

Université de Montréal

**DISSECTION DE LA FONCTION DU RCPG  
D'ADHÉSION BAI3 DANS LA FUSION DES  
MYOBLASTES**

Par Noumeira Hamoud

Programmes de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
En biologie moléculaire

Décembre 2017

© Noumeira Hamoud, 2017

## Résumé

La fusion des myoblastes est une étape critique dans le développement musculaire embryonnaire et lors de la régénération des muscles chez l'adulte. Les myoblastes gouvernent ce processus en établissant des contacts cellule-cellule et en fusionnant leurs membranes. Des études génétiques chez la drosophile ont permis de montrer l'importance d'activer la petite GTPase Rac. Cet événement est possible grâce à son activateur, le facteur d'échange de nucléotide de guanine Myoblast City, et sa protéine d'échafaudage ELMO. Le degré de conservation des molécules impliquées dans la fusion des myoblastes entre la drosophile et les vertébrés était inconnu. C'est alors que des équipes ont démontré que les composantes régulant le réarrangement du cytosquelette chez la drosophile étaient conservées chez les vertébrés. Ainsi Wasp, Rac et Dock180 (orthologue mammifère de Myoblast City) sont tous essentiels à la fusion des myoblastes dans les 2 systèmes. Cette machinerie est activée par des récepteurs de surface bien caractérisés chez la drosophile. Leurs équivalents demeurent inconnus chez les vertébrés. L'hypothèse pour répondre à cette question prétend que si un récepteur à la surface des myoblastes est capable d'interagir avec le complexe ELMO/DOCK alors il sera un candidat potentiel pour avoir la fonction de : régulateur de la fusion des myoblastes.

Le premier objectif de la thèse est d'identifier le récepteur de surface capable de réguler la fusion des myoblastes chez les vertébrés. Comme ELMO/DOCK sont importants pour la fusion, alors ils pourront directement lier le récepteur pro-fusion. Ainsi, en utilisant ELMO comme proie, le récepteur d'adhésion couplé aux protéines G, BAI3 a été identifié. Il induit la fusion par son interaction avec le complexe intracellulaire ELMO/DOCK/Rac. L'implication de ce complexe est bien établie dans la fusion des myoblastes. Les études de pertes de fonction de BAI3 et d'ELMO dans les cellules C2C12 montrent un blocage de fusion des myoblastes sans affecter le programme de différenciation. De plus lors du développement embryonnaire, la présence de BAI3 mutant, incapable de se lier à ELMO2, inhibe complètement la fusion. En conclusion, cet objectif a permis d'identifier BAI3, son rôle dans la fusion ainsi que l'importance de son interaction avec ELMO2 pour compléter la fusion des myoblastes des vertébrés.

Alors que le rôle de BAI3 est défini dans la fusion des myoblastes, le deuxième objectif vise à comprendre la régulation de BAI3. Comme la fusion des myoblastes est un processus précisément régulé, son régulateur, BAI3, doit être tout autant régulé. Étant donné que BAI3 est une RCPG alors il doit avoir de(s) ligand(s) régulant l'activation du récepteur et l'influence de ce signal sur doit se répercuter sur le recrutement d'ELMO2. Ainsi deux protéines qui régulent l'activation de BAI3 ont été identifiées. La première est la petite protéine sécrétée C1qL4 qui agit comme inhibiteur de BAI3 lors de la fusion des myoblastes. Le deuxième partenaire est le récepteur transmembranaire Stabilin-2. Ce dernier interagit avec la région extracellulaire de BAI3 et l'active. BAI3 transmet le signal en déclenchant le mécanisme canonique des RCPG ce qui permettra le recrutement du complexe ELMO/DOCK à la membrane.

En conclusion, l'objet de cette thèse a permis d'identifier le premier récepteur de surface capable de réguler la fusion des myoblastes et jusque-là inconnu chez les vertébrés. De plus, le mécanisme de régulation de BAI3 a aussi été caractérisé avec la fonction inhibitrice de C1qL4 et la fonction activatrice de Stabilin-2. Ces nouveaux joueurs et ce mécanisme représentent sans doute des nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des dystrophies musculaires.

**Mots-clés :** Myogenèse, formation de myotubes, fusion cellules-cellules, RCPG, Modèles expérimentaux.

## **Abstract**

Myoblast fusion is a critical step in embryonic muscle development and muscle regeneration in adults. Myoblasts govern this process by establishing cell-cell contacts and fusing their membranes. Genetic studies in *Drosophila* have shown the importance of activating the small GTPase Rac. This event is possible thanks to its activator, guanine nucleotide exchange factor Myoblast City, and its scaffold protein ELMO. The degree of conservation of molecules involved in myoblast fusion between *Drosophila* and vertebrates was unknown. Until teams demonstrated that the components regulating the reorganization of the cytoskeleton in *Drosophila* were conserved in vertebrates. Thus Wasp, Rac and Dock180 (Myoblast City mammal orthologue) are all essential for the fusion of myoblasts in both systems. This machinery is activated by well-characterized surface receptors in *Drosophila*. Their equivalents remain unknown in vertebrates. The hypothesis to answer this question is that if a myoblast cell surface is able to interact with the ELMO / DOCK complex then it will be a potential candidate to be a regulator of myoblast fusion.

The first objective of the thesis is to identify the surface receptor capable of regulating myoblast fusion in vertebrates. As ELMO / DOCK are important for fusion, then they will be able to directly bind the pro-fusion receptor. Thus, using ELMO as prey, the Adhesion G protein-coupled receptor BAI3 has been identified. It induces fusion by its interaction with the intracellular complex ELMO/DOCK/Rac. The involvement of this complex is well established in the fusion of myoblasts. Loss of Function studies of BAI3 and ELMO in C2C12 cells showed fusion blocking of myoblasts without affecting the differentiation program. Moreover, during the embryonic development, the presence of mutant BAI3, unable to bind to ELMO2, completely inhibits the fusion. In conclusion, this objective made it possible to identify BAI3, its role in fusion as well as the importance of its interaction with ELMO2 to complete the fusion of vertebrate myoblasts.

While the role of BAI3 is defined in myoblast fusion, the second objective is to understand the regulation of BAI3. As myoblast fusion is a precisely regulated process, its regulator, BAI3, must be regulated as well. Since BAI3 is a GPCR then it must have ligand (s)

regulating the activation of the receptor and the influence of this signal should affect the recruitment of ELMO2. Thus, two proteins that regulate the activation of BAI3 have been identified. The first is the small secreted protein C1qL4 that acts as an inhibitor of BAI3 during myoblast fusion. The second partner is the transmembrane receptor Stabilin-2. Thus Stabilin-2 interacts with the extracellular region of BAI3 and activates it. BAI3 transmits the signal by triggering the canonical mechanism of GPCRs which will allow the recruitment of the ELMO / DOCK complex at the membrane.

In conclusion, this thesis identified the first surface receptor capable of regulating myoblast fusion, previously unknown in vertebrates. In addition, the regulatory mechanism of BAI3 was also characterized with the C1qL4 inhibitory function and the Stabilin-2 activator function. These new players and this mechanism undoubtedly represent new therapeutic avenues for the treatment of muscular dystrophies.

