UNIVERSITE PARIS V - RENE DESCARTES

THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biologie cellulaire

Ecole doctorale : BioSPC

Clémence Martinet-Corbineau

Le 18 janvier 2016

Titre :

Rôle du gène *H19* dans les cellules souches musculaires

Directrice de thèse : Dr. Luisa Dandolo

Jury

Pr. Jonathan Weitzman	Président du jury
Dr. Didier Montarras	Rapporteur
Dr. Thierry Forné	Rapporteur
Dr. Slimane Ait-si-Ali	Examinateur
Dr. Anne Gabory	Examinateur

Résumé

Le gène *H19,* soumis à l'empreinte parentale, est fortement exprimé durant le développement embryonnaire, cependant, son expression est réprimée après la naissance dans l'ensemble des tissus à l'exception du muscle squelettique, et plus particulièrement des cellules souches musculaires : les cellules satellites.

L'objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle du gène *H19* dans la mise en place et dans la fonction de ces cellules souches durant la myogénèse adulte.

En utilisant un modèle murin présentant une délétion du gène *H19*, les souris *H19Δ3,* notre laboratoire avait montré que le gène *H19* est capable de moduler, dans le muscle embryonnaire, l'expression de neuf gènes appartenant à un réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale (IGN) impliqué dans la croissance.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le phénotype des muscles de ces souris mutantes qui présentent une hyperplasie et une hypertrophie des fibres musculaires. Ce phénotype est accompagné d'une diminution du nombre de cellules satellites qui apparait lors de l'entrée en quiescence de ces cellules. De façon étonnante, nous avons observé une meilleure capacité de régénération, malgré le nombre réduit de cellules satellites, dans les muscles *H19Δ3* comparée à celle des muscles *wt*. Cela indique que la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites n'est pas influencée par l'absence du gène *H19*. De même, nous avons observé une surexpression de plusieurs gènes appartenant à l'IGN lors de la régénération musculaire des muscles mutants comparés aux muscles *wt*. Ces résultats indiquent que le gène *H19* module l'expression des gènes de l'IGN durant l'embryogénèse et par la suite, durant les étapes de régénération de la myogénèse adulte.

Table des matières

Résumé 3
Liste des figures 6
Abréviations 7
Introduction 9
Chapitre I. L'empreinte parentale 10
1. Découverte de l'empreinte parentale 10
2. L'épigénétique 12
a) La méthylation de l'ADN 12
b) Les modifications des histones 13
c) Les longs ARN non codants 13
3. Les gènes soumis à l'empreinte parentale (GSE) 14
a) Découverte des GSE 14
b) Organisation des GSE 16
c) Fonction des GSE 17
4. Mécanisme de l'empreinte parentale 19
a) Reprogrammation épigénétique des cellules germinales 21
b) Maintenance et protection de l'empreinte parentale durant le développement pré- et post-implantatoire. 23
5. Empreinte parentale et pathologies chez l'homme 24
a) Les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman 24
b) Les syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russell 25
Chapitre 2. Le locus *H19-Igf2* 27
1. Description du locus 27
a) L'ICR, élément principal de contrôle de l'empreinte du locus H19-Igf2 28
b) Les DMRs, éléments de contrôle de l'expression du gène Igf2 28
2. Le gène *Igf2* 29
a) Rôle du gène Igf2 dans la croissance embryonnaire 29
b) Le miR-483 30
3. Le gène *H19* 30
a) Profil d'expression du gène H19 31
b) Le miR-675 32
c) Fonction du gène H19 34

Chapitre III. Le muscle squelettique 40
1. Structure et fonctionnement du muscle squelettique adulte 40
a) Anatomie du muscle squelettique 40
b) Mécanique du muscle squelettique 44
2. Formation du muscle squelettique 46
a) Myogenèse embryonnaire 46
b) Myogénèse post-natale 49
3. Les cellules satellites, cellules souches musculaires 50
a) Origine des cellules satellites 51
b) Caractéristiques des cellules satellites et de leur niche 51
c) Myogénèse adulte 52
Chapitre IV. Objectifs 56
Résultats 57
Partie I. L'IGN est réactivé durant la régénération musculaire sous le contrôle du gène *H19*. 58
1. Les muscles des souris *H19Δ3* présentent une hypertrophie et une hyperplasie 58
2. Le gène *H19* module le nombre de cellules satellites 59
3. Le gène *H19* contrôle la prolifération des myoblastes 59
4. Les muscles *H19Δ3* se régénèrent normalement après lésion à la cardiotoxine (Ctx) 60
5. L'expression des gènes de l'IGN est réactivée durant la régénération musculaire 60
. H19 controls reactivation of the fœtal imprinted gene network during muscle regeneration 62
Partie II. Le gène *H19* favorise la différenciation des cellules souches musculaires 87
Les myoblastes *H19Δ3* présentent un retard de différenciation 87
Discussion 89
Bibliographie 97

Liste des figures

Figure 1 : Production d'embryons de souris gynogénotes et androgénotes……12

Figure 2 : Carte des régions chromosomiques soumises à l'empreinte parentale chez la souris……..16

Figure 3 : Carte des gènes soumis à l'Empreinte Parentale chez la souris……..17

Figure 4 : Phénotype des souris invalidées pour différents GSE……19

Figure 5 : Imprinted Gene Network (IGN) : le réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale……20

Figure 6 : Etablissement de l'empreinte parentale au cours du développement……21

Figure 7 : Etablissement de l'empreinte parentale dans les cellules germinales……..22

Figure 8 : Etablissement, maintenance et protection de l'empreinte parentale durant l'embryogénèse……..25

Figure 9 : Représentation de la région 11p15.5 impliquée dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS)……27

Figure 10 : Le locus *H19-Igf2*……28

Figure 11 : Profil d'expression des gènes *H19* et *Igf2* dans l'embryon de 13,5 jours……32

Figure 12 : Production du miR-675 à partir du gène *H19*……34

Figure 13 : Les souris *H19Δ3* : modèle murin d'invalidation du gène *H19*……..35

Figure 14 : Réseau de GSE (IGN) dont l'expression est régulée en trans par le gène *H19*……37

Figure 15 : Modèle de régulation des gènes *Igf2*, *Slc38a4* et *Peg1* par l'ARN *H19* et la protéine MBD1.39

Figure 16 : Structure de la fibre musculaire……42

Figure 17 : Organisation du sarcomère……42

Figure 18 : Structure des filaments d'actine (A) et de myosine (B)……43

Figure 19 : Organisation du muscle squelettique……44

Figure 20 : Jonction neuro-musculaire et transmission du signal au sein de la fibre musculaire…….46

Figure 21 : Formation du myotome durant l'embryogénèse……48

Figure 22 : Les étapes de la myogénèse embryonnaire……49

Figure 23 : Photo d'une coupe transversale de cellule satellite……51

Figure 24 : Activation et engagement des cellules satellites durant la régénération musculaire……54

Abréviations

5mC	5-méthyl-Cytosine
5hmC	5-hydroxy-méthyl-Cytosine
ADN	Acide Desoxyribo-Nucléique
ANGPT1	Angiopoietine 1
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BWS	Syndrome de Beckwith-Wiedemann
Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CpG	Dinucléotides Cytosine-Guanine
CTCF	CCCTC-binding Factor
Ctx	Cardiotoxine
Dcn	Decorin
DMR	Région Différentiellement Méthylée
Dnmt	ADN methyltransferase
Dlk1	Delta-like 1 homolog
Fzd7	Frizzled7
GSE	Gènes Soumis à l'Empreinte parentale
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HUR	Human antigen R
ICR	Imprinting Control Region (Région de contrôle de l'empreinte)
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGN	Imprinted Gene Network (Réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale)
IL-1/10	Interleukine 1 et 10
KO	Knock Out
MBD1	Methyl-CpG-binding domain
MEF	Fibroblastes embryonnaires de souris
miR	Micro-ARN

MRF	Myogenic Regulatory Factor
MyHC	Myosin Heavy Chain
nc-RNA	ARN non codant
Notch	Notch gene homolog
Pax3/7	Paired box 3 et 7
Peg1/3	Paternally expressed gene 1/3
PGC	Cellules germinales primordiales
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
Rtl1	Retrotransposon-like 1
SETDB1	SET Domain, Bifurcated 1
Slc38a4	Solute carrier 38, member 4
Spry1	Sprouty 1
Tet1-3	Ten-Eleven Translocation 1-3
TGF-β	Transforming growth factor
Tn	Troponine
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
Tpm	Tropomyosine
Wnt	Wingless-related MMTV integration site
wt	Wild Type
Zfp57	Zinc finger protein 57

Introduction

Chapitre I. L'empreinte parentale

L'empreinte parentale se définit comme un mécanisme biologique qui aboutit à une expression monoallélique de certains gènes selon l'origine parentale de l'allèle. Ce processus est dû non pas à une différence dans la séquence d'ADN, mais à des différences touchant la molécule d'ADN elle-même. Ces dernières, que l'on qualifie d'épigénétiques, sont de deux types : la méthylation des bases cytosines de l'ADN et la modification chimique de certains acides aminés des histones.

1. Découverte de l'empreinte parentale

Bien que la parthénogénèse, mode de reproduction monoparentale, soit possible dans diverses espèces telles que les reptiles, les insectes, ou encore chez certains végétaux, il apparaît que ce mode de reproduction est impossible chez les mammifères. C'est ainsi qu'en 1984 la notion d'empreinte parentale fait son apparition avec les expériences de James McGrath, Davor Solter et Azim Surani.

En effet, l'hypothèse d'une contribution non équivalente, chez les mammifères, des génomes parentaux à la formation d'un embryon viable a été avancée. Un exemple connu de cette asymétrie dans la fonction du génome paternel et maternel est le cas du mulet et du bardot, le premier étant issu du croisement d'une jument avec un âne et le second du croisement d'une ânesse avec un étalon. Bien que possédant tous deux une part de génome issu de l'âne, et une autre issue du cheval, leur phénotype est visiblement différent selon la provenance maternelle ou paternelle de ces parts.

Pour vérifier cette hypothèse, les embryologistes Azim Surani et Davor Solter mettent au point une technique permettant de retirer, dans l'embryon de souris au stade une cellule, l'un des noyaux, paternel ou maternel, afin de le remplacer par celui d'un donneur. Ce procédé permet la production d'embryons gynogénotes (possédant deux noyaux d'origine maternelle) et androgénotes (possédant deux noyaux d'origine paternelle) qui s'avèrent dans les deux cas ne pas être viables malgré leur diploïdie (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984). Ainsi, après implantation de ces œufs dans l'oviducte d'une femelle pseudo-gestante, les embryons contrôles, ayant reçu un pronoyau mâle et un femelle, présentent un développement normal jusqu'au terme. Les embryons androgénotes sont, quant à eux, anormalement développés. Leur développement est arrêté très rapidement au stade 4-8 somites, mais ils présentent des annexes extra-embryonnaires normales. A l'inverse, les embryons gynogénotes se développent normalement, malgré une létalité au stade 25 somites, mais possèdent des annexes embryonnaires atrophiées (Figure 1). Ces résultats confirment

donc l'hypothèse que les génomes maternel et paternel ne sont pas équivalents et sont tous deux indispensables au développement d'un embryon viable chez les mammifères.

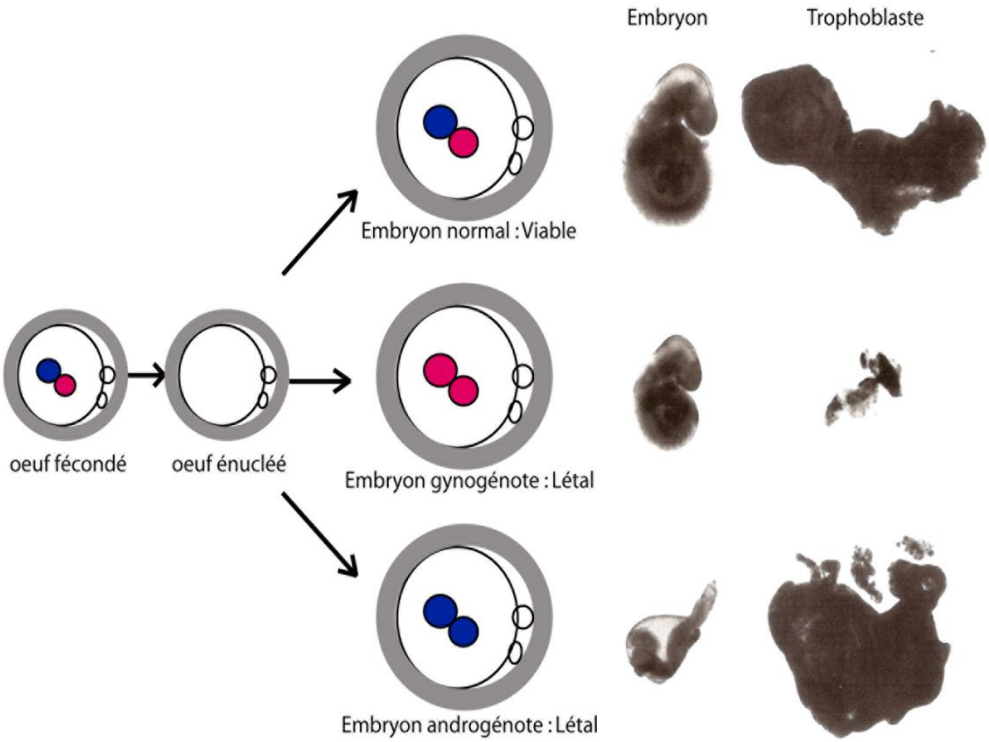


Figure 1 : Production d'embryons de souris gynogénotes et androgénotes.

Technique permettant la production d'embryons de type sauvage (un pronoyau male (bleu) et un pronoyau femelle (rose), de type gynogénote (deux pronoyaux femelles) et de type androgénote (deux pronoyaux mâles). Elle est réalisée à partir d'un œuf fécondé, auquel sont retirés les pronoyaux (œuf énucléé), qui recevra alors deux nouveaux pronoyaux tel que représenté sur la figure. L'embryon de type sauvage présente un développement normal contrairement aux embryons gynogénotes et androgénotes, qui ne sont pas viables, et qui, respectivement présentent une forte atrophie des annexes embryonnaires et un retard important du développement embryonnaire (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984).

Suite à ces résultats, la notion d'empreinte parentale, sorte de « marquage » spécifique du génome paternel et maternel ayant pour effet d'empêcher la parthénogénèse chez les mammifères, est formulée.

Ces découvertes ont amené un ensemble de questions, et, en premier lieu, à se demander comment fonctionne l'empreinte parentale.

On sait aujourd'hui que ce mécanisme est de type épigénétique, c'est-à-dire qu'il ne fait pas intervenir de modifications de la séquence d'ADN elle-même, mais plutôt des modifications jouant sur la conformation de l'ADN et de la chromatine.

2. L'épigénétique

L'épigénétique consiste en l'étude des mécanismes affectant l'expression des gènes. Les marques épigénétiques sont très sensibles à l'environnement et sont souvent réversibles. De fait, les modifications épigénétiques jouent un rôle dans la compaction de la chromatine et par conséquent modulent l'expression des gènes. Ainsi, une chromatine fortement condensée (hétérochromatine) empêche l'expression des gènes portés par cette chromatine. A l'inverse, une chromatine relâchée (euchromatine) favorise l'expression génique. Dès lors, bien que toutes les cellules d'un organisme possèdent la même « bibliothèque » de gènes, seuls certains gènes nécessaires au fonctionnement de la cellule donnée seront actifs. Ces mécanismes épigénétiques sont essentiels dans la mise en place, à partir des cellules pluripotentes de l'embryon, des cellules différenciées qui constituent les différents organes de l'individu.

a) La méthylation de l'ADN

Les modifications épigénétiques affectant la conformation de la chromatine sont de deux types. Le premier consiste en la méthylation de l'ADN découverte dans les années 1950 (Wyatt, 1950). Elle se localise spécifiquement au niveau des îlots CpG (dinucléotides Cytosine-Guanine), configuration indispensable à la méthylation des cytosines chez les mammifères. L'ajout d'un groupement méthyl sur le 5^{e} atome de carbone de la cytosine est possible grâce à la présence de protéines spécifiques appartenant à la famille des ADN méthyltransférases (DNMT).

Cette marque est réversible au cours de la vie et les phases de déméthylation et méthylation *de novo,* développées plus loin, qui ont lieu durant la gametogénèse et chez l'embryon en sont un

parfait exemple. De même, il est important que ces marques soient maintenues au cours des divisions cellulaires. Cela est possible grâce à la présence de l'enzyme DNMT1 qui est responsable du maintien de la méthylation en méthylant le brin complémentaire nouvellement répliqué et donc non méthylé (Sharif et al., 2007).

Dans le cas de la méthylation *de novo*, ce sont les DNMT3A, DNMT3B, ainsi que le facteur de régulation DNMT3L activant la méthylation *de novo,* qui jouent un rôle (Bourc'his et al., 2001; Kaneda et al., 2004; Kareta et al., 2006; Okano et al., 1999). La DNMT2 quant à elle, cible plutôt les ARN (Goll et al., 2006).

L'ADN peut également être déméthylé, notamment juste avant la gamétogénèse dans les cellules germinales primordiales PGC (primordial germ cells), et après la fécondation qui sont deux grandes phases de déméthylation totale de l'ADN. La déméthylation des cytosines peut être passive, en absence de DNMT1, au cours des divisions cellulaires, ou bien active grâce à une désamination des cytosines méthylées corrigée par des enzymes de réparation de l'ADN (Santos et al., 2013).

b) Les modifications des histones

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la longue molécule d'ADN est régulièrement enroulée autour de nucléosomes. Ces derniers sont composés d'octamères de protéines appartenant à la famille des histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4) (Luger et al., 1997). Cependant, le niveau de compaction de la chromatine est fortement influencé par les modifications qui peuvent intervenir au niveau des extrémités N- et C-terminales de la protéine d'histone. Ces modifications post-traductionnelles sont de quatre types : la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la phosphorylation. Elles ont pour effet de modifier les interactions entre les histones et la molécule d'ADN ou encore de favoriser la fixation de protéines de remodelage qui ont pour rôle de modifier la chromatine.

c) Les longs ARN non codants

Dans le génome humain, seul 1% des gènes code pour des protéines, alors que 70 à 90% du génome est transcrit. Ces ARN, produits mais non traduits, sont qualifiés d'ARN non codants. Ils peuvent être distingués en plusieurs groupes comme par exemple les ARN ribosomiques, les ARN de transfert, les petits ARN non codants ou encore les micro-ARN. Cependant, il existe également de longs ARN non codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes.

En effet, les longs ARN non codants sont capables de recruter des protéines de remodelage de la chromatine et ainsi moduler l'expression de leurs cibles. C'est le cas, par exemple, du long ARN non codant *HOTAIR,* exprimé à partir du locus *HOXC,* qui réprime en *trans* le locus *HOXD* grâce au recrutement du complexe protéique PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Ainsi, PRC2 peut triméthyler la lysine 27 de l'histone H3 au niveau du locus *HOXD* (Rinn et al., 2007).

3. Les gènes soumis à l'empreinte parentale (GSE)

La mise en place de l'empreinte parentale a lieu durant la gamétogénèse, seul moment où les deux génomes sont dans des compartiments séparés, permettant ainsi de les différencier. Cette empreinte cible un ensemble de gènes, différents selon le type de gamète (mâle ou femelle), qui sont fortement impliqués dans le développement embryonnaire et placentaire : les gènes soumis à l'empreinte parentale.

a) Découverte des GSE

La découverte des GSE a été possible notamment grâce à des études réalisées à partir de souris portant des translocations Robertsoniennes permettant d'obtenir des individus porteurs d'unidisomies parentales, c'est-à-dire que tout ou partie d'un chromosome provient d'un seul parent (Cattanach and Kirk, 1985). Une carte des régions à effet maternel ou paternel a ainsi pu être établie chez la souris par l'équipe de Bruce Cattanach (Cattanach et al., 2004, 2006) (Figure 2).

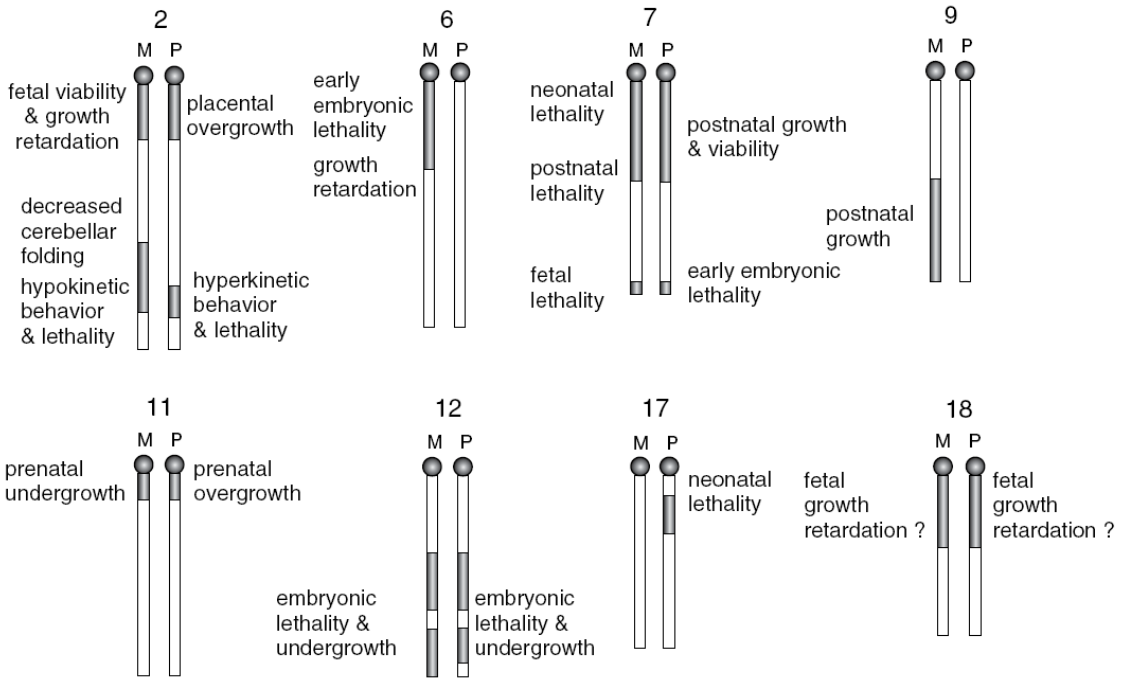


Figure 2 : Carte des régions chromosomiques soumises à l'empreinte parentale chez la souris.

Les régions grises sont absolument requises en deux copies, maternelle et paternelle, pour obtenir un développement normal. Ainsi, un embryon présentant, par exemple, une unidisomie maternelle de la partie proximale du chromosome 6, présente une létalité embryonnaire précoce, suggérant qu'un ou plusieurs gènes de cette région, essentiels pour le développement à terme de l'embryon, sont exprimés à partir de l'allèle d'origine paternelle. (D'après Feil R., 2011, Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics).

C'est finalement dans les années 1990 que les premiers GSE ont été découverts avec, tout d'abord, le gène *Igf2* qui a été décrit comme soumis à l'empreinte parentale suite à son invalidation dans des souris. Il a ainsi été observé que les portées de souris dont l'invalidation du gène *Igf2*, qui code pour un facteur de croissance, est apportée par le père présentent un retard de croissance surprenant (environ 40%) et surtout similaire à celui observé chez les souris *Igf2-/-* par rapport aux portées de souris sauvages (*wt*). Par la suite, il a été montré que l'expression de ce gène provient uniquement de l'allèle d'origine paternelle, l'allèle maternel étant réprimé, ce qui explique pourquoi une délétion de ce dernier entraine un phénotype similaire à celui des souris *Igf2-/-* (DeChiara et al., 1990, 1991). Dans le même temps, les gènes *Igf2r* et *H19* ont également été décrits comme étant des GSE, mais sont, contrairement au gène *Igf2*, exprimés uniquement à partir de l'allèle d'origine maternelle (Barlow et al., 1991; Bartolomei et al., 1991).

Les GSE forment donc un ensemble plutôt restreint de gènes caractérisés par une expression mono-allélique dépendante de l'origine parentale de l'allèle.

Actuellement, environ une centaine de GSE sont décrits chez la souris, dont la plupart sont conservés chez l'humain. Cependant, une approche bioinformatique du génome de souris a permis de prédire la découverte possible de 600 GSE (sur 23788 gènes analysés) dont 64% seraient à expression maternelle (Luedi, 2005).

b) *Organisation des GSE*

Les GSE ne représentent qu'une petite proportion des gènes présents dans le génome. Bien que dans de rares cas ils soient isolés, les GSE ont la caractéristique d'être regroupés dans des domaines chromosomiques, appelés « clusters », répartis dans tout le génome. Ces « clusters », plus ou moins importants et possédant un nombre variable de gènes, soumis à l'empreinte ou non, contiennent aussi bien des GSE à expression maternelle que des GSE à expression paternelle, dont, pour la plupart, au moins un GSE à l'origine d'un ARN non codant (nc-RNA) (O'Neill, 2005) (Figure 3).

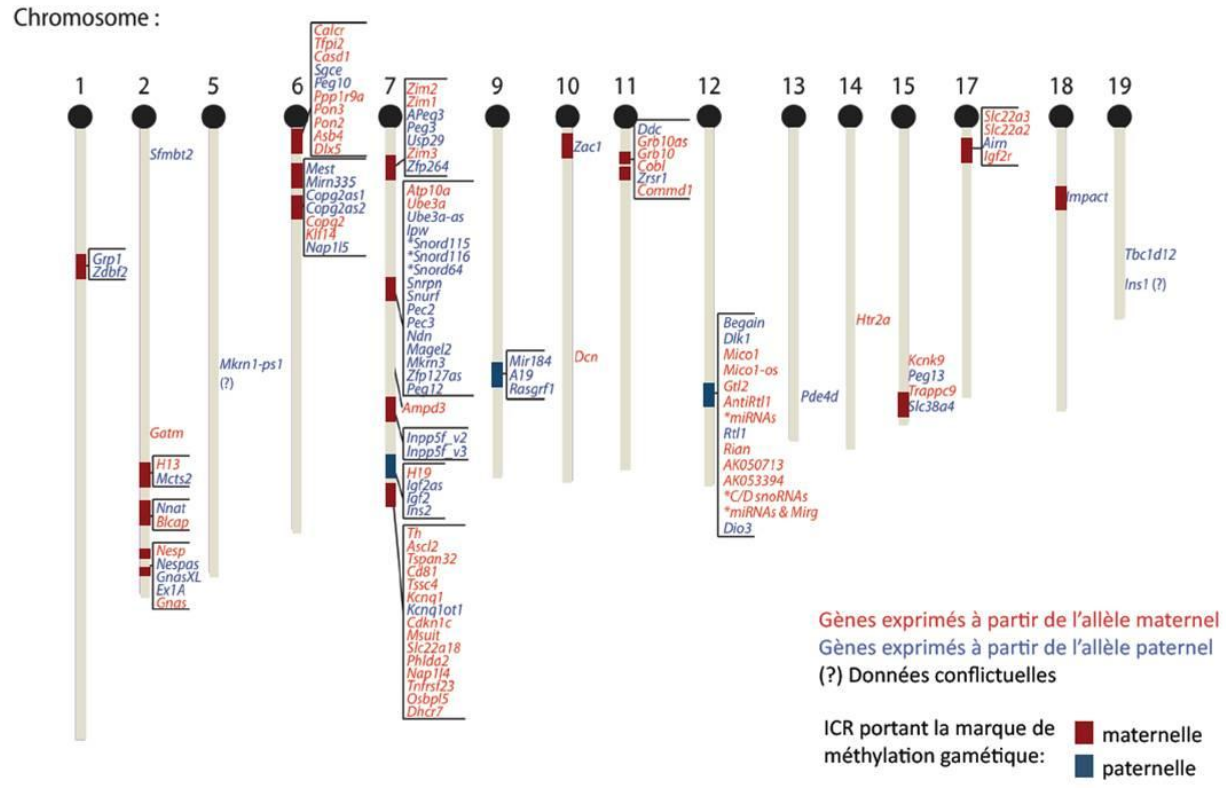


Figure 3 : Carte des gènes soumis à l'Empreinte Parentale chez la souris.

(D'après http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/maps.html).

L'expression monoallélique des gènes des « clusters » est régulée par des régions particulières appelées DMR (pour Differentially Methylated Region). Comme leur nom l'indique, ces régions, de quelques kilobases, riches en ilots CpG (dinucléotides cytosine-guanine), sont différentiellement méthylées au niveau des cytosines, selon leur origine parentale. Il existe cependant, dans chaque « cluster » de GSE, une DMR particulière appelée ICR (pour Imprinting Control Region) dont la mise en place de la méthylation se fait lors de la gamétogénèse. Elles sont définies comme DMR primaires, essentielles pour l'empreinte du « cluster ». En effet, il a été observé que l'empreinte des gènes du « cluster » est perdue lorsque l'ICR est délétée, ce qui a pour effet de restaurer l'expression biallélique de ces derniers (Thorvaldsen et al., 1998; Williamson et al., 2006; Wutz et al., 1997). Les autres DMR, appelées DMR secondaires, sont méthylées après la fécondation, durant le développement embryonnaire et tout au long de l'existence (Bartolomei et al., 1993).

c) *Fonction des GSE*

Chez les mammifères, certains GSE jouent un rôle important dans le développement et la croissance fœtale et placentaire. Il est possible d'observer ces phénotypes sur des souris présentant une délétion de ces différents GSE. Ainsi, le plus souvent, l'absence d'expression d'un gène à expression paternelle conduit à un retard de croissance (c'est le cas par exemple des souris *Igf2-/-*), alors que l'invalidation d'un gène à expression maternelle mène, quant à lui, à un phénotype de surcroissance (par exemple les souris *Igf2r*) (Figure 4). Les gènes à expression maternelle auraient donc plutôt un rôle suppresseur de croissance et ceux à expression paternelle, plutôt un rôle d'activateur de la croissance.

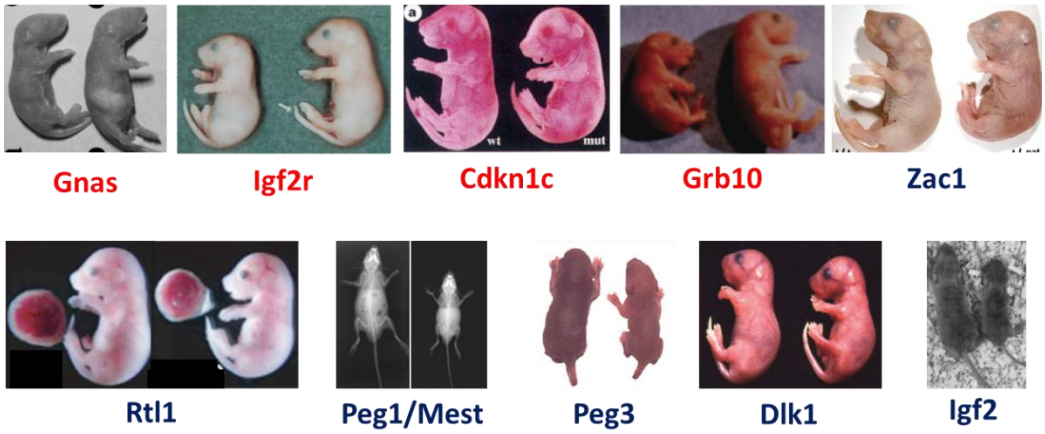


Figure 4 : Phénotype des souris invalidées pour différents GSE.

Les gènes à expression maternelle sont en rouge et les gènes à expression paternelle sont en bleu. Les souris contrôles sont à gauche et les souris KO sont à droite. (Charalambous et al., 2003; DeChiara et al., 1990; Lefebvre et al., 1998; Ludwig et al., 1996; Moon et al., 2002; Nicolas et al., 2005; Sekita et al., 2008; Varrault et al., 2006; Yu et al., 1998; Zhang et al., 1997).

De plus, il a été observé en 2006, grâce à une méta-analyse de l'expression de GSE sur puces à ADN, que ces gènes appartiennent à un réseau qui contrôle la croissance embryonnaire (Varrault et al., 2006). Cependant, il a également été remarqué que ce réseau comprend des gènes non soumis à l'empreinte parentale (dont l'expression est biallélique) impliqués dans le contrôle de la matrice extracellulaire, dans les jonctions cellule-cellule et dans l'adhésion cellulaire à la matrice (Al Adhami et al., 2015). Au sein de ce réseau, appelé IGN pour Imprinted Gene Network, il existe une sorte d'équilibre de l'expression des gènes qui le composent, qui aboutit à une croissance harmonieuse de l'individu (Figure 5). A l'inverse, si l'un des gènes composant ce réseau voit son expression modulée, cela entrainera un déséquilibre qui se traduira par la modulation transcriptionnelle des GSE dont l'expression est liée à ce dernier (Gabory et al., 2010).

