascidie, renforçant la pertinence de conduire des analyses fonctionnelles chez cette espèce. La technique employée chez l'ascidie pour inhiber l'expression d'un gène est basée sur l'injection de molécules appelées morpholinos qui sont couramment utilisées chez les espèces pour lesquelles l'inhibition par ARN interférence s'avère peu efficace, comme la poisson-zèbre ou le xénope (Eisen and Smith, 2008). Les morpholinos sont des molécules simple-brin, d'environ 25 bases. Ils sont composés d'une succession d'oligonucléotides synthétiques qui ont une structure qui diverge de celle des oligonucléotides retrouvés dans les molécules d'ADN et d'ARN, leur permettant toujours de s'associer aux acides nucléiques par complémentarité des bases, mais qui leur confère une plus grande stabilité et une toxicité moindre. On distingue classiquement deux types de morpholinos (MO), ceux qui bloquent la traduction et ceux qui empêchent l'épissage des ARN. Pour nos travaux, nous avons utilisé des MO de la première catégorie **(Fig. 4')**. J'ai participé activement à cette collaboration en déterminant les séquences de ces morpholinos et en réalisant quelques injections. Les séquences ont été choisies de façon à être complémentaires de la séquence en amont de l'AUG initiateur de la traduction afin de bloquer

efficacement la progression du complexe d'initiation de la traduction. La détermination de l'AUG initiateur est donc une étape préliminaire très importante dans le choix des MO. Un MO a été déterminé et synthétisé pour chaque orthologue. L'injection des MO se fait ensuite dans des œufs non fécondés au stade une cellule. En raison des difficultés techniques que présente cette manipulation et de manque de temps, nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de résultats.

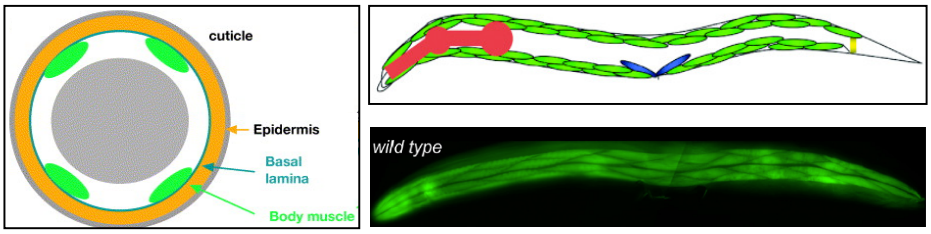


Figure 5' : Structure des muscles du corps chez *Caenorhabditis elegans* *(phalloidine)*

D'après Ding *et al.,* 2004, Fox *et al.*, 2007 et Nyamsuren *et al.*, 2007

Annexe 4 : Résultats obtenus chez le nématode

Les analyses chez le nématode ont été réalisées par Caroline Borrel au CGPMC de Villeurbanne sous la direction de Laurent Ségalat et de Kathrin Gieseler. L'approche par ARN interférence chez cette espèce est très rapide à mettre en œuvre puisque la plupart des clones permettant d'inhiber les gènes de *Caenorhabditis elegans* existent déjà et n'ont donc pas besoin d'être systématiquement clonés. *C. elegans* est donc un modèle largement utilisé pour réaliser des cribles génétiques et notamment pour la recherche de gènes impliqués dans le développement musculaire. En effet, le système musculaire chez cet invertébré est facile à observer puisque, comme chez l 'ascidie, on peut comptabiliser les muscles multinucléés : chaque ver possède quatre quadrants musculaires avec 20 cellules par quadrant **(Fig. 5')**.

L'inhibition de l'expression des gènes par ARNi chez le nématode se fait par ingestion de clones permettant la production d'ARNdb (Kamath and Ahringer, 2003). Deux types d'expériences ont été menées en utilisant cette technique. La première consistait à faire ingérer des clones à des vers à différents stades de développement afin d'observer comment se sont développés les muscles 48h plus tard (ARNi sur 48h). Pour cela, des souches exprimant la GFP dans les noyaux musculaires ont été utilisées afin de pouvoir comptabiliser le nombre de muscles, une cellule musculaire dégénérée se caractérisant par l'absence de son noyau. La deuxième approche consistait à étudier le phénomène d'ARN interférence sur la génération suivante (ARNi sur 7 jours). Pour cela, la progéniture issue d'adultes sauvages ayant ingéré les clones est analysée au bout de 7 jours de développement et les muscles sont observés après coloration à la phalloïdine couplée à la rhodamine afin de détecter la présence de fibres dégénérées.

L'atténuation de l'expression de *D2096.8,* l'orthologue de *Nap1,* sur 48h donne des vers qui présentent en moyenne 19,56 muscles par quadrant, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'effet de sur le nombre de muscles. Après l'expérience sur 7 jours, on observe des vers présentant une diminution de la longévité et de taille réduite ce qui pourrait être la conséquence d'un retard de développement. Cependant, au niveau