**Keywords:** Myogenesis, Myotube formation, GPCR signaling, cell-cell fusion, Model system

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
Modèles expérimentaux .....	3
<b>1.1 Le muscle squelettique</b> .....	<b>6</b>
1.1.1 La structure du muscle .....	7
1.1.2 Développement musculaire chez les vertébrés.....	9
1.1.3 Programme génétique myogénique .....	12
1.1.4 Fusion cellule-cellule.....	15
1.1.5 Fusion des myoblastes .....	18
1.1.5.1 Fusion des myoblastes chez la drosophile .....	18
1.1.5.2 Fusion des myoblastes chez les vertébrés.....	24
1.1.6 Mécanismes de signalisation régulant la fusion des vertébrés.....	27
1.1.6.1 La migration des myoblastes.....	29
1.1.6.2 Reconnaissance et adhésion des myoblastes.....	30
1.1.6.3 Cytosquelette d'actine et fusion .....	33
1.1.6.4. Autres protéines membranaires .....	37
<b>1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G</b> .....	<b>39</b>
1.2.1 Généralités .....	40
1.2.1.1 Structure des RCPG.....	41
1.2.1.2 Familles des RCPG.....	43
1.2.1.3 Signalisation canonique des RCPG .....	45

1.2.1.3.1 Sous-unités $\alpha$ .....	45
1.2.1.3.2 Sous-unités $\beta/\gamma$ .....	46
1.2.1.3.3 Les $\beta$ -arrestines.....	49
1.2.2 RCPG d'adhésion .....	52
1.2.2.1 Activation des RCPG d'adhésion.....	56
1.2.2.2 La sous-famille VII-Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI).....	57
Hypothèse et objectifs de la recherche.....	62

## CHAPITRE 2

### Article 1: LE RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G BAI3 PROMEUT LA FUSION DES MYOBLASTES CHEZ LES VERTÉBRÉS.....

Significance statement.....	67
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Results .....	71
Discussion.....	85
Material and methods .....	88
Acknowledgements.....	89
Supplemental material.....	90

## CHAPITRE 3

### Article 2: LA RÉGULATION SPATIO-TEMPORELLE DU RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G BAI3 ET SA SIGNALISATION CANONIQUE ET NON-CANONIQUE PAR LES PROTÉINES C1Q-LIKE ET STABILIN-2 CONTRÔLE LA FUSION DES MYOBLASTES.....

Abstract.....	114
Results .....	117
Discussion.....	140
Methods .....	146
Acknowledgements.....	152

Supplementary material .....	153
<b>Discussion .....</b>	<b>165</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>178</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>i</b>



# Liste des tableaux

## CHAPITRE 1

<b>Table 1. I :</b> Principaux modèles expérimentaux utilisés dans l'étude du muscle. ....	4
<b>Table 1. II :</b> Molécules impliquées dans la fusion des myoblastes chez la drosophile.....	23
<b>Table 1.III :</b> Fonctions des différentes familles de Protéines G hétérotrimériques .....	47
<b>Table 1.IV :</b> Fonctions physiologiques des RCPG d'Adhésions. ....	54

## CHAPITRE 2

<b>Table 2-SI :</b> Various primers used in this study .....	107
<b>Table 2-SII :</b> Short-hairpin RNAs (shRNAs) used in C2C12 and Sol8 knockdown experiments. .....	108
<b>Table 2-SIII :</b> Primers used to amplify anti-sense probes for In Situ Hybridization (ISH) on chicken embryo tissues.....	109

## CHAPITRE 3

<b>Table 3-SI:</b> Various plasmids used in this study.....	161
<b>Table 3-SII:</b> Various Primers used in this study.....	162
<b>Table 3-SIII:</b> Short-hairpin RNAs (shRNAs) used in C2C12 and Sol8 knockdown experiments. .....	163
<b>Table 3-SIV:</b> Primers used to amplify anti-sens probes for In Situ Hybridization (ISH) on chicken embryo tissues.....	164

# Liste des figures

## CHAPITRE 1

<b>Figure 1.1</b>	Structure du muscle squelettique des vertébrés.....	8
<b>Figure 1.2</b>	Développement embryonnaire.....	11
<b>Figure 1.3</b>	Programme génétique de différenciation.....	14
<b>Figure 1.4</b>	Fusion cellule-cellule.....	17
<b>Figure 1.5</b>	Fusion des myoblastes chez la drosophile.....	19
<b>Figure 1.6</b>	Programme moléculaire régulant la fusion des myoblastes chez la drosophile.....	22
<b>Figure 1.7</b>	Vagues de myogenèse.....	26
<b>Figure 1.8</b>	Programme moléculaires des vertébrés.....	28
<b>Figure 1.9</b>	Structure des RCPG.....	42
<b>Figure 1.10</b>	Classification GRAF des 5 familles de RCPG.....	44
<b>Figure 1.11</b>	Le cycle d'activation des protéines G.....	48
<b>Figure 1.12</b>	Cycle d'activation et de désensibilisation d'un RCPG.....	51
<b>Figure 1.13</b>	Représentations des 33 membres de la famille des RCPG d'adhésion.....	53
<b>Figure 1.14</b>	Sous-famille des RCPG d'adhésion : BAI.....	61

## CHAPITRE 2

<b>Figure 2.1</b>	The GPCR BAI3 is expressed in myoblasts and interacts with ELMO family of proteins.....	73
<b>Figure 2.2</b>	BAI3, ELMO1 and ELMO2 are essential for myoblast fusion.....	77
<b>Figure 2.3</b>	BAI3 coupling to ELMO2 is necessary for myoblast fusion.....	81
<b>Figure 2.4</b>	The interaction of BAI3 with ELMO is essential <i>in vivo</i> for myoblast fusion.....	83
<b>Figure 2-S1</b>	The predicted $\alpha$ -helical region at the C-terminus of BAI receptors is highly conserved.....	96
<b>Figure 2-S2</b>	N-terminal region of ELMO2 interacts with BAI3.....	97
<b>Figure 2-S3</b>	Additional and independent shRNAs confirm that BAI3 and ELMO1/2 are essential for myoblast fusion.....	98

<b>Figure 2-S4</b>	BAI2 is not a pro-fusion receptor in myoblasts.....	99
<b>Figure 2-S5</b>	Myoblast differentiation is not affected by downregulation of BAI3 or ELMO2. .....	101
<b>Figure 2-S6</b>	BAI3 and ELMO2 are essential for fusion in the Sol8 myoblast cell line.....	102
<b>Figure 2-S7</b>	BAI1 cannot functionally replace BAI3 during C2C12 myoblast fusion. ....	103
<b>Figure 2-S8</b>	BAI3 expression promotes myoblast fusion.....	104
<b>Figure 2-S9</b>	BAI3 mutants lacking ELMO-binding activity correctly localize to the plasma membrane.....	105
<b>Figure 2-S10</b>	BAI1 and BAI2 are highly expressed in the spinal cord but not in the developing muscles of chicken embryos. ....	106

### CHAPITRE 3

<b>Figure 3.1.</b>	C1q-Like proteins negatively regulate myoblasts fusion. ....	119
<b>Figure 3.2:</b>	C1qL4 acts as a BAI3 ligand to negatively control myoblast fusion.....	124
<b>Figure 3.3.</b>	Stabilin-2 is a new binding partner of BAI3.....	128
<b>Figure 3.4.</b>	BAI3 and Stabilin-2 interact <i>in cis</i> in myoblasts to promote cell fusion.....	130
<b>Figure 3.5.</b>	Canonical and non-canonical signaling from BAI3 are required to promote the recruitment of ELMO at the membrane.....	135
<b>Figure 3.6.</b>	Stabilin-2 promotes BAI3 GPCR activity and facilitates the recruitment of ELMO2 at the membrane.....	138
<b>Figure 3.7:</b>	Working model .....	144
<b>Figure 3-S1.</b>	C1qL4 family proteins inhibit myoblast fusion.....	155
<b>Figure 3-S2.</b>	C1qL4 specifically interacts with BAI3 to inhibit myoblast fusion. ....	156
<b>Figure 3-S3.</b>	The extracellular region of BAI3 interacts with Stabilin-2.....	157
<b>Figure 3-S4.</b>	BAI3 promotes myoblast fusion in an auto-proteolytic independent manner...	158
<b>Figure 3-S5.</b>	G protein subunits screen. ....	160