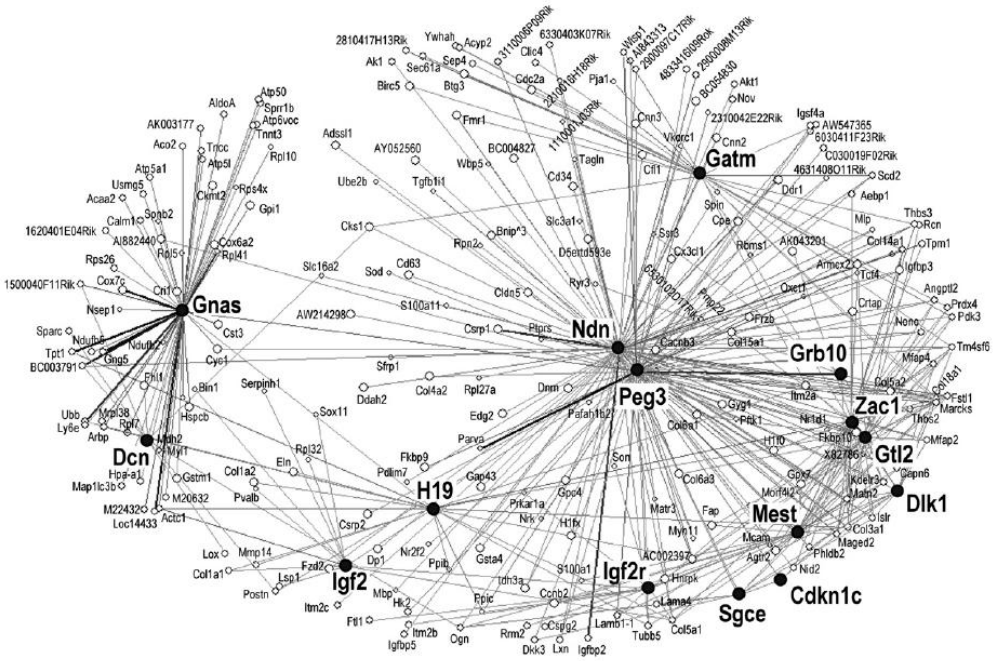


Figure 5 : Imprinted Gene Network (IGN) : le réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale.

Les GSE sont indiqués en gras. (Varrault et al., 2006).

4. Mécanisme de l'empreinte parentale

L'empreinte parentale est un phénomène épigénétique qui permet de différencier le génome paternel du génome maternel dans l'œuf fécondé. Il doit donc être mis en place à un moment où ces deux génomes sont localisés dans des compartiments différents, c'est-à-dire durant la spermatogénèse chez le mâle, et l'ovogénèse chez la femelle. Son déroulement comprend dans un premier temps un effacement des marques épigénétiques dans les cellules germinales, suivi de l'établissement d'un nouveau marquage par méthylation de l'ADN. Ainsi, les ICR maternelles seront méthylées durant l'établissement de l'ovogénèse alors que les ICR paternelles le seront durant la spermatogénèse. Cette première reprogrammation épigénétique dans les cellules germinales est suivie par une seconde qui apparait après la fécondation et qui concernera l'ensemble du génome de l'embryon nouvellement formé (Figure 6, 7 et 8) à l'exception des GSE.

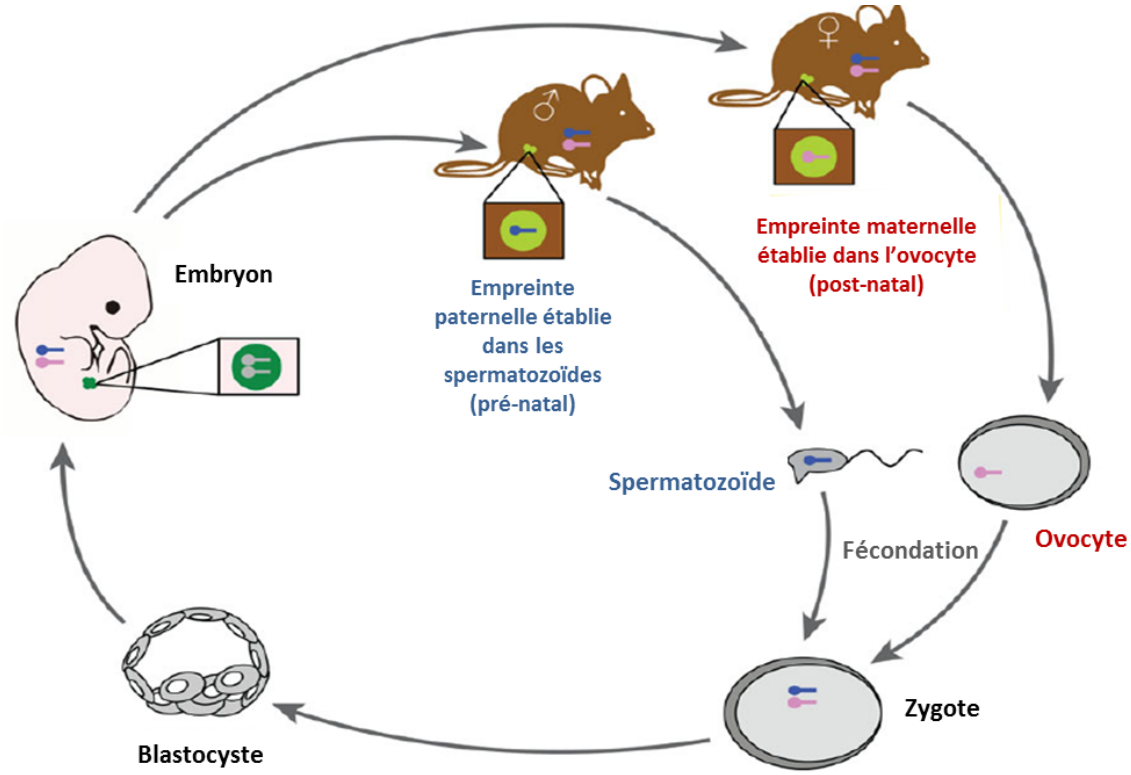


Figure 6 : Etablissement de l'empreinte parentale au cours du développement. (Plasschaert and Bartolomei, 2014).

a) *Reprogrammation épigénétique des cellules germinales*

La principale marque épigénétique associée à l'empreinte, aussi bien dans les ovocytes et les spermatozoïdes que dans les embryons, est la méthylation de l'ADN (Brandeis et al., 1993; Li et al., 1993). L'apposition de cette marque se fait en deux étapes au cours de la gamétogénèse : tout d'abord l'effacement des empreintes préexistantes suivie d'une méthylation *de novo* de l'ADN au niveau des ICR des « clusters » de GSE (Figure 7).

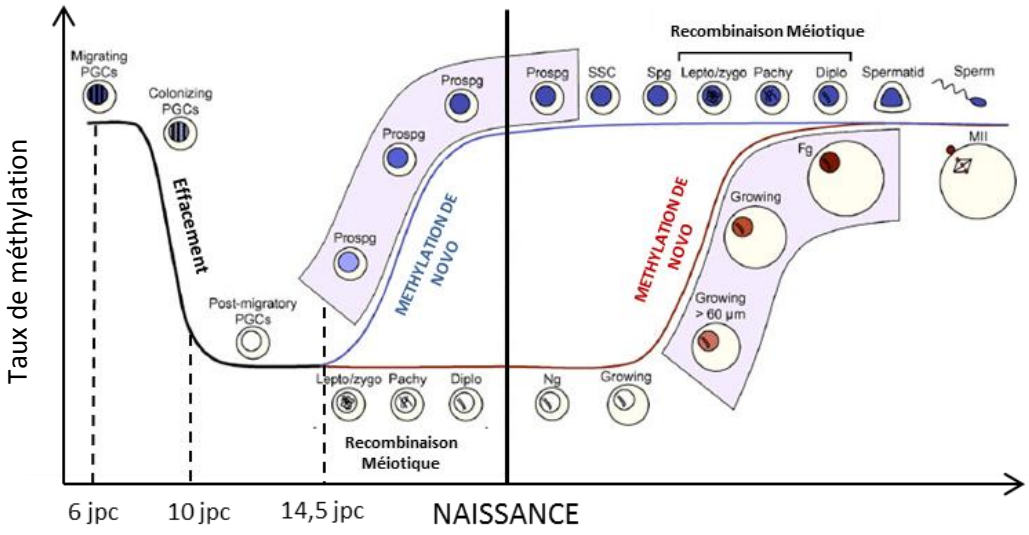


Figure 7 : Etablissement de l'empreinte parentale dans les cellules germinales.

Les PGC (cellules germinales primordiales) apparaissent dès le 6^{e} jour post-coïtum (jpc) et présentent un profil de méthylation bi-parental. Ces cellules subissent alors une déméthylation de leur génome durant leur prolifération puis migration vers le compartiment gonadique. Une nouvelle méthylation, ciblant les gènes à empreinte paternelle, est ensuite établie dans les prospermatogonies (Prospg), cellules germinales mâles en début de différenciation, quelques jours avant la naissance (courbe bleue). De même, une méthylation de novo ciblant les ICR maternelles a lieu dans les ovocytes après la naissance (courbe rouge). (SSC : Cellules Souches Spermatogoniales, Ng : Non-growing oocyte (ovocyte immature), Fg : Fully grown oocyte (ovocyte mature), MII : ovocyte en métaphase II). (Bourc'his and Proudhon, 2008).

Effacement de l'empreinte parentale dans les cellules germinales primordiales

Les cellules germinales primordiales PGC sont établies dans l'embryon à 6,25 jours (chez la souris) grâce au facteur Blimp1, qui active les gènes spécifiques à la lignée germinale (Ohinata et al., 2005). Peu de temps après commence, dans ces cellules, la phase d'effacement de l'empreinte biparentale héritée des parents afin d'apposer un nouveau marquage d'empreinte maternelle s'il s'agit de futurs ovocytes ou bien d'empreinte paternelle s'il s'agit de précurseurs de spermatozoïdes. Lorsque les PGC ont terminé leur migration vers le compartiment gonadique, autour du 10^{e} jour de développement, les ICR sont déméthylées et prêtes à recevoir une nouvelle méthylation dite *de novo* (Figure 7) (Lee et al., 2002).

Les mécanismes de cette déméthylation massive de l'ADN dans les PGC ne sont pas encore bien élucidés. Cependant, il semblerait que les protéines Tet1 et Tet2, qui sont des 5-methylcytosine dioxygénases, seraient impliquées. En effet, le taux élevé de ces protéines dans les PGC indique qu'elles ont certainement un rôle à jouer. Une étude récente a mis en évidence que les cytosines méthylées (5mC) des CpG sont converties en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) par l'action des enzymes Tet1 et Tet2 (Hackett et al., 2013). Les 5hmC seraient ensuite impliquées lors de la déméthylation active bien que cette fonction ne soit pas encore bien éclaircie à ce jour. Lors d'une autre étude, l'hypothèse d'une déméthylation passive dans les PGC, à travers les divisions cellulaires, a également été mise en évidence (Ohno et al., 2013).

Méthylation de novo durant la gamétogénèse

Lorsque l'étape de déméthylation de l'ADN est achevée dans les PGC, il est nécessaire qu'une nouvelle empreinte soit apposée. C'est la méthylation *de novo.*

Dans le cas des gamètes mâles, la méthylation *de novo* intervient très rapidement après l'effacement de l'empreinte biparentale. Dès 14,5 jours de développement, les PGCs d'embryons mâles se mettent en état de quiescence dès le début de leur différenciation, au stade de prospermatogonies. La méthylation des ICR paternelles a alors lieu, et ce, jusqu'à quelques jours après la naissance (Figure 7), puis les cellules prospermatogoniales vont reprendre leur différenciation jusqu'à devenir des spermatozoïdes matures. Dans le cas des gamètes femelles, la méthylation *de novo* des ICR maternelles ne se met en place que tardivement, quelques jours après la naissance, dans des ovocytes en cours de croissance grâce aux DNMT3A, 3B et 3L (Bourc'his and Proudhon, 2008).

b) Maintenance et protection de l'empreinte parentale durant le développement pré- et post-implantatoire.

Le développement préimplantatoire correspond à la période entre la fécondation et l'implantation du blastocyste dans l'utérus. Durant cette période, l'ADN présent dans les cellules de l'embryon nouvellement formé subit une vague de déméthylation à laquelle les GSE doivent résister (Figure 8). En effet, les ICR méthylées ne doivent pas perdre leur empreinte au cours de cette étape, et ce sont les facteurs PGC7/Stella et Zfp57 qui interviennent (Anvar et al., 2015; Li et al., 2008; Nakamura et al., 2007).

Après l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, et donc après la phase de déméthylation globale du génome, de nouvelles marques épigénétiques doivent être apposées. Il faut alors que les ICR non méthylées soient protégées de cette vague de méthylation (Figure 8), grâce à la fixation de la protéine CTCF (CCCTC-binding Factor) sur ce locus. Cela permet de protéger l'ICR de la méthylation *de novo* qui a lieu durant l'ovogénèse (Fedoriw et al., 2004; Pant et al., 2004) ainsi que de celle qui a lieu après l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine (Engel et al., 2006). Ainsi, dans le cas du locus *H19-Igf2*, une mutation de l'ICR empêchant la fixation de la protéine CTCF sur l'allèle maternel permet une méthylation post-fécondation de ce dernier qui ne sera plus protégé par la présence de la protéine CTCF, causant entre autre une expression biallélique du gène voisin *Igf2* (Szabó et al., 2004).

Enfin, tout au long de la vie, les cellules prolifèrent et grâce à l'action de DNMT1, enzyme de maintenance, le profil de méthylation est maintenu dans les cellules filles (Li et al., 1992).

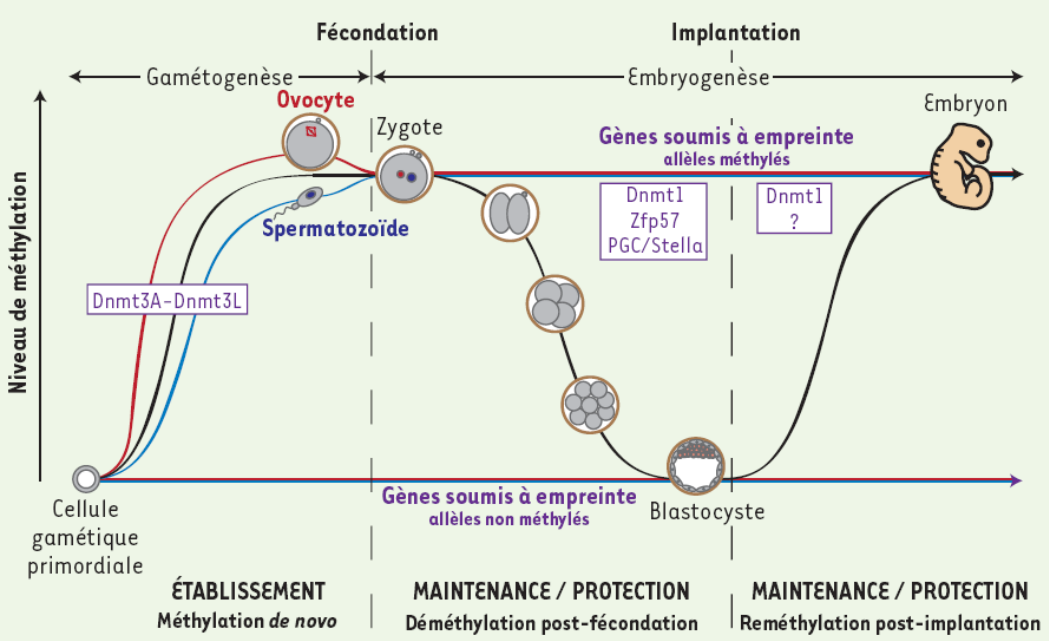


Figure 8 : Etablissement, maintenance et protection de l'empreinte parentale durant l'embryogénèse. *Durant la gamétogénèse, les empreintes paternelles et maternelles sont établies respectivement dans les gamètes mâles et femelles (courbes bleues et rouges). Après la fécondation, le génome de l'embryon est déméthylé (courbe noire) à l'exception des gènes soumis à l'empreinte parentale. Après implantation de l'embryon dans la paroi utérine, une méthylation de novo est mise en place et maintenue au cours de la vie.* (Proudhon and Bourc'his, 2010).

5. Empreinte parentale et pathologies chez l'homme

Il existe, chez l'homme, plusieurs maladies génétiques liées à des GSE. En effet, du fait de leur expression monoallélique, une perte de l'empreinte, ou encore une unidisomie parentale (deux copies héritées d'un même parent) d'une région porteuse de GSE, peut avoir un effet très délétère sur la santé des individus porteurs de ces anomalies.

a) Les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman

Dans le cas des syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, tous deux responsables de troubles neurodéveloppementaux, la pathologie est causée par la délétion d'une région porteuse de GSE du chromosome 15, le locus 15q11-q13. Dans le cas du syndrome de Prader-Willi, on observe une délétion de la copie paternelle ou unidisomie maternelle. Cela a pour effet une absence d'expression des gènes à expression paternelle de ce locus voire, dans le cas de l'unidisomie

maternelle, à une surexpression des gènes à expression maternelle. Dans le cas inverse, où la copie maternelle du locus 15q11-q13 est absente, on parle du syndrome d'Angelman (Buiting, 2010).

b) Les syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russell

Il existe également deux autres pathologies connues pour toucher une région chromosomique soumise à l'empreinte : le cas des syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russell. La région concernée est portée par le chromosome 11p15.5 et implique le locus *Kcnq1* et le locus *H19-Igf2*. Ces deux « clusters » de GSE présentent chacun une ICR, respectivement nommées ICR1 et ICR2 et respectivement méthylées sur l'allèle maternel et paternel (Figure 9).

Dans le cas du syndrome de Beckwith-Wiedemann, les patients présentent un phénotype de surcroissance qui touche l'ensemble des organes et qui apparait durant le développement embryonnaire (Weksberg et al., 2010). De plus, ce syndrome prédispose à l'apparition de tumeurs durant les premières années de vie principalement avant l'âge de 5 ans. A l'inverse, le syndrome de Silver-Russell se caractérise par un retard de croissance (Eggermann, 2010). Dans ces deux cas, des altérations de la méthylation des centres d'empreinte des loci *H19* et *Kcnq1* modifient les contributions de chaque allèle, de même que, dans le cas de Beckwith-Wiedemann, la présence d'unidisomies parentales au niveau de ce cluster mènent à la surexpression de gènes impliqués dans la croissance (Figure 9).

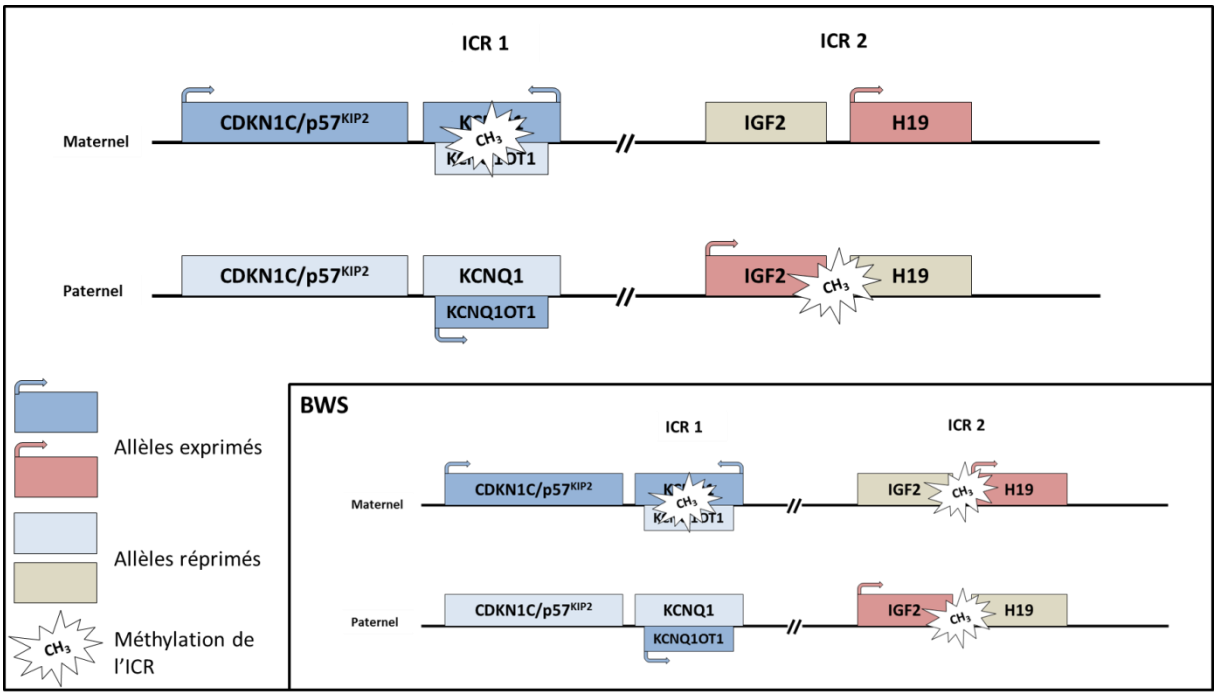


Figure 9 : Représentation de la région 11p15.5 impliquée dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS).

En situation normale, l'ICR1 du locus Kcnq1-Kcnq1ot1 est méthylée sur l'allèle maternel alors que l'ICR2 du locus H19-Igf2 est méthylée sur l'allèle paternel. Cela entraine une expression monoallélique des GSE présents sur ces clusters. Dans le cas du syndrome BWS, il y a une hyperméthylation de l'ICR2 qui perturbe l'expression monoallélique des gènes H19 et Igf2. (Eggermann et al., 2008).

Chapitre 2. Le locus *H19-Igf2*

Le gène *H19*, long de 2,5kb et composé de cinq exons et quatre introns, fut l'un des premiers GSE décrit avec les gènes *Igf2* et *Igf2r*, et appartient à un locus nommé *H19-Igf2*. Ce locus, qui est situé sur la partie distale du chromosome 7 chez la souris et sur le chromosome 11 chez l'homme, est l'un des exemples les plus étudiés et utilisés pour décrire les mécanismes de régulation des GSE.

1. Description du locus

Les deux gènes présents sur ce locus, *H19* et *Igf2*, ont une expression monoallélique, respectivement de l'allèle d'origine maternelle et paternelle, et sont distants l'un de l'autre de 90kb. Ce locus contient également le gène *ins2*, un GSE exprimé uniquement à partir de l'allèle paternel et exclusivement dans le sac vitellin (Deltour et al., 1995; Giddings et al., 1994). (Figure 10).

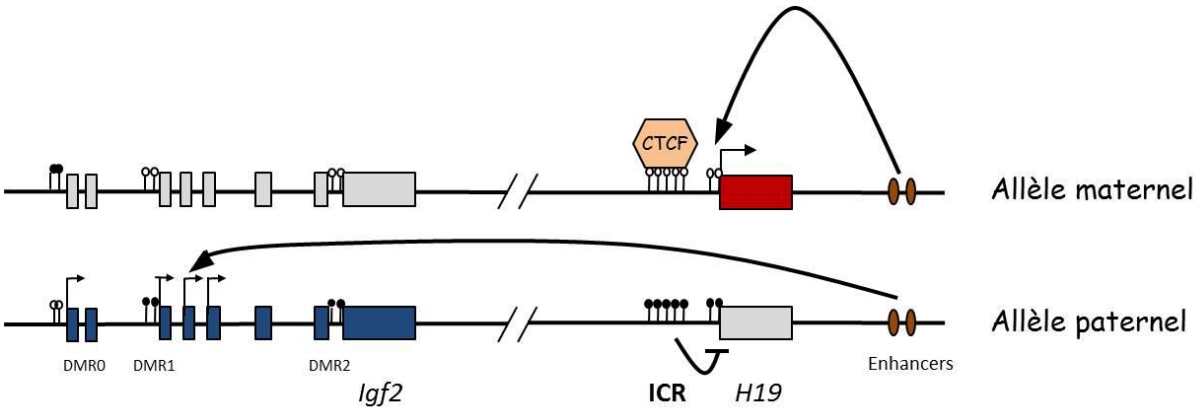


Figure 10 : Le locus *H19-Igf2*.

L'expression des gènes H19 et Igf2 est régulée grâce à l'ICR située en amont du gène H19. Cet ICR n'est pas méthylé sur l'allèle maternel et la protéine CTCF se fixe sur l'ICR et joue un rôle d'insulateur. Les « enhancers » communs aux deux gènes et situés en aval du locus interagissent avec le promoteur du gène H19 mais sont bloqués par la protéine CTCF. Lorsque l'ICR est méthylée, ce qui est le cas sur l'allèle d'origine paternelle, la protéine CTCF ne peut pas se fixer. Les « enhancers » peuvent interagir avec la DMR1 du gène Igf2 et permettre ainsi son expression.

a) L'ICR, élément principal de contrôle de l'empreinte du locus H19-Igf2

L'expression des gènes de ce locus est modulée grâce à la présence d'éléments régulateurs. En premier lieu, le locus *H19-Igf2* possède, comme tous les « clusters » de GSE, un centre de contrôle de l'empreinte (ICR) qui est différenciellement méthylé selon l'origine parentale de l'allèle.

Dans le cas du locus *H19-Igf2*, l'ICR, localisée entre -2 et -4 kb en amont du gène *H19*, est méthylée sur l'allèle paternel et totalement non méthylée sur l'allèle maternel. Cette méthylation différencielle de l'ICR, qui a lieu durant la gamétogénèse mâle, a pour conséquence de favoriser la fixation de la protéine CTCF (CCCTC-binding Factor) sur l'un des allèles, celui dont l'ICR est non méthylée (Figure 10). En effet, cette protéine est capable de se lier à l'ADN au niveau de séquences spécifiques et est également sensible à l'état de méthylation de ces dernières (Filippova, 2008). La protéine CTCF se fixe au niveau de quatre sites de l'ICR maternelle, et joue un rôle d'insulateur par rapport aux séquences activatrices, appelées « enhancers » situées en aval du gène *H19.* En effet, deux « enhancers » caractéristiques de l'endoderme ont été identifiés en aval du gène *H19*, et agissent aussi bien sur l'expression du gène *H19* que sur celle du gène *Igf2* (Leighton et al., 1995a). Il existe également deux « enhancers » en amont du gène *H19* et plusieurs autres en aval, qui sont spécifiques du mésoderme (Ishihara et al., 2000). Ces « enhancers » situés en aval du gène *H19* interagiront avec le promoteur du gène *H19* mais ne pourront pas activer les promoteurs du gène *Igf2* sur cet allèle (Figure 10). Cela a été observé lors d'une étude pour laquelle l'ICR du locus *H19-Igf2* a été mutée de façon à ce que la protéine CTCF ne puisse plus s'y fixer, ce qui a eu pour conséquence une expression du gène *Igf2* devenue biallélique (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Pant et al., 2004).

b) Les DMRs, éléments de contrôle de l'expression du gène Igf2

Outre la présence de l'ICR, il existe également trois autres DMRs situées au niveau du gène *Igf2* : la DMR0, spécifique du placenta, méthylée sur l'allèle maternel, et située entre les exons 2 et 3 du gène *Igf2*, la DMR1 localisée en amont du promoteur fœtal d'*Igf2* et la DMR2 dans le dernier exon du gène *Igf2*, méthylées toutes deux sur l'allèle paternel (Eden et al., 2001; Moore et al., 1997; Murrell et al., 2008).

Il a été montré en 2003 que les DMR1 et 2 sont protégées de la méthylation sur l'allèle maternel grâce à la présence de l'ICR, et que la DMR1 protège de la méthylation la DMR2 (Lopes, 2003). Il y a en quelque sorte une hiérarchie entre ces régions indispensable à la mise en place de l'empreinte et donc à l'expression mono-allélique des gènes de ce locus.

2. Le gène *Igf2*

Le gène *Igf2*, composé de 8 exons sur une longueur de 19 kb, est à l'origine d'un facteur de croissance fortement impliqué dans le développement embryonnaire et placentaire. Le gène *Igf2* est exprimé dès l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine, en premier lieu dans les tissus extra-embryonnaires, puis dans les tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme (Lee et al., 1990).

La protéine Igf2 est produite à partir de différents transcrits selon le promoteur activé. En effet, le gène *Igf2* possède 4 promoteurs, le premier étant activé uniquement dans le placenta, alors que les trois autres sont activés aussi bien dans l'embryon que dans les tissus extra-embryonnaires (Moore et al., 1997). Cela donne lieu à la production de plusieurs transcrits qui aboutiront tous à la production d'une protéine identique.

a) Rôle du gène Igf2 dans la croissance embryonnaire

Le gène *Igf2* appartient à la famille des IGF (Insulin-like growth factor) et, contrairement au gène *Igf1* qui n'est exprimé que chez l'adulte, le gène *Igf2* est exprimé uniquement durant le développement embryonnaire. La protéine Igf2 est capable de se fixer sur le récepteur Igf1r, présent à la surface des cellules, ce qui déclenche une cascade de signalisation impliquée dans la croissance. Elle se fixe également au niveau du récepteur Igf2r, lorsqu'elle ne peut plus se fixer sur les récepteurs Igf1r, ce qui entraine sa dégradation. Les souris n'exprimant pas le gène *Igf2* présentent un phénotype de retard de croissance d'environ 40% par rapport à des souris sauvages (DeChiara et al., 1990), phénotype détecté au cours du développement embryonnaire (12,5 jours) suggérant que cette altération de la croissance apparait à cette période du développement et est maintenue tout au long de la vie de l'individu. De même, ces souris ont une altération de la croissance placentaire (Efstratiadis, 1998). A l'inverse, une surexpression du gène *Igf2*, telle que celle obtenue après délétion du gène *H19* et décrite ci-après, entraine un phénotype de surcroissance (Ripoche et al., 1997; Sun et al., 1997).

b) Le miR-483

Les micro-ARN sont de petits ARN non codants d'environ 20 nucléotides qui ont pour fonction de réguler l'expression d'ARN messagers définis en modulant leur stabilité ou en empêchant leur traduction en protéine. Ils ont un rôle important dans le développement, le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation des cellules souches et dans le développement des tumeurs (Ambros, 2004). Récemment, des travaux ont mis en évidence la production d'un micro-ARN à partir du deuxième intron du gène *Igf2*, le miR-483 (Landgraf et al., 2007). Il a été montré que le miR-483 agit comme un suppresseur de tumeur grâce à ses propriétés apoptotiques (Bertero et al., 2013). Il a également été observé, *in vitro,* que le miR-483 est capable de réprimer l'expression du gène *Srf* (Serum Response Factor), à l'origine d'un facteur de transcription spécifique du muscle, en ciblant son ARN messager dans les cellules endothéliales (Qiao et al., 2011).

Pour résumer, le gène *Igf2* est à l'origine d'un facteur de croissance et d'un micro-ARN qui régulent l'expression de gènes impliqués dans divers processus biologiques tels que la croissance et la prolifération cellulaire, ou encore dans la différenciation musculaire.