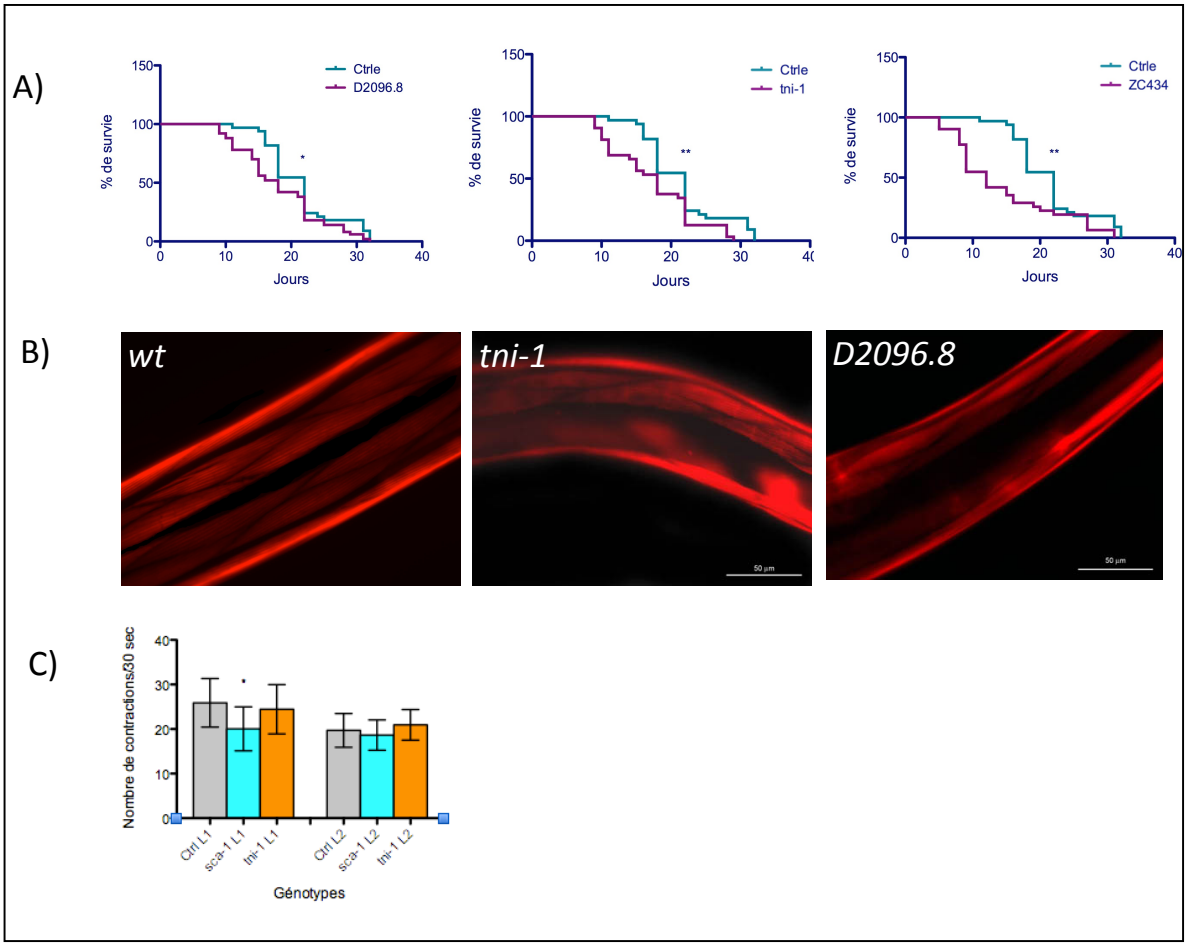


Figure 6' : Analyses fonctionnelles des orthologues de *Nap1 (D2096.8)*, *Ca-P60A, (sca-1) WupA (tni-1) et ArgK* (ZC434.8) chez *Caenorhabditis elegans*

Effet de l'ARNi sur 7 jours sur A) la longévité des vers et B) le développement musculaire. C) Test de Body Bends: Etude de l'impact de l'inhibition de l'expression des gènes sur la contraction musculaire

musculaire aucune dégénérescence n'a été observée **(Fig. 6')**. Ces résultats montrent l'implication de *Nap1* dans la croissance et dans la longévité, mais aucun rôle musculaire n'est mis en évidence suite par ces analyses. On ne connaît pas le profil d'expression de l'orthologue de *Nap1* chez *C.elegans* et il est donc possible qu'il ne soit pas conservé dans le muscle.

Concernant l'ARNi sur 48h après inactivation du gène *sca-1*, orthologue de *Ca-P60A,* le nombre moyen de noyaux par quadrant est de 20, c'est-à-dire que l'ensemble des cellules musculaires est présent suggérant que ce gène n'a pas d'effet sur la myogenèse. Cependant, lors de l'expérience de ARNi sur 7 jours, l'inhibition de *sca-1* provoque une létalité importante des vers et très peu de descendants survivent. Par conséquent, les fibres musculaires n'ont pas pu être observées. De plus, des tests de survie ont montré qu'en moyenne près de 9% des œufs pondus par ces adultes sont retrouvés morts 24h après la ponte. Ce résultat laisse penser que *sca-1* joue un rôle au cours du développement embryonnaire du nématode.

De la même façon, après inhibition de l'expression de *tni1*, orthologue de *WupA*, les vers présentent en moyenne 19,1 muscles par quadrant, montrant qu'il n'y a pas de véritable dégénérescence musculaire. Cependant, l'expérience sur 7 jours induit une diminution de la longévité des vers et on observe des défauts musculaires **(Fig. 6')**

Pour *sca-1* et *tni-1*, un troisième test a été réalisé afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de ces gènes sur la contraction musculaire des larves. Ce test, dit de « body bends » , consiste à compter le nombre de contractions permettant au ver de tourner durant son déplacement par reptation sur 30 secondes. Le comptage est réalisé sur des vers aux stades larvaires L1 et L2 (J2 et J3, avant la létalité) issus de parents ayant ingéré des clones ARNi et 20 comptages sont réalisés pour chaque génotype. Chez le contrôle, le nombre moyen de contractions en 30 sec est de 25,9 pour les L1 et 19,7 pour les L2. Aucune différence significative n'est observée avec les vers L2 atténués pour *sca-1* et *tni-1* qui effectuent respectivement 18,65 et 20,95 contractions en 30 sec (Figure 6'C). Une diminution du nombre de contraction est cpendant observée chez les L1 après inhibition de sca-1. Concernant l'orthologue du gène *ArgK, ZC434*, l'expérience d'ARNi sur 7 jours donne des vers au phénotype

sauvage, sans aucune fibre musculaire dégénérée. L'ARNi sur 48h n'a pas non plus montré de défaut musculaire puisqu'en moyenne les vers ont 19,1 noyau par quadrant. Cependant, on note une diminution significative de la durée de vie des vers de la génération suivante **(Fig. 6')**.

Annexe 5 : Revue
Publiée dans Experimental Cell Research

Author's personal copy

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 316 (2010) 3019–3027

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yexcr

Review

Diversification of muscle types: Recent insights from *Drosophila*

*Vanessa Tixier, Laetitia Bataillé, Krzysztof Jagla**

GReD, INSERM U931, CNRS UMR6247, Clermont University, Faculty of Medicine, 28, place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:
Received 1 March 2010
Revised version received 20 July 2010
Accepted 21 July 2010
Available online 29 July 2010

Keywords:
Drosophila
Somatic muscles
Diversification
Muscle identity

ABSTRACT

Myogenesis is a highly conserved process ending up by the formation of contracting muscles. In *Drosophila* embryos, myogenesis gives rise to a segmentally repeated array of thirty distinct fibres, each of which represents an individual muscle. Since *Drosophila* offers a large range of genetic tools for easily testing gene functions, it has become one of the most studied and consequently best-described model organisms for muscle development. Over the last two decades, the *Drosophila* model system has enabled major advances in our understanding of how the initially equivalent mesodermal cells become competent for entering myogenic differentiation and how each distinct type of muscle is specified. Here we present an overview of *Drosophila* muscle development with a special focus on the diversification of muscle types and the genes that control acquisition of distinct muscle properties.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction . . . 3019
Determination of the somatic mesoderm . . . 3020
From somatic mesoderm to founder cells and fusion-competent myoblasts . . . 3020
From founders to individual muscle fibres. . . . 3022
Relevance to human diseases . . . 3022
Concluding remarks . . . 3024
References . . . 3024

Introduction

In *Drosophila* embryos, somatic muscles corresponding to vertebrate skeletal muscles show a stereotyped and segmentally repeated organization [1]. Within a given segment, each somatic muscle is morphologically distinct and displays specific properties such as size, position and orientation along the dorsoventral and anteroposterior axes, attachment to the epidermis, and innervation [2]. These unique properties can be used to identify and follow individual muscles during normal development and in different genetic contexts. Moreover, the wide range of genetic tools available in *Drosophila* such as P-element insertions, deletions [3,4] and RNAi lines collections [5] further facilitate the analysis of genes involved in muscle development.

The high conservation of the processes and genes giving rise to the formation of the somatic/skeletal muscles in both *Drosophila*

* *Corresponding author.*
E-mail address: christophe.jagla@u-clermont1.fr (K. Jagla).

0014-4827/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.yexcr.2010.07.013

Author's personal copy

and vertebrates [6] makes the fruit fly particularly well suited for studying myogenesis and dissecting myogenic gene networks. Several studies and large-scale screens have been performed to identify new muscle genes and predict the regulatory cascades involved in myogenesis [7–11]. In addition to the fundamental knowledge on muscle development gained, it also turns out that *Drosophila* can be used to generate pertinent models of human myopathies and thus develop novel therapeutic strategies [12–14].