## Liste des abréviations

**ADAM12:** ADAM METALLOPEPTIDASE DOMAIN 12

**ANTS:** ANTISOCIAL

**ARF6:** ADP-RIBOSYLATION FACTOR 6

**BAI:** BRAIN-SPECIFIC ANGIOGENESIS INHIBITOR

**BOC:** BROTHER OF CDO

**BRAG2:** BREFELDIN-RESISTANT ARF-GEF 2 PROTEIN

**BSA:** BOVINE SERUM ALBUMIN

**CDC42:** CELL DIVISION CYCLE 42

**CDO:** CELL ADHESION MOLECULE-RELATED/DOWN-REGULATED BY ONCOGENES

**CD47:** PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE, C

**CRK:** V-CRK SARCOMA VIRUS CT10 ONCOGENE HOMOLOG

**CRK-L:** V-CRK SARCOMA VIRUS CT10 ONCOGENE HOMOLOG (AVIAN)-LIKE

**CXCL12:** CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) LIGAND 12

**CXCR4:** CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) RECEPTOR 4

**DH:** DBL-HOMOLOGY

**DHR:** DOCK-HOMOLOGY REGION

**DOCK:** DEDICATOR OF CYTOKINESIS

**DUF:** DUMBFOUNDED

**E:** EMBRYONIC DAY

**EAD:** ELMO AUTOREGULATORY DOMAIN

**EBS:** ELMO BINDING SITE

**EID:** ELMO INHIBITORY DOMAIN

**EGF:** EPIDERMAL GROWTH FACTOR

**ELMO:** ENGULFMENT AND CELL MOTILITY

**ES:** EMBRYONIC STEM

**FAK:** FOCAL ADHESION KINASE

**FBS:** FETAL BOVINE SERUM

**FCM:** FUSION COMPETENT MYOBLASTS  
**FC:** FOUNDER CELL  
**FURMAS:** FUSION-RESTRICTED-MYOGENIC-ADHESIVE-STRUCTURE  
**GAP:** GTP<sub>ASE</sub> ACTIVATING PROTEIN  
**GDI:** GUANINE NUCLEOTIDE DISSOCIATION INHIBITOR  
**GDP:** GUANOSINE DIPHOSPHATE  
**GEF:** GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTORS  
**GPCR:** G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR  
**GRK:** G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASE  
**GTP:** GUANOSINE TRIPHOSPHATE  
**HEK:** HUMAN EMBRYONIC KIDNEY  
**HBS:** HIBRIS  
**IL-4:** INTERLEUKIN-4  
**IP:** PROSTAGLANDIN I2 RECEPTOR  
**ITG:** INTEGRIN  
**IRES:** INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE  
**IRRE-C:** IRREGULAR-CHIASM-C  
**ISH:** IN SITU HYBRIDIZATION  
**KIRRE:** KIN OF IRRE  
**KIRREL:** KIN OF IRRE LIKE  
**KO:** KNOCK-OUT  
**MBC:** MYOBLAST CITY  
**MyHC/MHC:** MYOSIN HEAVY CHAIN  
**MLC:** MYOSIN LIGHT CHAIN  
**MAPK:** MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE  
**MRF:** MUSCLE-SPECIFIC REGULATORY FACTOR  
**MRF4:** MUSCLE-SPECIFIC REGULATORY FACTOR 4  
**MYF5:** MYOGENIC FACTOR 5  
**MYOD:** MYOGENIC DIFFERENTIATION  
**NEPH1:** NEPHRIN-LIKE PROTEIN 1  
**NEPH2:** NEPHRIN-LIKE PROTEIN 2

**NEPH3:** NEPHRIN-LIKE PROTEIN 3  
**NFATC2:** NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS, CYTOPLASMIC,  
CALCINEURIN DEPENDENT 2  
**PAX1:** PAIRED BOX GENE 1  
**PAX3:** PAIRED BOX GENE 3  
**PAX7:** PAIRED BOX GENE 7  
**PAX9:** PAIRED BOX GENE 9  
**PBS :** PHOSPHATE BUFFER SALINE  
**PCP :** POLAR CELL POLARITY  
**PCR :** POLYMERASE CHAIN REACTION  
**PFA :** PARAFORMALDEHYDE  
**PGI2 :** PROSTACYCLIN  
**PH:** PLECKSTRIN HOMOLOGY  
**PKA:** PROTEINE KINASE A  
**PKC:** PROTEINE KINASE C  
**PLC:** PHOSPHOLIPASE C  
**PS:** PHOSPHATIDYLSERINE  
**RAC:** RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 1  
**RBD:** RAS-BINDING DOMAIN  
**RGS:** REGULATOR OF GPCR SIGNALING  
**RHO:** RAS-LIKE GTP-BINDING PROTEIN RHO  
**RHOA:** RAS HOMOLOG FAMILY MEMBER A  
**RHOG:** RAS HOMOLOGY GROWTH-RELATED  
**RNA:** RIBONUCLEIC ACID  
**ROLS:** ROLLING PEBBLES  
**RST:** ROUGHEST  
**SHH:** SONIC HEDGEHOG  
**TIAM1:** T CELL LYMPHOMA INVASION AND METASTASIS 1  
**TRIO:** TRIO RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR  
**WASP:** WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN  
**WAVE1:** WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN FAMILY MEMBER 1

**WIP:** WASP-INTERACTING PROTEIN

**WNT:** WINGLESS-RELATED INTEGRATION SITE

**WT:** WILD-TYPE

*À mes parents,*

## Remerciements

*J'aimerais remercier les membres du comité de thèse pour leur temps, d'avoir accepté de juger et critiquer ce travail. J'aimerais remercier mon comité de suivi : Dre. Kmita, Dr. Carreno et Dr. Tremblay pour leurs questions et de m'avoir poussée à développer mon esprit critique et de me permettre de devenir une meilleure scientifique.*

*Merci aux collaborateurs, Dr Kania et Dr Bouvier pour le temps, leur ressources et leur savoir.*

*Merci au agences des financements : IRCM pour les bourses internes ainsi que le FRSQ et le CIHR.*

*Merci aux membres des plateformes de l'IRCM. Merci à Dominic Fillion et son expertise des microscopie, Agnès, Miriam et Odile pour leur aide en biologie moléculaire et merci à Éric et Julie pour m'aider à trier les C2C12 à plusieurs reprises. Sans eux, les projets n'avanceraient pas aussi efficacement.*

*Je remercie Jean-François pour son temps, sa patience, ses critiques, ses questions, ses doutes. De m'avoir sans cesse poussée à faire mieux. Merci d'avoir partagé ton enthousiasme et ton amour pour la science. Merci Jean-François de sans cesse travailler pour nous créer des opportunités de toutes sortes. Merci de m'avoir envoyé si souvent en conférences et de me permettre de rencontrer et d'échanger avec les 'big shots' du milieu. Merci de nous aider a renforcer nos forces et de nous améliorer de nos faiblesses. Finalement, merci pour ton professionnalisme et de ton humanité.*

*J'aimerais remercier les anciens membres du labo qui sont devenues des amies. Merci à Mani pour tes conseils et ta compréhension. Merci à Mel pour ton support moral et tes conseils et toutes les séances ciné, potinages et souper ☺*