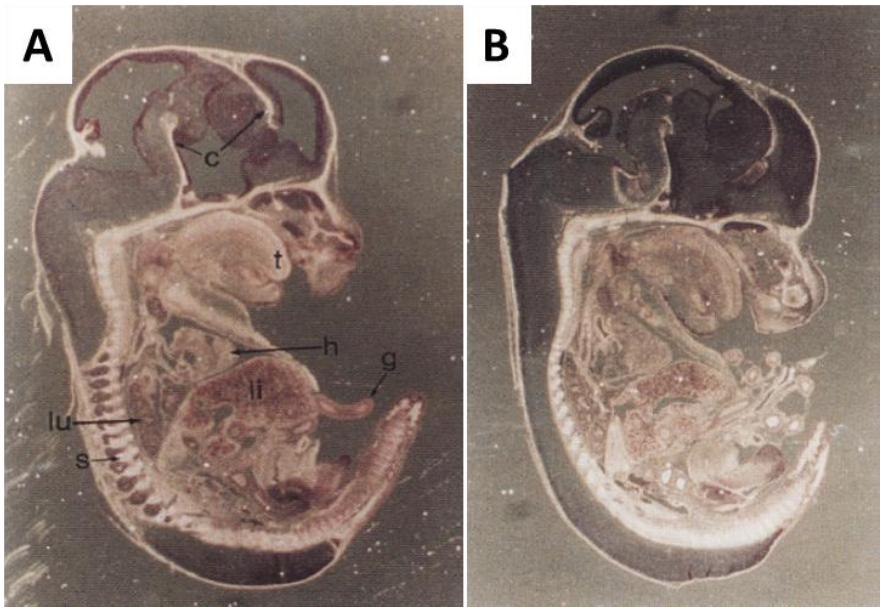
3. Le gène *H19*

Le gène *H19* a été découvert et isolé dans différents laboratoires. Il a tout d'abord été identifié lors d'une étude menée par l'équipe de S. Tilghman ayant pour objectif d'identifier des gènes pouvant être régulés par le gène *raf* dont on sait qu'il régule en *trans* le taux d'ARNm de l'*AFP* (α-Fœtoprotein) après la naissance. Lors de cette étude, ils ont identifié un gène étant sous le contrôle de *raf* qu'ils ont nommé *H19* car se trouvant être le 19^{e} clone de la ligne H des clones étudiés (Pachnis et al., 1984). De la même manière, lors d'une étude pour laquelle étaient recherchés des gènes impliqués dans la myogénèse, le gène *H19* a été isolé, en même temps que le gène *MyoD*, et appelé *MyoH* (Davis et al., 1987). Il a également été retrouvé surexprimé dans les carcinomes embryonnaires (Wiles, 1988), puis identifié comme un gène activé lors de la différenciation *in vitro* des cellules souches embryonnaires (Poirier et al., 1991).

Très rapidement après sa découverte, il a été suggéré que le gène *H19*, composé de 5 exons, n'est pas à l'origine d'une protéine mais permet la production, à l'aide d'une ARN polymérase II, d'un long ARN de 2,3 kb épissé, coiffé et polyadénylé (Brannan et al., 1990). Il est également à l'origine d'un transcrit antisens de 120 kb, nommé 91H, capable de réguler l'expression, en *trans*, du gène *Igf2* (Berteaux et al., 2008; Tran et al., 2012).

a) <u>Profil d'expression du gène H19</u>

Tout comme le gène *Igf2*, *H19* est fortement exprimé durant l'embryogénèse, avec un taux comparable à celui de la *β-actine*, dans les tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme (Figure 11). De même, son expression est réprimée après la naissance dans l'ensemble des tissus à l'exception du muscle squelettique et du cœur, et son expression peut être réactivée dans l'utérus et les glandes mammaires notamment lors d'une grossesse (Adriaenssens et al., 1999).



Igf2 ***H19***

Figure 11 : Profil d'expression des gènes *H19* et *Igf2* dans l'embryon de 13,5 jours.

Photos d'hybridation in situ des ARN Igf2 (A) et H19 (B). Expression paternelle du gène Igf2 dans un embryon hétérozygote paternel (Igf2-/+) (A) et expression maternelle du gène H19 dans un embryon hétérozygote maternel (H19+/-) (B). Tous deux sont exprimés dans les tissus dérivés de l'endoderme et du mésoderme. (Photos de Leighton et al., 1995a).

b) Le miR-675

Il a été montré, en 2007, que le long ARN non codant *H19* est le précurseur d'un micro-ARN, le miR-675 (Cai and Cullen, 2007). Après transcription du long ARN non codant *H19* dans le placenta, la protéine Drosha, enzyme de type ribonucléase qui initie, dans le noyau, la première étape de formation des micro-ARN, puis l'enzyme Dicer, dans le cytoplasme, permettent d'aboutir à la production de deux micro-ARN, les miR-675-3p et miR-675-5p à partir de l'exon 1 du gène *H19* (Figure 12) (Keniry et al., 2012; Kim et al., 2009).

Le miR-675 voit son expression croître au cours du développement placentaire où il est très fortement exprimé, contrairement à l'embryon où la production du miR-675 semble inhibée. En effet, chez ce dernier, seul le long ARN non codant est exprimé. Dans le placenta, il a été observé que le taux d'expression du gène *HuR* (Human antigen R) décroit rapidement à partir de 13,5 jours de gestation. Or la protéine HUR permet, en se fixant sur l'ARN, d'empêcher le processus par lequel le miR-675 est produit (Figure 12). L'invalidation, dans le placenta, de l'expression du gène *H19*, ou du miR-675 aboutit à un phénotype de surcroissance placentaire. Cela suggère que le miR-675 inhibe la croissance placentaire au cours de la grossesse. Une des cibles du miR-675 est le gène *Igf1r*, récepteur important impliqué dans la croissance du placenta (Keniry et al., 2012).

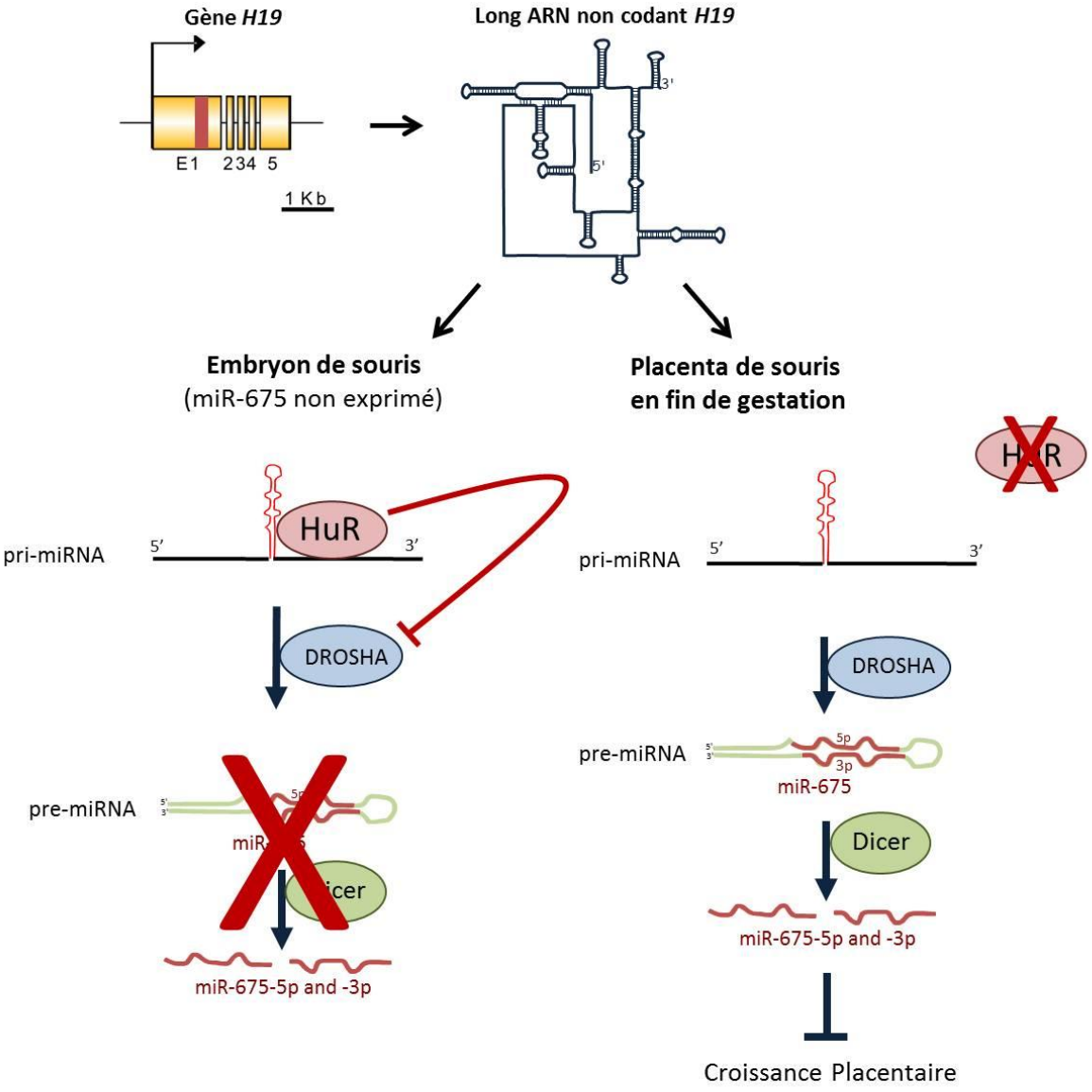


Figure 12 : Production du miR-675 à partir du gène *H19*.

Le gène H19 murin, long de 2,5 kb, est composé de cinq exons. Il est à l'origine d'un long ARN non codant de 2,3 kb qui peut servir à la production du micro-ARN miR-675. Dans le placenta, le taux de miR-675 augmente au cours de la gestation. L'absence de la protéine HUR permet la production du pre-miRNA grâce à l'action de l'enzyme DROSHA. Les miR-675-5p et -3p sont alors obtenus par l'action de l'enzyme Dicer, et entrainent une inhibition de la croissance placentaire. Dans l'embryon, le miR-675 n'est pas produit car la protéine HUR bloque l'action de l'enzyme DROSHA à l'origine de la production du pre-miRNA.

c) *Fonction du gène H19*

Dans le but d'étudier la fonction du gène *H19*, plusieurs modèles de souris invalidées pour ce gène ont été créées. La première observation est que cette invalidation n'est pas délétère pour l'individu puisque toutes les souris sont viables et sont capables de se reproduire. Dans le cas du modèle dénommé *H19Δ13*, le gène *H19* ainsi que les 10 kb en amont (13 kb au total) ont été remplacés par le gène *néo*, gène de résistance à la néomycine (Leighton et al., 1995b). De la même façon, un second modèle appelé *H19Δ3* délété uniquement pour les 3 kb du gène *H19* a également été produit dans notre laboratoire (Ripoche et al., 1997) (Figure 13). Ce dernier modèle est celui utilisé lors de l'étude présentée dans la partie résultats.

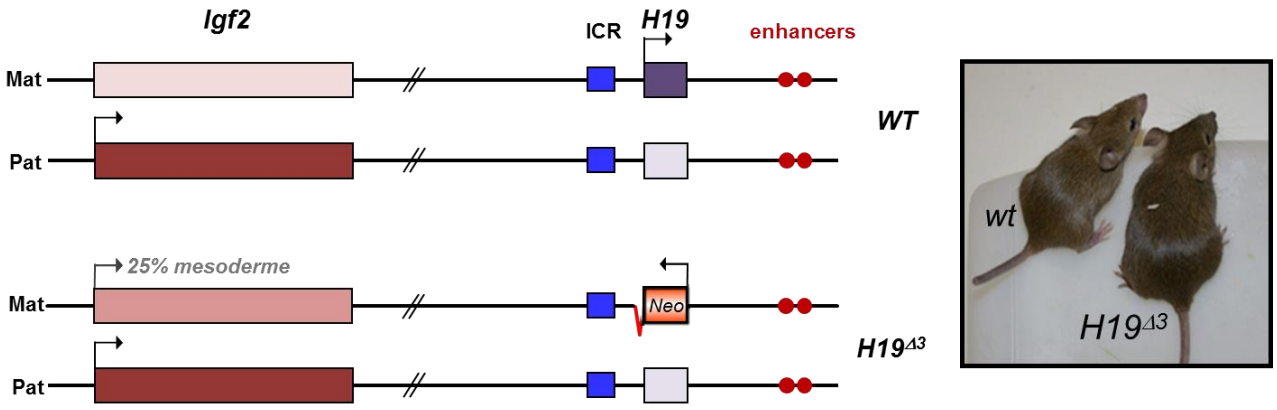


Figure 13 : Les souris *H19Δ3* : modèle murin d'invalidation du gène *H19*.

Les souris H19Δ3 sont invalidées pour les 3 kb du gène H19. Cela entraine une réactivation de l'expression du gène Igf2 sur l'allèle maternel normalement réprimé. Cette augmentation de l'expression est de l'ordre de 25% par rapport à l'expression de l'allèle paternel dans les tissus dérivés du mésoderme, et se traduit par un phénotype de surcroissance de 8% par rapport aux souris sauvages (wt). (D'après Ripoche et al., 1997).

Le gène H19 et la croissance embryonnaire

Ces modèles murins ont permis de mettre en évidence un phénotype de surcroissance générale visible dès la naissance, maintenue tout au long de la vie de l'individu, et plus ou moins important selon le type de délétion. En effet, les souris *H19Δ13* présentent une augmentation de poids d'environ 30% par rapport à des souris contrôles, alors que les souris *H19Δ3* ne présentent qu'une augmentation de 8% (Figure 13).

Cette augmentation de la croissance en absence d'expression du gène *H19* s'explique par une modification du phénomène d'empreinte au niveau du locus puisque le gène *Igf2* normalement exprimé de façon monoallélique à partir de l'allèle paternel se trouve alors réactivé. Cette réactivation est totale dans le cas des souris *H19Δ13* alors que dans le cas des souris *H19Δ3,* cette réactivation n'est que de 25% et ne concerne que les tissus dérivés du mésoderme, d'où une surcroissance plus importante dans les premières (Leighton et al., 1995b; Ripoche et al., 1997). Cette perte de l'empreinte totale observée chez les souris *H19Δ13* peut en fait s'expliquer par le fait que la délétion comprend l'ICR du locus *H19-Igf2,* contrairement aux souris *H19Δ3,* entrainant une perte totale de l'empreinte du gène *Igf2.* En effet, l'absence de l'ICR empêche la protéine CTCF de s'y fixer et donc de bloquer l'expression du gène *Igf2*. Cependant, le fait que, lorsque seul le gène *H19* est délété, une réactivation partielle de l'expression du gène *Igf2* à partir de l'allèle maternel est observée tend à laisser supposer un effet du gène *H19* et plus particulièrement du long ARN non codant *H19*. Afin de s'assurer que le phénotype observé chez les souris *H19Δ3* est bien la conséquence de l'absence du long ARN *H19,* un transgène du gène *H19*, sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, le promoteur du gène *Necdine*, a été introduit dans des souris *H19Δ3* et permet de restaurer le phénotype *wt* (Gabory et al., 2009).

Le gène H19 module l'expression de gènes appartenant à l'IGN

Le gène *Igf2* n'est pas le seul à voir son expression modulée par le gène *H19*. En effet, les GSE ont la particularité de voir leur expression étroitement liée formant ainsi un réseau appelé IGN et décrit dans le premier chapitre. Nous avons voulu, au sein de notre laboratoire, savoir comment le gène *H19* interagissait au sein de ce réseau en utilisant des embryons de 14,5 jours *H19Δ3* puisque le phénotype de surcroissance est observé dès 15,5 jours de développement. En comparant le profil d'expression des gènes du réseau dans le muscle embryonnaire *H19Δ3* et *wt*, il a été mis en évidence que le gène *H19* est capable de moduler directement ou indirectement l'expression de neuf gènes de ce réseau impliqués notamment dans la croissance (Figure 14) (Gabory et al., 2009). Six de ces neuf

gènes sont exprimés à partir de l'allèle paternel (*Dlk1, Gnas, Igf2, Peg3, Rtl1 et Slc38a4*), les trois autres étant exprimés à partir de l'allèle maternel (*Cdkn1c, Dcn et Igf2r*). De plus, certains de ces gènes sont impliqués dans la myogénèse adulte. Le gène *Dcn*, à l'origine de la protéine Décorine impliquée dans la croissance cellulaire, favorise, *in vitro*, la prolifération et la différenciation des cellules musculaires en inhibant l'action de la Myostatine, facteur de croissance et de différenciation impliquée dans la voie TGF-β (transforming growth factor) (Kishioka et al., 2008). L'expression du gène *Dlk1* est retrouvée augmentée lors du développement et de la régénération musculaire, ce qui implique une fonction de ce gène dans ces processus (Andersen et al., 2009; Waddell et al., 2010). Le gène *Peg3*, également connu sous le nom *Pw1*, est impliqué dans le comportement post-natal des cellules souches musculaires et en absence de *Peg3*, le phénotype musculaire est altéré (Nicolas et al., 2005).

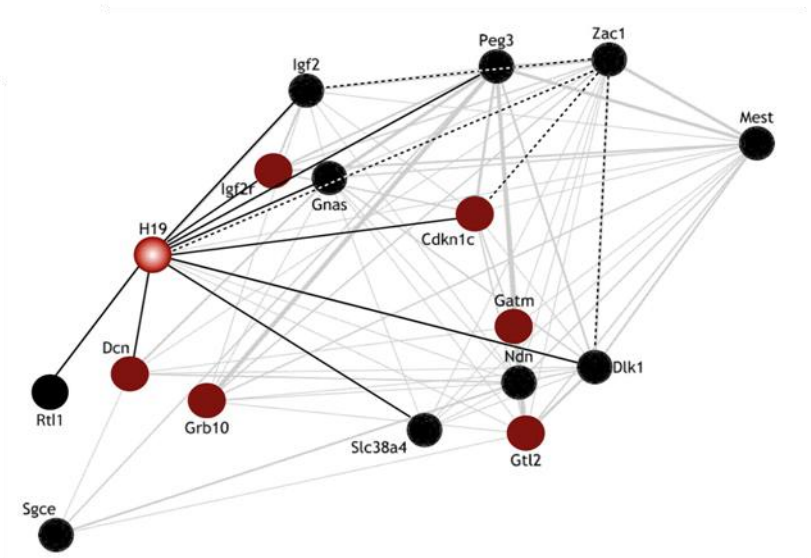


Figure 14 : Réseau de GSE (IGN) dont l'expression est régulée en *trans* par le gène *H19*.

Les GSE à expression maternelle sont représentés en rouge et ceux à expression paternelle en noir. Les lignes grises représentent les interactions entre les gènes prédites grâce à une analyse in silico et les lignes pointillées représentent les intéractions entre le gène Zac1 et ses cibles (Varrault et al., 2006). Les lignes noires représentent les interactions entre le gène H19 et les gènes dont l'expression est modulée lorsque le gène H19 n'est pas exprimé (Gabory et al., 2009).

L'ARN H19 module l'expression de certains gènes de l'IGN via la protéine MBD1

Il a été montré très récemment, au sein de notre laboratoire, que le long ARN non codant *H19* est capable de recruter la protéine MBD1 (methyl-CpG-binding domain) (Monnier et al., 2013). Cette protéine de remodelage de la chromatine est capable de se fixer au niveau de l'ADN méthylé et de recruter des complexes protéiques qui modulent la conformation de la chromatine (Defossez and Stancheva, 2011) et jouent donc sur l'expression des gènes ciblés.

Suite à l'observation, faite dans les muscles embryonnaires de souris *H19Δ3*, de la modulation de l'expression des neuf gènes soumis à l'empreinte appartenant à l'IGN, et du fait que le miR-675 n'est pas exprimé dans l'embryon, il est légitime de supposer que cette régulation des gènes du réseau peut se faire grâce au long ARN non codant *H19*.

Afin de déterminer comment le gène *H19* est capable de moduler l'expression de ses cibles, nous avons, dans un premier temps, recherché des partenaires protéiques de l'ARN non codant *H19* à l'aide d'expériences d'immunoprécipitation de l'ARN. C'est ainsi que l'interaction entre l'ARN *H19* et la protéine MBD1 a pu être mise en évidence dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Dans le but de vérifier si les modulations d'expression des gènes cibles du long ARN *H19* sont la conséquence d'une interaction de ce dernier avec la protéine MBD1, le taux d'expression des neuf gènes cibles du gène *H19* a été étudié dans des MEF n'exprimant pas le gène *Mbd1*. C'est ainsi qu'a été mise en évidence la surexpression de cinq gènes cibles de *H19* (*Igf2, Slc38a4, Dcn, Dlk1 et Peg1*), ce qui suggère que le long ARN *H19* réprime l'expression de ces cinq gènes via la protéine MBD1. De plus, grâce à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), il a pu être mis en évidence que la protéine MBD1 se fixe au niveau de la DMR 1 du gène *Igf2* et de la DMR des gènes *Slc38a4* et *Peg1* lorsque le long ARN *H19* est présent. Ces résultats indiquent que l'ARN *H19* régule directement ces trois gènes via le recrutement de MBD1 (Figure 15). La protéine MBD1 forme un complexe avec l'histone méthyl-transférase SETDB1, capable de méthyler la lysine 9 de l'histone H3 (Sarraf and Stancheva, 2004). Une seconde expérience de ChIP a montré qu'en absence de recrutement de MBD1 (et donc de SETDB1), c'est-à-dire dans le contexte *H19Δ3*, aucune marque H3K9me3 n'est observée sur les trois DMR, ce qui aboutit à une augmentation de l'expression de ces gènes cibles.

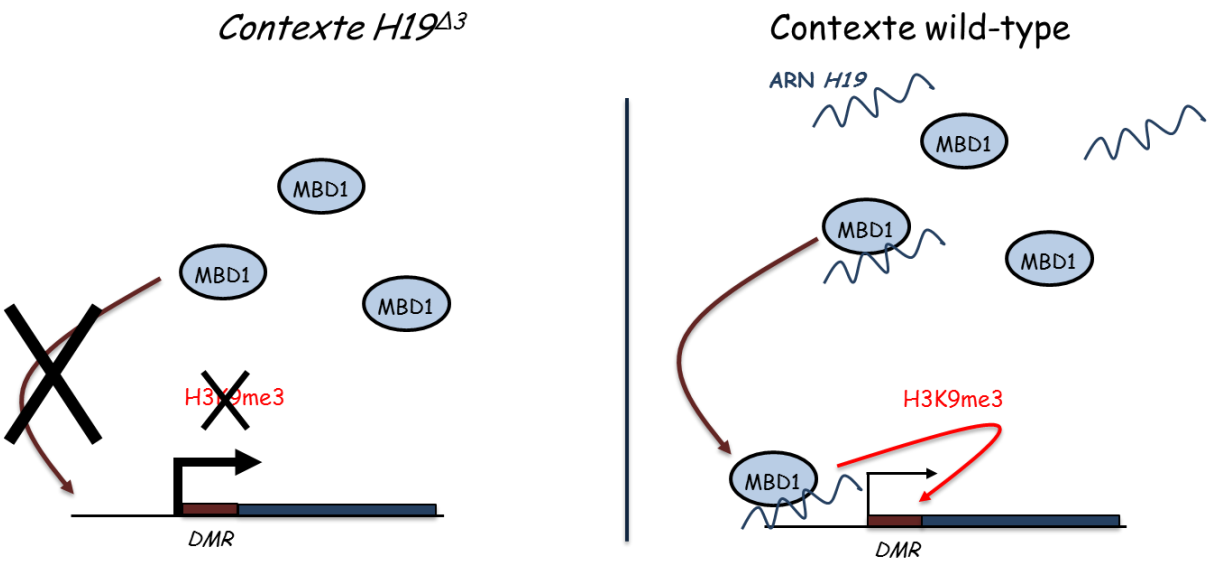


Figure 15 : Modèle de régulation des gènes *Igf2*, *Slc38a4* et *Peg1* par l'ARN *H19* et la protéine MBD1.

Dans les cellules sauvages (wt), l'ARN non codant H19 est capable de recruter la protéine MBD1 au niveau de la DMR des gènes cibles, ce qui induit une triméthylation de l'histone H3K9. En absence du long ARN H19, la protéine MBD1 ne peut pas être recrutée d'où une absence de triméthylation de l'histone H3K9, ce qui aboutit à une surexpression des gènes cibles. (D'après Monnier et al., 2013).

Le rôle suppresseur de tumeur du gène H19

Grâce à l'utilisation de plusieurs approches *in vivo*, il a été montré que le gène *H19* possède un rôle suppresseur de tumeur. En effet, le gène *H19* est impliqué dans le syndrome de Beckwith-Wiedeman qui prédispose à l'apparition de tumeurs embryonnaires, ce qui suggère qu'il peut jouer un rôle dans la tumorigénèse. Il a été observé pour la première fois en 1993, que le gène *H19* possède un rôle de suppresseur de tumeur grâce à l'étude, *in vitro*, de lignées de cellules tumorales présentant un retard de formation de colonies tumorales lorsqu'elles surexpriment le gène *H19* (Hao et al., 1993). Au sein de notre équipe, nous avons observé, *in vivo*, qu'en absence d'expression du gène *H19*, les tumeurs, induites par la greffe d'un embryon de 6,5 jours sous la capsule rénale, sont plus grosses, ce qui confirme le rôle suppresseur de tumeur de ce gène. Cela est également confirmé grâce à l'utilisation d'un modèle murin présentant une délétion du gène *Apc*, ce qui induit un cancer

colorectal. En absence d'expression du gène *H19*, un plus grand nombre de polypes est observé dans ce modèle de cancer colorectal. De même, dans un modèle murin de cancer hépatique, l'absence d'expression du gène *H19* entraine une accélération du développement de ce type de tumeur (Yoshimizu et al., 2008).

Le long ARN non codant H19 et le miR-let-7

Récemment il a été observé que le long ARN *H19* présente plusieurs sites potentiels de fixation du micro ARN let-7 (Kallen et al., 2013). Le miR-let-7 est un régulateur de certains oncogènes et un régulateur du cycle cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose (Johnson et al., 2007, 2005). Il a également été observé que ces sites semblent fonctionnels puisque le taux d'expression des gènes cibles de let-7 est réduit en cas de surexpression du gène *H19*. Ces résultats suggèrent donc que le long ARN non codant *H19* est capable de réguler le taux de miR-let-7 en jouant un rôle d' « éponge » pour ce miR.

Chapitre III. Le muscle squelettique

Les individus possèdent, au sein de leurs organismes, différents muscles dont la fonction varie selon le type de tissu qui les compose. Il est possible de distinguer trois types de tissus musculaires différents : le muscle lisse, le muscle strié cardiaque et le muscle strié squelettique.

1. Structure et fonctionnement du muscle squelettique adulte

Le muscle squelettique a pour fonction, entre autres, d'assurer la locomotion de l'individu, lui permettre de respirer, et permettre son maintien. Cependant, il se caractérise surtout par le fait que sa contraction est en grande partie volontaire, sous le contrôle du système nerveux central et permet donc les mouvements actifs du corps.

a) Anatomie du muscle squelettique

Le muscle squelettique est composé en grande partie de cellules géantes (50-100 µm de diamètre chez l'homme) appelées fibres musculaires (Figure 16). Elles ont pour particularité d'être multinucléées, c'est-à-dire qu'elles possèdent plusieurs noyaux de forme allongée et localisés en périphérie. Ces très longues cellules sont capables d'être excitées via une stimulation nerveuse. Elles sont également contractiles, ce qui permet le mouvement grâce à un passage de l'état contracté à relâché. Les fibres musculaires sont extensibles et élastiques puisqu'elles reviennent à leur état initial après contraction ou extension.

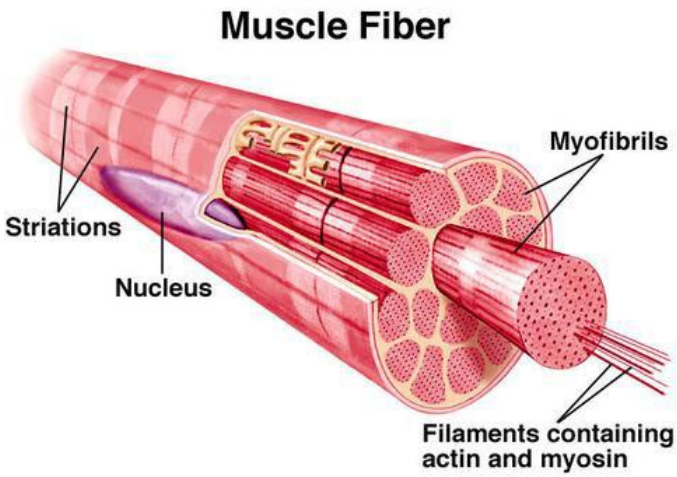


Figure 16 : Structure de la fibre musculaire.

La fibre musculaire est entourée d'une membrane plasmique. Elle possède plusieurs noyaux localisés à la périphérie de la fibre, et des myofibrilles, composés de filaments d'actine et de myosine, en son centre. (Image tirée du site http://www.nvo.com/jin/homepage8/).

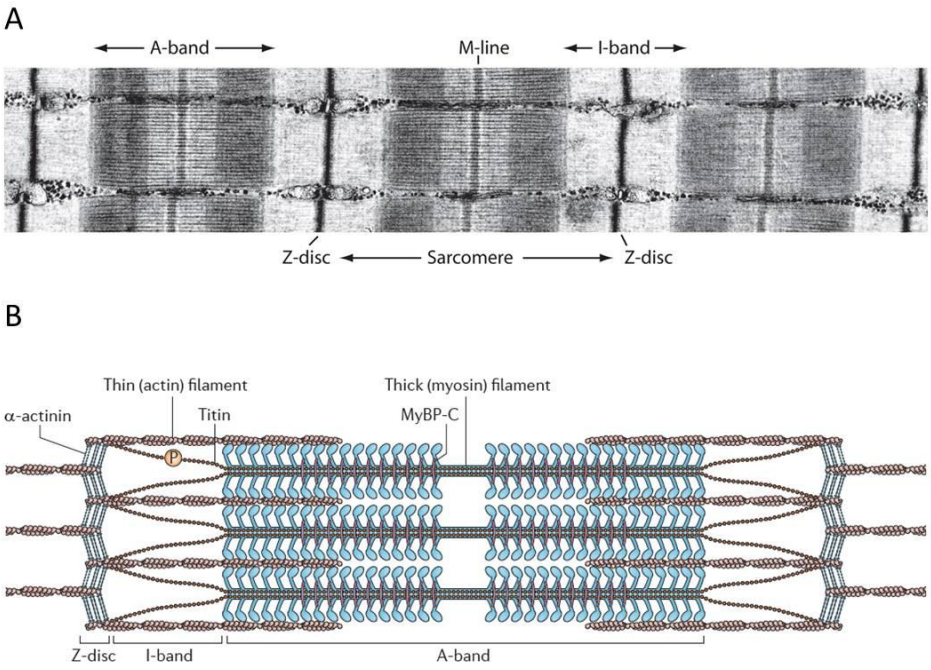


Figure 17 : Organisation du sarcomère.

A. Photo d'un sarcomère au microscope éléctronique (Adapté de Roger Craig, University of Massachusetts).

B. Représentation schématique d'un sarcomère avec les filaments d'actine et les filaments de myosine. (MyBP-C : Myosin Binding Protein C). (Hwang and Sykes, 2015).

Le cytoplasme de la fibre musculaire est principalement occupé par les myofibrilles qui permettent la contraction musculaire grâce au glissement des filaments d'actine, de myosine et de titine qui les composent. Ces filaments sont organisés régulièrement sur toute la longueur de la fibre et forment une succession d'unité contractiles appelées sarcomères, ce qui donne cet aspect strié visible au microscope électronique (Figure 17).

Au sein de chaque sarcomère est retrouvé un épais filament de myosine caractérisé par la forme particulière « en coude » des sous unités qui le composent (Figure 18). Ces filaments de myosine sont intercalés avec des filaments d'actine sur lesquels les « têtes » de myosine peuvent se fixer. Ces filaments d'actine, appelés actine F, sont composés de sous-unités d'actine G et sont positionnés en double hélice. La double hélice d'actine contient également deux autres protéines ayant un rôle important dans la contraction musculaire : la tropomyosine et la troponine. La première, notée Tpm, est retrouvée sous forme d'un long polymère longeant chaque filament d'actine. La seconde forme un complexe composé de troponine T (TnT), de troponine I (TnI) et de troponine C (TnC) capable de fixer le calcium. Ce complexe est localisé régulièrement tout au long de la Tpm (Lehman and Craig, 2008) (Figure 18). Chaque sarcomère est délimité par de fines lignes transversales visibles au microscope électronique : les bandes Z. L'élasticité de la fibre est, quant à elle, due à la présence de filaments de titine, sortes de ressorts reliant les filaments de myosine aux bandes Z (Figure 17). Afin d'assurer un apport en énergie, indispensable à la contraction du muscle, un nombre variable de mitochondries, selon le besoin énergétique du muscle, est présent au sein du sarcoplasme des fibres musculaires.

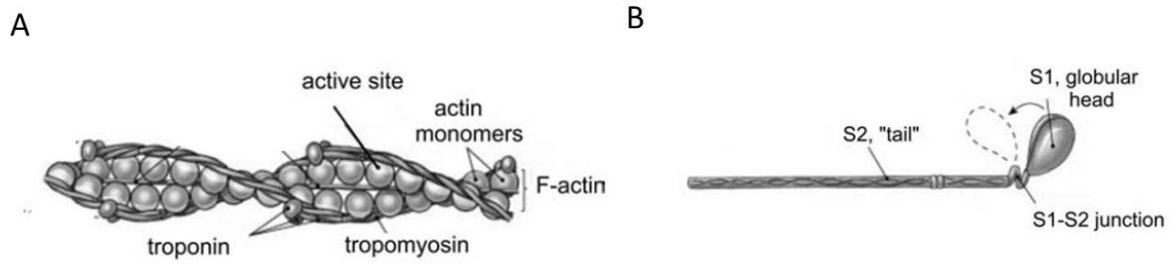


Figure 18 : Structure des filaments d'actine (A) et de myosine (B).