From the standpoints of both fundamental and muscular disease research, one of the major challenges is to understand how morphologically and functionally distinct muscles are formed from a common pool of initially equivalent mesodermal cells. In this review, we focus on embryonic myogenesis in *Drosophila* and present the current view on how progressive diversification of mesodermal cells leads to the formation of different muscle types. Because of the description of a growing number of *Drosophila* genes displaying a muscle-type specific expression patterns with functional significance in the acquisition of specific muscle properties, this model represents an attractive resource for future studies in this field. Indeed, similar knowledge in vertebrate myogenesis would be essential, pointing the importance of the simple *Drosophila* model.

Determination of the somatic mesoderm

Cardiac, visceral and somatic muscles all derive from the mesoderm. Mesodermal cells are determined in the ventral part of *Drosophila* embryos at embryonic stage 5, between 2 h 10 min and 2 h 50 min AEL (After Egg Laying), by a high concentration of Dorsal morphogene, which induces the expression of Twist (Twi) and Snail (Sna) transcription factors [15,16]. *twi* is a master gene of mesoderm formation. It specificies different mesodermal derivatives by activating a large range of genes [17] such as *tinman (tin)* which is required for dorsal somatic, cardiac and visceral mesoderm development [18]. In contrast, *sna* inhibits the expression of genes that induce the development of neighbouring territories such as the neuroectoderm [19].

A bundle of ventral cells determined as being mesodermal invaginates during the gastrulation process and then migrates dorsally under the influence of the FGF receptor Heartless (Htl) [20].

At embryonic stage 10 (4 h 20 min–5 h 20 min AEL), the mesodermal layer in each segment gets subdivided by signals from the ectoderm into four compartments along the anteroposterior and dorsoventral axes. The anteroposterior axis is defined by Wingless (Wg) and Hedgehog (Hh) signals whereas the dorsoventral one is determined by decapentaplegic (Dpp) (Fig. 1A).

Wg is secreted in the anterior part of each segment where it induces the expression of *sloppy-paired (slp)* that in turn maintains a high concentration of Twi, which is required to determine the myogenic competence domains [21,22]. Within the myogenic domain, Twi acts as a homodimer to activate genes involved in somatic muscle development [23,24]. The somatic mesoderm forms mainly in the antero-ventral part of each segment and in a portion of the antero-dorsal compartment. Cardiac precursors arise from the most dorsal portion of this "high-Twi domain". In the dorsal part, Twi activates *tin* whose expression is maintained by the ectodermal decapentaplegic (Dpp) [25] and Wg signals [26]. Tin specifies the territory of the future cardiac and dorsal somatic muscles [18]. Reciprocally, in the ventral part of the "high-Twi domain", Twi targets *Dsix4* and *pox meso (poxm)* [17] specify the territory of the future ventral and lateral muscles [27,28].

In the posterior part, Hh signalling and low levels of Twi allow the specification of visceral muscles and fat body [29].

Notch signalling also plays a critical role in determining competence domains by either *twi* activation or repression in presumptive high and low Twi domains, respectively [30].

From somatic mesoderm to founder cells and fusion-competent myoblasts

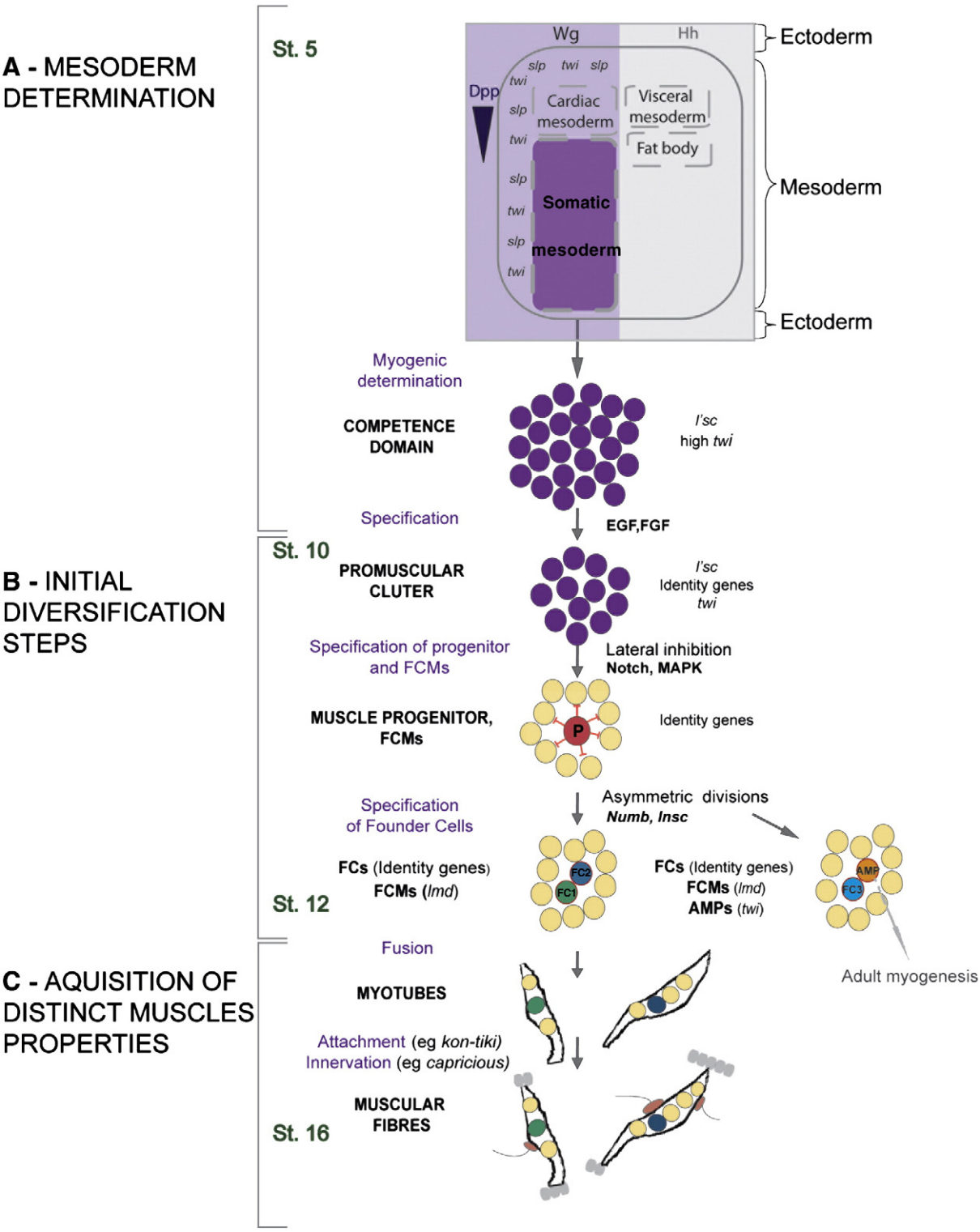
Drosophila somatic muscles, like vertebrate skeletal muscles, are multinucleated and form by myoblast fusion. There is solid experimental evidence that the fusion process is asymmetric in *Drosophila* and that the myofibres form by fusion between two types of cells: Founder Cells (FC), which support the identity of the future muscle, and Fusion-Competent Myoblasts (FCMs) [1,31]. Both types of myoblasts (FCs and FCMs) originate from the same competence domain. How do these two types of cells with different properties get determined from a pool of initially equivalent cells? In fact, successive steps of cell fate determination specify them progressively.