*Merci à Nad et Ari pour votre soutien et votre aide à différents moments du projet.*

*Merci aux membres présents du labo. Merci à Halil pour les discussions délirantes, pour ta folie et tous les logiciels. Merci à MAG. Merci à MPT pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Tu es un bel être humain.*

*Thanks to Afnan for listening, being interested, for your scientific input and for being a good friend through the years in the lab.*

*Merci à Viv pour ton esprit critique, de t'intéresser à mon projet depuis le début. D'avoir pris le temps à chaque fois de lire et d'écouter tout ce que je t'envoyais. Merci d'avoir fait partie de la superbe chorale du labo et merci pour tout le reste.*

*Merci à tous les Primers : Alex, Ludi, Steve, Steve, Jul, Jen, Aurele, Jin, Max et aux nouveaux membres pour les soirs de games, pour les soupers, pour les tournois, pour les chalets et d'être*



*des amis si divertissants. PRIMERS HYBRIDIZE...PRIMERS AMPLIFY..... GOOOO  
PRIMERS !!!!*

*Thanks to Jin for being a good friend a having a regular lunches and coffees to help balance everything.*

*Merci au club culturel du comptoir 21, Jen et Ludi, pour les superbes soirées de filles au musée et fish and chips. De votre support et conseils tout le long de ces dernières années.*

*Merci à Aurèle. Je ne sais même pas par où commencer. D'être là tous les jours à m'écouter chialer sur tout et n'importe quoi, de remettre mon raisonnement des fois irrationnels sur le bon chemin. D'être là pour les pauses café tous les jours, pour les séances de magasinage et de m'empêcher de tout dépenser mon argent au Mochico ou autres dépenses compulsives. D'être là dans les moments des plus faciles comme les plus difficiles. Tu es un ami comme il n'y en a pas deux. Merci d'être entré dans ma vie...malgré les premiers jugements ;)*

*Merci à Bani, pour ton amour et ton support, merci de croire quand moi j'y crois plus, merci d'être toujours là avec tes blagues. Comme l'autre l'a dit, c'est toi le boss.*

*Merci à mes parents pour leur support depuis toujours, de toujours me pousser plus loin, merci de l'intérêt pour mes projets. Merci de me rendre la vie facile à plusieurs niveaux pour me permettre de me concentrer sur mes études. Merci à mes sœurs d'être là et d'être aussi folles que vous êtes. Ça m'a fait plaisir d'être votre grossiste de vêtements. Merci à Rayenne de m'avoir aidé à pratiquer mes présentations. Merci à toute ma belle-famille pour votre support et les soupers délirants à chaque fois.*

# **Introduction**

# Chapitre 1

## Modèles expérimentaux

L'étude du muscle a mené au développement de plusieurs systèmes tant *in vivo* qu'*in vitro*. Les modèles *in vitro* sont principalement constitués de lignées cellulaires comme Sol8, L6 et C2C12 qui sont parmi les plus utilisés. Ces cellules progénitrices sont capables de récapituler la fusion des myoblastes lorsque le milieu de croissance est changé pour un milieu contenant un faible taux de sérum, le milieu de différenciation. Après quelques jours de différenciation, il est alors possible d'observer des fibres multinucléées. Les lignées cellulaires permettent d'étudier les mécanismes moléculaires régissant la fusion. Les techniques biochimiques et biologie cellulaire sont régulièrement appliquées sur les lignées cellulaires. Ce qui a ultimement conduit à une plus grande compréhension de la fusion des myoblastes.

Même si les lignées sont d'une utilité cruciale, l'étude du muscle doit se faire à l'aide de modèles animaux aussi. La drosophile a été un instrument puissant dans l'identification de molécules régissant la myogenèse. Le poisson zèbre et la souris, des espèces plus évoluées que la drosophile, ont permis d'accomplir deux choses. Dans un premier temps, ces modèles ont permis de confirmer et d'infirmer les molécules identifiées chez la drosophile. Dans un second temps, ils ont permis d'identifier des joueurs spécifiques aux vertébrés [1, 2]. Dans les dernières années, l'embryon de poulet a été développée comme modèle animal pour l'étude des stades précoces de la myogenèse [3]. Les différents modèles présentent tous des avantages et des inconvénients. Par contre chacun d'eux facilite l'étude de certains aspects de la formation du muscle. La table 1.I compare les espèces en énumérant certains avantages et inconvénients à leur utilisation.

### Avantages

Drosophile	Souris	Poisson zèbre	Embryon de poulet
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Système génétique simple</li> <li>• Peu de redondance des gènes</li> <li>• Myogenèse complète en 12 heures</li> <li>• Chaque fibre est un muscle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myogenèse ressemble à celle de l'humain</li> <li>• Longue espérance de vie pour étudier le muscle sur le long terme par exemple régénération ou vieillissement.</li> <li>• Possibilité d'isoler des myoblastes primaires en grand nombre.</li> <li>• Possibilité de faire de faire de la génétique (KO, cKO, CRISPR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande reproduction et courte gestation</li> <li>• Grande similarité avec le génome humain.</li> <li>• Les gènes orthologues régulent les mêmes processus.</li> <li>• Possibilité de suivre une protéines grâce à son corps transparent et de Petite taille</li> <li>• Possibilité de faire de faire de la génétique (morpholino, CRISPR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu coûteux et grande disponibilité</li> <li>• Reproduit les mêmes étapes de développement que les mammifères</li> <li>• Permet de quantifier différents paramètres du muscle</li> <li>• Permet d'étudier l'influence des tissus environnant sur le muscle</li> <li>• Flexibilité dans l'approche génétique (électroporation)</li> </ul>

### Désavantages

Drosophile	Souris	Poisson zèbre	Embryon de poulet
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Loin des vertébrés évolutionnairement</li> <li>• Processus de myogenèse très différents des vertébrés.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Génome plus complexe et redondance des gènes</li> <li>• Impossibilité de faire de l'imagerie en temps réel <i>in vivo</i></li> <li>• Nombre de progéniture limité</li> <li>• Temps de générer des mutants est long.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Évolutionnairement loin des mammifères</li> <li>• Les molécules identifiées doivent être testées dans un modèle mammifère.</li> <li>• Duplication de certains gènes du génome</li> <li>• Limitations des anticorps et autres réactifs disponibles.</li> <li>• Différents types de muscles (rapide et lent)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne peut être utilisé pour le développement tardif</li> <li>• Le génome n'est pas encore complètement séquencé.</li> </ul>

**Table 1. I : Principaux modèles expérimentaux utilisés dans l'étude du muscle.**

Inspiré de [1-3]

Notre étude porte sur la compréhension du mécanisme moléculaire menant à la fusion des myoblastes chez les vertébrés. Ce processus est critique dans le développement du muscle squelettique. Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé l'embryon de poulet et les cellules murines C2C12 comme modèle expérimentaux. L'embryon de poulet présente différents avantages d'utilisation dans l'étude du développement du muscle dont le principal est d'avoir les mêmes étapes de développement que tous les vertébrés et de d'avoir accès aux structures primaires du développement tels les somites.

Afin de bien comprendre l'enjeu de la thèse, l'introduction explorera les thèmes suivants :

- 1) Développement du muscle squelettique chez les vertébrés.
- 2) La fusion cellule-cellule et plus spécifiquement la fusion des myoblastes tant chez la drosophile que chez les vertébrés.
- 3) Les RCPG d'adhésion, plus spécifiquement BAI1, BAI2 et BAI3.