A. Schéma d'un filament d'actine composé de monomères d'actine (actine G) formant les filaments d'actine F. Ces filaments sont entourés de Tropomyosine (Tpm) et de Troponine (de trois types : TnT, TnI et TnC).

B. Schéma d'un filament de myosine.

(Images tirées de Koubassova and Tsaturyan, 2011).

La fibre musculaire est délimitée par une membrane plasmique qui porte le nom de sarcolemme et par la lame basale située vers l'extérieur. Le sarcolemme s'invagine dans le sarcoplasme (cytoplasme de la fibre musculaire) pour former des tubules transverses (tubule t) reliés à un réseau de réticulum sarcoplasmique qui enveloppe les myofibrilles (Figure 20).

Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux et sont entourées d'un premier tissu conjonctif, l'endomysium. Les faisceaux sont eux-mêmes enveloppés d'un second tissu conjonctif, le périmysium et l'ensemble, qui compose le muscle, est entouré d'un troisième tissu conjonctif appelé épimysium (Figure 19) qui donne sa forme au muscle et se prolonge, à ses deux extrémités, en un tissu conjonctif très dense et solide relié à l'os : le tendon.

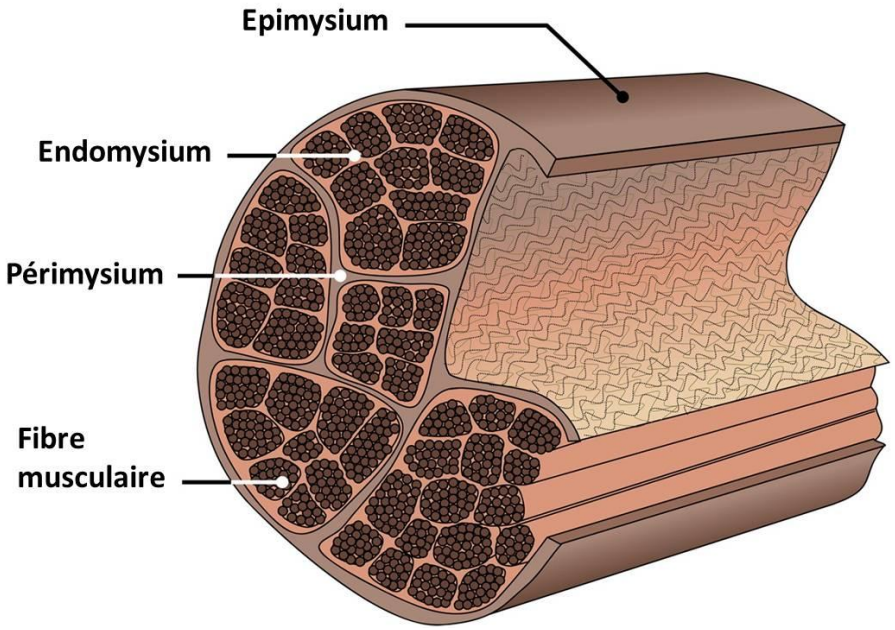


Figure 19 : Organisation du muscle squelettique.

Les fibres musculaires, contenant les myofibrilles (petits cercles marrons), sont entourées d'un tissu appelé endomysium et forment un faisceau de fibres lui-même enveloppé d'un tissu, le périmysium. L'ensemble du muscle est, quant à lui, entouré d'un tissu appelé épimysium. (Adapté de Purslow, 2010).

Chaque fibre musculaire est également cernée d'un réseau de vaisseaux sanguins et de nerfs. L'importante vascularisation du muscle permet un apport conséquent en oxygène qui est transporté par la myoglobine au sein des fibres musculaires.

La population de fibres musculaires au sein du muscle est hétérogène. Il existe différents types de fibres dont la fonction de contraction varie. Les premières, dites de type I sont des fibres de type lent, c'est-à-dire qu'elles ont une vitesse de contraction lente et un temps de contraction lent. Ces fibres sont petites, fortement vascularisées et riches en mitochondries et en myoglobine, d'où leur couleur très rouge. Les secondes sont dites de type II, et sont des fibres rapides qui présentent un temps de contraction bref. Ces fibres se distinguent en trois sous-groupes : les plus fréquentes de type IIA possédant un peu de myoglobine d'où leur couleur rosée, les fibres de type IIB d'aspect blanc car ne possédant pas de myoglobine, et les fibres de type IIX. La proportion de chaque type de fibre dans la composition de chaque muscle est variable. Ainsi, le muscle Soléaire, localisé derrière le tibia, présente une plus forte proportion de fibres lentes, ce qui en fait un muscle de type lent. A l'inverse, le Gastrocnémien, muscle qui recouvre le Soléaire à l'arrière de la patte des souris, est un muscle de type rapide permettant l'articulation du genou.

b) <u>Mécanique du muscle squelettique</u>

Le muscle squelettique a pour fonction de se contracter puis de se relâcher afin de permettre un mouvement des os auxquels il est relié via les tendons. Cette contraction se fait selon un axe déterminé par la position des fibres musculaires. En effet, les longues fibres musculaires d'un muscle sont positionnées parallèlement les unes aux autres sur toute la longueur du muscle.

Elles sont chacune sous le contrôle d'un motoneurone qui transmet le signal de contraction. C'est l'axone des motoneurones qui est en contact avec la fibre musculaire formant ainsi une synapse appelée plaque motrice (Figure 20). C'est au niveau de cette synapse que les neurotransmetteurs (acétylcholine) sont sécrétés dans l'espace synaptique sous l'effet d'un stimulus nerveux transmis par l'axone du motoneurone. La fixation des neurotransmetteurs sur des récepteurs spécifiques, localisés à la surface de la fibre musculaire, favorise l'entrée au sein de la fibre, et ce tout au long du sarcolemme, d'ions calcium. Ce phénomène a pour effet d'activer le glissement des filaments d'actine et donc la contraction de la fibre. En effet, sous l'action des ions calcium, les complexes de troponine modifient la position des polymères de Tpm, ce qui favorise la liaison des têtes de myosine à l'actine G (Filatov et al., 1999; Gunning et al., 2015). L'activité ATPase des têtes de myosine permet alors le clivage de l'ATP (adénosine triphosphate) fournie par les

mitochondries, ce qui entraine un basculement des têtes de myosine, leur coude formant alors un angle d'environ 50° (l'angle étant de 90° à l'état relâché). Cela a pour effet de faire glisser les filaments d'actine. Les filaments de myosine se détachent ensuite de l'actine et leurs têtes se redressent afin de se fixer à nouveau sur les filaments d'actine, débutant ainsi un nouveau cycle. Le glissement des filaments engendré a pour conséquence un raccourcissement des sarcomères et donc un raccourcissement des fibres musculaires, ce qui aboutit à la contraction du muscle.

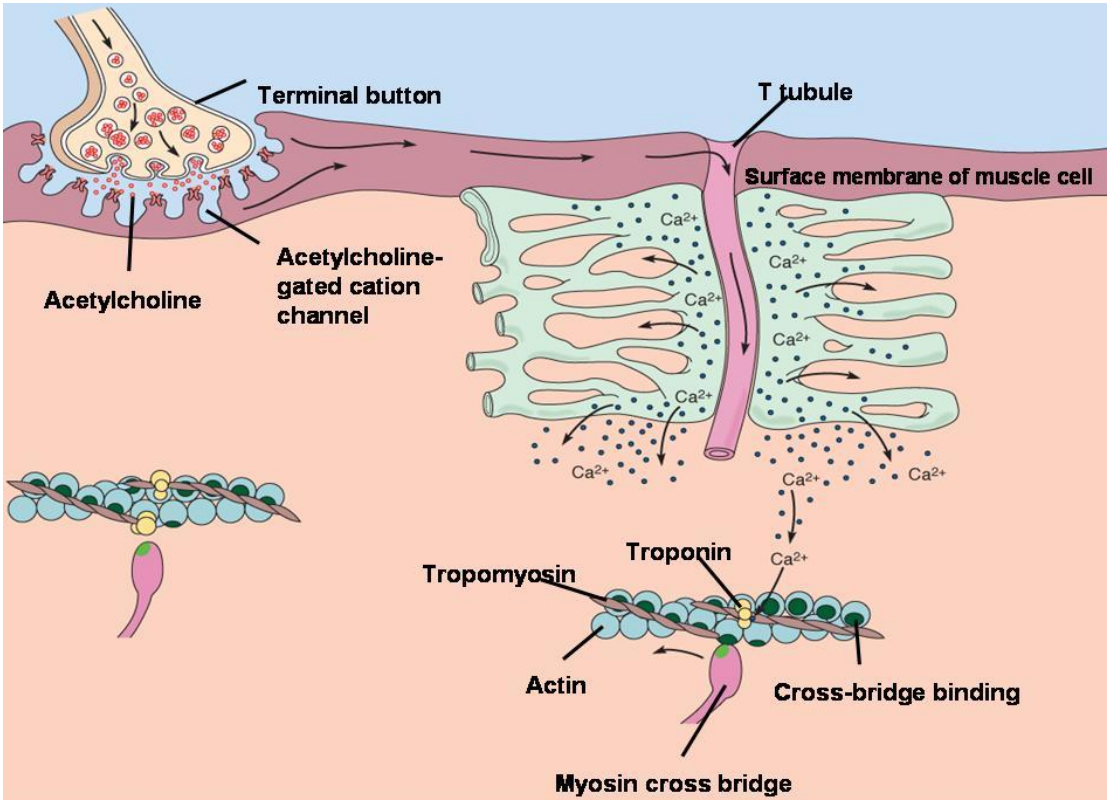


Figure 20 : Jonction neuro-musculaire et transmission du signal au sein de la fibre musculaire.

Les neurotransmetteurs, sécrétés par le bouton terminal du neurone dans l'espace synaptique, se fixent à la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) tout au long de la fibre musculaire via les tubules t puis via le réticulum sarcoplasmique (en bleu clair). L'entrée d'ions calcium permet la fixation des têtes de myosine aux filaments d'actine puis le mouvement des têtes de myosine. (Image tirée du site http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Muscle.html).

2. Formation du muscle squelettique

a) *Myogenèse embryonnaire*

Description

Lors du développement embryonnaire, trois feuillets apparaissent : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Les cellules constituant ces feuillets sont engagées dans une voie de différenciation, ainsi chaque feuillet donnera naissance à un ensemble d'organes défini : l'ectoderme est à l'origine de l'épiderme et du système nerveux, l'endoderme est à l'origine des organes du tube digestif et de l'appareil respiratoire ainsi que de leurs glandes annexes, et le mésoderme est, quant à lui, à l'origine des vaisseaux, des tissus musculaires et du squelette.

Le mésoderme, au cours du développement embryonnaire, se segmente tout au long de l'axe antéro-postérieur (de la tête à la queue) de part et d'autre du tube neural, et forme des structures répétées appelées somitomères (somites immatures) qui deviendront matures par la suite sous l'action de différentes voies de signalisation telles que la voie FGF (Fibroblast Growth Factor), la voie Notch (Notch gene homologue) et la voie Wnt (wingless-related MMTV integration site), activées par des signaux provenant du tube neural et de la notochorde (Aulehla and Pourquié, 2010; Buckingham, 2001). Les cellules présentes au sein de ces somites se réorganisent alors pour donner naissance à deux régions : le dermomyotome et le sclérotome.

Le sclérotome est à l'origine des côtes et des vertèbres alors que le dermomyotome donnera naissance au derme et aux muscles squelettiques. C'est au niveau du dermomyotome que sont présentes, entre autres, les cellules progénitrices musculaires qui donneront naissance aux muscles du tronc et des membres, dans une sous-région appelée myotome (Gros et al., 2005). Le myotome se forme à partir des cellules du dermomyotome qui migrent à partir des bords (lèvres) du dermomyotome vers le myotome situé juste en dessous (Figure 21).

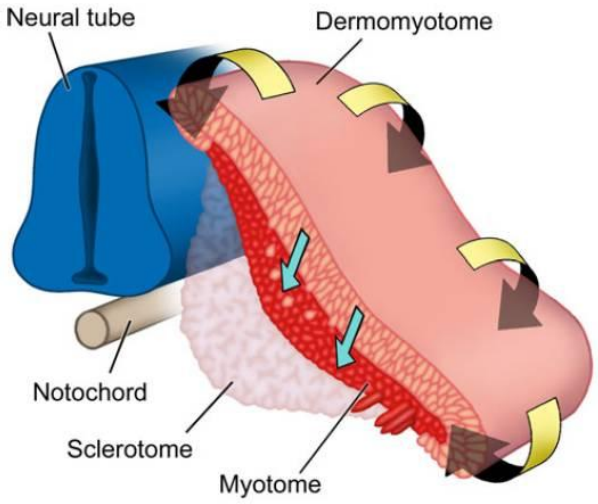


Figure 21 : Formation du myotome durant l'embryogénèse.

Les flèches jaunes représentent la migration des cellules à partir des lèvres du dermomyotome vers le myotome. Les flèches bleues représentent la deuxième vague de migration des cellules du centre du dermomyotome vers le myotome. (Yusuf and Brand-Saberi, 2012).

Au sein du myotome, les cellules progénitrices se caractérisent par l'expression des facteurs de transcription Pax3 et Pax7 (Paired box 3 et 7) (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005). Ils possèdent tous deux un rôle clé dans la myogénèse, Pax3 étant impliqué durant la formation du muscle squelettique dans l'embryon et Pax7 étant impliqué principalement dans le développement musculaire post-natal et la régénération musculaire (Buckingham and Relaix, 2015). Plus tard au cours du développement, entre 9,5 et 14,5 jours, les cellules du myotome, que l'on peut également appeler myoblastes, et qui ne possèdent qu'un seul noyau, se différencient en myocytes qui commencent à fusionner entre eux pour former les premières fibres musculaires multinucléées. C'est la myogénèse primaire, ou vague embryonnaire, qui donne naissance à des fibres musculaires de type lent. Cette première vague de fusion est très rapidement suivie d'une seconde vague dite fœtale (à partir de 14,5 jours) ou myogénèse secondaire, qui permet la production de fibres rapides autour des fibres primaires. Cela implique qu'au sein du myotome, une population constante de progéniteurs est maintenue au cours du développement. Cette maintenance est assurée notamment par la présence du facteur de transcription RBP-J, acteur de la voie de signalisation Notch, qui maintient les cellules dans un état indifférencié (Vasyutina et al., 2007).

Mécanismes moléculaires

Plusieurs familles de facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans la myogénèse. Le facteur de transcription Pax3, et de façon moins importante, le facteur Pax7, sont notamment exprimés dans les cellules progénitrices embryonnaires (Goulding et al., 1994; Jostes et al., 1990). L'expression du gène *Pax3* marque l'état très précoce des cellules progénitrices dans la voie myogénique (Williams and Ordahl, 1994), et une invalidation de ce gène chez la souris a permis de mettre en évidence un phénotype de létalité embryonnaire ainsi que des défauts au niveau du tube neural et dans la formation du muscle squelettique (Franz et al., 1993). L'expression de *Pax7*, comme celle du gène *Pax3*, est retrouvée durant le développement du système nerveux et musculaire chez l'embryon (Jostes et al., 1990). Cependant, concernant la myogénèse, elle est plutôt caractéristique des cellules souches musculaires où son taux d'expression est élevé (Figure 22).

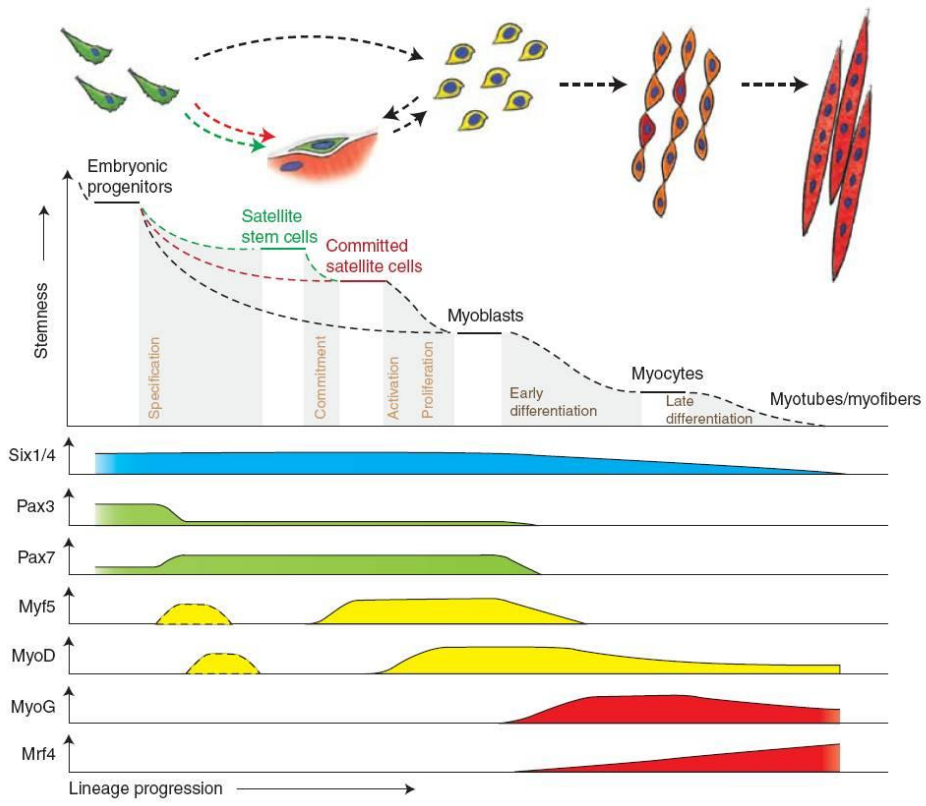


Figure 22 : Les étapes de la myogénèse embryonnaire.

Les progéniteurs embryonnaires (Pax3+) donnent naissance aux myoblastes impliqués dans la formation du muscle embryonnaire (ligne pointillé noire). Après la naissance, ils donnent naissance aux cellules satellites (Pax7+) (lignes pointillées verte et rouge). (Bentzinger et al., 2012).

La détermination des cellules progénitrices est possible grâce à un groupe de facteurs de transcription spécifiques du muscle, les MRFs (Myogenic Regulatory Factors), qui ont pour fonction d'orchestrer la différenciation myogénique. Ce sont les protéines MyoD et Myf5, qualifiées de MRFs primaires car impliquées dans la détermination des myoblastes, et les protéines Myogénine et Mrf4 impliquées plus tardivement au cours de la myogénèse, qui jouent ce rôle à différentes étapes de la différenciation musculaire. Lorsque les gènes *MyoD*, *Myf5*, *Myogénine* et *Mrf4* sont exprimés dans des cellules non musculaires, ces dernières sont capables d'entrer en différenciation myogénique (Bentzinger et al., 2012).

Il a été observé que MyoD et Myf5 jouent tous deux un rôle très important dans la formation du muscle squelettique. En effet, des souris n'exprimant pas le gène *Myod* ou le gène *Myf5* présentent un développement normal du muscle squelettique. Cependant, lorsque les deux gènes sont invalidés simultanément, une absence des muscles squelettiques est observée car ces souris ne possèdent pas de précurseurs de myoblastes, et bien que les souris soient viables à la naissance, elles meurent très rapidement (Rudnicki et al., 1993). Il a été montré finalement que Myod est nécessaire à la régulation du développement musculaire des membres alors que Myf5 régule le développement des muscles du tronc (Kablar et al., 1997). Après la première étape de spécification des cellules progénitrices en myoblastes, ces dernières vont entamer leur différenciation tout d'abord en myocytes mononucléés qui, après fusion, formeront les myofibres multinucléées. C'est lors de ces étapes qu'interviennent Mrf4 et Myogénine. En effet, l'invalidation du gène *Myogénine* entraine une mort prématurée et une désorganisation du tissu musculaire qui se traduit par une forte présence de cellules mononucluéées (myoblastes bloqués avant l'entrée en différenciation et myocytes incapables de fusionner) dans les tissus musculaires (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). Le facteur de transcription Mrf4 est, quant à lui, impliqué principalement dans la fusion et la maintenance des fibres musculaires. L'invalidation de ce gène entraine une forte augmentation de l'expression de la Myogénine, ce qui aboutit à une fusion excessive des myocytes (Zhang et al., 1995).

b) <u>Myogénèse post-natale</u>

La myogénèse post-natale intervient après la naissance, suite aux deux premières vagues de fusion de myocytes. Suite à ces deux vagues de fusion, le nombre de fibres musculaires devient constant (White et al., 2010). La taille des fibres augmente par la suite grâce à la fusion de myocytes, visible par l'augmentation du nombre de noyaux présents dans la fibre musculaire, et grâce à une augmentation du volume du sarcoplasme. Cette myogénèse post-natale est assurée par les cellules satellites.

3. Les cellules satellites, cellules souches musculaires

La plupart des tissus, chez l'adulte, possède des cellules souches localisées au sein d'une niche qui leur permet de maintenir un état de quiescence. Au sein du muscle squelettique, ces cellules souches, qui portent le nom de cellules satellites, ont été identifiées en 1961 chez la grenouille et doivent leur nom à leur localisation à la périphérie des fibres musculaires, entre la membrane plasmique de la fibre et la lame basale (Mauro, 1961; Schultz, 1976) (Figure 23). De plus, il a été observé qu'elles sont le plus souvent situées à proximité de capillaires sanguins (Christov et al., 2007). Les cellules satellites sont ancrées au sarcolemme des fibres musculaires avant la mise en place de la lame basale. Elles se caractérisent par l'expression du gène *Pax7*. Elles participent à la croissance post-natale du muscle squelettique ainsi qu'à la régénération musculaire permettant la réparation du muscle suite à des lésions. A la naissance, chez la souris, le nombre de cellules satellites représente environ 32% du nombre de noyaux du muscle, puis ce nombre est fortement réduit puisqu'il est seulement de 5% chez les souris adultes (2 mois) (Seale and Rudnicki, 2000).

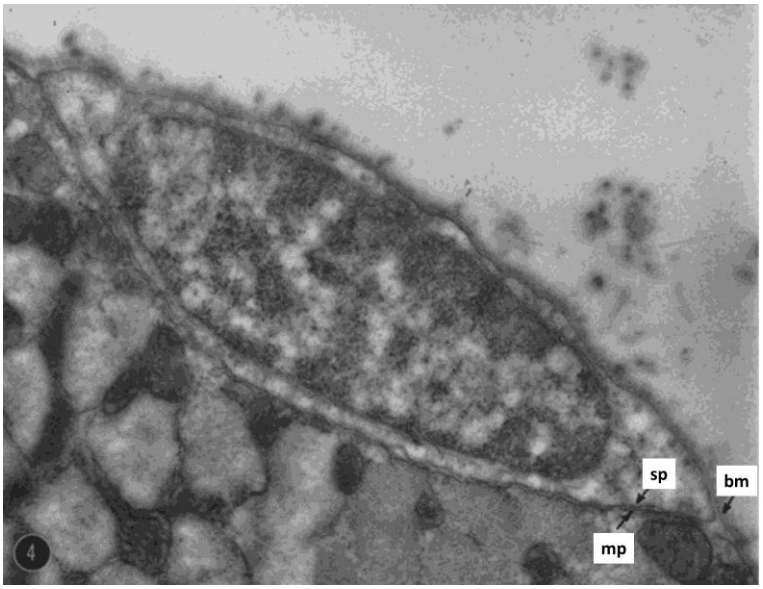


Figure 23 : Photo d'une coupe transversale de cellule satellite.

La cellule satellite est positionnée le long de la membrane plasmique de la fibre musculaire (mp) et est recouverte de la lame basale (bm) qui enveloppe toute la fibre musculaire. (Image tirée de Mauro, 1961).

a) Origine des cellules satellites

Les cellules satellites proviennent de la population de cellules *Pax3/Pax7* positives présentes dans le dermomyotome. En effet une partie de cette population s'engage dans la voie myogénique sous l'action des MRFs, devenant alors des myoblastes, afin de former le muscle squelettique. Cependant, une portion de cette population, qui présente un taux de *Pax3* diminué alors que le taux de *Pax7* est augmenté (Figure 22), maintient sa prolifération tout au long du développement musculaire et vient se positionner à la surface des fibres musculaires au sein du muscle post-natal. Cette mise en place se fait progressivement jusqu'à environ 21 jours après la naissance.

Les mécanismes impliqués dans l'entrée en quiescence des cellules satellites dans le muscle post-natal, ne sont pas encore bien connus. Cependant, il n'existe pas une protéine responsable de la mise en place de cette quiescence, mais plutôt un ensemble de facteurs impliqués. Parmi ces facteurs, la *Myostatine* est retrouvée fortement exprimée dans les cellules satellites quiescentes, qui prolifèrent activement dès que l'expression de la *Myostatine* est inhibée (McCroskery et al., 2003), ce qui suggère que cette protéine est importante pour l'entrée et le maintien en quiescence des cellules satellites. De même, une étude récente montre que les péricytes, cellules entourant les capillaires sanguins, semblent impliqués dans l'entrée en quiescence des cellules satellites via le facteur ANGPT1 (Angiopoietine 1) (Kostallari et al., 2015). L'état de quiescence des cellules satellites est maintenu grâce notamment à la voie Notch puisque lorsque cette dernière est altérée, la réserve de cellules souches musculaires se trouve fortement réduite, conséquence d'un défaut de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation (Bjornson et al., 2012).

b) Caractéristiques des cellules satellites et de leur niche

Les cellules satellites se caractérisent par l'expression du facteur de transcription *Pax7*, mais également, dans certains muscles et pour certaines d'entre elles, par l'expression du gène *Pax3*. Bien que cette notion ne soit pas totalement admise, il semble que la population de cellules satellites ne soit pas homogène. En effet, lors d'une étude réalisée en 2000, il a été mis en évidence que la population de cellules satellites contient environ 80% de cellules M-cadhérine, Myf5 et CD34 positives définies comme étant des cellules quiescentes mais engagées dans la voie de progéniteurs myogéniques et prêtes à être activées si besoin, alors que les 20% de cellules restantes seraient des cellules satellites quiescentes permettant le maintien d'une population de cellules souches musculaires (Beauchamp et al., 2000). Cette hypothèse a été confirmée par la suite puisqu'il a été montré en 2007 qu'environ 10% de la population de cellules satellites (Pax7 positives) n'a jamais

exprimé le gène *Myf5.* Cette population restreinte, qui correspond aux cellules satellites quiescentes non engagées, est capable de donner naissance à des cellules Myf5 positives (progéniteurs myogéniques) mais également, grâce à une division asymétrique, à des cellules Myf5 négatives qui permettront le maintien d'un réservoir de cellules satellites quiescentes non engagées (Kuang et al., 2007). Cependant, il a été proposé récemment que la transcription de *Myf5* dans les cellules satellites n'entrave pas leur état de quiescence puisque les transcrits seraient séquestrés dans des granules mRNP (messenger ribonucleo-protein) grâce au miR-31. Lors de l'activation des cellules satellites, ces transcrits sont libérés et traduits en protéine permettant ainsi une entrée rapide dans la voie de différenciation myogénique (Crist et al., 2012).

Pour résumer, la population de cellules satellites pourrait être distinguée en deux sous-populations. La première se caractérise par l'expression de CD34 et Myf5 et représente une population de précurseurs myogéniques quiescents mais qui seront très rapidement activés en cas de régénération musculaire. La seconde population, plus restreinte, n'exprime pas les marqueurs CD34 et Myf5, et peut être définie comme une population de cellules souches quiescentes, capable de reformer la population de précurseurs myogéniques, et également capable de s'auto-renouveler pour maintenir un réservoir de cellules souches.

Il y a un équilibre entre auto-renouvellement, prolifération et différenciation des cellules satellites. En effet, un défaut dans leur capacité d'auto-renouvellement peut entrainer une diminution du réservoir de cellules satellites, alors qu'une capacité non régulée d'auto-renouvellement pourrait mener à une surpopulation de cellules souches musculaires (Kuang et al., 2008). C'est notamment le rôle de la niche des cellules souches adultes de maintenir cet équilibre. En effet, la niche représente un environnement dans lequel les cellules souches seront protégées de la différenciation et de la prolifération aberrante, grâce à un ensemble de signaux, provenant notamment de la fibre musculaire et de la lame basale, permettant de garder un équilibre entre la population de cellules souches qui doit rester constante, et les besoins du tissu (Scadden, 2006).

c) *Myogénèse adulte*

Le muscle est un organe possédant une impressionnante capacité à se régénérer suite à une lésion musculaire telle que peut en provoquer un effort intense, une myotoxine, ou encore une pathologie entrainant une importante atrophie. Ce sont les cellules satellites, quiescentes en situation normale bien que parfois sollicitées pour maintenir l'intégrité musculaire menacée par l'usure quotidienne, qui jouent ce rôle. En effet, suite à une lésion, une nécrose des tissus est

observée, ainsi qu'une réponse inflammatoire. Cela conduit à l'émission d'un ensemble de signaux au sein de la niche des cellules satellites, permettant ainsi leur activation et entrainant alors la prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement de ces cellules (Figure 24).

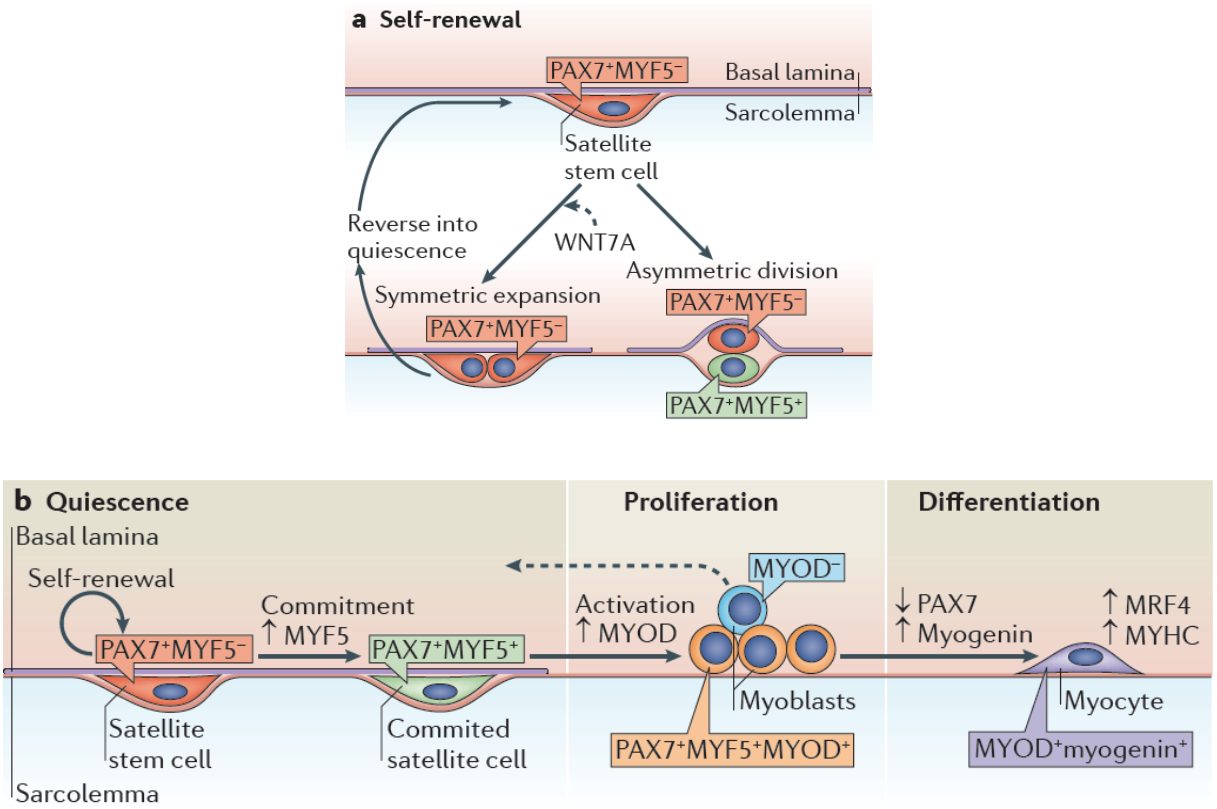


Figure 24 : Modèle proposé de l'activation et de l'engagement des cellules satellites durant la régénération musculaire.