First, the extrinsic Wg signal coming from the ventral and lateral epidermis and, dorsally, the combination of Wg and Dpp signals induce expression of the proneural gene *lethal of scute (l'sc)* in all the cells of the competence domain [32] (Fig. 1A). Then, subdivision of the competence domain into different promuscular clusters represents an initial step in diversification of muscle cells and in formation of different types of muscles (Fig. 1B). This process involves intrinsic FGF and EGF signals, which restrict *l'sc*

Fig. 1 – Successive steps in the myogenic cascade in *Drosophila* embryos. The scheme illustrates stages of embryonic development, main myogenic events, and key genes involved in the different steps of myogenesis. (A) Determination of somatic mesoderm. Somatic mesoderm is determined in the anterior part of each segment by a high level of *twist (twi)*, which is induced by the ectodermal Wingless (Wg) signal. Competence domains are determined by the expression of the proneural gene *lethal of scute (l'sc)*. (B) Initial diversification steps. *l'sc* expression is then restricted by EGF and FGF signals to promuscular clusters. The cells in these clusters express identity genes. In each cluster, one cell is determined as a muscular progenitor. It has the Ras-MAPK pathway strongly activated, and induces higher Notch activity in the other cells of the cluster, which are at the origin of fusion-competent myoblasts (FCMs). The muscular progenitor then divides asymmetrically, giving rise to either two founder cells (FCs) or one FC and one adult muscle precursor (AMP) via an asymmetric division. (C) Acquisition of distinct muscle properties. Different FCs fuse with a defined number of FCMs giving rise to the formation of myotubes. These myotubes then attach to epidermis and are innervated by motoneurons to give functional muscles. Each muscle has distinct and specific attachment and innervation patterns.

Author's personal copy

expression to a subset of cells forming promuscular clusters [33,34]. Cells within promuscular clusters also start to express different muscle identity genes [35], and at this stage they still have the same potential to become either FCs or FCMs. Slightly later, a process of lateral inhibition involving Notch and MAPK pathways [36] dictates that only one cell in each cluster acquires the identity of muscular progenitor, the other remaining cells becoming FCMs (Fig. 1B). Only the progenitor cell strongly maintains the active MAPK pathway that, in turn, leads to peak Notch pathway activity in the surrounding cells (the presumptive FCMs). MAPK activation in the segregating muscular progenitor cell restricts the expression of identity genes whereas Notch pathway activity in non-segregating cells induces the expression of the FCM-specific *lame duck* gene (*lmd*) [36,37]. The progenitor cells then divide, most of the time asymmetrically, giving rise to either two FCs or one FC and one adult muscle precursor cell (AMP) [38]. Asymmetric division takes place in progenitors in which the Numb and Inscuteable (Insc) proteins are localized at



Author's personal copy

opposite sides of the cell. Consequently, only one of the sibling myoblasts retains Numb, which is able to repress Notch, whereas the second daughter cell becomes Notch-positive [38,39]. The AMP cells correspond to specific siblings maintaining Notch activity. They remain undifferentiated throughout embryogenesis and do not contribute to embryonic muscle development, but they are required for adult myogenesis. Thus, progressive cell fate specification in the somatic mesoderm at the end of stage 12 of embryogenesis (9 hr AEL) results in three distinct classes of myoblasts: FCs, AMPs and FCMs. During their specification, FCs are organized into four groups, termed dorsal, dorso-lateral, ventro-lateral and ventral. Each of these groups comprising a set number of FCs prefigures the spatial distribution of future myofibres within the embryo [40]. Importantly, all FCs share the capacity to fuse with FCMs but at the same time they differ by the expression of muscle identity genes that are known to control the acquisition of distinct properties of individual muscles.

From founders to individual muscle fibres

Following these initial diversification steps (Fig. 1B), each FC expressing identity genes undergoes a series of myogenic events that enable the formation of functional muscles with unique features. Over last two decades, a large number of muscle identity genes that encode transcription factors and are expressed in different subsets of FCs and resulting muscles has been identified in *Drosophila* [41] (see Table 1 and Fig. 2). The expression profiles and functions of most of these genes, including *apterous* (*ap*) [42], *collier* (*col*) [43], *even-skipped* (*eve*) [44], *Kruppel (Kr)* [45], *ladybird (lb)* [46], *nautilus* (*nau*) [47] and *slouch (slou)* [48], have been described in detail, revealing their key roles in the specification of muscle identities and thus in the diversification of muscle types. In general, loss of function of an identity gene leads to the loss or the aberrant formation of a muscle in which this identity gene is expressed. Identity genes expression is determined via negative regulations with other identity genes [48,49], regulatory interactions with Hox genes [50,51], and the influence of extrinsic signals such as Wg [6]. As an output of this regulation, some identity genes, like *lb* and *eve* are expressed in non-overlapping domains restricted to a few muscle founder (see Fig. 2 and Table 1), whereas others such as *nau, col, slou, Kr* or *Poxm* display much larger and partially overlapping expression domains [28,45,52] (see Fig. 2 and Table 1). Taken together, these patterns lead to the so-called combinatorial code of identity gene expression, thought to be unique for each FC and resulting muscle. As shown in Fig. 2, this code has been at least partially characterized for the majority of muscles, leaving only a few remaining ventral muscle precursors for which no identity gene expression has yet been reported.

Moreover, some identity genes (e.g. *lb* and *eve*) are expressed in every step of muscle development [35,46], from promuscular cluster through to fully functional contracting muscle, while others (e.g. *Kr* or *msh*) are expressed only transiently [45,53] (Fig. 2). The functional significance of persistent *versus* transient expression of identity genes is not yet well understood, but may be linked to the regulation of the subsequent acquisition of muscle-specific properties.

A functional syncytial myotube is obtained by one FC fusing with several FCMs. Studies have identified a large number of genes required for myoblast fusion in all muscles. However, there has to be muscle type-specific regulation of the fusion process in order to form muscles that differ by number of nuclei [54], and recent data indicate that this regulation is dependent on the activity of identity genes [51,55]. Similarly, to build a functional muscle, it has to attach to tendon cells and has to be connected by motoneurons. All muscles appear to have molecular pathways controlling these processes [56–58], but here again, each muscle has its own attachment and innervation, suggesting that regulation of these processes is muscle-type specific (Fig. 1C).

To identify genes with potential functions in acquisition of different properties of individual muscles, several large-scale screens have been performed in last few years [7,59–61]. As a result, numerous candidate genes expressed specifically in FCs and their subsets (Table 1) have been identified. Systematic functional analyses of these large collections of genes are expected to improve our knowledge on how the muscle type-specific differentiation is regulated.

Indeed, there is growing evidence that not only the identity genes but also genes encoding cytoskeletal components or adhesion molecules are expressed in a muscle-type specific manner (see Fig. 2 and Table 1). Functions of some of them (e.g. *kon-tiki*, *capricious*, *Paxillin*) have been recently analyzed revealing their roles in attachment, innervation or regulation of the number of fusion events of individual muscles respectively [55,62,63].

The identification of targets of the muscle identity factor Lb showing that it acts at multiple levels by regulating genes which contribute to cell shape, adhesion and motility [61] suggested a link between the identity gene function and the acquisition of distinct muscle properties. Our recent work confirmed this possibility revealing that the identity genes (i.e. *eve*, *lb* and *slou*) specifically regulate modulators of actin cytoskeleton and by this way regulate number of fusion events in a muscle-type specific manner [55]. By establishing a direct link between the identity gene function and the target gene function, this work illustrated how identity gene information is translated into muscle-type specific differentiation programs.

Relevance to human diseases

Gaining insights into the function of genes expressed in a muscle-type specific manner in normally developing organisms may also help to understand why different types of muscles are differentially affected in certain pathological conditions.