## **1.1 Le muscle squelettique**

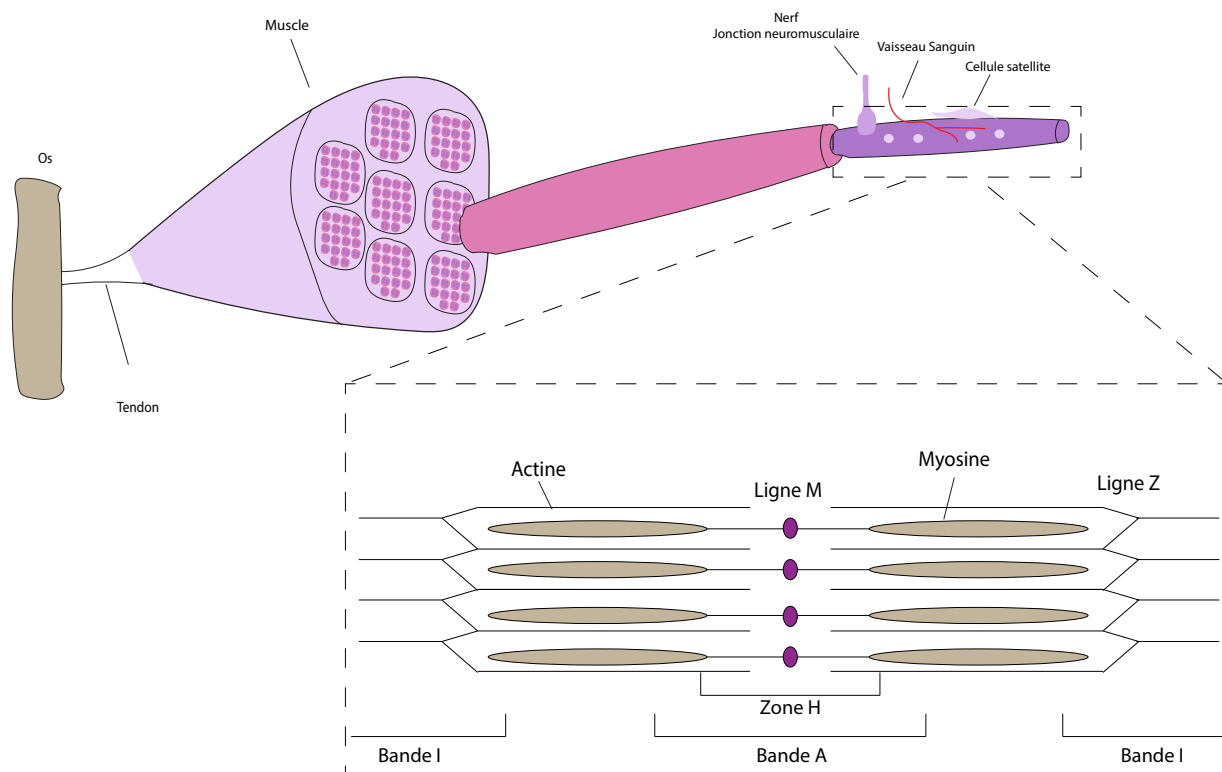
### **1.1.1 La structure du muscle**

Les muscles squelettiques sont responsables de la motricité du corps. Ils sont attachés aux os par les tendons et ils sont en contact avec le système nerveux par les jonctions neuromusculaires qui contrôlent le mouvement. De plus, ils sont liés au système vasculaire pour l'apport en oxygène et en nutriments. Le muscle est un tissu complexe formé de plusieurs structures et il varie en taille, en forme et en organisation de ses fibres.

Chaque muscle est composé d'ensembles de fibres musculaires. Les fibres sont à leur tour formées par plusieurs événements de fusion des myoblastes (qui sera discuté en détail dans le présent chapitre). Au stade mature, les noyaux se retrouvent en périphérie de la fibre afin de permettre à la machinerie de contraction de fonctionner. Il existe 2 types de fibres : les fibres de type I et de type II. Le premier type est utilisé pour les efforts physiques prolongés. Les fibres de type II ont une contraction rapide et puissante requise pour les efforts brefs et intenses (exemple : entraînement par intervalle). À la suite de blessures, le muscle squelettique a la capacité de se régénérer. Cette réparation est possible grâce à l'activité des cellules souches musculaires, les cellules satellites (CS). Elles se localisent le long des fibres musculaires entre le sarcolemme et la lame basale. Lorsqu'elles sont activées, ces dernières sont responsables de la régénération du muscle suite à une blessure. L'efficacité de la régénération dépend de l'interaction entre les CS et leur environnement qui est influencée par différents facteurs comme l'innervation, la vascularisation et la gravité de la blessure. Ces facteurs définissent le microenvironnement où résident les cellules satellites. Une fois activées, elles se divisent de façon asymétrique afin de maintenir un bassin de cellules satellites tout en produisant les myoblastes nécessaires à la réparation de la blessure [4].

Les éléments contractiles du muscle sont les myofibrilles. Chacune de ces unités est formée de sarcomères, elles-mêmes composées de myosine et d'actine organisées telles que schématisées dans la figure 1.1.





**Figure 1.1 Structure du muscle squelettique des vertébrés.**

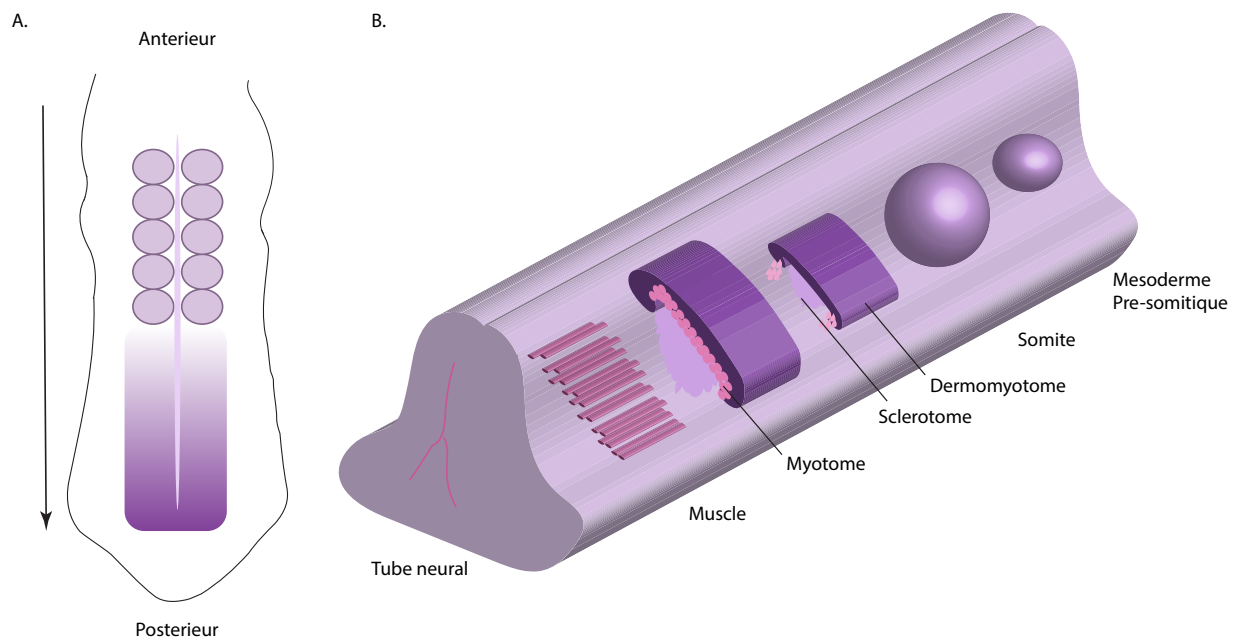
Le muscle squelettique est relié à l'os par le tendon. Chaque muscle est constitué de faisceaux eux-mêmes englobant un regroupement de fibres multinucléées. Ces dernières sont en contact avec les jonctions neuromusculaires et le système sanguin. Les cellules satellites se retrouvent le long des fibres. Les myofibrilles sont constituées d'éléments contractiles. Chacun est composé de sarcomère. La contraction du muscle est régie par l'activité du sarcomère où le glissement de l'actine et de la myosine qui se raccourcit de 20 à 50% et permet ainsi de répondre au stimuli. Les coupes longitudinales ont permis d'observer une alternance de régions claires et foncées. Il existe une alternance de bandes foncées (bande A) et de bandes claires (bande I). La bande A est due à la condensation de la myosine. Cette bande est coupée au milieu par une rayure claire, la zone H. La bande I est coupée par la ligne Z, la plus petite unité contractile, qui sépare deux sarcomères [4].