Lorsqu'une lésion survient, les cellules satellites Myf5- donnent naissance à des cellules filles Myf5+ engagées qui participeront à la régénération musculaire, et à des cellules filles Myf5- via une division asymétrique. De même, elles peuvent donner naissance à deux cellules filles Myf5- grâce à une division symétrique (Figure a). Ce mécanisme permet un auto-renouvellement des cellules satellites quiescentes. Les cellules Myf5+ vont en parallèle entrer en prolifération et exprimer le gène MyoD formant ainsi une population de cellules appelées myoblastes. Parmi ces cellules, certaines cesseront d'exprimer MyoD pour retourner à un état de quiescence, alors que les autres entreront en différenciation avec l'expression de la Myogénine (Figure b), devenant des myocytes qui fusionneront pour donner de nouvelles fibres musculaires. (Wang and Rudnicki, 2011).

Les étapes de la myogénèse adulte

La première étape qui survient après la lésion musculaire est la nécrose des fibres musculaires ainsi que la réponse inflammatoire. Les macrophages phagocytent les débris cellulaires et sécrètent les cytokines anti-inflammatoires TNF-α (tumor necrosis factor) et IL-1 et 10 (interleukine-1 et 10). En parallèle, les cellules satellites quiescentes sont activées via différents signaux, tels que les protéines de la famille des FGF (fibroblast growth factor) et HGF (hepatocyte growth factor), provenant de la fibre musculaire.

La seconde étape consiste en la réparation du muscle par les cellules souches musculaires. Ces dernières, du moins celles exprimant les gènes *Myf5* et *Pax7*, entrent en intense prolifération afin de fournir une importante quantité de myoblastes qui pourront reformer de nouvelles fibres. Pour cela, elles commencent à exprimer le gène *MyoD*, en plus des gènes *Pax7* et *Myf5*, et entrent alors dans le cycle cellulaire pour proliférer (Figure 24). Parmi ces myoblastes, certaines sont capables de retourner à l'état de quiescence en réprimant l'expression du gène *MyoD*. Ce mécanisme est possible grâce à l'expression du gène *Sprouty1* (*Spry1*), un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase. Il a été observé que les cellules quiescentes expriment un fort taux de *Spry1*. De même, lors de la régénération musculaire, les cellules activées présentent une expression de *Spry1* réprimée, expression qui sera réactivée dans les cellules entrant de nouveau en quiescence. *Spry1* est nécessaire à ce retour à l'état de quiescence puisqu'en absence de ce gène, les cellules satellites engagées sont incapables de retourner à l'état de quiescence, ce qui entraine une diminution de la réserve de cellules satellites quiescentes (Shea et al., 2010).

Afin de maintenir une réserve de cellules souches quiescentes, les cellules Pax7+/Myf5- sont également capables d'auto-renouvellement. Elles entrent en division pour donner des cellules Pax7+/Myf5- et Pax7+/Myf5+. Cette division asymétrique présente un axe de division perpendiculaire à la fibre musculaire (Figure 24a) où la cellule Myf5+ est du côté de la fibre musculaire, alors que la cellule Myf5- reste attachée à la lame basale. La protéine Numb, qui inhibe la voie Notch, est impliquée dans les divisions asymétriques. En effet, du fait de sa localisation asymétrique au sein de la cellule, seule une des cellules filles hérite des protéines Numb lui permettant de s'engager dans la voie de la différenciation en inhibant la voie Notch (Luo et al., 2005; Shinin et al., 2006). Les cellules Pax7+/Myf5- sont également capables de se diviser de façon symétrique (axe de division parallèle à la fibre musculaire) afin de donner naissance à deux cellules filles identiques Pax7+/Myf5-. C'est la protéine Wnt7a, impliquée dans la voie de signalisation Wnt, qui permet de promouvoir ce type de division grâce à la présence à la surface des cellules de son récepteur : Frizzled7 (Fzd7) (Le Grand et al., 2009).

Les cellules satellites quittent leur niche et migrent vers le site de la lésion musculaire. Ce sont alors des myoblastes (Figure 24). Cette phase de prolifération est très rapidement suivie de la différenciation des myoblastes ainsi obtenus en myocytes qui fusionnent afin de former les nouvelles fibres musculaires. Dans un premier temps ces fibres sont très fines, et se caractérisent par la production de MyHC (Myosin heavy chain) embryonnaire. Elles sont également caractérisées par une localisation centrale des noyaux qui prendront plus tard leur position à la périphérie de la fibre.

Enfin la dernière étape est celle de la maturation des myofibres nouvellement formées, c'est-à-dire l'augmentation de leur taille suivie de la migration des noyaux à la périphérie de la cellule.

Les autres acteurs de la myogénèse adulte

Afin de vérifier l'importance des cellules satellites caractérisées par l'expression du gène *Pax7*, des souris modifiées génétiquement afin de permettre l'ablation des cellules Pax7 positives chez les souris adultes, suite à une induction spécifique, ont été créées. Il a alors été observé que, suite à l'ablation des cellules satellites, les muscles lésés par injection d'une myotoxine, la cardiotoxine, sont incapables de se régénérer complètement (Lepper et al., 2011). Cependant, les cellules satellites ne sont pas seules à permettre la formation de fibres musculaires. Il a, par exemple, été découvert qu'une population de cellules interstitielles exprimant le gène *Pw1/Peg3* (mais pas le gène *Pax7*, suggérant que ce ne sont pas des cellules satellites) et non issues de la lignée myogénique, participent à la croissance post-natale du muscle squelettique (Mitchell et al., 2010). De même, les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse sont capables de participer à la réparation du muscle après lésion. Cela a été observé sur des souris *mdx*, modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne, pathologie entrainant la destruction progressive des fibres musculaires, dans lesquelles ont été transplantées des cellules de moelle osseuse (Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999; LaBarge and Blau, 2002).

Chapitre IV. Objectifs

A l'heure actuelle plusieurs études ont permis d'établir le rôle du gène *H19* dans le développement embryonnaire et placentaire où il est fortement exprimé. Cependant, chez l'adulte, les études portant sur le rôle du gène *H19* sont restreintes principalement aux tumeurs. En effet son expression est inhibée après la naissance dans l'ensemble des organes à l'exception du muscle squelettique et cardiaque. Cela suggère que le gène *H19* a un rôle à jouer au sein de ces organes.

Le but de ma thèse a été d'étudier le rôle du gène *H19* dans le muscle squelettique et plus principalement dans les cellules souches musculaires où il est fortement exprimé.

Etant donné son implication durant la croissance embryonnaire, et du fait du phénotype de surcroissance observé chez les souris délétées pour le gène *H19* (appelées *H19Δ3*), nous avons, dans un premier temps, analysé le phénotype musculaire de ces souris, c'est-à-dire le nombre et la taille des fibres musculaires, mais également le nombre de cellules satellites disponibles pour la régénération musculaire.

Chez l'adulte, les cellules souches musculaires sont capables de rester en quiescence, mais lorsqu'elles sont activées, suite à une lésion musculaire, elles ont un potentiel de prolifération, de différenciation et d'auto-renouvellement dans lesquels nous avons supposé que le gène *H19* peut avoir un rôle à jouer. Nous nous sommes donc posé la question de l'effet que peut avoir une absence d'expression du gène *H19* sur ces caractéristiques des cellules souches musculaires. Pour répondre à cette question, des myoblastes primaires ont été isolés à partir de souris sauvages et de souris *H19Δ3* ainsi que de souris *H19Δ3* possédant un transgène du gène *H19* (appelée *H19Δ3/Tg*), sur lesquels des essais de prolifération et de différenciation cellulaires ont été réalisés.

Enfin, des essais de multiples régénérations nous ont permis d'étudier le rôle du gène *H19* dans la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites, ainsi que l'expression des gènes du réseau IGN durant la régénération musculaire.

Résultats

Partie I. L'IGN est réactivé durant la régénération musculaire sous le contrôle du gène *H19*.

Le gène *H19* est à l'origine d'un long ARN non codant fortement exprimé dans l'embryon. Nous avons montré au sein de notre équipe que ce long ARN est capable de moduler l'expression de neuf gènes appartenant à l'IGN (Gabory et al., 2006). Nous avons ensuite mis en évidence que le long ARN *H19* est capable de recruter la protéine MBD1 au niveau des DMR de trois de ces gènes (*Peg1*, *Slc38a4* et *Igf2*) affectant alors leur expression via la modulation des marques épigénétiques des histones H3K9me3.

Après la naissance, l'expression du gène *H19* est totalement réprimée dans l'ensemble des tissus à l'exception des muscles squelettiques et cardiaques. Nous avons donc choisi d'étudier le rôle du gène *H19* dans le muscle squelettique, et notamment durant la myogénèse. En effet, le gène *H19* a été identifié en 1987 lors d'une étude menée afin de rechercher des gènes impliqués dans la myogénèse, et isolé en même temps que le gène *MyoD* qui est l'un des facteurs importants de la myogénèse (Davis et al., 1987).

1. Les muscles des souris *H19Δ3* présentent une hypertrophie et une hyperplasie

Nous avions déjà observé que les souris *H19Δ3* présentent un phénotype de surcroissance de 8% par rapport à des souris *wt*. Nous avons donc étudié le phénotype des muscles de ces souris, qui présentent une augmentation de poids de 25%, et de façon intéressante, nous avons observé une hyperplasie, c'est-à-dire une augmentation du nombre de fibres musculaires par rapport aux souris *wt*, mais également une hypertrophie de ces fibres chez des souris adultes.

Afin de savoir à quel moment du développement apparait ce phénotype, nous avons étudié les muscles de souris de 6 jours et 21 jours après la naissance. Nous avons ainsi pu observer que l'hypertrophie n'apparait qu'après 21 jours alors que l'hyperplasie semble apparaitre bien avant puisque nous observons une légère augmentation du nombre de fibres dans les muscles *H19Δ3* à P6, qui est réellement significative à P21, comparée à des muscles *wt*. Cette hyperplasie serait due à une augmentation de la prolifération au cours de la myogénèse secondaire ayant lieu en période fœtale tardive.

Afin de comprendre comment le gène *H19* est capable de moduler le phénotype d'hypertrophie, nous avons étudié le taux d'expression de gènes affectant la croissance. Nous avons étudié la voie de signalisation des IGF et nous avons constaté que l'expression du gène *Igf2* est augmentée dans les muscles adultes *H19Δ3* comparé aux muscles *wt*, alors que les gènes *Igf2r*, *Igf1* et *Igf1r* ne sont pas affectés. Nous avons également étudié le taux d'expression du gène *Myostatine*, qui inhibe la croissance musculaire, et nous avons constaté qu'il est moins exprimé dans les muscles *H19Δ3* comparé aux muscles *wt*.

2. Le gène *H19* module le nombre de cellules satellites

Le gène *H19*, ainsi que de nombreux autres gènes de l'IGN, est fortement exprimé dans les cellules souches musculaires. Notre but a donc été de comprendre si les cellules satellites *H19Δ3* étaient affectées par l'absence d'expression du gène H19. Nous avons d'abord observé que le taux d'expression du gène *Pax7*, marqueur des cellules satellites, est réduit dans les muscles *H19Δ3*. Nous avons ensuite étudié le nombre de cellules satellites présentes sur des fibres isolées de souris *H19Δ3* et *wt*. Ce nombre est réduit de moitié en absence d'expression du gène *H19*, et la réintroduction d'un transgène *H19* (souris *H19Δ3Tg*) permet de restaurer le phénotype *wt*.

Les cellules satellites se mettent en place à partir de la fin de la période fœtale et jusqu'à 21 jours après la naissance, où elles entrent en quiescence pour former la réserve de cellules souches chez l'adulte. Nous avons ainsi observé qu'à 6 et 21 jours après la naissance, le nombre de cellules satellites n'est pas modifié en absence d'expression du gène *H19*, ce qui indique que la réduction de cellules satellites observée dans les muscles *H19Δ3* apparait après le sevrage. Enfin, nous avons pu montrer que les cellules satellites *H19Δ3* présentent un délai d'entrée en quiescence.

3. Le gène *H19* contrôle la prolifération des myoblastes

Le destin des cellules souches, lorsqu'elles sont activées, est de proliférer, se différencier, et s'auto-renouveler. Nous avons, dans un premier temps, étudié leur capacité à proliférer en utilisant des myoblastes primaires issus de souris *H19Δ3* et *wt* en culture dans un milieu inhibant leur différenciation. Nous avons observé qu'après 7 jours de culture, le nombre de myoblastes *H19Δ3* est plus élevé que le nombre de myoblastes *wt*, ce qui suggère que ces dernières ont un taux de prolifération réduit par l'expression du gène *H19*. De même, des lignées de myoblastes *H19Δ3Tg* présentent un taux de prolifération similaire à celui des *wt*.

Très récemment, il a été publié que le miR-675 est capable de promouvoir la différenciation des myoblastes (Dey et al., 2014). Nous avons donc choisi de ne pas en parler dans la publication mais mes résultats sur notre modèle murin sont présentés dans la seconde partie des résultats.

4. Les muscles *H19Δ3* se régénèrent normalement après lésion à la cardiotoxine (Ctx)

Afin d'étudier la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites, nous avons réalisé de multiples essais successifs de lésion à la cardiotoxine (Ctx). En effet, nous avons observé qu'après une seule lésion, les muscles *H19Δ3*, ainsi que les muscles *wt*, présentent une régénération totale. Ainsi le nombre réduit de cellules satellites disponibles dans les muscles *H19Δ3* n'a pas influencé leur capacité de régénération. Cependant, il se pourrait que le réservoir de cellules satellites soit affecté, en raison d'un défaut d'auto-renouvellement, nécessaire pour maintenir un taux constant de cellules souches. Nous avons alors réalisé quatre lésions successives, et constaté, à l'issue de cette expérience, que les muscles *H19Δ3* présentent une régénération complète, et même plus efficace que dans les muscles *wt.* L'étude histologique des muscles montre que le nombre de fibres n'est pas modifié entre les muscles *wt* et *H19Δ3*. Cependant, un petit pourcentage de fibres présente une hypertrophie comparée aux fibres *wt*.

Nous avons également évalué le taux d'expression des gènes *Pax7* et *Ki67* qui sont tous deux augmentés dans les muscles lésés, en absence d'expression du gène *H19*. Le taux d'expression des gènes de la famille IGF est également augmenté dans ces muscles.

5. L'expression des gènes de l'IGN est réactivée durant la régénération musculaire

L'expression de neuf gènes du réseau IGN est modulée en absence d'expression du gène *H19* dans le muscle embryonnaire, cependant, après la naissance, nous observons que seule l'expression du gène *Igf2* reste modulée sous l'action du gène *H19* dans le muscle squelettique.

Dans le muscle en régénération, 7 jours après la quatrième lésion, nous avons observé, chez des souris *wt*, que les gènes du réseau IGN sont principalement surexprimés par rapport aux muscles non lésés. De plus, cette surexpression induite par la lésion musculaire est retrouvée de façon plus importante dans les muscles *H19Δ3* lésés par rapport aux muscles *wt*.

Ces résultats indiquent que les gènes du réseau IGN, modulés par l'expression du gène *H19* dans le muscle embryonnaire sont surexprimés durant la régénération musculaire où ils sont de nouveau régulés par le gène *H19*.

H19 controls reactivation of the foetal imprinted gene network during muscle regeneration

Clémence Martinet[1], Paul Monnier[1,2], Yann Louault[1,3], Matthieu Benard[1], Anne Gabory[1,4] and Luisa Dandolo[1§]

[1] Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, University Paris Descartes, Paris 75014, France
[2] Present address : Institute of Molecular Health Sciences, Swiss Federal Institute of Technology, ETH, 8093 Zurich, Switzerland.
[3] Present address : Institut Curie, Unit "Nuclear Dynamics" UMR 3664 CNRS, 75248 Paris cedex 05, France
[4] Present address : INRA, UMR1198, Biology of Development and Reproduction, 78350 Jouy-en-Josas, France

Short tittle : *H19* and IGN in adult myogenesis

Keywords : satellite cells, quiescence, genomic imprinting, epigenetics

ABSTRACT

The imprinted *H19* locus controls foetal growth by regulating the expression of several genes belonging to an imprinted gene network (IGN). *H19* is fully repressed after birth in all tissues, with the exception of heart and skeletal muscle. Using loss-of-function $H19^{\Delta 3}$ mice, we investigated the biological function of *H19* in adult muscle. Mutant muscles display hypertrophy and hyperplasia. This phenotype is associated with increased *Igf2* expression and decreased *myostatin* expression. Imprinted genes are known to be expressed in muscle stem cells, also known as satellite cells. Unexpectedly, the number of satellite cells is reduced by 2-fold in $H19^{\Delta 3}$ muscle fibers. This reduction occurs only after the postnatal day P21, suggesting a link with the entry into quiescence of these muscle stem cells. We investigated the biological function of these mutant satellite cells *in vivo* by a regeneration assay induced by multiple injections of cardiotoxin. Surprisingly, despite the reduction in the number of satellite cells in the mutant mice, the self-renewal capacity of the satellite cells is fully retained in the absence of *H19*. In addition, we observe a better regeneration potential of the mutant muscles compared with *wt* muscles. This is accompanied by the enhanced expression of several genes from the IGN. We conclude that the *H19* locus exerts a fine-tuned regulation of the IGN at two specific times, at the foetal stage of development and during adult muscle regeneration.

INTRODUCTION

The *H19* gene produces an imprinted maternally expressed non-coding RNA (Brannan et al., 1990). This transcript is very abundant during murine embryonic development, being as highly expressed as β-*actin* (Poirier et al., 1991). A highly conserved stem loop structure in the first exon of the gene was discovered to produce a micro-RNA, called miR-675 (Pfeifer and Tilghman, 1994; Smits et al., 2008). Distinct roles during embryogenesis were identified for the long non-coding RNA and for the miR (Gabory et al., 2009; Gabory et al., 2010; Keniry et al., 2012). The production of mice carrying a targeted deletion of the gene, the $H19^{\Delta 3}$ strain, allowed us to identify an overgrowth phenotype in the absence of the *H19* gene. This phenotype is first detected in E15.5 embryos and continues in adult mice (Ripoche et al., 1997). Using both loss-of-function $H19^{\Delta 3}$ and gain-of-function *H19* transgenic ($H19^{Tg}$) animals, we identified nine other imprinted genes whose expression was increased in the absence of *H19* and rescued by the transgene (Gabory et al., 2009). These genes belong to an imprinted gene network described by several authors (Varrault et al., 2006; Lui et al., 2008; Berg et al., 2011; Al Adhami et al., 2015). These results suggest that *H19* controls growth of the embryo through a balanced expression of imprinted genes.

We then showed that this control of the IGN in the embryo is driven by an interaction of the *H19* non-coding RNA with the MBD1 methyl CpG binding protein. This complex directly affects the expression level of *Igf2*, *Mest*/*Peg1* and *Slc38a4*, by modulating the H3K9me3 histone marks on the differentially methylated regions (DMR) of these genes (Monnier et al., 2013). This suggests that imprinted genes are subject to epigenetic mechanisms on their DMRs that convey a strict control of their expression to produce a fine-tuned regulation of embryonic growth.

Since the more recent discovery of the miR-675, the question was raised of its potential role. It was shown to negatively regulate placental growth at the late stages of gestation, by affecting the expression of the *Igf1r* gene. Its excision from the exon 1 and its processing by DROSHA into a pre-miRNA is inhibited by the HuR protein in early gestation placenta as well as in the embryo (Keniry et al., 2012).

The *H19* gene is strongly repressed after birth in all murine tissues, but it remains expressed in skeletal muscle and heart in the adult, suggesting an important function for this gene in these tissues. Interestingly, *H19* was also identified under the name of *MyoH* in the same selective screen that pinpointed *MyoD* as a key factor in muscular differentiation (Davis et al., 1987). Recently, it has also been observed that the miR-675 promotes differentiation of myoblast cell lines (Dey et al., 2014).

Our aim was to investigate the role of *H19 in vivo* during adult myogenesis in our $H19^{\Delta 3}$ model. Myogenesis is determined by several myogenic regulatory transcription factors, the MRFs, which include Pax7, Pax3, Myf5, Myod, Myogenin and MRF4 (Sabourin and Rudnicki, 2000; Buckingham, 2007; Buckingham and Relaix, 2007). Muscles are composed of multinucleated myofibers, resulting from the differentiation of myoblasts under the control of these different MRFs. During embryogenesis, primary and secondary myogenesis result in the production of the myoblasts

and myotubes composing the final adult muscle fibers. Satellite cells, characterized by the expression of the *Pax7* gene, are located at the surface of the myofibers and are identified as muscle stem cells. The satellite cells appear and proliferate in the embryo at the end of gestation (E16.5) and their number is considered definitive around 21 days after birth. These satellite cells then enter into quiescence and remain in this state all through the adult life. However they are activated upon injury of a muscle and contribute to the regeneration capacity of muscle tissue, by proliferation and differentiation steps in order to produce newly formed myofibers. This is accompanied by an important self-renewal step to help maintain this stem cell population (Sambasivan and Tajbakhsh, 2007; White et al., 2010). Interestingly, the IGN appears to play a role in the satellite cells as shown by the expression of many imprinted genes in these cells (Yan et al., 2003; Berg et al., 2011; Al Adhami et al., 2015).

We show here that the overgrowth phenotype of the $H19^{\Delta 3}$ mice is associated with muscle hypertrophy and hyperplasia. This phenotype is linked with higher proliferation of $H19^{\Delta 3}$ myoblasts compared with *wt* myoblasts and with higher expression of *Igf2* and reduced expression of *myostatin*. *H19* is highly expressed in satellite cells and this led us to investigate the status of these cells in the mutant muscles. Unexpectedly, a two-fold reduction in the number of satellite cells was observed in adult $H19^{\Delta 3}$ mice compared with *wt* controls. To evaluate the biological function of these satellite cells *in vivo*, we investigated their regeneration capacity and their self-renewal status.

Material and methods

Mouse strains

All experimental designs and procedures were in agreement with the guidelines of the animal ethics committee of the Ministère de l'Agriculture (France).

The $H19^{\Delta 3}$ and $H19^{Tg}$ gain-of-function mice were previously described (Ripoche et al., 1997; Gabory et al., 2009). The $H19^{\Delta 3}$ strain is maintained on the 129SV/Pas background.

Mutant $H19^{\Delta 3}$ females were mated with $H19^{Tg}$ males (C57BL/6/CBA backgound) to obtain $H19^{-/+/Tg}$ mice. $H19^{-/+/Tg}$ females were mated with *wt* males to obtain litters of $H19^{-/+}$, $H19^{-/+/Tg}$ and *wt* mice on a similar genetic background. $H19^{-/+}$($H19^{mat\ \Delta 3/pat\ wt}$) mice are identical to $H19^{-/-}$ mice because of the imprinted status of the gene.

Histology and immunostaining

Tibialis anterior and *EDL* (*extensor digitorum longus*) muscles of P6, P21 or six-week-old male mice from each genotype were dissected and fixed during 4h at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) and washed in PBS as described previously (Le Grand et al., 2012). After incubation in PBS - 10% sucrose overnight at 4°C, samples were incubated in PBS - 10% gelatin - 10% sucrose, then included in 10% gelatin and frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Sections were obtained (7 µm) using a Leica CM1850 cryostat and stained with hematoxylin-eosin or immunostained using anti-Pax7 (Santa Cruz), anti-Ki67 (Abcam) and anti-Laminin (Sigma) antibodies. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG and Alexa Fluor 546 anti-rabbit IgG (Life Technologies). The sections were mounted and the images were captured with an Olympus BX63 microscope. Image analysis was performed with the ImageJ software.

Single myofiber isolation and staining

Single myofibers were isolated from the *EDL* muscles of P21 or six-week-old male mice as previously described (Pasut et al., 2013). Freshly isolated fibers were fixed in 4% PFA,blocked in PBS - 5% horse serum - 0.5% Triton X100 during 1 h at room temperature and stained with anti-Pax7 antibodies (Santa-Cruz) at 4°C overnight. The samples were washed in PBS and incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies). Nuclei were counterstained with DAPI.

Primary myoblast isolation and cell proliferation assay

Primary myoblasts were isolated from limb muscles of P21 and six-week-old male mice as described previously (Le Grand et al., 2012). For the 129SV/Pas *wt* and $H19^{\Delta 3}$ cultures, two mice for each genotype were dissected. For the C57BL/6/CBA backgound, three mice for each genotype were used. Muscles were digested in collagenase B (10 mg/ml)/Dispase (3.2 mg/ml) (Roche) at 37°C during 30 minutes. Cells were filtered, centrifuged and plated on collagen coated dishes and cultured in growth medium (F10 Ham's medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum, 5 ng/ml bFGF and 1% penicillin-streptomycin).

To determine the cell proliferation rate, early passages of primary myoblasts were seeded (50000 cells per well) on six-well plates coated with collagen and counted at different time points (Day 0 to Day 7). Experiments were performed in triplicate for each primary culture from each genotype and for each time point.

Muscle injury and regeneration assay

Muscle injury was induced by injecting 50 µl of snake venom cardiotoxin I (Ctx, Latoxan) (12 µmol/L in PBS) with 26G needles into the left *tibialis* muscle of six-week-old anesthesized males as described previously (Yan et al., 2003; Castets et al., 2011). For multiple regeneration assays, four successive Ctx injections were performed with an interval of 4 weeks between injections. Muscles were collected 7 days after the fourth Ctx injury, to extract RNA or perform histological analysis. The multiple regeneration experiment was performed three times on 5-6 male mice for each experiment and for each genotype.

RNA isolation and quantitative PCR assay

Total RNA was extracted using the Qiagen miRNeasy mini kit (Qiagen) with DNase treatment to remove the genomic DNA. 500 ng of total RNA were reverse-transcribed using the PrimeScript™ RT reagent kit (TAKARA). Quantitative Real Time PCR was performed on 10 ng of cDNA using SYBR® Premix Ex Taq™ (TAKARA) in a LightCycler 480 apparatus (Roche). Gene expression levels were normalized to the geometric mean of the expression level of *Mrpl32*, *SdhA* and *EiF4a2* housekeeping genes, as determined by Genorm analysis (Vandesompele et al., 2002). Primer sequences used for this study are listed in Table S1.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism software. Student's t-test, two-way Anova with Bonferroni post test and Kruskal-Wallis test with Dunn's post test were used, as indicated in the Figure legends.

RESULTS

H19$^{\Delta 3}$ muscles display hypertrophy and hyperplasia

H19$^{\Delta 3}$ mice display a general overweight increase of 8 to 10% compared with *wt* littermates (Ripoche et al., 1997; Gabory et al., 2009) (Figure S1). We have been able to link this phenotype to muscle overgrowth, since the *tibialis anterior* weight in *H19*$^{\Delta 3}$ mutants showed an increase of 25% compared with *wt* animals (6 week-old mice) (Fig. 1A).

To identify the cause of this overweight phenotype, *tibialis* and *EDL* muscles were collected from 6 week-old adults and sections were labelled with laminin (Fig. 1B). The cross-section area (CSA) was determined and showed both hypertrophy (2-fold increase) (Fig. 1C and D) and hyperplasia (40% increase) (Fig. 1E) of *H19*$^{\Delta 3}$ muscles compared with *wt* muscles.

To determine if these phenotypes were already established during the postnatal stage, *tibialis* muscles were collected from *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* mice at 6 (P6) and 21 (P21) days after birth. No difference in the CSA between the mutant and the *wt* muscles was found at either of these stages, therefore hypertrophy only sets in after P21 (Fig. 1G and I). In contrast, hyperplasia sets in earlier than hypertrophy: the number of fibers was slightly higher at P6, although not statistically significant (12%, p= 0.24) and at P21, *H19*$^{\Delta 3}$ *tibialis* muscles showed significant hyperplasia (39% increase) (Fig. 1H and J).

Two major signaling pathways control skeletal muscle growth: the insulin-like growth factor (IGF) pathway acts as a positive regulator of muscle growth, and the myostatin pathway acts as a negative regulator. To investigate these pathways, we performed expression analysis by RT-qPCR on *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ adult muscles (Fig. 1F). We identified an increase in the level of *Igf2* expression (1.5-fold) and a reduction of *myostatin* expression level (2-fold) in absence of *H19*. Other members of the IGF pathway such as *Igf2r*, *Igf1* and *Igf1r* showed no significant difference between *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* samples.

We concluded from these observations that hyperplasia is present at the postnatal stage. The number of muscle fibers is normally set between embryonic day 18 and birth (White et al., 2010). Our results suggest that an increased proliferation leading to hyperplasia occurs in the *H19*$^{\Delta 3}$ muscles, probably during the late foetal stage. In contrast, hypertrophy sets in only at the adult stage in the mutant muscles. The expression profiles of the *Igf2* and *myostatin* genes strongly suggest that these genes are responsible for the hypertrophic phenotype of the mutant mice.

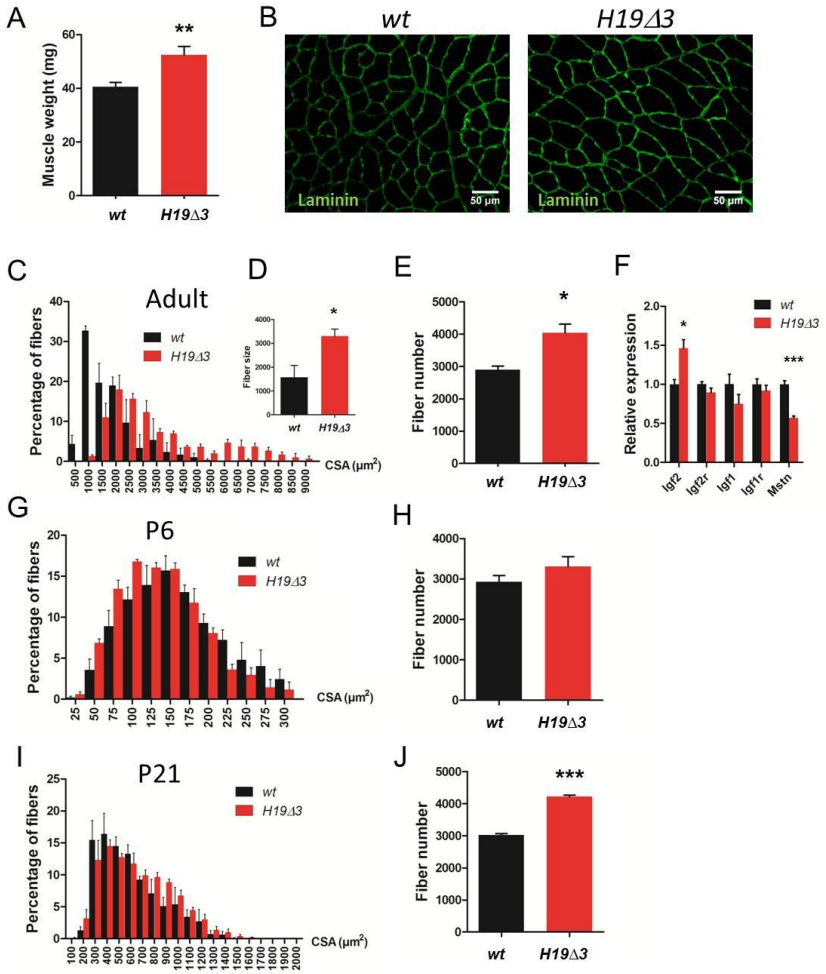


Figure 1. *H19* deletion induces muscle hyperplasia and hypertrophy.

(A) Weight of individual *tibialis* muscle from *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ six-week-old males (respectively n=12 and n=15). (B) Histological section of *tibialis* muscle from *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ mice immunostained with laminin antibody. (C) Histogram of fiber CSA (µm^2) from *tibialis* of adult males (n=3/genotype), mean of fiber CSA is also represented as a bar graph (D). (E) Number of fibers per *tibialis* section from adult males (n=3 mice/genotype). (F) Transcript levels of genes from the IGF pathway and of *myostatin* (*Mstn*) were quantified by RT-qPCR in adult *tibialis* muscle (n=4 mice/genotype). (G-I) Histogram of fiber CSA (µm^2) from *tibialis* of P6 males (n=3/genotype) (G), and of P21 males (n=3/genotype) (I). (H-J) Number of fibers per *tibialis* section from P6 males (n=4/genotype) (H), and from P21 males (n=4/genotype) (J). Data are shown as mean ± SEM. Asterisks indicate that data are statistically significant (**, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 Student's t-test*). Abreviations: CSA, cross-sectioned area.

H19 deletion induces depletion of satellite cells

Since many imprinted genes, including *H19*, are expressed in satellite cells, we investigated if the absence of *H19* would have an effect on these cells. We first evaluated the expression of *Pax7*, a specific marker of satellite cells, in whole *tibialis* muscles by RT-qPCR (Fig. 2A). Interestingly, there was a significant decrease (35%) in the expression of this gene in *H19*$^{\Delta 3}$ muscles compared with *wt* muscles.