Two of the most common muscular dystrophies, Duchenne muscular dystrophy and Steinert myotonic dystrophy, in principle affect all muscles, yet the severity of muscle degeneration differs between muscles, suggesting that distinct inherent properties of individual muscles make them more or less disease-resistant [64,65]. More importantly, other muscular diseases only affect some subtypes of muscles. This is the case of the dysferlinopathies Miyoshi myopathy (MM), Limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD 2B) [66], Charcot–Marie–Tooth disease [67] and distal myopathy with anterior tibial onset (DMAT) [68] which affect mainly leg and hand muscles, as well as oculopharyngeal muscular dystrophies (OPMD), which show particularly restricted muscle defects [69]. Even though the mutations associated with these myopathies have been identified, they do not explain why only a particular subset of muscles is affected.

Author's personal copy

Table 1 – Genes differentially expressed in muscle fibres.

Gene name	Protein	Expression pattern	Orthologs
FC specification			
ladybird (lb)	homeodomain transcription factor	SBM [46]	**LBX1, LBX2**
even skipped (eve)	homeodomain transcription factor	DA1 (DO1) [35]	EVX1, EVX2
Kruppel (Kr)	Zinc finger transcription factor	DA1 DO1 LL1 LT2 LT4 VL3 VA2 VO2 VO5 (VA1 DT1 LT1 VL2 VL4) [45]	
slouch (slou)	homeodomain transcription factor	VT1 VA2 DT1 (VA1 VA3 LO1) [48,77]	**NKX1-1**
apterous (ap)	homeodomain LIM transcription factor	VA2 VA3 LT1-4 [42]	LHX2, LHX9
muscle segment homeobox (msh)	homeodomain transcription factor	DO1 DO2 (LT1-4) [53]	**MSX1, MSX2**
collier (col)	COE transcription factor	DA3 (DO5 DO4 DT1) [43,51]	EBF4, EBF3, EBF2, EBF1
Pox meso (Poxm)	Paired homeodomain transcription factor	VA1-3 DT1 (DO3) [28]	PAX1, PAX9
nautilus (nau)	bHLH transcription factor	LL1 DO3 VA1 DA3 DO4 DO1 DO5 LO1 [78,79]	**MYF6, MYF5, MYOG, MYOD1**
runt (run)	RUNT transcription factor	DO2 VO3 VO4 [36,80]	RUNX3, **RUNX2, RUNX1**
vein (vn)	EGFR ligand	DA1 DO1 LL1 LT2 LT4 VA2 [81]	
phyllopod (phyl)	adaptor protein	subset of FCs [60]	
Muscle development			
vestigial (vg)	transcription factor regulator	DA1-3 LL1 VL1-4 [82]	VGLL1, **VGLL2,** VGLL3
scalloped (sd)	transcription co-factor	dynamic expression -restricted to some VLs [82]	**TEAD4, TEAD1,** TEAD2, TEAD3
Ptx1	homeodomain transcription factor	ventral muscles [83]	**PITX1, PITX2, PITX3**
Targeted attachment			
Connectin (Con)	LRR repeats transmembrane protein	DT1 LT1-4 VA2 VA3 LO1 [84,85]	
derailed (drl)	receptor tyrosine kinase	LT1 LT2 LT3 [86]	TYRO3, MET, MERTK, RYK, MST1R, AXL
kon-tiki (kon)	PDZ-binding domain transmembrane protein	VL1 VA2 (VL1-4 LL1 Dorsal muscles) [62]	**CSPG4**
Targeted innervation			
Toll (Tl)	LRR repeats transmembrane protein	VL4 VO4 VO5 VO6 VO3 VL3 [85,87]	CD180, TLR4, LRRC32, TLR3, LRRC33
Netrin-A (NetA)	Netrin protein	DA1 DA2 [88]	USH2A, NTN1, NTN5, NTN3
Netrin-B (NetB)	Netrin protein	DA2 VL3 VL4 [88]	
knockout (ko)	Netrin-like protein	DA1 DO1 DO4 DT1 LT1-3 VT1 VL1 VA2 (VL2-4) [89]	
capricious (caps)	LRR protein	DA1 DA2 DO1 DO2 VL1 VO1-6 [63]	
Wnt4	WNT secreted protein	differentially expressed [90]	WNT9A, WNT9B
hattifattener (haf)	LRR protein	differentially expressed [91]	
Fiber-specific regulation of fusion process			
Paxillin (Pax)	Zinc ion binding protein Scaffold protein	VA1 VA2 (DT1 DO5 DO4 LL1 LO1 LT1-4 VL1-4 VO1 VO2) [55]	LPXN, **PXN**, **TGFB1I1**
Muscle protein 20 (Mp20)	Actin binding protein	DT1 LT4 VA2 VA3 VO4 (DO4 LT2 LT3 LO1 SBM) [55]	CNN2, **CNN3**, **CNN1**, TAGLN3, **TAGLN**, TAGLN2
M-spondin (mspo)	ECM protein	DT1 (LL1 LO1 LT1-4 VA1 VA2) [55]	SPON2
Unknown			
beat-IIIc	Ig repeats protein	differentially expressed [90]	
Sulf1	Alkaline phosphatase protein	differentially expressed [90]	SULF1, SULF2
CG6867	Ig repeats protein	differentially expressed [90]	OLFM4, OLFML3, OLFML1, GLDN
asense (ase)	bHLH transcription factor	subset of FCs [60]	ASCL1, ASCL2, ASCL3, ASCL4
nidogen	ECM protein	subset of FCs [60]	NID2, NID1

Several *Drosophila* genes show an expression pattern restricted to a muscle subset and are required at different levels during muscle formation. For muscle nomenclature, see Ruiz-Gómez et al., 1997. Brackets indicate muscles that display transient expression or a lower expression levels.
Note that precise descriptions of expression patterns are not available for some genes. Vertebrate orthologs were identified using the Ensembl database (http://www.ensembl.org/index.html). Vertebrate orthologs involved in skeletal myogenesis are in bold.