## 1.1.2 Développement musculaire chez les vertébrés

Le somite est une sphère de cellules formée très tôt durant le développement dans le mésoderme paraxial, cette structure apparaît le long de l'axe du tube neural (figure 1.2). Les somites sont caractérisés par une couche externe de cellules épithéliales entourant un amas de cellules mésenchymateuses. Cette structure est le somitecoele [5]. Durant les stades avancés du développement, les cellules épithéliales de la partie ventrale du somitocèle subissent une transition mésenchymateuse et se mélangent aux cellules de la cavité mésenchymateuse du somitocèle. Cet événement donne lieu au sclérotome [6]. Ce tissu donnera naissance plus tard au cartilage et aux os du squelette. La partie dorsale de somite conserve son identité épithéliale et deviendra le dermomyotome. Ce dernier est à l'origine du derme dorsal, des vaisseaux sanguins, des cellules endothéliales ainsi que du myotome qui deviendra le muscle squelettique [7].

Peu de temps après la formation du somite, celui-ci se différencie sous différents signaux. Sous l'influence de Sonic Hedgehog, secrété par le tube neural, la formation du sclérotome débute [6]. Les cellules épithéliales perdent leurs membranes basales et entament la transition vers des cellules mésenchymateuses (EMT). Ce passage est accompagné par une diminution de l'expression de N-Cadhérine qui diminue l'adhésion cellulaire et augmente la migration des cellules [6, 8]. Les cellules migrent alors dans différentes directions pour donner naissance à différentes structures dans l'embryon. Le sclérotome exprime alors les facteurs Pax1 et Pax9 qui lui sont spécifiques et qui sont impliqués dans le maintien de son identité et dans la prolifération des cellules du sclérotome. Le développement du sclérotome inclut une polarisation de la partie caudale (postérieure) qui est séparée de la partie crâniale (antérieure). Cette segmentation est due à l'apparition de cellules allongées et orientées de façon transversale, c'est la fissure de Von Ebner [6]. Chacune de ces parties diffère selon la densité cellulaire, les protéines exprimées et leur influence sur le système neuronal. La partie caudale est réputée donner naissance aux structures tels les vertèbres, les disques intervertébraux, les côtes de la cage thoracique, aux tendons et aux joints synoviaux (jonction entre les vertèbres). Tandis que la partie antérieure du sclérotome oriente la formation des neurones [6].

Des expériences utilisant l'embryon de poulet ont montré que la partie dorsale du somite qui formera le dermomyotome doit son identité au tube neural qui sécrète des signaux de la famille Wnt ainsi qu'au notochorde qui exprime Shh [9]. Sous cette influence, les cellules acquièrent l'identité dermomyotomale. Les cellules dorsales du somite s'étirent pour constituer un feuillet oblique le long du tube neural. C'est le dermomyotome (Figure 1.2) [7]. À ce stade, les cellules à l'extrémité du feuillet forment des replis nommés les lèvres du dermomyotome, entourant en partie le sclérotome. Une fois cette structure établie, les cellules s'engagent vers la lignée myogénique. Les cellules forment des myotubes primaires adjacents au dermomyotome, il est à noter que ces myotubes sont mononucléés [7]. Les fibres sont alors toutes alignées et parallèles le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Cette orientation est acquise grâce à l'expression du facteur WNT11 par le tube neural. Une étude a démontré que WNT11 dicte la directionalité des myocytes à travers le mécanisme polarité planaire des cellules (PCP). Suite à l'activation de ce mécanisme, la signalisation se complète à travers le mécanisme WNT/  $\beta$ -caténine afin d'avoir des fibres embryonnaires fonctionnelles [10]. Ce tissu est le myotome primaire (Figure 1.2) [7].



**Figure 1.2 Développement embryonnaire.**

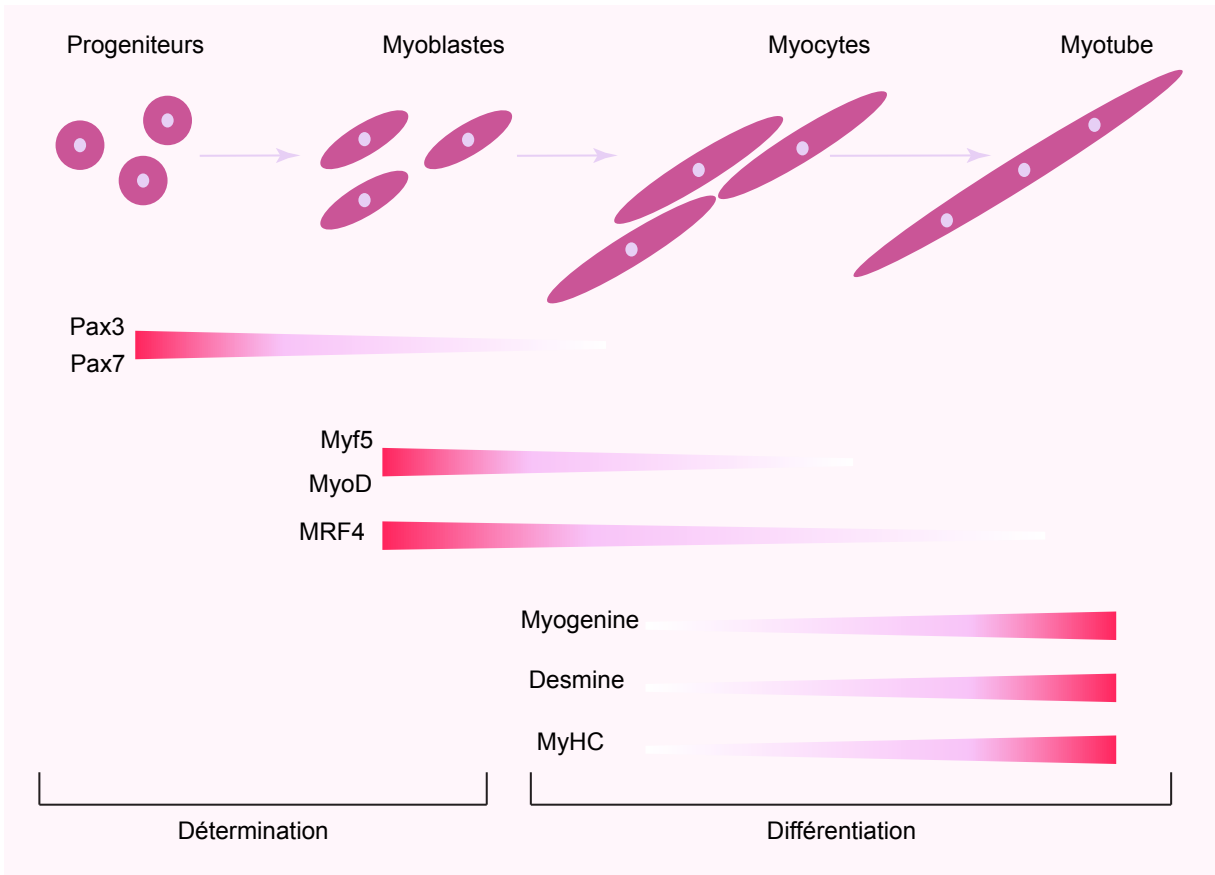
A) Somitogenèse : le développement des somites se fait de la région antérieure vers la région postérieure selon l'expression de différents facteurs de transcription ce qui est nommé l'horloge moléculaire. B) Le muscle prend naissance à partir du mésoderme pré-somitique qui se développe en somite mature. L'expression de différents facteurs permet la différenciation en sclérotome et en dermomyotome. Des cellules migrent alors sous le dermomyotome pour former le myotome primaire. Ce dernier est composé de fibres mononuclées qui agissent comme échafaudage à la musculature plus mature. Inspiré de [11]