We then compared the number of satellite cells present on muscle fibers from *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* mice. For these experiments, the *EDL* muscle was used because of easier dissection of the muscle held by the tendon. Individual fibers were immunostained with anti-Pax7 antibodies and DAPI counterstaining (Fig. 2B). The number of satellite cells present on fibers showed a striking two-fold reduction on adult *H19*$^{\Delta 3}$ fibers, compared with *wt* fibers (Fig. 2C). In addition to this experiment, the number of satellite cells was compared on muscle fibers from *H19*$^{-/+}$, *wt* and *H19*$^{-/+/Tg}$ littermates. The results show a similar, although less pronounced, decrease in the number of satellite cells (25%) in *H19*$^{-/+}$ compared with *wt* muscle (Fig. 2D). The difference in the decreased number of satellite cells in the two experiments is probably due to the different backgrounds on which these mice were maintained, 129/SV for the first and C57BL/6/CBA/129 for the experiment including the transgene. The interesting observation came from the result of the *H19*$^{-/+/Tg}$ mice, since the presence of the *H19* transgene was able to rescue the reduced number of satellite cells and to restore a number similar to *wt* muscles.

Since satellite cells appear during late gestation and continue to proliferate during the postnatal stage up to P21, we performed anti-Pax7 labelling on P6 and P21 muscles. For the P21 stage, individual fibers were isolated from the *EDL* muscle and immunostained with anti-Pax7 antibodies and DAPI as above (Fig. 2E). For the P6 stage, because of the small size of the muscle samples, Pax7 detection was performed on frozen sections and included a co-labelling with anti-Laminin antibodies and DAPI counterstaining (Fig. 2F and G). The comparison of *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* muscles showed no difference in the number of satellite cells at these early stages. The reduction in the number of satellite cells therefore occurs during adult life. This could suggest that the establishment of quiescence is delayed in the mutant mice, with *H19*$^{\Delta 3}$ satellite cells continuing to be incorporated and fused into muscle fibers later than the P21 stage and thus reducing their number in the adult muscle.

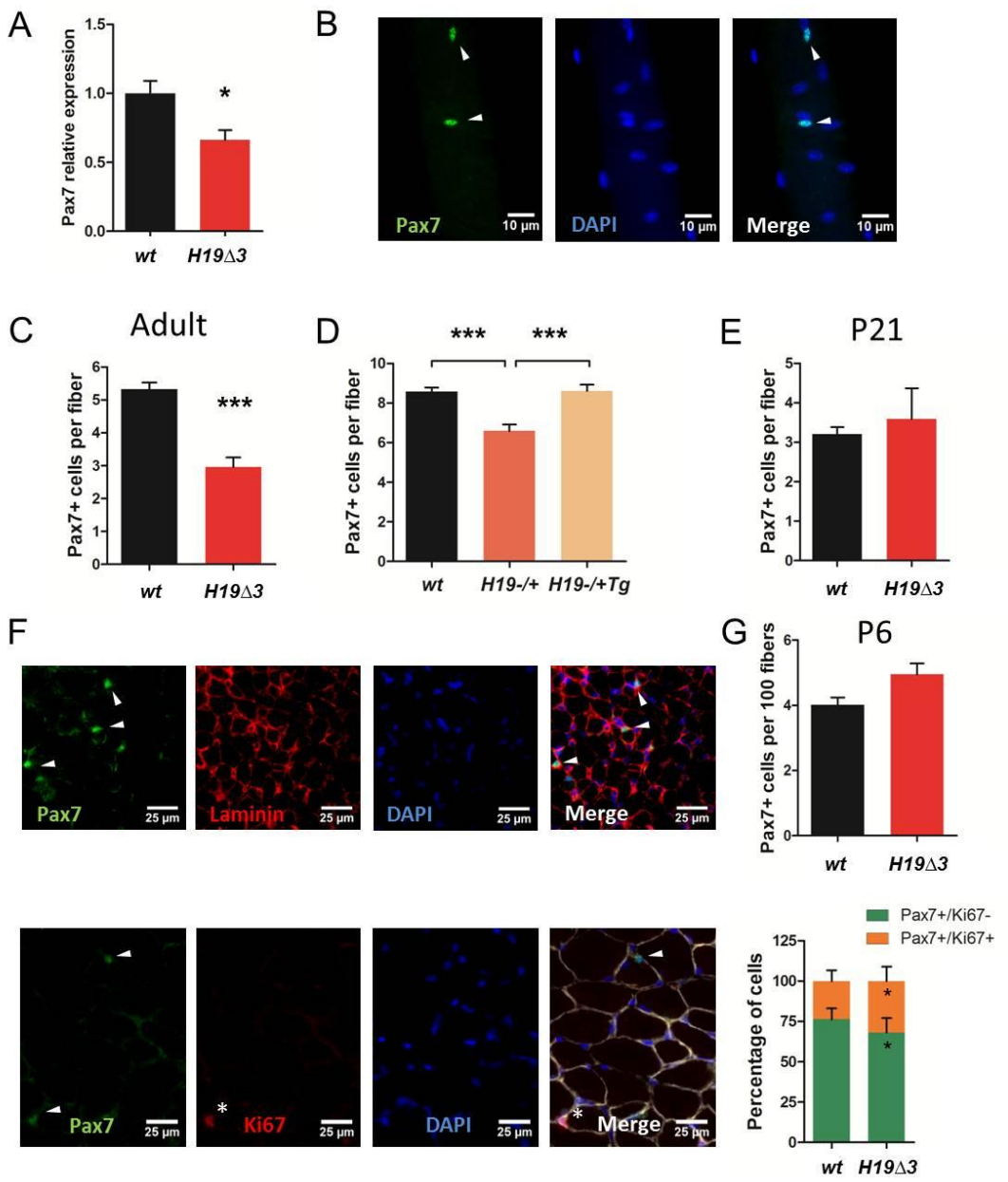


Figure 2. *H19* controls the number of satellite cells.

(A) Transcript level of the *Pax7* gene was quantified by RT-qPCR in adult *tibialis* muscle (n=4 mice/genotype). (B) Immunostaining of quiescent satellite cells. Arrowheads indicate Pax7 positive cells (green) on isolated myofiber. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). (C) Mean number of quiescent satellite cells per *EDL* myofiber of *wt* and $H19^{\Delta 3}$ adult mice (n= mean of 130 fibers from 4 mice/genotype). (D) Mean number of quiescent satellite cells per *EDL* myofiber of *wt*, $H19^{-/+}$ and $H19^{-/+/Tg}$ adult mice (n=4 mice/genotype). (E) Mean number of quiescent satellite cells per *EDL* myofiber of *wt* and $H19^{\Delta 3}$ P21 mice (n=3 mice/genotype). (F) *EDL* cryosection from P6 males immunostained with Pax7 (green) and Laminin (red) antibodies. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Arrowheads indicate Pax7 positive cells. (G) The mean number of Pax7 positive cells per 100 fibers/section is represented as a bar graph (n=4/genotype). (H) *EDL* cryosection from P21 males immunostained with Pax7 (green) and Ki67 (red) antibodies. Nuclei are counterstained with DAPI. Laminin staining is shown in white in the merge. Arrowheads indicate Pax7 only positive cells. Stars indicate Pax7/Ki67 positive cells. (I) The ratio of Pax7+/Ki67+ versus Pax7+/Ki67- cells from either *wt* or $H19^{\Delta 3}$ sections is represented as a bar graph (n=4 /genotype). Data are shown as mean ± SEM. Asterisks indicate that data are statistically significant (*, *p<0.05;* ***, *p<0.001; Student's t-test (C,E,G,I) and Kruskall-Wallis test with Dunn's post test (D)*).

To investigate this, we performed simultaneous Ki67 and Pax7 immunostaining at the P21 stage, when the satellite cells enter into quiescence (Fig. 2H and I). The ratio of Pax7/Ki67+ versus Pax7/Ki67- at this stage shows the ratio of active satellite cells versus quiescent cells. The number of active satellite cells is higher in the *H19*$^{\Delta 3}$ P21 sections (2.3 fold increase). This suggests that the *H19*$^{\Delta 3}$ satellite cells have not yet reached full quiescence at this stage, reinforcing the idea that entry into quiescence is delayed in the mutants compared to *wt* muscles.

H19 controls proliferation of myoblasts

Since the fate of satellite cells is to proliferate, differentiate and self-renew, we first evaluated the proliferation capacity of *H19*$^{\Delta 3}$ myoblasts compared with *wt* myoblasts. Primary myoblasts were isolated from limb muscles of *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* adult mice. The myoblasts were maintained in culture in growth medium. Their growth rate was evaluated for 7 days and showed that the cell number was increased by 2-fold in the cells lacking *H19* compared with *wt* myoblasts (Fig. 3A).

We then used the gain-of-function transgenic mice and isolated myoblasts from *wt*, *H19*$^{-/+}$ and *H19*$^{-/+/Tg}$ littermates. We observed a rescue of the enhanced growth rate of the *H19*$^{-/+}$ myoblasts in the presence of the *H19* transgene (Fig. 3B). This suggests that the *H19* RNA itself is controlling myoblast number.

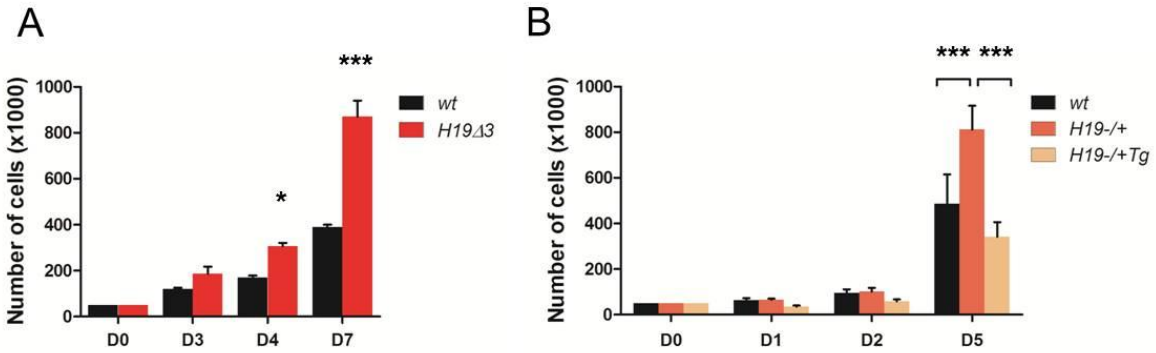


Figure 3. *H19* controls myoblast growth.

(A) Growth curves for *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ primary myoblast cultures (from 2 mice per genotype and triplicate time points) and (B) for *wt*, *H19*$^{-/+}$ and *H19*$^{-/+/Tg}$ primary myoblast cultures (from 3 mice per genotype and triplicate time points). Data are shown as mean ± SD. Asterisks indicate that data are statistically significant (*, *p<0.05;* ***, *p<0.001; two-way Anova, Bonferroni post test*).

H19$^{\Delta 3}$ satellite cells show normal regeneration capacity

To evaluate the biological function of the satellite cells *in vivo*, we investigated their capacity to perform muscle regeneration. Quiescent satellite cells are activated after muscle injury and participate in the production of new myofibers. Injection of snake venom (cardiotoxin, Ctx) into the *tibialis*

muscle induces injury of the muscle and allows to evaluate the regeneration capacity of satellite cells *in vivo*.

We performed a first Ctx injection in *tibialis* muscles from *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* male mice and collected injured muscles four weeks later. Sections of the injured muscles were stained with hematoxylin and eosin. The sections displayed normal muscle fibers with centrally located nuclei and they showed no difference in regeneration capacity at this stage between *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* samples (Figs. 4B and S2).

Repeated injury is a suitable model to assess the self-renewal ability of satellite cells and the long-term regeneration potential of skeletal muscle. We reasoned that if *H19*$^{\Delta 3}$ satellite cells had a self-renewal defect, multiple injections of Ctx would lead to poor regeneration after several rounds of injury. To investigate this question, we performed four series of injections of Ctx into the *tibialis* muscle of 6-week-old adult male mice, each separated by a period of 28 days (Fig. 4A). The experiment was repeated three times on 5-6 mice of each genotype in each experiment. After the third injection, muscles were collected after 28 days and sections were stained with hematoxylin and eosin. Regeneration was complete and very similar to what was observed after only one injection, suggesting that self-renewal of the satellite cells occurred normally in the mutant muscles.

It was described previously that the strongest change in gene expression is detected 7 days after injury (Andersen et al., 2013; Al Adhami et al., 2015). Therefore, muscles were collected at 7 days after the fourth injection. Interestingly, the injured *H19*$^{\Delta 3}$ muscles were larger than the *wt* injured muscle (Fig. 4C). A 12% increase in weight was observed for the mutant injured muscle compared with the *wt* injured muscle (Fig. 4 D) (n=7, p=0.0128).

Sections of these injured muscles showed similar regeneration efficiency, with centrally located nuclei. We performed anti-Laminin immunolabelling on these muscle sections and evaluated the number of fibers and their CSA. No difference in the number of fibers was detected. In contrast, a small percentage of fibers were larger in the *H19*$^{\Delta 3}$ compared with the *wt* muscles (Fig. 4E).

Expression levels of *Pax7* and *Ki67* were analysed by RT-qPCR on samples collected 7 days after the fourth injection (Fig. 4F). Higher levels of these two genes (1.5-fold and 2-fold increase respectively) were detected in the mutant samples compared with the *wt* samples. This suggests that although there is a reduced number of satellite cells in the mutant muscle, *H19*$^{\Delta 3}$ satellite cells are correctly activated after injury and even show increased proliferation compared with *wt* cells during the regeneration process. This is in agreement with the increased growth rate of mutant myoblasts compared with *wt* myoblasts, observed *in vitro* in the primary cultures (Fig. 3).

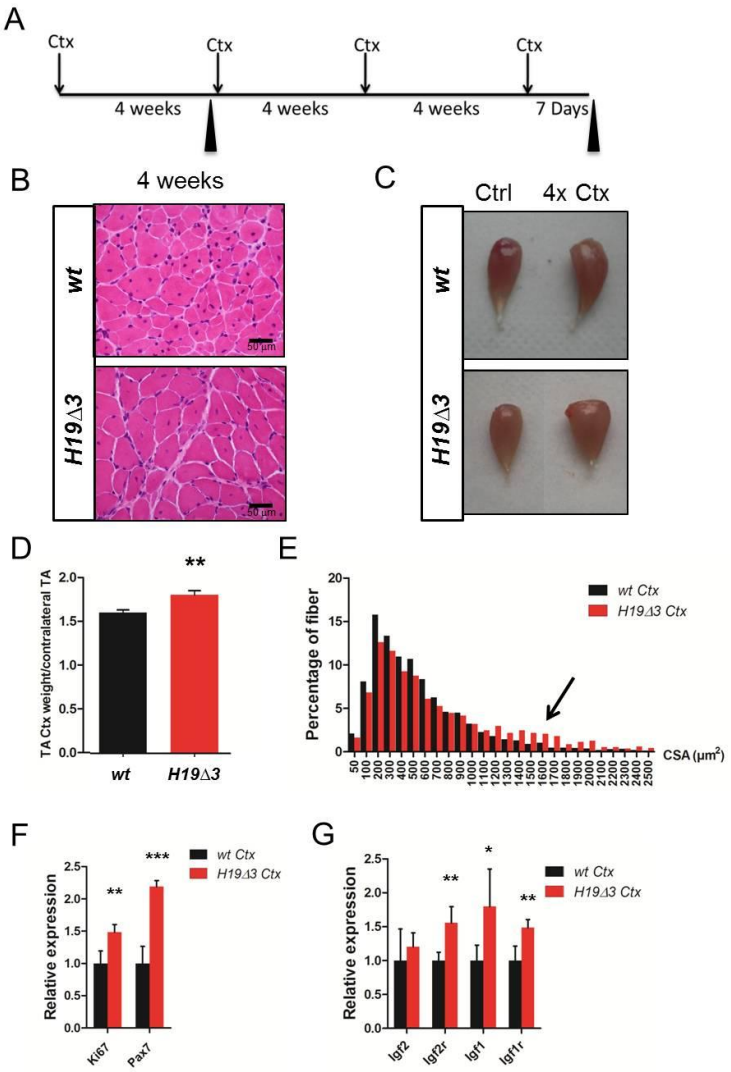


Figure 4. Regeneration assay by Cardiotoxin (Ctx) injection.

(A) Representation of the multiple Ctx assay. Arrowheads indicate time of collection of the muscles. (B) Sections of adult *tibialis* muscle from *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ mice after one Ctx injection stained with hematoxylin and eosin. (C) Picture of *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ muscles after 4 Ctx injections, with control contralateral uninjected muscle. (D) Weight of injured *tibialis* versus contralateral uninjected *tibialis* from *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ males (n=11). (E) Histogram of fiber CSA (µm^2) after 4 Ctx injections in *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ muscles. Arrow points to larger fibers in the mutant muscle. (F) Transcript levels of the *Pax7* and *Ki67* genes and (G) of the IGF pathway genes quantified by RT-qPCR in adult *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ injured *tibialis* muscles (n=4 mice/genotype). Data are shown as mean ± SEM. Asterisks indicate that data are statistically significant (*, *p<0.05;* **, *p<0.01;* ***, *p<0.001 Student's t-test*).

To investigate the reason for the increased weight and size of *H19*$^{\Delta 3}$ regenerated muscles, expression levels of genes involved in growth control were analysed. Whereas in uninjured muscle, only *Igf2* expression was increased in mutants, others genes of the IGF pathway also showed increased levels of expression after injury. *Igf1*, *Igf1r* and *Igf2r* showed higher expression levels (1.5-fold increase) in the mutant samples (Fig. 4G). This up-regulation of IGF pathway genes most certainly

accounts for the increased muscle weight and the hypertrophic fibers observed after the multiple Ctx injuries.

We concluded from these results that the *H19*$^{\Delta 3}$ satellite cells have a self-renewal capacity that is similar to that of *wt* satellite cells. Regeneration occurs normally in mutant mice, if not better than in *wt* mice. The weight increase observed for the regenerated mutant muscles could be associated with the increased proliferation of the *H19*$^{\Delta 3}$ myoblasts (suggested by the increase in *Ki67* expression) and with hypertrophic fibers with high levels of expression of genes from the growth controlling IGF pathway.

Imprinted gene network expression is induced upon muscle regeneration

Imprinted genes are co-expressed and co-regulated in foetal tissues and belong to an imprinted gene network (IGN). We had shown previously that *H19* controlled nine genes of the IGN during foetal development (Gabory et al., 2009; Monnier et al., 2013). To identify potential genes involved in the *H19* mutant muscle phenotype described above, we performed RT-qPCR experiments in muscles collected at different stages from *H19*$^{\Delta 3}$ and *wt* mice. Several genes from the imprinted gene network (IGN) were tested, such as *Igf2*, *Dlk1*, *Cdkn1c*, *Dcn*, *Peg3*, *Mest/Peg1*, *Igf2r* and *Slc38a4*.

No major significant alteration of expression was observed in muscles collected from P6 mice, with the exception of *Igf2* and *Dlk1* (15 to 20% increase) (Fig. 5A). We also tested P21 proliferating myoblast cultures and found no change in expression of any of these genes (Fig. S3). This suggests that the effect of the *H19* gene on the modulation of the IGN occurs essentially in the embryo as we had shown previously (Gabory et al., 2009) and not at postnatal stages. In adult muscles, *Igf2* expression remained up-regulated (50%) and was accompanied by a decrease in expression of *Dcn* and *Slc38a4* (20% and 50% respectively) (Fig. 5B). *Dcn* reduction can be correlated with the observed *myostatin* decrease (Fig. 1F), since both genes belong to the TGF-beta pathway (Kishioka et al., 2008).

We then performed the same analysis of these imprinted genes on uninjured and injured *tibialis* muscles, collected at 7 days after four rounds of Ctx injury. We first evaluated a possible effect of Ctx treatment on the reference genes and found no significant difference in their expression between control and Ctx samples (Fig. S4). A comparison of the expression profiles of the imprinted genes in *wt* mice showed a striking increase in levels of expression of *H19* (6-fold), *Igf2* (46-fold), *Dlk1* (4.5 fold), *Cdkn1c* (2-fold), *Peg3* (8-fold), *Mest/Peg1* (10-fold) and *Igf2r* (1.5-fold) (Figs. 5C and S5). In the *H19*$^{\Delta 3}$ injured muscles, a further enhancement of expression was detected for *Dlk1* (3.4-fold), *Cdkn1c* (2-fold), *Dcn* (1.5-fold), *Peg3* (2-fold), *Igf2r* (1.6-fold) and *Slc38a4* (1.6-fold) (Figs. 5D and S5). For the evaluation of the *Dlk1* level of expression, primers for both the membrane bound form and for the soluble form of Dlk1 were used and produced very similar results. We concluded from these results that *H19* and a set of genes from the IGN are strongly reactivated during regeneration and formation of new myofibers in adult muscle.

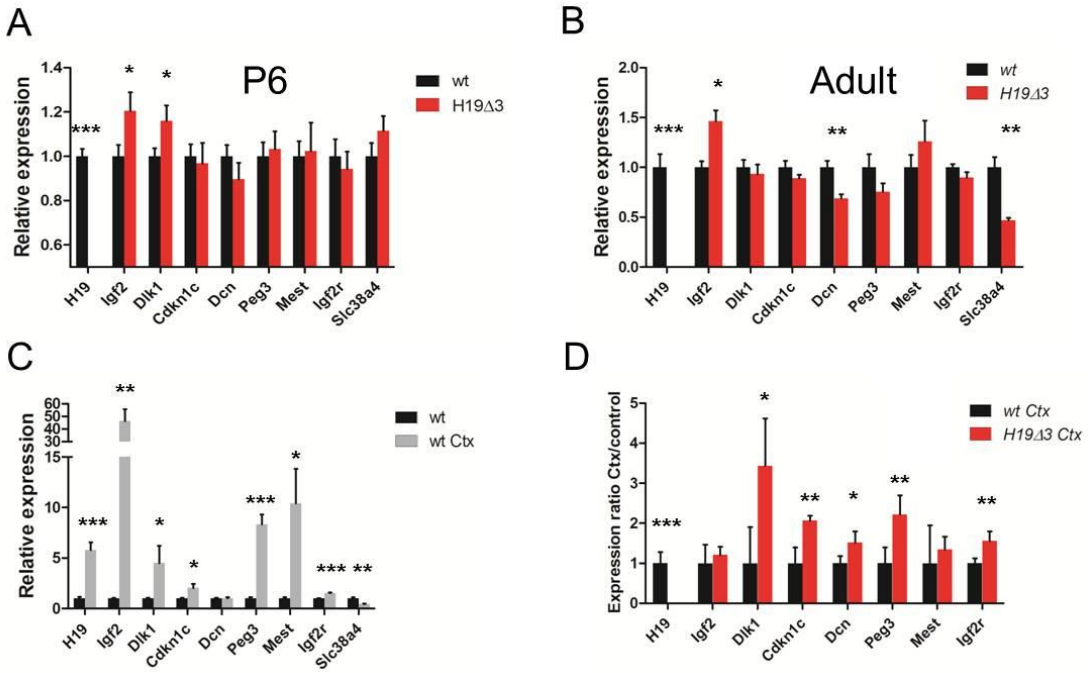


Figure 5. IGN expression is induced upon muscle regeneration.

(A) Transcript levels of the IGN genes in *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ *tibialis* muscles from P6 mice, (B) in uninjured *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ adult *tibialis* muscles, (C) in uninjured *wt* compared with injured *wt* Ctx adult *tibialis* muscles and (D) in injured *wt* Ctx compared with injured *H19*$^{\Delta 3}$ Ctx reported to uninjured muscle transcript levels. Data are shown as mean ± SEM. Asterisks indicate that data are statistically significant (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ *Student's t-test*).

DISCUSSION

H19 plays an important role during development in limiting growth of the embryo via a regulatory control of genes belonging to the IGN (Gabory et al., 2009; Gabory et al., 2010). Since *H19* remains expressed in the adult muscle, the $H19^{\Delta 3}$ mutant mice provide an interesting model to study the role of this gene in the adult. Our main findings show a role for the *H19* gene in the control of the number of satellite cells and of their proliferation in the adult muscle. We also show an effect of the *H19* gene in the process of muscle regeneration. Our results show an improved regeneration in a functional test of multiple rounds of injury. Interestingly, the analysis of the expression of imprinted genes from the IGN revealed a remarkable up-regulation of these genes during regeneration in the mutant mice, accompanied by increased muscle size. Our study of the $H19^{\Delta 3}$ mice provides a model for the regulation of the IGN in the context of muscle injury. This suggests that the embryonic regulatory function of *H19* on the IGN is reactivated during the regeneration process occurring in the adult muscle.

Our first observation was an increase in the weight of the $H19^{\Delta 3}$ muscles with hypertrophy and hyperplasia at the adult stage, compared with *wt* mice. Muscle fiber number is determined during development at the secondary myogenesis step, which occurs during late gestation and the total number of fibers is unchanged between birth and adult stage (White et al., 2010). We suggest that the increased proliferation observed in $H19^{\Delta 3}$ myoblasts compared with *wt* myoblasts must occur during the late foetal stage. This leads to the hyperplasia observed in the adult muscle. Muscle fiber size in contrast is under the control of growth controlling genes (Musaro et al., 2001). Hypertrophy observed in the adult mutant muscles could therefore be correlated to the increase in the expression levels of the *Igf2* and *Dlk1* genes, combined with the reduced expression of the *myostatin* gene. Our initial experiments in the $H19^{\Delta 3}$ embryos had revealed an up-regulation of the *Igf2* gene in the absence of *H19* (Ripoche et al., 1997). *Igf2* belongs to the IGF pathway, which confers positive growth regulation. Interestingly, *Igf2* expression is normally down regulated after birth and is replaced by expression of the *Igf1* gene. In the case of the $H19^{\Delta 3}$ mutants, the absence of *H19* seems to help maintain *Igf2* expression in adult muscle. *Dlk1* is another imprinted gene whose expression is enhanced in $H19^{\Delta 3}$ muscle, at least at the P6 stage. *Dlk1* is highly induced during normal muscle development and during regeneration (Andersen et al., 2009; Waddell et al., 2010). *Dlk1* is also one of the genes responsible for the callipyge phenotype in cattle (Charlier et al., 2001) and has been shown to induce hypertrophy (Davis et al., 2004; Waddell et al., 2010). One of the other main regulatory pathways of muscle growth is the *myostatin* pathway. This gene belongs to the TGF-beta family. *Myostatin* null mice show hypertrophy and hyperplasia of their muscles (Lee and McPherron, 2001). Exceptional muscle development of the Belgian Blue cattle has also been associated with a mutation in the *myostatin* gene (Grobet et al., 1997). *Myostatin* is considered as a powerful inhibitor of muscle growth. Its reduced expression in the $H19^{\Delta 3}$ muscles suggests that it could be a good candidate for the overgrowth phenotype of these mutants. A tight correlation between *myostatin* and *Igf2* expression has

been previously established (Kalista et al., 2012; Clark et al., 2015). Taken together, although other genes may also participate in this phenotype, we suggest that the up-regulation of the growth-promoting *Igf2* and *Dlk1* genes at the early postnatal P6 stage coupled with the reduced expression of *myostatin* in the adult muscle are good candidates for the hypertrophic phenotype observed in the $H19^{\Delta 3}$ mutant muscles.

Primary myoblast in culture show an enhanced growth rate in the absence of *H19,* which can be rescued by the *H19 Tg.* Although we have not pursued this study to identify the possible underlying mechanisms, this can be correlated with our previous identification of *H19* acting as a tumour suppressor (Yoshimizu et al., 2008).

We surprisingly observed a 2-fold reduction in the number of satellite cells present on the mutant muscle fibers. Satellite cells are produced during late gestation and proliferate during the early postnatal period. They cease proliferating and enter into quiescence around 21 days after birth, with their number remaining constant after this stage (Schultz et al., 1978; White et al., 2010). To understand the reason for this reduction, we compared the number of satellite cells in *wt* and mutant muscle fibers at different postnatal stages, P6 and P21 and found no difference. The reduction in the number of satellite cells was only observed in the adult muscle. The rescue of the number of satellite cells in the $H19^{-/+/Tg}$ strongly suggests that the *H19* gene is involved in the control of the number of satellite cells at some stage of their establishment.

H19 has previously been shown to affect quiescence of another category of stem cells, the hematopoietic stem cells (Venkatraman et al., 2013). A possible explanation for the observed reduction is that the entry into quiescence of satellite cells is delayed in the $H19^{\Delta 3}$ mutants. The number of satellite cells is fixed at a certain stage, but the mutant cells continue to be incorporated into adult muscles after P21 and only enter into quiescence at a later stage. This would lead to a reduced number of quiescent satellite cells in the adult mutant muscle. Our experiment showing a higher level of Pax7+/Ki67+ satellite cells in the mutant P21 muscles confirms this delay in the entry into quiescence. Quiescence perturbation could be a common feature of stem cells deficient for the *H19* gene.

At the molecular level, satellite cells may show a delay in their entry into quiescence because a certain number of genes involved in proliferation are not properly down-regulated in the satellite cells. A comparison of expression profiles of quiescent and activated satellite cells reveals a strong induction of several imprinted genes upon activation (Pallafacchina et al., 2010). These genes are *Mest/Peg1*, *Ndn*, *Cdkn1c*, *Gnas*, *Kvlqtot1* (all approximately 3 to 4-fold induced), *Slc38a4*, *Peg12*, *Igf2* (6-fold induction) and especially *Dlk1* (30 to 50-fold induction). If genes such as *Igf2* and *Dlk1* are not correctly repressed in the active $H19^{\Delta 3}$ satellite cells at the time of their entry into quiescence, this could lead to continued proliferation and would result in a delay in the mutant muscles.

Satellite cells display stem cell properties of self-renewal, proliferation and differentiation. To further investigate the biological capacities of *H19* deficient satellite cells, we focused on the regeneration capacity of these cells by performing injury on *tibialis* muscles. A first injection of Ctx results in efficient regeneration after 28 days both in *wt* and $H19^{\Delta 3}$ injured muscles. A delay in the regeneration efficiency at early times (14 days post injury) has been observed (Dey et al., 2014). We have also observed this delay in the $H19^{\Delta 3}$ injured muscles as early as Day 7, but regeneration appears to be rescued with time. This delay could be the initial reflection of the reduced number of satellite cells. As muscle repair proceeds, more efficient proliferation of the $H19^{\Delta 3}$ myoblasts compensates the reduced number of satellite cells and results in efficient regeneration after 28 days. Subsequent multiple rounds of injury show that the mutant satellite cells continue to perform their function and maintain a high muscle repair capacity. A significant increase in the weight of *tibialis* muscles after four rounds of Ctx injury was observed in $H19^{\Delta 3}$ mice. This improvement could be related not only to the higher growth rate of mutant myoblasts but also to the enhanced expression of genes from the IGF pathway, as *Igf1* has been shown to play a role in improving regeneration (Pelosi et al., 2007). Overall, the self-renewal capacity of the *H19* deficient satellite cells does not seem to be impaired, and once activated, their efficient proliferation capacity leads to improved regeneration.

We followed the expression levels of genes from the IGN in whole muscle at the P6 and adult stage, in P21 myoblast cultures and during regeneration experiments. Very few genes are affected during postnatal growth and at the adult stage in $H19^{\Delta 3}$ whole muscle. In contrast, in *wt* Ctx injured muscles, seven imprinted genes show increased expression (*H19*, *Igf2*, *Dlk1*, *Cdkn1c*, *Peg3*, *Mest/Peg1* and *Igf2r*). The involvement of genes from the IGN in regeneration has been previously described (Yan et al., 2003; Al Adhami et al., 2015). Our data provide a detailed quantification of the increased expression of IGN genes during *wt* regeneration. The strong increase in expression of *H19* and *Igf2* after injury can be related to the observed 2-fold increase in the expression of *Myod* (Fig. S6). This myogenic factor binds the mesodermal enhancers controlling expression of the *H19-Igf2* locus (Cao et al., 2010; Borensztein et al., 2013). Therefore an increase in *Myod* expression is expected to lead to a correlated increase in the expression of these two imprinted genes. In addition, we observe an enhanced up-regulation of most imprinted genes in the mutant injured mice compared with the *wt* injured mice. In the embryo, the absence of *H19* also induces up-regulation of these genes, suggesting that the IGN is subject to a fine-tuned control to achieve correct development of the embryo (Gabory et al., 2009). The regenerating muscle is recapitulating an embryonic programme, as evidenced by the expression of embryonic forms of myosin heavy and light chains in new myofibers (Whalen et al., 1990; Jerkovic et al., 1997). There is strong evidence for maternally expressed genes to limit growth, whereas paternally expressed genes enhance growth (Haig, 2004). A coordinated up-regulation of these genes during regeneration therefore provides a simultaneous balanced correlation between growth enhancement and growth reduction. This results in adequately controlled muscle production.