Author's personal copy

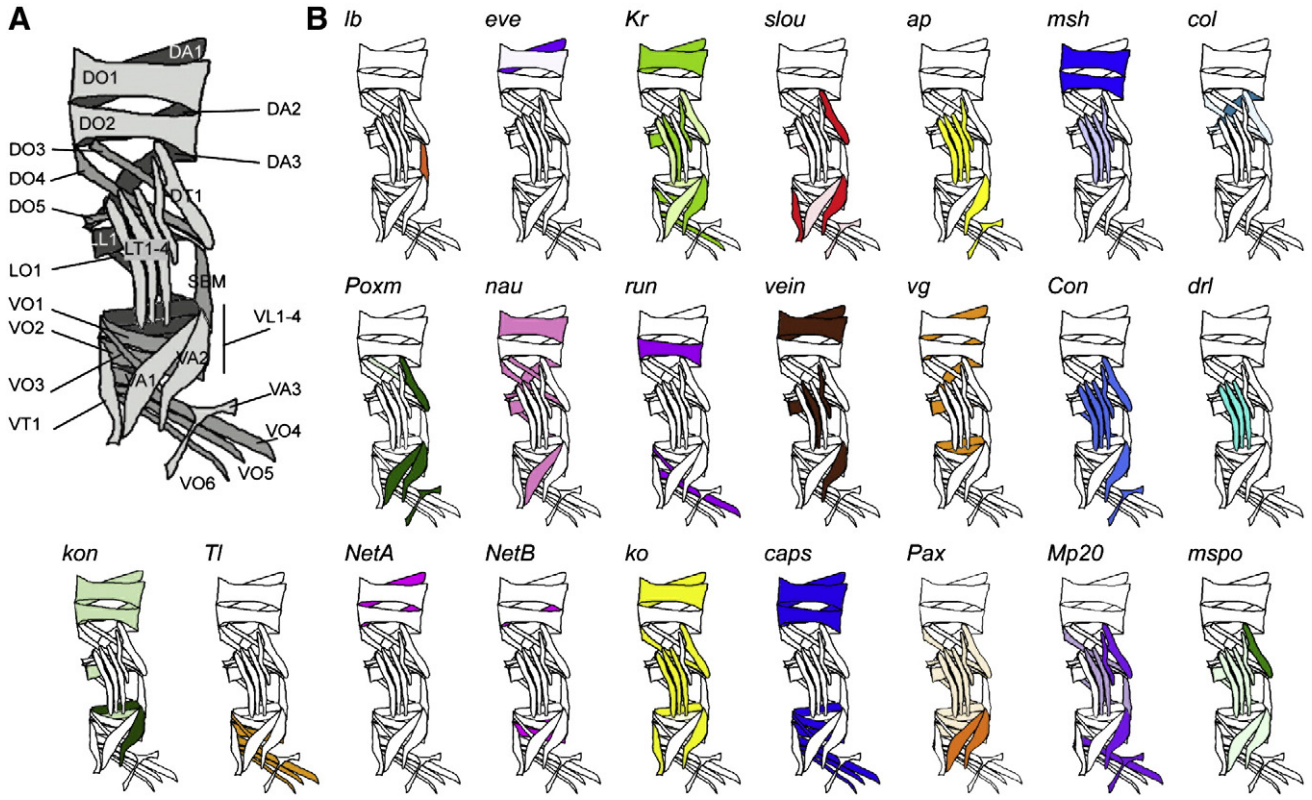


Fig. 2 – Restricted gene expression patterns in somatic muscles. (A) Scheme of the larval muscle pattern of abdominal segment A2–A7. Internal muscles are coloured in dark grey, intermediate muscles in grey, and external muscles in light grey. Dorsal is top, anterior is left. Muscles are identified according to the nomenclature described in Ruiz-Gómez et al. (1997). (B) Expression patterns of genes expressed in a muscle subset. Light colouring corresponds to transient expression or lower expression levels.

On the other hand, as shown in Table 1, a large portion of the *Drosophila* genes expressed in a fibre-specific manner is conserved in vertebrates and some of the vertebrate orthologs are also expressed in muscle subsets (e.g. mouse *Msx1* [70] and zebrafish *sax2* [71], orthologs of *Drosophila* genes *msh* and *slou*). More importantly, functional analyses have demonstrated that some of them play roles in the development of specific muscles. For example, the mouse *Ptx1* orthologs, *Pitx2* and *Pitx1*, are respectively essential for head muscle formation [72], and for the determination of the morphological identity of mouse hindlimb tissues (muscle, tendons and bones) [73]. Mouse *Msx1* and *Msx2*, which are *msh* orthologs, have redundant roles in embryonic ventral body wall formation [74] while *lb* mouse ortholog *Lbx1* is involved in the migration of hypaxial muscle precursors [75].

Furthermore, orthologs of certain muscle-specific *Drosophila* genes are involved in myopathies affecting different subtypes of muscles in humans. This is the case of the human *eve* ortholog, *EVX2*, whose deletion is involved in synpolydactyly [76]. Nevertheless, the muscle-type specific functions of conserved genes have only been described in developing embryos, and to date, little if anything is known about their involvement in muscular diseases in the adult.

Concluding remarks

Specification of muscle cell types in *Drosophila* and the subsequent acquisition of muscle specific properties is a tightly regulated process involving action of muscle identity genes. Muscles differ from one to another by a combination of identity gene expression and we are only just beginning to understand how this code is translated into individual muscle properties.

Thus, gaining insight into identity gene functions and the genetic cascades operating downstream of identity genes appears an important challenge, not just in the field of fundamental muscle biology but also in relation to diseases affecting particular types of muscles.

REFERENCES

[1] M. Bate, The embryonic development of larval muscles in Drosophila, Development 110 (1990) 791–804.
[2] M. Bate, E. Rushton, Myogenesis and muscle patterning in Drosophila, CR Acad. Sci. III 316 (1993) 1047–1061.
[3] E. Ryder, M. Ashburner, R. Bautista-Llacer, J. Drummond, J. Webster, G. Johnson, T. Morley, Y.S. Chan, F. Blows, D. Coulson, G. Reuter, H. Baisch, C. Apelt, A. Kauk, T. Rudolph, M. Kube, M. Klimm, C. Nickel, J. Szidonya, P. Maroy, M. Pal, A. Rasmuson-Lestander, K. Ekstrom, H. Stocker, C. Hugentobler, E. Hafen, D. Gubb, G. Pflugfelder, C. Dorner, B. Mechler, H. Schenkel, J. Marhold, F. Serras, M. Corominas, A. Punset, J. Roote, S. Russell, The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource, Genetics 177 (2007) 615–629.
[4] E. Ryder, F. Blows, M. Ashburner, R. Bautista-Llacer, D. Coulson, J. Drummond, J. Webster, D. Gubb, N. Gunton, G. Johnson, C.J. O'Kane,

Author's personal copy

D. Huen, P. Sharma, Z. Asztalos, H. Baisch, J. Schulze, M. Kube, K. Kittlaus, G. Reuter, P. Maroy, J. Szidonya, A. Rasmuson-Lestander, K. Ekstrom, B. Dickson, C. Hugentobler, H. Stocker, E. Hafen, J.A. Lepesant, G. Pflugfelder, M. Heisenberg, B. Mechler, F. Serras, M. Corominas, S. Schneuwly, T. Preat, J. Roote, S. Russell, The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*, Genetics 167 (2004) 797–813.

[5] G. Dietzl, D. Chen, F. Schnorrer, K.C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman, B.J. Dickson, A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila, Nature 448 (2007) 151–156.

[6] M. Taylor, Comparison of Muscle Development in Drosophila and Vertebrates., Molecular biology Intelligent Unit. Muscle Development in Drosophila. Helen Sink. (2006) 169–190.

[7] B. Estrada, S.E. Choe, S.S. Gisselbrecht, S. Michaud, L. Raj, B.W. Busser, M.S. Halfon, G.M. Church, A.M. Michelson, An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes, PLoS Genet. 2 (2006) e16.

[8] E.E. Furlong, E.C. Andersen, B. Null, K.P. White, M.P. Scott, Patterns of gene expression during Drosophila mesoderm development, Science 293 (2001) 1629–1633.

[9] G. Junion, T. Jagla, S. Duplant, R. Tapin, J.P. Da Ponte, K. Jagla, Mapping Dmef2-binding regulatory modules by using a ChIP-enriched in silico targets approach, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 18479–18484.

[10] T. Sandmann, L.J. Jensen, J.S. Jakobsen, M.M. Karzynski, M.P. Eichenlaub, P. Bork, E.E. Furlong, A temporal map of transcription factor activity: mef2 directly regulates target genes at all stages of muscle development, Dev. Cell 10 (2006) 797–807.

[11] B.E. Richardson, S.J. Nowak, M.K. Baylies, Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives, Traffic 9 (2008) 1050–1059.

[12] A. Chartier, B. Benoit, M. Simonelig, A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1, EMBO J. 25 (2006) 2253–2262.