### 1.1.3 Programme génétique myogénique

Génétiquement, l'apparition du myotome est définie par l'expression des facteurs de régulation myogénique (MRF). La découverte des MRF a commencé par l'identification de MyoD [12]. Ce dernier a l'habileté de transformer des cellules de types fibroblastes en cellules capables de fusionner et former des myotubes [12]. La découverte de ce facteur a mené à l'identification de 3 nouveaux régulateurs myogéniques soit Myf5, myogénine, et MRF4 [13]. Tous sont capables de transformer différents types cellulaires en cellules musculaires. Les MRF ont une structure hélice-boucle-hélice. Le domaine base se lie à l'ADN, tandis que les domaines hélice sont requis pour l'hétérodimerisation avec la protéine E. Cette dernière reconnaît la boîte E, un motif caractéristique des promoteurs des gènes spécifiques aux muscles [14]. Chronologiquement, Myf5 est le premier facteur exprimé suivi de MyoD (Figure 1.3). Des modèles murins ont montré qu'en l'absence de Myf5 ou de MyoD, les souris sont viables et ne présentent pas de défauts apparents [15, 16]. Les souris manquant Myf5 ont un délai dans le développement qui est rattrapé une fois MyoD exprimé. Inversement, l'absence de MyoD force le maintien de l'expression de Myf5 à des stades plus tardifs du développement [15-17]. Par contre, en l'absence commune des 2 facteurs les souris n'ont pas de tissu musculaire et manquent aussi des cellules engagées dans la lignée musculaire. Ces expériences montrent que Myf5 et MyoD sont redondants [16]. Suivant l'expression Myf5 et MyoD, Myogénine et MRF4 sont exprimés (Figure 1.3). Les souris myogénine KO ont montré que l'expression de Myf5 et MyoD n'est pas affectée [18, 19]. Par contre, l'expression des facteurs de différenciation tardive telle que myosine à chaîne lourde (MyHC) et desmine étaient réduits. Ces études génétiques ont permis d'établir que Myf5 et MyoD sont responsables de l'établissement de la lignée myogénique [18, 19]. Ils sont alors en amont de Myogénine et MRF4. Ces derniers sont impliqués plus directement dans la phase de différenciation terminale des myoblastes (Figure 1.3).

Dans le dermomyotome, les cellules, qui s'engagent dans la lignée musculaire, expriment principalement Pax3 et Pax7. Par contre, les cellules migratrices qui forment les muscles des membres et du diaphragme expriment Pax3 et non Pax7. Les modèles murins où

Pax3 a été éliminée sont incapables de former les muscles des membres. Aussi en l'absence de Pax3, MyoD n'est pas exprimé, ce qui place Pax3 génétiquement en amont de MyoD et au même niveau que Myf5 [20-22]. De son côté, Pax7 semble être facultatif pour le développement [23]. La perte de Pax3 est létale pour l'embryon et empêche l'apparition de cellules exprimant Pax7 [24]. Par contre, la perte de Pax7 affecte seulement les stades tardifs du développement qui se traduit par la formation de fibres plus petites [24]. Ces études suggèrent que Pax3 et Pax7 sont capables de se compenser mutuellement de façon partielle. Puisque la perte des deux facteurs mène à un phénotype plus prononcé [25]. En bref, ces études suggèrent que Pax3 joue un rôle décisif dans les premières étapes de la formation des muscles des membres tandis que Pax7 est plus impliqué dans la formation des fibres secondaires, l'établissement des cellules satellites et la régénération à l'âge adulte [26].



**Figure 1.3 Programme génétique de différenciation.**

L'identité de la lignée musculaire est acquise chez les progéniteurs Pax3<sup>+</sup> et Pax7<sup>+</sup> par l'expression des facteurs de transcription de la famille MRF : Myf5, MyoD et MRF4. La période de différenciation se conclut par la formation de myotubes multinucléés suite aux multiples fusions des myocytes. Cette étape est marquée par l'expression de Myogenine, Desmine et MyHC. Inspiré de [11]

## 1.1.4 Fusion cellule-cellule

Durant le développement, les myoblastes se différencient en myocytes sous l'expression des MRF pour finalement fusionner leurs membranes et former les fibres musculaires multinucléées, les myotubes (Figure 1.3). Cette fusion entre deux cellules n'est pas seulement limitée aux myoblastes, mais elle est essentielle pour différents tissus et types cellulaires. Il ya la fusion des gamètes, la fusion des macrophages, la fusion des trophoblastes et finalement la fusion des myoblastes. Le processus implique l'alignement des deux cellules et le rapprochement de leurs membranes, puis suit la fusion. Bien que chacun des types cellulaires soit régulé par un mécanisme spécifique, il existe des similarités comme la présence des protéines d'adhésion (impliquées dans le contact cellule-cellule), L'implication des protéines dites fusogènes. Elles sont responsables du réarrangement de la membrane plasmique et le rôle des protéines chargées du réarrangement du cytosquelette et désassemblage des complexes. La figure 1.4 résume les types de cellules qui fusionnent et les molécules essentielles qui les régulent identifiées à ce jour.

Les macrophages fusionnent pour former les ostéoclastes pour la résorption des os ou pour former les cellules géantes afin de participer à la réponse immunitaire. CD47 et MFR sont des protéines membranaires de la famille des immunoglobulines et sont essentielles à la fusion des macrophages. Les études *in vitro* montrent qu'ils agissent selon le mode récepteur-ligand, car ils sont exprimés par deux macrophages opposés impliqués dans la fusion. Ceci rappelle les récepteurs régulant la fusion des myoblastes chez les drosophiles Duf et Sns [27] (voir section 1.1.5.1).