Enhanced expression of these genes during regeneration in $H19^{\Delta 3}$ muscles could explain the improved regeneration effect in the mutant mice after multiple rounds of injury.

The *H19* locus produces a long non-coding full-length RNA and a micro RNA, miR-675. In placenta, miR-675 was shown to control growth by repressing *Igf1r*, a direct target of the miR (Keniry et al., 2012). It was also previously shown that the miR-675 plays a role in inducing differentiation of myoblasts (Dey et al., 2014). During enhanced regeneration of $H19^{\Delta 3}$ muscles, *Igf1r* expression is clearly up-regulated, suggesting that the miR-675 may be responsible for part of this effect. Interestingly, a study performed on purified satellite cells has shown that miR-675 is not expressed in quiescent satellite cells but is expressed in activated satellite cells (D. Castel and S. Tajbakhsh, personal communication). Alternatively, since the *H19* RNA interacts with MBD1 to bring H3K9me3 repressive marks on some of its targets (*Igf2*, *Mest/Peg1* and *Slc34a8*), *H19* could act by repressing imprinted genes involved in the myogenic pathways through epigenetic modifications (Monnier et al., 2013). Another long non-coding RNA, *linc-MD1*, plays an important role in myogenesis, by targeting a myomiR called miR-133 (Legnini et al., 2014). Since the *H19* RNA has also been shown to act as a sponge for *let7* (Kallen et al., 2013), it could also interfere with the levels of other myomiRs. Whether the different effects of the *H19* locus on the control of the number and growth rate of satellite cells and on regeneration efficiency can be attributed to the full-length RNA or to the miR-675 remains to be elucidated.

Finally, the *H19-Igf2* locus is associated in humans with the Beckwith-Wiedemann syndrome, in which affected children show an increased predisposition to tumours such as Wilms tumours and rhabdomyosarcomas. This occurs particularly in cases of paternal unidisomies, and therefore is correlated to a lack of maternally expressed genes of the region (Cooper et al., 2005). *H19* has been shown to be a tumour suppressor (Hao et al., 1993; Yoshimizu et al., 2008). The enhanced muscle regeneration observed in our mutant mouse model could be considered as a first step of increased proliferation of myofibers lacking *H19*, possibly leading to tumourigenesis. However, we have never observed the appearance of tumours in our $H19^{\Delta 3}$ mouse colony over the years. Provided the mouse model can be applied to a human situation, this suggests that occurrence of rhabdomyosarcomas requires the absence of more than one tumour suppressor gene in Beckwith-Wiedemann children.

In conclusion, with this *in vivo* study, we have provided evidence that the imprinted *H19* locus plays a role during the foetal stage of development and during adult muscle regeneration, but not during the postnatal stage, through its fine-tuned regulation of other imprinted genes of the IGN.

Acknowledgements

We thank Dominique Daegelen, Pascal Maire, Fabien Le Grand and Shahragim Tajbakhsh for many helpful discussions. We are very grateful to Athanassia Sotiropoulos and Didier Montarras for critical reading of the manuscript. We thank the Animal House Core Facility

for their constant help and the Sequencing and Genomic Core Facility of the Cochin Institute for their technical support and advice. This work was supported by funding from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE11-0022-02 "Twothyme"). C.M. was awarded a fellowship from the Région Ile-de-France (DIM Biotherapy).

Author Contributions

C.M., P.M., Y.L. and A.G. performed experiments and analyzed data. M.B. helped with Ctx injection of the mice. L.D directed the project, analyzed data and wrote the manuscript. All authors contributed to critical reading and editing the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

Al Adhami, H., Evano, B., Le Digarcher, A., Gueydan, C., Dubois, E., Parrinello, H., Dantec, C., Bouschet, T., Varrault, A. and Journot, L. (2015). A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation. *Genome Res* 25, 353-67.

Andersen, D. C., Laborda, J., Baladron, V., Kassem, M., Sheikh, S. P. and Jensen, C. H. (2013). Dual role of delta-like 1 homolog (DLK1) in skeletal muscle development and adult muscle regeneration. *Development* 140, 3743-53.

Andersen, D. C., Petersson, S. J., Jorgensen, L. H., Bollen, P., Jensen, P. B., Teisner, B., Schroeder, H. D. and Jensen, C. H. (2009). Characterization of DLK1+ cells emerging during skeletal muscle remodeling in response to myositis, myopathies, and acute injury. *Stem Cells* 27, 898-908.

Berg, J. S., Lin, K. K., Sonnet, C., Boles, N. C., Weksberg, D. C., Nguyen, H., Holt, L. J., Rickwood, D., Daly, R. J. and Goodell, M. A. (2011). Imprinted genes that regulate early mammalian growth are coexpressed in somatic stem cells. *PLoS One* 6, e26410.

Borensztein, M., Monnier, P., Court, F., Louault, Y., Ripoche, M. A., Tiret, L., Yao, Z., Tapscott, S. J., Forne, T., Montarras, D. and Dandolo, L. (2013). Myod and H19-Igf2 locus interactions are required for diaphragm formation in the mouse. *Development* 140, 1231-9.

Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S. and Tilghman, S. M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* 10, 28-36.

Buckingham, M. (2007). Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol* 330, 530-3.

Buckingham, M. and Relaix, F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 645-73.

Cao, Y., Yao, Z., Sarkar, D., Lawrence, M., Sanchez, G. J., Parker, M. H., MacQuarrie, K. L., Davison, J., Morgan, M. T., Ruzzo, W. L., Gentleman, R. C. and Tapscott, S. J. (2010). Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Dev Cell* 18, 662-74.

Castets, P., Bertrand, A. T., Beuvin, M., Ferry, A., Le Grand, F., Castets, M., Chazot, G., Rederstorff, M., Krol, A., Lescure, A., Romero, N. B., Guicheney, P. and Allamand, V. (2011). Satellite cell loss and impaired muscle regeneration in selenoprotein N deficiency. *Hum Mol Genet* 20, 694-704.

Charlier, C., Segers, K., Karim, L., Shay, T., Gyapay, G., Cockett, N. and Georges, M. (2001). The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. *Nat Genet* 27, 367-9.

Clark, D. L., Clark, D. I., Hogan, E. K., Kroscher, K. A. and Dilger, A. C. (2015). Elevated insulin-like growth factor 2 expression may contribute to the hypermuscular phenotype of myostatin null mice. *Growth Horm IGF Res* 25, 207-18.

Cooper, W. N., Luharia, A., Evans, G. A., Raza, H., Haire, A. C., Grundy, R., Bowdin, S. C., Riccio, A., Sebastio, G., Bliek, J., Schofield, P. N., Reik, W., Macdonald, F. and Maher, E. R. (2005). Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 13, 1025-32.

Davis, E., Jensen, C. H., Schroder, H. D., Farnir, F., Shay-Hadfield, T., Kliem, A., Cockett, N., Georges, M. and Charlier, C. (2004). Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype. *Curr Biol* 14, 1858-62.

Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

Dey, B., Pfeifer, K. and Dutta, A. (2014). The *H19* long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes and Development* 28, 491-501.

Gabory, A., Jammes, H. and Dandolo, L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays* 32, 473-80.

Gabory, A., Ripoche, M. A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyyat, A., Forne, T., Jammes, H., Ainscough, J. F., Surani, M. A., Journot, L. and Dandolo, L. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* 136, 3413-21.

Grobet, L., Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17, 71-4.
Haig, D. (2004). Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet* 38, 553-85.
Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E. and Tycko, B. (1993). Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 365, 764-7.
Jerkovic, R., Argentini, C., Serrano-Sanchez, A., Cordonnier, C. and Schiaffino, S. (1997). Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle. *Cell Struct Funct* 22, 147-53.
Kalista, S., Schakman, O., Gilson, H., Lause, P., Demeulder, B., Bertrand, L., Pende, M. and Thissen, J. P. (2012). The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy. *Endocrinology* 153, 241-53.
Kallen, A. N., Zhou, X. B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J. S., Zhang, H., Min, W., Bennett, A. M., Gregory, R. I., Ding, Y. and Huang, Y. (2013). The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol Cell* 52, 101-12.
Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G. and Reik, W. (2012). The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol* 14, 659-65.
Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J., Hattori, A., Sharma, M., Kambadur, R. and Nishimura, T. (2008). Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. *J Cell Physiol* 215, 856-67.
Le Grand, F., Grifone, R., Mourikis, P., Houbron, C., Gigaud, C., Pujol, J., Maillet, M., Pages, G., Rudnicki, M., Tajbakhsh, S. and Maire, P. (2012). Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J Cell Biol* 198, 815-32.
Lee, S. and McPherron, A. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9306-11.
Legnini, I., Morlando, M., Mangiavacchi, A., Fatica, A. and Bozzoni, I. (2014). A feedforward regulatory loop between HuR and the long noncoding RNA linc-MD1 controls early phases of myogenesis. *Mol Cell* 53, 506-14.
Lui, J., Finkielstain, G., Barnes, K. and Baron, J. (2008). An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol Rev* 295, R189-196.
Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S. and Dandolo, L. (2013). H19 lncRNA controls gene transcription of the imprinted gene network by recruiting MBD1. *PNAS* 110, 20693-8.
Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L. and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 27, 195-200.
Pallafacchina, G., Francois, S., Regnault, B., Czarny, B., Dive, V., Cumano, A., Montarras, D. and Buckingham, M. (2010). An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res* 4, 77-91.
Pasut, A., Jones, A. E. and Rudnicki, M. A. (2013). Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *J Vis Exp*, e50074.
Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N., Molinaro, M. and Musaro, A. (2007). Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *Faseb J* 21, 1393-402.
Pfeifer, K. and Tilghman, S. M. (1994). Allele-specific gene expression in mammals: The curious case of the imprinted RNAs. *Gene Develop* 8, 1867-1874.
Poirier, F., Chan, C.-T. J., Timmons, P. M., Robertson, E. J., Evans, M. J. and Rigby, P. W. J. (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation *in vitro* and at the time of implantation in the developing embryo. *Development* 113, 1105-1114.
Ripoche, M. A., Kress, C., Poirier, F. and Dandolo, L. (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes and Dev* 11, 1596-1604.
Sabourin, L. A. and Rudnicki, M. A. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57, 16-25.
Sambasivan, R. and Tajbakhsh, S. (2007). Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol* 18, 870-882.

Schultz, E., Gibson, M. and Champion, T. (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 206, 451-6.
Smits, G., Mungall, A. J., Griffiths-Jones, S., Smith, P., Beury, D., Matthews, L., Rogers, J., Pask, A. J., Shaw, G., VandeBerg, J. L., McCarrey, J. R., Renfree, M. B., Reik, W. and Dunham, I. (2008). Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians. *Nat Genet* 40, 971-6.
Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Aknin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., Pavlidis, P. and Journot, L. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell* 11, 711-22.
Venkatraman, A., He, X. C., Thorvaldsen, J. L., Sugimura, R., Perry, J. M., Tao, F., Zhao, M., Christenson, M. K., Sanchez, R., Yu, J. Y., Peng, L., Haug, J. S., Paulson, A., Li, H., Zhong, X. B., Clemens, T. L., Bartolomei, M. S. and Li, L. (2013). Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 500, 345-9.
Waddell, J. N., Zhang, P., Wen, Y., Gupta, S. K., Yevtodiyenko, A., Schmidt, J. V., Bidwell, C. A., Kumar, A. and Kuang, S. (2010). Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration. *PLoS One* 5, e15055.
Whalen, R. G., Harris, J. B., Butler-Browne, G. S. and Sesodia, S. (1990). Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 141, 24-40.
White, R. B., Bierinx, A. S., Gnocchi, V. F. and Zammit, P. S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol* 10, 21.
Yan, Z., Choi, S., Liu, X., Zhang, M., Schageman, J. J., Lee, S. Y., Hart, R., Lin, L., Thurmond, F. A. and Williams, R. S. (2003). Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 278, 8826-36.
Yoshimizu, T., Miroglio, A., Ripoche, M. A., Gabory, A., Vernucci, M., Riccio, A., Colnot, S., Godard, C., Terris, B., Jammes, H. and Dandolo, L. (2008). The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12417-22.

SUPPLEMENTARY FIGURES

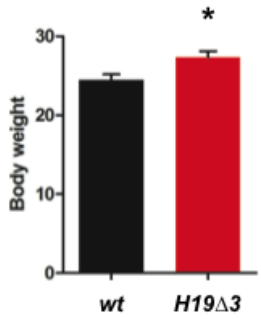


Figure S1. Adult *H19*$^{\Delta 3}$ mice show an overgrowth phenotype.

Body weight of adult (4 months) *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ mice (respectively n=16 mice and n=14 mice). Data are shown as mean ± SEM. Asterisk indicates statistically significant data (**, p<0.05 Student's t-test*).

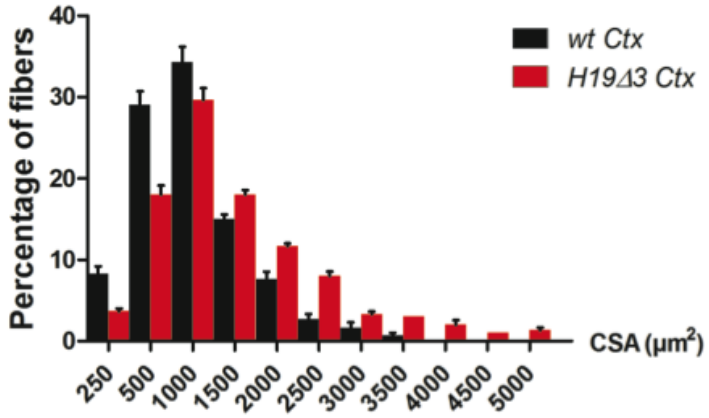


Figure S2. Regeneration assay after one Ctx injection.

Histogram of fiber CSA (µm^2) from injured adult *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ *tibialis* muscles (n=3/genotype). Data are shown as mean ± SEM.

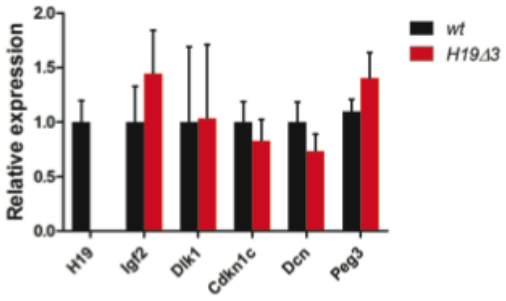


Figure S3. IGN expression in P21 myoblasts.

Transcript levels of the IGN genes in *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ myoblasts (n=3 primary myoblast cultures/genotype). Data are shown as mean ± SEM.

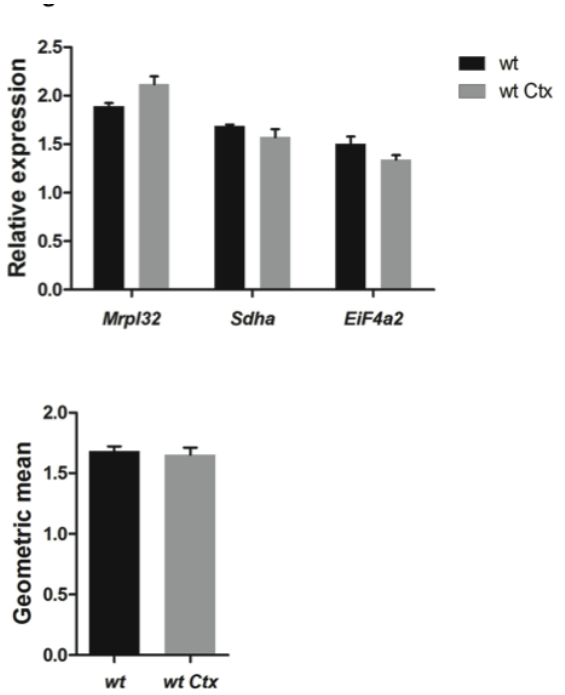


Figure S4. Transcript levels of reference genes.

RT-qPCR data for the three reference genes in control and Ctx-injected *tibialis* muscle samples. Data are shown as mean ± SEM.

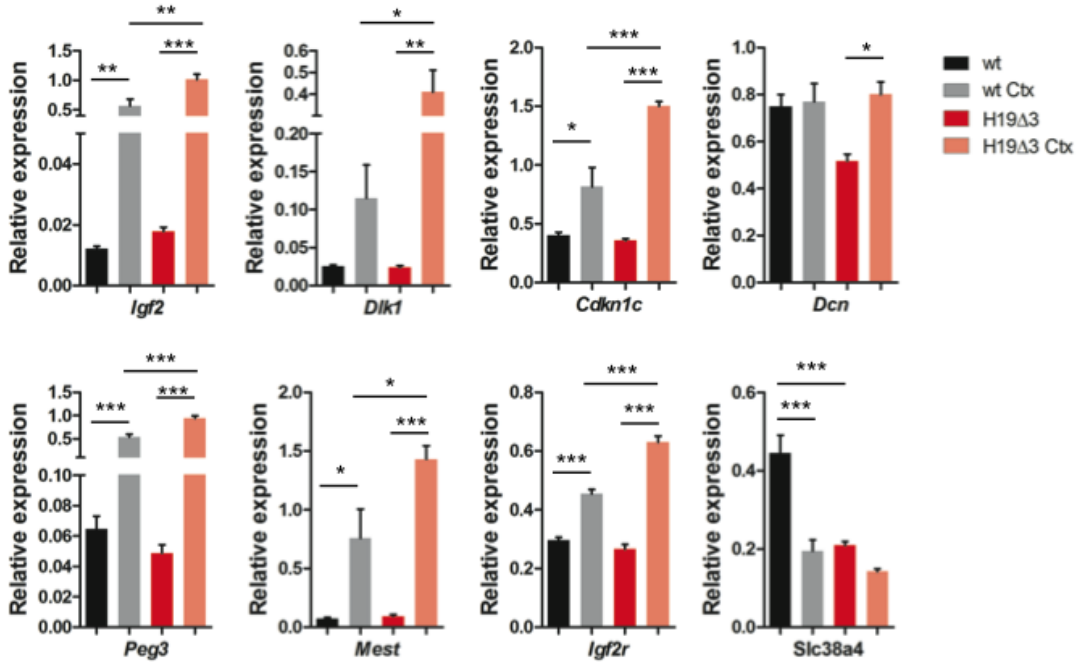


Figure S5. IGN expression in muscle regeneration.

Transcript levels of the IGN genes in *wt* and *H19*$^{\Delta 3}$ adult *tibialis* muscles (n=4 mice/genotype). Data are shown as mean ± SEM. Asterisks indicate statistically significant data (*, *p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 one-way Anova with Bonferroni post test*).

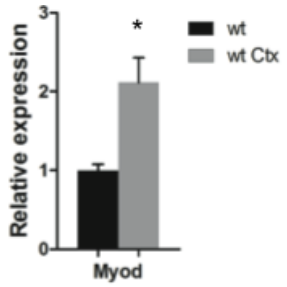


Figure S6. *Myod* gene is overexpressed after Ctx injury in *wt* mice.

Transcript levels of the *Myod* gene in *wt* and $H19^{\Delta 3}$ adult *tibialis* muscles (n=4 mice/genotype). Data are shown as mean ± SEM. Asterisk indicates statistically significant data (*, *p<0.05 Student's t-test*).

Table S1: Primers used for Real Time RT-PCR

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
H19	GGAGACTAGGCCAGGTCTC	GCCCATGGTGTTCAAGAAGGC
Igf2	GGTGCTTCTCATCTCTTTGG	CGACGGTTGGCACGGCTTGA
Igf2r	GCACAGAATCCAGACTAGCATTACA	CCTCCTTATCAGCTTTAAATATGTCTTTCTT
Igf1	CACTCATCCACAATGCCTGT	TGGATGCTCTTCAGTTCGTG
Igf1r	GTGGGGGCTCGTGTTTCTC	GATCACCGTGCAGTTTTCCA
Dlk1	ACTTGCGTGGACCTGGAGAA	CTGTTGGTTGCGGCTACGAT
Cdkn1c	AACTTCCAGCAGGATGTGCC	CATCCACTGCAGACGACCAG
Dcn	CATCTTCGAGTGGTGCAGTGTT	GCAGGTCTAGCAAGGTTGTGTC
Peg3	TTGGACTGGACAGAGATGATGACA	ATTCTGGTATGACTCGGCATCCT
Mest/Peg1	CAACAATGACGGCAACCTGGT	TCTGAATTTCTTCCTTTGATTAATGTACTGTA
Slc38a4	ACTGTGGCAATACTCTCGCTCTA	ATCCAAATGCTTTCTCGCCCAAT
MyoD	GATGGTGCCCCTGGTTCTT	AAAGGCTTCGAAAGGACAGTT
Ki67	CAGTTTGGCGACATTAGCAGA	GCAACTATCTTGGCAACATCCTC
Pax7	TGTCTCCAAGATTCTGTGCC	GGATTTCCCAGCTGAACATC

Partie II. Le gène *H19* favorise la différenciation des cellules souches musculaires

Durant ma thèse, une équipe américaine a publié un article dans lequel ils décrivent que le miR-675 promeut la différenciation et la régénération musculaire (Dey et al., 2014).

Tout d'abord, ils observent que le long ARN non codant *H19* ainsi que le miR-675 sont surexprimés dans une lignée établie de myoblastes (C2C12) en différenciation ainsi qu'en situation de régénération musculaire. A l'aide de si-RNA, ciblant le long ARN non codant *H19*, dans les myoblastes C2C12, ainsi que dans des myoblastes primaires issus de souris délétées pour le gène *H19*, ils observent que la capacité de différenciation de ces cellules est réduite. La transfection du miR-675 dans ces cellules n'exprimant pas le gène *H19* permet la restauration du phénotype *wt*. Ces résultats suggèrent que la différenciation musculaire est sous le contrôle du miR-675.

Les myoblastes *H19Δ3* présentent un retard de différenciation

Nous avons réalisé, sur les myoblastes primaires issus de nos souris *H19Δ3* des essais de différenciation sur Matrigel®. Pour cela, j'ai ensemencé 50 000 cellules par puit de 3 cm de diamètre pour quatre lignées (issues de quatre souris âgées de six semaines) par génotype. Le lendemain, le milieu de culture des myoblastes (Milieu Ham's F10 (Gibco), 20% sérum de veau fœtal, 5ng/ml de bFGF et 1% penicilline-streptomycine) est remplacé par un milieu de différenciation pauvre en sérum (DMEM Glutamax®(Gibco), 4% de Sérum de cheval, 1% penicilline-streptomycine). Après six jours de différenciation, les cellules sont fixées en Paraformaldéhyde 4% et immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la protéine MyHC (Myosin Heavy Chain) (anticorps MF20 (DSHB)) et un anticorps secondaire anti-souris Alexa488 (Invitrogen). Les noyaux sont marqués au DAPI.

Ce marquage permet de révéler les fibres musculaires différenciées, et permet de déterminer deux facteurs. Le premier est le pourcentage de différenciation cellulaire calculé de la manière suivante : (Nombre de noyaux présents dans les cellules MyHC+/Nombre total de noyaux)/100. Le second est l'index de fusion calculé de la façon suivante : (Nombre de fibres MyHC+ possédant 2 noyaux ou plus/Nombre total de fibres MyHC+)/100.

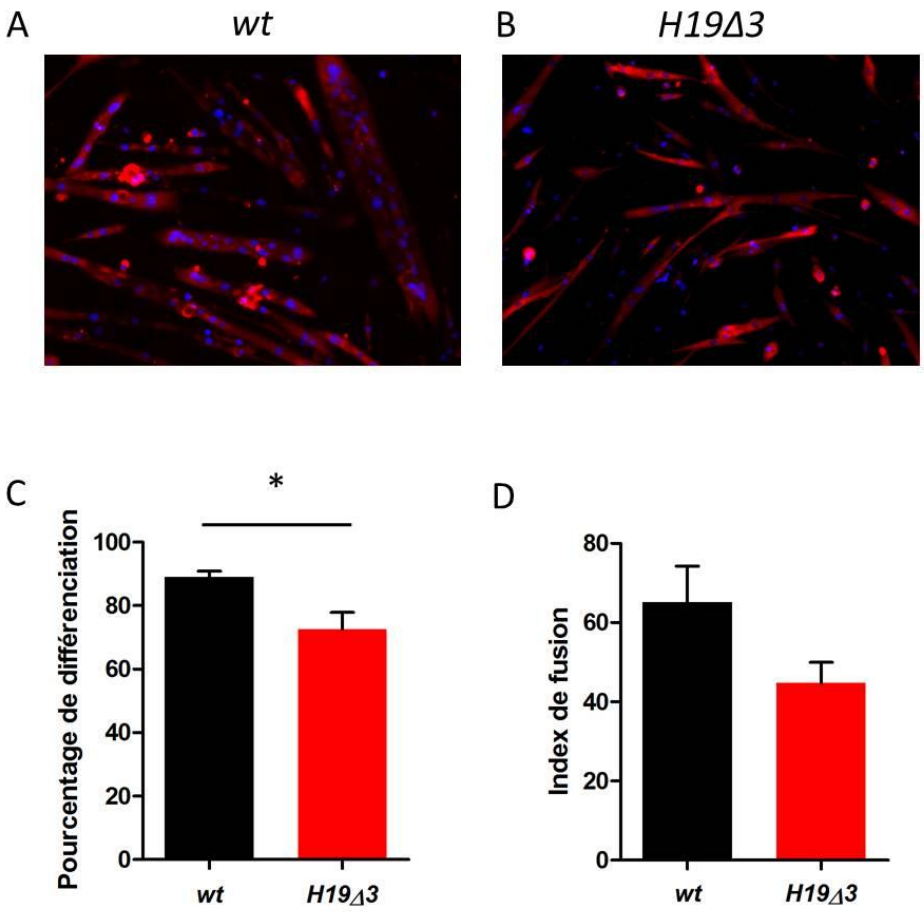


Figure 1 : Capacité de différenciation et de fusion des myoblastes *wt* et *H19Δ3*.

(A-B) Immunomarquage MyHC (rouge) de myoblastes wt (A) et H19Δ3 (B) à six jours de différenciation. Les noyaux sont marqués en bleu. (C) Histogramme représentant le pourcentage de différenciation cellulaire et (D) l'index de fusion des myoblastes wt et H19Δ3 à six jours de différenciation. Les résultats représentent la moyenne ±SEM de n=4 lignées par génotype. Les astérisques indiquent que les résultats sont significatifs (, p<0.05 Student t-test).*

Mes résultats, présentés en figure 1A-B, permettent de voir clairement qu'après six jours de différenciation, les myoblastes *wt* présentent plus de noyaux par fibre que les myoblastes *H19Δ3.* En effet, lorsque l'on regarde le pourcentage de différenciation cellulaire, c'est-à-dire le nombre de cellules (représenté par le nombre de noyaux) exprimant MyHC, nous constatons que les myoblastes *H19Δ3* présentent un retard significatif de différenciation par rapport aux myoblastes *wt* (Figure 1C). De même l'index de fusion des cellules *H19Δ3* semble réduit par rapport aux myoblastes *wt* bien que ce résultat ne soit pas significatif (Figure 1D). Ces résultats indiquent donc que le gène *H19* favorise la différenciation des myoblastes, comme l'a observé l'équipe de A. Dutta.

Discussion

Le travail effectué durant ma thèse a permis de mieux définir le rôle du gène *H19* dans la formation du muscle squelettique et son implication durant la régénération musculaire. Nous avons découvert que ce gène est important pour le maintien de l'homéostasie du muscle puisqu'il régule le nombre de fibres musculaires ainsi que leur croissance. Il est impliqué dans la régulation du nombre de cellules satellites ainsi que dans leur comportement, notamment dans leur capacité de prolifération et de différenciation. Il a été publié précédemment par notre laboratoire que le gène *H19* module l'expression de neuf gènes appartenant au réseau IGN durant le développement embryonnaire ce qui permet de contrôler la croissance de l'embryon (Gabory et al., 2006). Nous avons montré ici qu'il régule, de nouveau, les gènes du réseau IGN durant le processus de régénération musculaire chez l'adulte.

Phénotype musculaire des souris *H19Δ3*

Dans un premier temps, nous avons observé un phénotype de surcroissance des souris délétées pour le gène *H19*. Cette surcroissance est également observée au niveau des muscles squelettiques (25% d'augmentation de poids par rapport aux muscles *wt*), qui présentent à la fois un phénotype d'hyperplasie et d'hypertrophie.

Nous savons, d'après la littérature, que le nombre de fibres est établi en fin de développement embryonnaire, durant la myogénèse secondaire, et reste constant tout au long de la vie de l'individu. Nos résultats nous permettent de constater que l'hyperplasie, observée dans les souris *H19Δ3* adultes, est visible de façon significative 21 jours après la naissance. Cependant, six jours après la naissance, bien que les résultats ne soient pas significatifs, nous observons une légère hyperplasie qui pourrait être significative grâce à l'utilisation d'un plus grand nombre de souris. En parallèle, nous avons isolé des lignées de myoblastes primaires à partir de souris *wt* et *H19Δ3*, pour lesquelles nous avons comparé la capacité de prolifération. Les résultats obtenus indiquent clairement que les myoblastes *H19Δ3* prolifèrent mieux que les myoblastes *wt in vitro*. Nous observons également que le transgène *H19* permet de restaurer le phénotype *wt*, ce qui indique qu'il s'agit bien d'un phénotype dû au gène *H19*. Ces résultats nous indiquent donc que l'hyperplasie apparaitrait bien durant la myogénèse secondaire, et nous supposons qu'elle pourrait être due à la prolifération plus importante des myoblastes durant cette étape chez les souris *H19Δ3*.

L'hypertrophie, quant à elle, apparait bien après la naissance, durant la vie adulte. La surexpression du facteur de croissance Igf2 dans ces muscles peut expliquer ce phénotype. En effet, il a été montré que la croissance des fibres musculaires est sous le contrôle de facteurs de la famille

des IGF (Musarò et al., 2001). De plus, après comptage du nombre de noyaux présents par fibre, nous n'avons pas observé de différences entre les fibres *wt* et *H19Δ3* (résultats non présentés), ce qui suggère bien un rôle des facteurs de croissance plutôt qu'une différenciation et une fusion augmentée de myocytes dans ce phénotype d'hypertrophie.

Par ailleurs, l'expression du gène *Igf2* est normalement réprimée après la naissance, laissant la place à l'expression du gène *Igf1* appartenant à la même famille. Or, dans les muscles *H19Δ3,* ce phénomène semble altéré puisque le gène *Igf2* reste exprimé, de façon importante, dans les muscles adultes *H19Δ3*. Cela suggère que l'absence d'expression du gène *H19* permet de maintenir l'expression du gène *Igf2* dans ce tissu. De plus, cette surexpression du gène *Igf2* est associée à une diminution significative du gène *Myostatine*, appartenant à la famille des TGF-beta. Or, les souris délétées pour ce gène présentent un phénotype d'hyperplasie et d'hypertrophie (Lee and McPherron, 2001), et il a été montré récemment que lorsque la Myostatine est inhibée, cela entraine une hypertrophie musculaire (Latres et al., 2015). Le gène *Myostatine* participe donc aussi à l'hypertrophie observée dans les muscles de souris *H19Δ3.* Il reste à définir comment l'expression de ce gène peut être régulée par *H19*.

Nous observons également, jusqu'à six jours après la naissance, une surexpression du gène *Dlk1* (appartenant à l'IGN) impliqué dans le développement musculaire et la régénération (Andersen et al., 2009; Waddell et al., 2010). L'absence de ce gène induit également le phénotype callipyge (délétion d'un locus de gènes comprenant le gène *Dlk1*) observé chez le mouton et qui se caractérise par une hypertrophie musculaire (Charlier et al., 2001).

Ainsi, la surexpression de gènes favorisant l'hypertrophie (*Igf2* et *Dlk1*) associée à la diminution de l'expression de la *Myostatine* entraine le phénotype d'hypertrophie observé dans les muscles des souris *H19Δ3*.

La réserve de cellules satellites est affectée par l'expression du gène *H19*

Nous avons également observé une diminution importante de la réserve de cellules souches musculaires dans les muscles *H19Δ3*. Les cellules satellites, qui apparaissent en fin de développement embryonnaire, entrent en quiescence pour former cette réserve autour de 21 jours après la naissance. Avant cela, elles prolifèrent et se différencient pour fusionner avec les fibres existantes, participant ainsi à leur croissance.