[13] H.R. Shcherbata, A.S. Yatsenko, L. Patterson, V.D. Sood, U. Nudel, D. Yaffe, D. Baker, H. Ruohola-Baker, Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy, EMBO J. 26 (2007) 481–493.

[14] Y. Xu, M. Condell, H. Plesken, I. Edelman-Novemsky, J. Ma, M. Ren, M. Schlame, A Drosophila model of Barth syndrome, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 11584–11588.

[15] Y.T. Ip, R.E. Park, D. Kosman, K. Yazdanbakhsh, M. Levine, dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo, Genes Dev. 6 (1992) 1518–1530.

[16] C. Thisse, F. Perrin-Schmitt, C. Stoetzel, B. Thisse, Sequence-specific transactivation of the Drosophila twist gene by the dorsal gene product, Cell 65 (1991) 1191–1201.

[17] T. Sandmann, C. Girardot, M. Brehme, W. Tongprasit, V. Stolc, E.E. Furlong, A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*, Genes Dev. 21 (2007) 436–449.

[18] N. Azpiazu, M. Frasch, tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila, Genes Dev. 7 (1993) 1325–1340.

[19] M. Leptin, twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development, Genes Dev. 5 (1991) 1568–1576.

[20] E. Shishido, N. Ono, T. Kojima, K. Saigo, Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific Drosophila FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS, Development 124 (1997) 2119–2128.

[21] H.H. Lee, M. Frasch, Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target sloppy paired, Development 127 (2000) 5497–5508.

[22] V. Riechmann, U. Irion, R. Wilson, R. Grosskortenhaus, M. Leptin, Control of cell fates and segmentation in the Drosophila mesoderm, Development 124 (1997) 2915–2922.

[23] M.K. Baylies, M. Bate, twist: a myogenic switch in Drosophila, Science 272 (1996) 1481–1484.

[24] M.C. Wong, I. Castanon, M.K. Baylies, Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis, Dev. Biol. 317 (2008) 417–429.

[25] M. Frasch, Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early Drosophila embryo, Nature 374 (1995) 464–467.

[26] M.S. Halfon, A. Carmena, S. Gisselbrecht, C.M. Sackerson, F. Jimenez, M.K. Baylies, A.M. Michelson, Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors, Cell 103 (2000) 63–74.

[27] I.B. Clark, J. Boyd, G. Hamilton, D.J. Finnegan, A.P. Jarman, D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the Drosophila mesoderm, Dev. Biol. 294 (2006) 220–231.

[28] H. Duan, C. Zhang, J. Chen, H. Sink, E. Frei, M. Noll, A key role of Pox meso in somatic myogenesis of Drosophila, Development 134 (2007) 3985–3997.

[29] N. Azpiazu, P.A. Lawrence, J.P. Vincent, M. Frasch, Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm, Genes Dev. 10 (1996) 3183–3194.

[30] A. Tapanes-Castillo, M.K. Baylies, Notch signaling patterns Drosophila mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist, Development 131 (2004) 2359–2372.

[31] B. Richardson, K. Beckett, M. Baylies, Visualizing new dimensions in Drosophila myoblast fusion, Bioassays 30 (2008) 423–431.

[32] A. Carmena, M. Bate, F. Jimenez, Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila embryogenesis, Genes Dev. 9 (1995) 2373–2383.

[33] E. Buff, A. Carmena, S. Gisselbrecht, F. Jimenez, A.M. Michelson, Signalling by the Drosophila epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors, Development 125 (1998) 2075–2086.

[34] A.M. Michelson, S. Gisselbrecht, Y. Zhou, K.H. Baek, E.M. Buff, Dual functions of the heartless fibroblast growth factor receptor in development of the Drosophila embryonic mesoderm, Dev. Genet. 22 (1998) 212–229.

[35] A. Carmena, S. Gisselbrecht, J. Harrison, F. Jimenez, A.M. Michelson, Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the Drosophila embryonic mesoderm, Genes Dev. 12 (1998) 3910–3922.

[36] A. Carmena, E. Buff, M.S. Halfon, S. Gisselbrecht, F. Jimenez, M.K. Baylies, A.M. Michelson, Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the Drosophila embryonic mesoderm, Dev. Biol. 244 (2002) 226–242.

[37] H. Duan, J.B. Skeath, H.T. Nguyen, Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development, Development 128 (2001) 4489–4500.

[38] M. Ruiz Gomez, M. Bate, Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb, Development 124 (1997) 4857–4866.

[39] A. Carmena, B. Murugasu-Oei, D. Menon, F. Jimenez, W. Chia, Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis, Genes Dev. 12 (1998) 304–315.

[40] K. Beckett, M.K. Baylies, 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion, Dev. Biol. 309 (2007) 113–125.

[41] M.K. Baylies, M. Bate, M. Ruiz Gomez, Myogenesis: a view from Drosophila, Cell 93 (1998) 921–927.

[42] C. Bourgouin, S.E. Lundgren, J.B. Thomas, Apterous is a Drosophila LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles, Neuron 9 (1992) 549–561.

[43] M. Crozatier, A. Vincent, Requirement for the Drosophila COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle

Author's personal copy

transcriptional response to notch signalling, Development 126 (1999) 1495–1504.
[44] M.T. Su, M. Fujioka, T. Goto, R. Bodmer, The Drosophila homeobox genes zfh-1 and even-skipped are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision Development 126 (1999) 3241–3251.
[45] M. Ruiz-Gomez, S. Romani, C. Hartmann, H. Jackle, M. Bate, Specific muscle identities are regulated by Kruppel during Drosophila embryogenesis, Development 124 (1997) 3407–3414.
[46] T. Jagla, F. Bellard, Y. Lutz, G. Dretzen, M. Bellard, K. Jagla, ladybird determines cell fate decisions during diversification of Drosophila somatic muscles, Development 125 (1998) 3699–3708.
[47] L. Balagopalan, C.A. Keller, S.M. Abmayr, Loss-of-function mutations reveal that the Drosophila nautilus gene is not essential for embryonic myogenesis or viability, Dev. Biol. 231 (2001) 374–382.
[48] S. Knirr, N. Azpiazu, M. Frasch, The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning, Development 126 (1999) 4525–4535.
[49] T. Jagla, Y. Bidet, J.P. Da Ponte, B. Dastugue, K. Jagla, Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in Drosophila, Development 129 (2002) 1037–1047.
[50] M. Capovilla, Z. Kambris, J. Botas, Direct regulation of the muscle-identity gene apterous by a Hox protein in the somatic mesoderm, Development 128 (2001) 1221–1230.
[51] J. Enriquez, H. Boukhatmi, L. Dubois, A.A. Philippakis, M.L. Bulyk, A.M. Michelson, M. Crozatier, A. Vincent, Multi-step control of muscle diversity by Hox proteins in the Drosophila embryo, Development 137 (2010) 457–466.
[52] L. Dubois, J. Enriquez, V. Daburon, F. Crozet, G. Lebreton, M. Crozatier, A. Vincent, Collier transcription in a single Drosophila muscle lineage: the combinatorial control of muscle identity, Development 134 (2007) 4347–4355.
[53] A. Nose, T. Isshiki, M. Takeichi, Regional specification of muscle progenitors in Drosophila: the role of the msh homeobox gene, Development 125 (1998) 215–223.
[54] S.M. Abmayr, S. Zhuang, E.R. Geisbrecht, Myoblast fusion in Drosophila, Methods Mol. Biol. 475 (2008) 75–97.
[55] L. Bataillé, I. Delon, N.H. Brown, K. Jagla, Downstream of identity genes: muscle-type specific regulation of the fusion process, Dev. Cell. 19 (2010) 317–328.
[56] S. Becker, G. Pasca, D. Strumpf, L. Min, T. Volk, Reciprocal signaling between Drosophila epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles, Development 124 (1997) 2615–2622.
[57] M. Landgraf, S. Thor, Development of Drosophila motoneurons: specification and morphology, Semin. Cell Dev. Biol. 17 (2006) 3–11.
[58] T. Volk, Singling out Drosophila tendon cells: a dialogue between two distinct cell types, Trends Genet. 15 (1999) 448–453.
[59] A.A. Philippakis, B.W. Busser, S.S. Gisselbrecht, F.S. He, B. Estrada, A.M. Michelson, M.L. Bulyk, Expression-guided in silico evaluation of candidate cis regulatory codes for Drosophila muscle founder cells, PLoS Comput. Biol. 2 (2006) e53.
[60] R. Artero, E.E. Furlong, K. Beckett, M.P. Scott, M. Baylies, Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during Drosophila myogenesis, Development 130 (2003) 6257–6272.
[61] G. Junion, L. Bataille, T. Jagla, J.P. Da Ponte, R. Tapin, K. Jagla, Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors, Genes Dev. 21 (2007) 3163–3180.
[62] F. Schnorrer, I. Kalchhauser, B.J. Dickson, The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in Drosophila, Dev. Cell 12 (2007) 751–766.
[63] E. Shishido, M. Takeichi, A. Nose, Drosophila synapse formation: regulation by transmembrane protein with Leu-rich repeats, CAPRICIOUS, Science 280 (1998) 2118–2121.
[64] C. Aslanidis, G. Jansen, C. Amemiya, G. Shutler, M. Mahadevan, C. Tsilfidis, C. Chen, J. Alleman, N.G. Wormskamp, M. Vooijs, et al., Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect, Nature 355 (1992) 548–551.
[65] P.A. Jacobs, P.A. Hunt, M. Mayer, R.D. Bart, Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21, Am. J. Hum. Genet. 33 (1981) 513–518.
[66] J. Liu, M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J.A. Urtizberea, F. Hentati, M.B. Hamida, S. Bohlega, E.J. Culper, A.A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B.A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, P.J. de Jong, R.H. Brown Jr., Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy, Nat. Genet. 20 (1998) 31–36.
[67] H. Skre, Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease, Clin. Genet. 6 (1974) 98–118.
[68] J.A. Urtizberea, G. Bassez, F. Leturcq, K. Nguyen, M. Krahn, N. Levy, Dysferlinopathies, Neurol. India 56 (2008) 289–297.
[69] B. Brais, J.P. Bouchard, Y.G. Xie, D.L. Rochefort, N. Chretien, F.M. Tome, R.G. Lafreniere, J.M. Rommens, E. Uyama, O. Nohira, S. Blumen, A.D. Korczyn, P. Heutink, J. Mathieu, A. Duranceau, F. Codere, M. Fardeau, G.A. Rouleau, Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy, Nat. Genet. 18 (1998) 164–167.
[70] D. Houzelstein, G. Auda-Boucher, Y. Cheraud, T. Rouaud, I. Blanc, S. Tajbakhsh, M.E. Buckingham, J. Fontaine-Perus, B. Robert, The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb, Development 126 (1999) 2689–2701.
[71] Y.K. Bae, T. Shimizu, O. Muraoka, T. Yabe, T. Hirata, H. Nojima, T. Hirano, M. Hibi, Expression of sax1/nkx1.2 and sax2/nkx1.1 in zebrafish. Gene Expr. Patterns 4 (2004) 481–486.
[72] H.P. Shih, M.K. Gross, C. Kioussi, Muscle development: forming the head and trunk muscles, Acta Histochem. 110 (2008) 97–108.
[73] A. DeLaurier, R. Schweitzer, M. Logan, Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb, Dev. Biol. 299 (2006) 22–34.
[74] H. Ogi, K. Suzuki, Y. Ogino, M. Kamimura, M. Miyado, X. Ying, Z. Zhang, M. Shinohara, Y. Chen, G. Yamada, Ventral abdominal wall dysmorphogenesis of Msx1/Msx2 double-mutant mice, Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol. 284 (2005) 424–430.
[75] H. Brohmann, K. Jagla, C. Birchmeier, The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells, Development 127 (2000) 437–445.
[76] F.R. Goodman, F. Majewski, A.L. Collins, P.J. Scambler, A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly, Am. J. Hum. Genet. 70 (2002) 547–555.
[77] C. Dohrmann, N. Azpiazu, M. Frasch, A new Drosophila homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis, Genes Dev. 4 (1990) 2098–2111.
[78] C.A. Keller, M.A. Grill, S.M. Abmayr, A role for nautilus in the differentiation of muscle precursors, Dev. Biol. 202 (1998) 157–171.
[79] C.A. Keller, M.S. Erickson, S.M. Abmayr, Misexpression of nautilus induces myogenesis in cardioblasts and alters the pattern of somatic muscle fibers, Dev. Biol. 181 (1997) 197–212.
[80] M. Fujioka, R.J. Wessells, Z. Han, J. Liu, K. Fitzgerald, G.L. Yusibova, M. Zamora, P. Ruiz-Lozano, R. Bodmer, J.B. Jaynes, Embryonic even skipped-dependent muscle and heart cell fates are required for normal adult activity, heart function, and lifespan, Circ. Res. 97 (2005) 1108–1114.
[81] T. Yarnitzky, L. Min, T. Volk, An interplay between two EGF-receptor ligands, Vein and Spitz, is required for the formation of a subset of muscle precursors in Drosophila, Mech. Dev. 79 (1998) 73–82.
[82] H. Deng, S.C. Hughes, J.B. Bell, A.J. Simmonds, Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*, Mol. Biol. Cell 20 (2009) 256–269.
[83] G. Vorbruggen, R. Constien, O. Zilian, E.A. Wimmer, G. Dowe, H. Taubert, M. Noll, H. Jackle, Embryonic expression and

Author's personal copy

characterization of a Ptx1 homolog in Drosophila, Mech. Dev. 68 (1997) 139–147.
[84] S. Raghavan, R.A. White, Connectin mediates adhesion in Drosophila, Neuron 18 (1997) 873–880.
[85] A. Nose, V.B. Mahajan, C.S. Goodman, Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in Drosophila, Cell 70 (1992) 553–567.
[86] C.A. Callahan, J.L. Bonkovsky, A.L. Scully, J.B. Thomas, derailed is required for muscle attachment site selection in Drosophila, Development 122 (1996) 2761–2767.
[87] D. Rose, X. Zhu, H. Kose, B. Hoang, J. Cho, A. Chiba, Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in Drosophila, Development 124 (1997) 1561–1571.
[88] M.L. Winberg, K.J. Mitchell, C.S. Goodman, Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs, Cell 93 (1998) 581–591.
[89] C. Hartmann, M. Landgraf, M. Bate, H. Jackle, Kruppel target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of Drosophila larval muscles, EMBO J. 16 (1997) 5299–5309.
[90] M. Inaki, S. Yoshikawa, J.B. Thomas, H. Aburatani, A. Nose, Wnt4 is a local repulsive cue that determines synaptic target specificity, Curr. Biol. 17 (2007) 1574–1579.
[91] M. Kurusu, A. Cording, M. Taniguchi, K. Menon, E. Suzuki, K. Zinn, A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection, Neuron 59 (2008) 972–985.