Cependant, à ce stade du développement post-natal, où la réserve de cellules satellites se forme, nous n'observons pas encore cette diminution. Elle apparait donc plus tardivement. Nous émettons l'hypothèse que les cellules satellites *H19Δ3* auraient un délai d'entrée en quiescence, ce qui leur permettrait de continuer à proliférer et à se différencier pour fusionner avec les fibres pré-existantes au-delà de 21 jours. Cela aboutirait à une réduction de la réserve de cellules satellites. En effet, il a déjà été observé, dans les cellules souches hématopoïétiques, que le gène *H19* affecte la quiescence de ces cellules (Venkatraman et al., 2013). Nous pouvons donc légitimement penser que le gène *H19* affecte également l'entrée en quiescence des cellules souches musculaires.

Il est très difficile d'étudier la quiescence des cellules souches puisqu'elle dépend d'un ensemble de signaux émis par leur niche. Or, si l'on retire ces cellules de leur niche pour les étudier, invariablement elles s'activent. Nous avons étudié des lignées primaires de myoblastes issues de souris *H19Δ3*, cependant, ces cellules sont déjà activées. Une perspective d'étude de la quiescence pourrait consister à collecter des cellules satellites Pax7 ou Pax3 positives après tri cellulaire de la GFP au FACS, à partir de souris issues de croisement entre des souris *H19Δ3* et Pax7-GFP ou Pax3-GFP. Cela nous permettrait d'avoir le matériel pour étudier, grâce à une analyse haut-débit par RNA-seq, l'expression d'un grand nombre de gènes dans les cellules satellites quiescentes *wt* et *H19Δ3*, et notamment des gènes impliqués dans l'entrée et le maintien en quiescence des cellules satellites tels que la *Myostatine*, *Sprty* ou les gènes régulant ou appartenant à la voie Notch (Luo et al., 2005; McCroskery et al., 2003; Shea et al., 2010).

Nous avons choisi une autre approche qui consiste à réaliser un immunomarquage dirigé contre les protéines Pax7 et Ki67 sur coupe de muscles de 21 jours (moment de l'entrée en quiescence) et permet d'évaluer le moment d'entrée en quiescence des cellules satellites, en présence ou en absence du gène *H19*. Le facteur de transcription Pax7 est un marqueur des cellules satellites alors que Ki67 est un marqueur des cellules en prolifération. Ainsi, en évaluant le nombre de cellules Pax7+/Ki67+, correspondant à une population de cellules satellites en prolifération et donc non quiescentes, par rapport à la population de cellules quiescentes Pax7+/Ki67-, nous avons déterminé que, dans les muscles *H19Δ3*, cette population est plus importante que dans les muscles *wt* (facteur 2.3). Cela confirme donc un retard dans l'entrée en quiescence des cellules satellites dépourvues du gène *H19*.

L'expression du gène *H19* et la régénération musculaire

Après les observations faites sur la réserve de cellules satellites, nous avons voulu savoir si leur caractéristiques, c'est-à-dire leur capacité à proliférer, se différencier et s'auto-renouveler, étaient affectées par l'absence d'expression du gène *H19*.

Pour cela, nous avons réalisé des essais de lésion à la cardiotoxine (Ctx). Dans un premier temps, nous avons observé qu'après une seule lésion, les muscles *H19Δ3*, ainsi que les muscles *wt*, présentent une régénération totale, 28 jours après la lésion, malgré un délai observé lors de l'initiation de la régénération dans les muscles délétés pour le gène *H19* (résultats non présentés). Il apparait en effet que sept jours après la lésion, les muscles *wt* présentent une régénération bien engagée, avec la présence de fibres possédant des noyaux centraux et peu de fibrose comparés aux muscles *H19Δ*3 qui semblent être encore dans leur phase d'inflammation et de phagocytose des tissus lésés. La cause de ce délai peut être le nombre fortement réduit de cellules satellites. L'autre cause peut être l'altération de la capacité de différenciation observée *in vitro* en absence d'expression du gène *H19*. En effet, lorsque nous avons réalisé des essais de différenciation sur nos lignées primaires de myoblastes issues de souris *wt* et *H19Δ3*, nous avons constaté une réduction de leur capacité à se différencier en absence d'expression du gène *H19*. Cela concorde avec les résultats déjà publiés (Dey et al., 2014). Cependant, nous avons également observé que ces cellules ont une capacité de prolifération fortement améliorée par l'absence du gène *H19.* Il a déjà été observé que le gène *H19* agit comme un suppresseur de tumeur (Yoshimizu et al., 2008), ce qui laisse penser qu'il peut avoir un rôle sur la prolifération cellulaire, notamment via les gènes du réseau tel que le gène *Cdkn1c*, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette capacité de prolifération améliorée peut compenser les deux points précédents, réduction du nombre de cellules satellites et altération de la capacité de différenciation, afin de permettre une régénération complète du muscle.

Cependant, ce résultat ne nous informe pas sur l'état de la réserve de cellules souches musculaires après cette première lésion. Les cellules satellites ont bien été activées pour proliférer et se différencier, cependant nous nous sommes demandé si elles avaient reformé ce réservoir grâce à leur capacité à s'auto-renouveler. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé de multiples lésions successives par injection de Ctx afin d'épuiser la réserve de cellules satellites en cas de défaut d'auto-renouvellement. Après quatre lésions, nous observons que les muscles *H19Δ3* présentent une régénération complète du muscle, ce qui indique que les cellules satellites de ces muscles ne présentent pas de défaut d'auto-renouvellement. Par ailleurs, l'étude du poids des muscles *wt* et *H19Δ3* met en évidence que la régénération est plus efficace en absence d'expression du gène *H19*. Cela s'explique par la taille augmentée d'un certain nombre de fibres *H19Δ3* et par la surexpression

des gènes de la famille des IGF, et en particulier le gène *Igf1*, comparées aux données des muscles *wt*. En effet, il a été observé que le facteur Igf1 favorise la régénération musculaire (Pelosi et al., 2007).

Les gènes du réseau IGN sont surexprimés lors de la régénération musculaire

Afin de mieux comprendre comment l'absence d'expression du gène *H19* pouvait permettre une meilleure régénération que dans les muscles *wt*, nous avons étudié le taux d'expression d'un certain nombre de gènes dans ces muscles, sept jours après la quatrième lésion, moment où les gènes impliqués dans la régénération musculaire sont le plus exprimés. Nous aurions pu faire une analyse haut débit du transcriptome de ces tissus, cependant, nous avons choisi de restreindre notre analyse et de cibler des gènes impliqués dans la myogénèse adulte ainsi que les neuf gènes du réseau IGN dont l'expression est modulée dans le muscle embryonnaire par le gène *H19*.

Nous avons ainsi constaté qu'en situation de régénération musculaire dans des muscles *wt*, sept gènes du réseau IGN sont surexprimés (*H19*, *Igf2*, *Dlk1*, *Cdkn1c*, *Peg3*, *Mest*, et *Igf2r*), et le gène *Slc38a4* est réprimé. Cela indique que ces gènes sont impliqués dans la myogénèse et confirme les résultats déjà publiés (Al Adhami et al., 2015; Yan et al., 2003). Nous avons également observé que l'expression du gène *MyoD* est augmentée lors de la régénération, or le gène *MyoD*, en se fixant au niveau des « enhancers » du locus *H19-Igf2*, permet d'augmenter l'expression de ces deux gènes (Borensztein et al., 2013), ce qui corrèle avec les résultats obtenus.

Cependant, ces modulations d'expression des gènes du réseau IGN, observées en situation de régénération musculaire, sont également retrouvées de façon plus importante dans les muscles *H19Δ3* par rapport aux muscles *wt*. Dans les muscles embryonnaires, l'expression de ces gènes est également modulée en absence d'expression du gène *H19* (Gabory et al., 2006). Nous avons donc cherché à savoir si, dans les muscles de nouveaux-nés et dans les muscles de souris adultes, l'expression de ces gènes est toujours influencée par la présence du gène *H19*. Nous avons ainsi pu constater qu'à six jours, les muscles *H19Δ3* ne présentent pas de surexpression des gènes du réseau IGN, à l'exception des gènes *Igf2* et *Dlk1*. De même, chez l'adulte, seule l'expression des gènes *Igf2* et *Dcn* est modulée dans les muscles *H19Δ3.* En revanche, au cours de la régénération, l'expression de ces gènes est amplifiée de façon plus importante dans les muscles *H19Δ3* comparés aux muscles *wt.* Ces résultats indiquent que le gène *H19* contrôle la réactivation des gènes du réseau IGN dans les muscles en régénération. De même, ces gènes regroupent aussi bien des GSE à expression maternelle que des GSE à expression paternelle, or si les premiers limitent la croissance, les seconds

la favorisent. Cela est révélateur d'un certain équilibre nécessaire à une croissance harmonieuse du muscle. Ainsi cet équilibre est perturbé lorsque le gène *H19* est délété. Mais de façon intéressante, l'augmentation de l'expression de ces gènes de l'IGN semble favoriser la régénération.

Bien que ces résultats permettent de mettre en évidence le rôle du gène *H19* dans la régulation de la myogénèse, ils ne nous permettent pas de savoir si ce rôle passe par le long ARN non codant *H19* ou bien s'il passe par le miR-675. Nous savons que le long ARN non codant *H19* est exprimé dans l'embryon où il régule en *trans* l'expression des gènes du réseau IGN notamment via la protéine MBD1 (Gabory et al., 2006; Monnier et al., 2013). Le miR-675, quant à lui, est exprimé dans le placenta où il contrôle sa croissance via la répression du gène *Igf1r* (Keniry et al., 2012).

Le fait que les mêmes gènes soient modulés dans le muscle embryonnaire, où seul le long ARN non codant *H19* est exprimé, suggère que ce dernier est impliqué dans la myogénèse adulte et notamment dans la réactivation des gènes du réseau au moment de la régénération musculaire. De même, nous pouvons supposer que cette action passe notamment par la protéine MBD1 et donc par des régulations épigénétiques. De plus, le long ARN *H19* est un réservoir pour un micro-ARN, le miR-let-7 (Kallen et al., 2013). Ainsi, il pourrait, ainsi que d'autres ARNs non codants, servir de réservoir pour d'autres micro-ARN impliqués dans la myogénèse. En effet, le long ARN non codant *linc-MD1* a été identifié comme jouant un rôle important dans la myogénèse via son action de régulation du myomiR appelé miR-133 (Legnini et al., 2014). Il serait intéressant de poursuivre cette étude en analysant les micro-ARN appelés myomiRs (McCarthy, 2011), dont l'expression pourrait être modulée en présence ou en absence du gène *H19*, et qui pourraient ainsi cibler d'autres gènes impliqués dans la myogenèse et la régénération. Trois myomiRs, miR-1, miR-133 et miR-206, sont considérés comme spécifiques du muscle et fortement impliqués dans la régulation de la myogénèse et la régénération musculaire. Alors que le miR-1 et le miR-206 favorisent la différenciation des myoblastes, le miR-133 stimule leur prolifération (Chen et al., 2006; Mitchelson, 2015).

Cependant, il a été montré récemment que le miR-675 est également impliqué dans la myogénèse puisqu'il favorise la différenciation des myoblastes (Dey et al., 2014). De fait, dans notre étude, nous observons que le gène *Igf1r*, dont l'expression est contrôlée par le miR-675 dans le placenta, présente une surexpression plus importante dans les muscles lésés *H19Δ3* que dans les muscles *wt.* De même, il semble que le miR-675 n'est pas exprimé dans les cellules quiescentes mais serait plutôt exprimé dans les cellules activées (D. Castel et S. Tajbakhsh, communication personnelle). Ainsi, le phénotype musculaire et la régénération améliorée en absence d'expression du gène *H19* peut être attribué au long ARN *H19* qui agirait sur l'expression des gènes du réseau, mais il n'est pas exclus que le miR-675 pourrait également jouer un rôle.

Le gène *H19* et la tumorigénèse

Le gène *H19* est impliqué dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann pour lequel il est observé une prédisposition à l'apparition, principalement chez l'enfant, de tumeurs rénales (tumeurs de Wilms) et de tumeurs musculaires (rhabdomyosarcomes). Or, bien que le gène *H19* agisse comme un suppresseur de tumeurs (Yoshimizu et al., 2008), ce qui corrèle avec l'augmentation de la prolifération des myoblastes *H19Δ3,* nous n'avons jamais observé l'apparition de tumeurs dans notre lignée murine *H19Δ3.* Cela semble indiquer que l'apparition des rhabdomyosarcomes en absence d'expression du gène *H19*, pourtant observée chez l'homme, mais pas chez la souris, implique l'altération d'autres gènes suppresseurs de tumeurs, en plus du gène *H19*.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que le gène *H19* est impliqué dans le développement embryonnaire du muscle squelettique ainsi que dans la régénération au cours de la myogénèse adulte via la régulation des gènes du réseau IGN.

Bibliographie

Adriaenssens, E., Lottin, S., Dugimont, T., Fauquette, W., Coll, J., Dupouy, J.P., Boilly, B., and Curgy, J.J. (1999). Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. Oncogene *18*, 4460–4473.

Al Adhami, H., Evano, B., Le Digarcher, A., Gueydan, C., Dubois, E., Parrinello, H., Dantec, C., Bouschet, T., Varrault, A., and Journot, L. (2015). A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation. Genome Res. *25*, 353–367.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. Nature *431*, 350–355.

Andersen, D.C., Petersson, S.J., Jørgensen, L.H., Bollen, P., Jensen, P.B., Teisner, B., D. Schroeder, H., and Jensen, C.H. (2009). Characterization of DLK1 $^{+}$ Cells Emerging During Skeletal Muscle Remodeling in Response to Myositis, Myopathies, and Acute Injury. Stem Cells *27*, 898–908.

Anvar, Z., Cammisa, M., Riso, V., Baglivo, I., Kukreja, H., Sparago, A., Girardot, M., Lad, S., De Feis, I., Cerrato, F., et al. (2015). ZFP57 recognizes multiple and closely spaced sequence motif variants to maintain repressive epigenetic marks in mouse embryonic stem cells. Nucleic Acids Res.

Aulehla, A., and Pourquié, O. (2010). Signaling gradients during paraxial mesoderm development. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a000869.

Barlow, D.P., Stöger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., and Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. Nature *349*, 84–87.

Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. Nature *351*, 153–155.

Bartolomei, M.S., Webber, A.L., Brunkow, M.E., and Tilghman, S.M. (1993). Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene. Genes Dev. *7*, 1663–1673.

Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., and Zammit, P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. J. Cell Biol. *151*, 1221–1234.

Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature *405*, 482–485.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a008342–a008342.

Ben-Yair, R., and Kalcheim, C. (2005). Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. Dev. Camb. Engl. *132*, 689–701.

Berteaux, N., Aptel, N., Cathala, G., Genton, C., Coll, J., Daccache, A., Spruyt, N., Hondermarck, H., Dugimont, T., Curgy, J.-J., et al. (2008). A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. Mol. Cell. Biol. *28*, 6731–6745.

Bertero, T., Bourget-Ponzio, I., Puissant, A., Loubat, A., Mari, B., Meneguzzi, G., Auberger, P., Barbry, P., Ponzio, G., and Rezzonico, R. (2013). Tumor suppressor function of miR-483-3p on squamous cell carcinomas due to its pro-apoptotic properties. Cell Cycle Georget. Tex *12*, 2183–2193.

Bittner, R.E., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Höger, H., Elbe-Bürger, A., and Wachtler, F. (1999). Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. Anat. Embryol. (Berl.) *199*, 391–396.

Bjornson, C.R.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., and Rando, T.A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio *30*, 232–242.

Borensztein, M., Monnier, P., Court, F., Louault, Y., Ripoche, M.-A., Tiret, L., Yao, Z., Tapscott, S.J., Forné, T., Montarras, D., et al. (2013). Myod and H19-Igf2 locus interactions are required for diaphragm formation in the mouse. Dev. Camb. Engl. *140*, 1231–1239.

Bourc'his, D., and Proudhon, C. (2008). Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. Mol. Cell. Endocrinol. *282*, 87–94.

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science *294*, 2536–2539.

Brandeis, M., Ariel, M., and Cedar, H. (1993). Dynamics of DNA methylation during development. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *15*, 709–713.

Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. Mol. Cell. Biol. *10*, 28–36.

Buckingham, M. (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. Curr. Opin. Genet. Dev. *11*, 440–448.

Buckingham, M., and Relaix, F. (2015). PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. Semin. Cell Dev. Biol.

Buiting, K. (2010). Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet. *154C*, 365–376.

Cai, X., and Cullen, B.R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. RNA N. Y. N *13*, 313–316.

Cattanach, B.M., and Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. Nature *315*, 496–498.

Cattanach, B.M., Beechey, C.V., and Peters, J. (2004). Interactions between imprinting effects in the mouse. Genetics *168*, 397–413.

Cattanach, B.M., Beechey, C.V., and Peters, J. (2006). Interactions between imprinting effects: summary and review. Cytogenet. Genome Res. *113*, 17–23.

Charalambous, M., Smith, F.M., Bennett, W.R., Crew, T.E., Mackenzie, F., and Ward, A. (2003). Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 8292–8297.

Charlier, C., Segers, K., Karim, L., Shay, T., Gyapay, G., Cockett, N., and Georges, M. (2001). The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. Nat. Genet. *27*, 367–369.

Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat. Genet. *38*, 228–233.

Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. Mol. Biol. Cell *18*, 1397–1409.

Crist, C.G., Montarras, D., and Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. Cell Stem Cell *11*, 118–126.

Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987–1000.

DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., and Robertson, E.J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. Nature *345*, 78–80.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. Cell *64*, 849–859.

Defossez, P.-A., and Stancheva, I. (2011). Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *101*, 377–398.

Deltour, L., Montagutelli, X., Guenet, J.L., Jami, J., and Páldi, A. (1995). Tissue- and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene, Ins2. Dev. Biol. *168*, 686–688.

Dey, B.K., Pfeifer, K., and Dutta, A. (2014). The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. Genes Dev. *28*, 491–501.

Eden, S., Constancia, M., Hashimshony, T., Dean, W., Goldstein, B., Johnson, A.C., Keshet, I., Reik, W., and Cedar, H. (2001). An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. EMBO J. *20*, 3518–3525.

Efstratiadis, A. (1998). Genetics of mouse growth. Int. J. Dev. Biol. *42*, 955–976.

Eggermann, T. (2010). Russell-Silver syndrome. Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet. *154C*, 355–364.

Eggermann, T., Eggermann, K., and Schönherr, N. (2008). Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. Trends Genet. *24*, 195–204.

Engel, N., Thorvaldsen, J.L., and Bartolomei, M.S. (2006). CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. Hum. Mol. Genet. *15*, 2945–2954.

Fedoriw, A.M., Engel, N.I., and Bartolomei, M.S. (2004). Genomic imprinting: antagonistic mechanisms in the germ line and early embryo. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *69*, 39–45.

Filatov, V.L., Katrukha, A.G., Bulargina, T.V., and Gusev, N.B. (1999). Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. Biochem. Biokhimiia *64*, 969–985.

Filippova, G.N. (2008). Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. Curr. Top. Dev. Biol. *80*, 337–360.

Franz, T., Kothary, R., Surani, M.A., Halata, Z., and Grim, M. (1993). The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. Anat. Embryol. (Berl.) *187*, 153–160.

Gabory, A., Ripoche, M.-A., Yoshimizu, T., and Dandolo, L. (2006). The <i>H19</i> gene: regulation and function of a non-coding RNA. Cytogenet. Genome Res. *113*, 188–193.

Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyyat, A., Forné, T., Jammes, H., Ainscough, J.F.X., Surani, M.A., Journot, L., et al. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. Dev. Camb. Engl. *136*, 3413–3421.

Gabory, A., Jammes, H., and Dandolo, L. (2010). The H19 locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. BioEssays *32*, 473–480.

Giddings, S.J., King, C.D., Harman, K.W., Flood, J.F., and Carnaghi, L.R. (1994). Allele specific inactivation of insulin 1 and 2, in the mouse yolk sac, indicates imprinting. Nat. Genet. *6*, 310–313.

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science *311*, 395–398.

Goulding, M., Lumsden, A., and Paquette, A.J. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. Dev. Camb. Engl. *120*, 957–971.

Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature *435*, 954–958.

Gunning, P.W., Hardeman, E.C., Lappalainen, P., and Mulvihill, D.P. (2015). Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. J. Cell Sci. *128*, 2965–2974.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature *401*, 390–394.

Hackett, J.A., Sengupta, R., Zylicz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A. (2013). Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. Science *339*, 448–452.

Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E., and Tycko, B. (1993). Tumour-suppressor activity of H19 RNA. Nature *365*, 764–767.

Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. Nature *405*, 486–489.

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

Hwang, P.M., and Sykes, B.D. (2015). Targeting the sarcomere to correct muscle function. Nat. Rev. Drug Discov. *14*, 313–328.

Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y., and Sasaki, H. (2000). Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in Igf2/H19 imprinting. Genome Res. *10*, 664–671.

Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., et al. (2007). The let-7 MicroRNA Represses Cell Proliferation Pathways in Human Cells. Cancer Res. *67*, 7713–7722.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. Cell *120*, 635–647.

Jostes, B., Walther, C., and Gruss, P. (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. Mech. Dev. *33*, 27–37.

Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, A., Tapscott, S.J., and Rudnicki, M.A. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. Dev. Camb. Engl. *124*, 4729–4738.

Kallen, A.N., Zhou, X.-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J.-S., Zhang, H., et al. (2013). The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. Mol. Cell *52*, 101–112.

Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. Nature *429*, 900–903.

Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., and Chédin, F. (2006). Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. J. Biol. Chem. *281*, 25893–25902.

Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. Genes Dev. *19*, 1426–1431.

Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., and Reik, W. (2012). The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. Nat. Cell Biol. *14*, 659–665.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 126–139.

Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J., Hattori, A., Sharma, M., Kambadur, R., and Nishimura, T. (2008). Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. J. Cell. Physiol. *215*, 856–867.

Kostallari, E., Baba-Amer, Y., Alonso-Martin, S., Ngoh, P., Relaix, F., Lafuste, P., and Gherardi, R.K. (2015). Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. Dev. Camb. Engl. *142*, 1242–1253.

Koubassova, N.A., and Tsaturyan, A.K. (2011). Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. Biochem. Biokhimiia *76*, 1484–1506.

Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. Cell *129*, 999–1010.

Kuang, S., Gillespie, M.A., and Rudnicki, M.A. (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell *2*, 22–31.

LaBarge, M.A., and Blau, H.M. (2002). Biological Progression from Adult Bone Marrow to Mononucleate Muscle Stem Cell to Multinucleate Muscle Fiber in Response to Injury. Cell *111*, 589–601.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell *129*, 1401–1414.

Latres, E., Pangilinan, J., Miloscio, L., Bauerlein, R., Na, E., Potocky, T.B., Huang, Y., Eckersdorff, M., Rafique, A., Mastaitis, J., et al. (2015). Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. Skelet. Muscle *5*, 34.

Lee, S.J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 9306–9311.

Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., and Ishino, F. (2002). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. Dev. Camb. Engl. *129*, 1807–1817.

Lee, J.E., Pintar, J., and Efstratiadis, A. (1990). Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. Dev. Camb. Engl. *110*, 151–159.

Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S.C., Ishino, F., Keverne, E.B., and Surani, M.A. (1998). Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. Nat. Genet. *20*, 163–169.

Legnini, I., Morlando, M., Mangiavacchi, A., Fatica, A., and Bozzoni, I. (2014). A feedforward regulatory loop between HuR and the long noncoding RNA linc-MD1 controls early phases of myogenesis. Mol. Cell *53*, 506–514.

Le Grand, F., Jones, A.E., Seale, V., Scimè, A., and Rudnicki, M.A. (2009). Wnt7a Activates the Planar Cell Polarity Pathway to Drive the Symmetric Expansion of Satellite Stem Cells. Cell Stem Cell *4*, 535–547.

Lehman, W., and Craig, R. (2008). Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation. Adv. Exp. Med. Biol. *644*, 95–109.

Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S., Stewart, C.L., and Tilghman, S.M. (1995a). An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. Genes Dev. *9*, 2079–2089.

Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., and Tilghman, S.M. (1995b). Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. Nature *375*, 34–39.

Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Dev. Camb. Engl. *138*, 3639–3646.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell *69*, 915–926.

Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature *366*, 362–365.

Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., and Ferguson-Smith, A.C. (2008). A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. Dev. Cell *15*, 547–557.

Lopes, S. (2003). Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. Hum. Mol. Genet. *12*, 295–305.

Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A.J., Davenport, M.L., and Efstratiadis, A. (1996). Mouse Mutants Lacking the Type 2 IGF Receptor (IGF2R) Are Rescued from Perinatal Lethality inIgf2andIgf1rNull Backgrounds. Dev. Biol. *177*, 517–535.

Luedi, P.P. (2005). Genome-wide prediction of imprinted murine genes. Genome Res. *15*, 875–884.

Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Waye, M.M., and Richmond, T.J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. J. Mol. Biol. *272*, 301–311.

Luo, D., Renault, V.M., and Rando, T.A. (2005). The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. Semin. Cell Dev. Biol. *16*, 612–622.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol. *9*, 493–495.

McCarthy, J.J. (2011). The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. Exerc. Sport Sci. Rev. *39*, 150–154.

McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J. Cell Biol. *162*, 1135–1147.

McGrath, J., and Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell *37*, 179–183.

Mitchell, K.J., Pannérec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., and Sassoon, D.A. (2010). Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. Nat. Cell Biol.

Mitchelson, K.R. (2015). Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. World J. Biol. Chem. *6*, 162.

Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S., and Dandolo, L. (2013). H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 20693–20698.

Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.-H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. Mol. Cell. Biol. *22*, 5585–5592.

Moore, T., Constancia, M., Zubair, M., Bailleul, B., Feil, R., Sasaki, H., and Reik, W. (1997). Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 12509–12514.

Murrell, A., Ito, Y., Verde, G., Huddleston, J., Woodfine, K., Silengo, M.C., Spreafico, F., Perotti, D., De Crescenzo, A., Sparago, A., et al. (2008). Distinct methylation changes at the IGF2-H19 locus in congenital growth disorders and cancer. PloS One *3*, e1849.

Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. Nat. Genet. *27*, 195–200.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. Nature *364*, 532–535.

Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. Nat. Cell Biol. *9*, 64–71.

Nicolas, N., Marazzi, G., Kelley, K., and Sassoon, D. (2005). Embryonic deregulation of muscle stress signaling pathways leads to altered postnatal stem cell behavior and a failure in postnatal muscle growth. Dev. Biol. *281*, 171–183.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature *436*, 207–213.

Ohno, R., Nakayama, M., Naruse, C., Okashita, N., Takano, O., Tachibana, M., Asano, M., Saitou, M., and Seki, Y. (2013). A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells. Development *140*, 2892–2903.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. Cell *99*, 247–257.

O'Neill, M.J. (2005). The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. Hum. Mol. Genet. *14*, R113–R120.

Pachnis, V., Belayew, A., and Tilghman, S.M. (1984). Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 5523–5527.

Pant, V., Kurukuti, S., Pugacheva, E., Shamsuddin, S., Mariano, P., Renkawitz, R., Klenova, E., Lobanenkov, V., and Ohlsson, R. (2004). Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance. Mol. Cell. Biol. *24*, 3497–3504.

Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N., Molinaro, M., et al. (2007). Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *21*, 1393–1402.

Plasschaert, R.N., and Bartolomei, M.S. (2014). Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. Development *141*, 1805–1813.

Poirier, F., Chan, C.T., Timmons, P.M., Robertson, E.J., Evans, M.J., and Rigby, P.W. (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. Dev. Camb. Engl. *113*, 1105–1114.

Proudhon, C., and Bourc'his, D. (2010). Évolution de l'empreinte parentale chez les mammifères: Quelle ménagerie ! Médecine/sciences *26*, 497–503.

Purslow, P.P. (2010). Muscle fascia and force transmission. J. Bodyw. Mov. Ther. *14*, 411–417.

Qiao, Y., Ma, N., Wang, X., Hui, Y., Li, F., Xiang, Y., Zhou, J., Zou, C., Jin, J., Lv, G., et al. (2011). MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. FEBS Lett. *585*, 3095–3100.

Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., et al. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. Cell *129*, 1311–1323.

Ripoche, M.A., Kress, C., Poirier, F., and Dandolo, L. (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. Genes Dev. *11*, 1596–1604.

Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell *75*, 1351–1359.

Santos, F., Peat, J., Burgess, H., Rada, C., Reik, W., and Dean, W. (2013). Active demethylation in mouse zygotes involves cytosine deamination and base excision repair. Epigenetics Chromatin *6*, 39.

Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. Mol. Cell *15*, 595–605.

Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. Nature *441*, 1075–1079.

Schultz, E. (1976). Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. Am. J. Anat. *147*, 49–70.

Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A New Look at the Origin, Function, and "Stem-Cell" Status of Muscle Satellite Cells. Dev. Biol. *218*, 115–124.

Sekita, Y., Wagatsuma, H., Nakamura, K., Ono, R., Kagami, M., Wakisaka, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Ogura, A., et al. (2008). Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. Nat. Genet. *40*, 243–248.

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., et al. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. Nature *450*, 908–912.

Shea, K.L., Xiang, W., LaPorta, V.S., Licht, J.D., Keller, C., Basson, M.A., and Brack, A.S. (2010). Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle Stem Cell Pool during Regeneration. Cell Stem Cell *6*, 117–129.

Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. Nat. Cell Biol. *8*, 677–687.

Sun, F.L., Dean, W.L., Kelsey, G., Allen, N.D., and Reik, W. (1997). Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. Nature *389*, 809–815.

Surani, M.A., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature *308*, 548–550.

Szabó, P.E., Tang, S.-H.E., Silva, F.J., Tsark, W.M.K., and Mann, J.R. (2004). Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. Mol. Cell. Biol. *24*, 4791–4800.

Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1998). Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. Genes Dev. *12*, 3693–3702.

Tran, V.G., Court, F., Duputié, A., Antoine, E., Aptel, N., Milligan, L., Carbonell, F., Lelay-Taha, M.-N., Piette, J., Weber, M., et al. (2012). H19 antisense RNA can up-regulate Igf2 transcription by activation of a novel promoter in mouse myoblasts. PloS One *7*, e37923.

Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Aknin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., et al. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. Dev. Cell *11*, 711–722.

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

Venkatraman, A., He, X.C., Thorvaldsen, J.L., Sugimura, R., Perry, J.M., Tao, F., Zhao, M., Christenson, M.K., Sanchez, R., Yu, J.Y., et al. (2013). Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. Nature *500*, 345–349.

Waddell, J.N., Zhang, P., Wen, Y., Gupta, S.K., Yevtodiyenko, A., Schmidt, J.V., Bidwell, C.A., Kumar, A., and Kuang, S. (2010). Dlk1 Is Necessary for Proper Skeletal Muscle Development and Regeneration. PLoS ONE *5*, e15055.

Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2011). Satellite cells, the engines of muscle repair. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.

Weksberg, R., Shuman, C., and Beckwith, J.B. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *18*, 8–14.

White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. BMC Dev. Biol. *10*, 21.

Wiles, M.V. (1988). Isolation of differentially expressed human cDNA clones: similarities between mouse and human embryonal carcinoma cell differentiation. Dev. Camb. Engl. *104*, 403–413.

Williams, B.A., and Ordahl, C.P. (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. Dev. Camb. Engl. *120*, 785–796.

Williamson, C.M., Turner, M.D., Ball, S.T., Nottingham, W.T., Glenister, P., Fray, M., Tymowska-Lalanne, Z., Plagge, A., Powles-Glover, N., Kelsey, G., et al. (2006). Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. Nat. Genet. *38*, 350–355.

Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F., and Barlow, D.P. (1997). Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. Nature *389*, 745–749.

Wyatt, G.R. (1950). Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. Nature *166*, 237–238.

Yan, Z., Choi, S., Liu, X., Zhang, M., Schageman, J.J., Lee, S.Y., Hart, R., Lin, L., Thurmond, F.A., and Williams, R.S. (2003). Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. J. Biol. Chem. *278*, 8826–8836.

Yoshimizu, T., Miroglio, A., Ripoche, M.-A., Gabory, A., Vernucci, M., Riccio, A., Colnot, S., Godard, C., Terris, B., Jammes, H., et al. (2008). The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 12417–12422.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H., and Weinstein, L.S. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Gsalpha) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the gsalpha gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 8715–8720.

Yusuf, F., and Brand-Saberi, B. (2012). Myogenesis and muscle regeneration. Histochem. Cell Biol. *138*, 187–199.

Zhang, P., Liégeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., and Elledge, S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. Nature *387*, 151–158.

Zhang, W., Behringer, R.R., and Olson, E.N. (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. Genes Dev. *9*, 1388–1399.