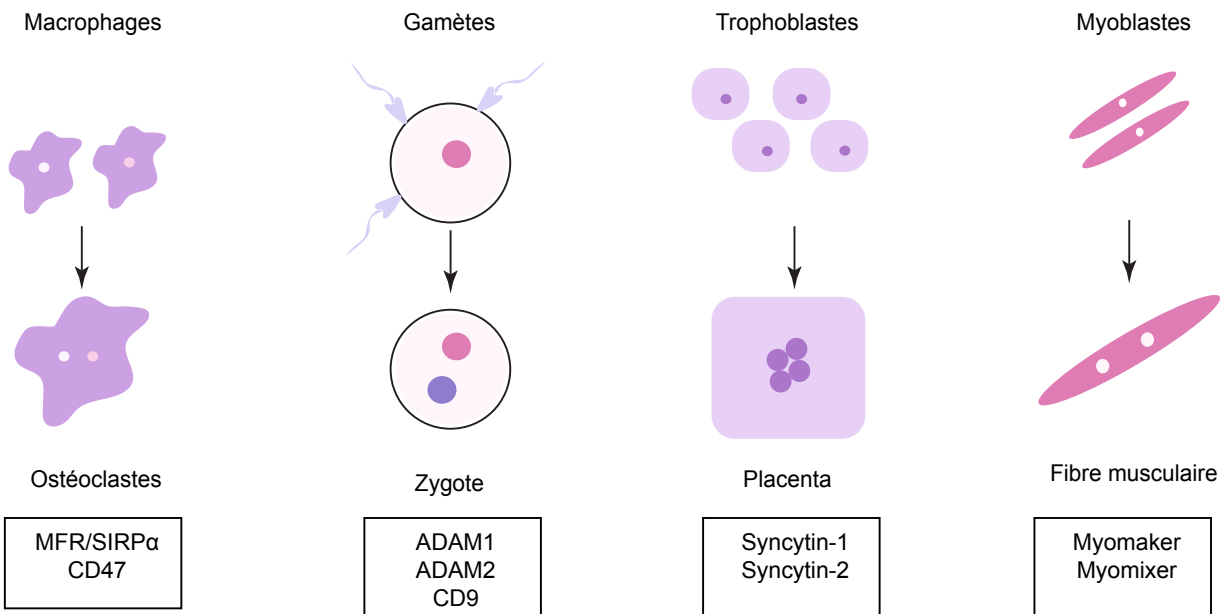
Les gamètes, lors de la fécondation, ont aussi un mécanisme de fusion. Malgré l'implication de différentes protéines telle que ADAM1 et 2, seul CD9 est indispensable à la fusion des gamètes. CD9 est une protéine de la famille des tétraspanines qui contient 4 domaines



transmembranaires. Son mécanisme d'action est encore inconnu ainsi que l'implication de d'autres complexes protéiniques [28-30].

La fusion des trophoblastes est responsable de la formation du placenta lors de la grossesse. Le placenta sert de barrière entre le système sanguin de la mère et celui du fœtus. Le mécanisme régissant la fusion des trophoblastes est très peu connu. Seul Syncytin-1 et 2, protéines à domaines transmembranaires, ont été identifiées. Leur mode d'action demeure inconnu et plus d'études sont nécessaires pour comprendre la fusion des trophoblastes [31, 32].

Bien que des similarités existent entre les différents types de fusion, la prochaine section se concentrera à détailler la fusion des myoblastes.



**Figure 1.4 Fusion cellule-cellule.**

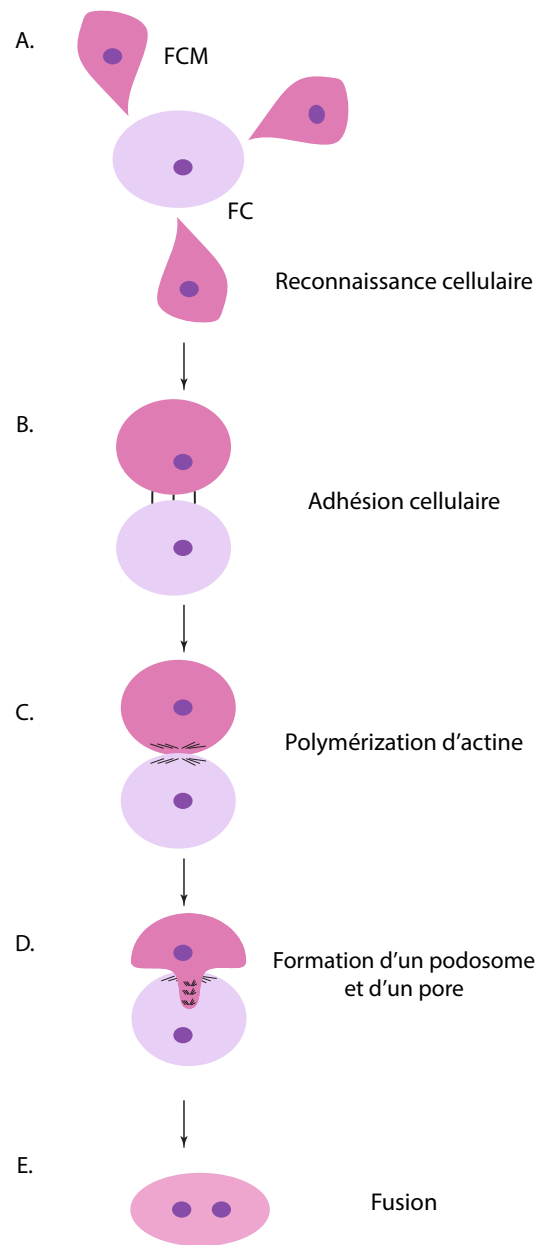
Cellules de vertébrés qui ont des événements de fusion. Les principales molécules fusogènes identifiées à ce jour sont présentées. Voir le texte pour plus d'information [27-31].

## **1.1.5 Fusion des myoblastes**

La fusion des myoblastes est la dernière étape de la myogenèse, elle permet la formation de myotubes à partir de myoblastes mononucléés. Ce processus est conservé de la drosophile aux vertébrés. Pour comprendre cet évènement du développement, plusieurs modèles ont été développés, dont la drosophile, l'embryon de poulet, le poisson-zèbre ainsi que la souris.

### **1.1.5.1 Fusion des myoblastes chez la drosophile**

Chez la drosophile, les muscles se développent sur une période de 10 à 12 heures. Cette période donne naissance aux 30 segments musculaires de la région abdominale. Cette structure correspond au muscle squelettique des vertébrés. Ces muscles diffèrent selon leur taille, leur forme, leur localisation ainsi que leur point d'attache [33, 34]. Chaque muscle de la drosophile est une fibre qui est le résultat de la fusion d'une cellule fondatrice (FC) avec plusieurs cellules compétentes pour la fusion (FCM) (Figure 1.5).



**Figure 1.5 Fusion des myoblastes chez la drosophile.**

A) les cellules FCM forment des protusions et migrent vers les cellules FC. B) Grâce aux récepteurs membranaires, les FC et FCM adhèrent ensemble. C) Des foyers d'actine sont alors formés au site de contact. D) Un podosome est formé par les cellules FCM qui envahit la cellule FC. E) La fusion est complétée, le foyer d'actine est dissout et les noyaux sont positionnés au centre de la fibre. Le cycle recommence pour augmenter la taille de la fibre. Inspiré de [2]

Les premières études sur la myogenèse chez la drosophile ont révélé la présence de 2 populations de cellules soit les cellules fondatrices (FC) et les myoblastes compétents pour la fusion (FCM). Ces deux types sont originaires du mésoderme somatique. Durant le développement, l'inhibition latérale régit par Notch ainsi qu'une division asymétrique permettent de sélectionner les cellules fondatrices [35]. Ces dernières dictent la fusion et l'identité du muscle qui sera formé [35]. Les cellules compétentes à la fusion, quant à elles sont spécifiées par l'expression de facteur de transcription tel que la famille Gli ainsi que celle de *Lame Duck* [36, 37].

Après la première fusion entre les cellules FC et FCM, d'autres cellules FCM sont recrutées pour d'autres événements de fusion jusqu'à ce que la taille désirée du muscle soit atteinte. Il est à noter qu'étant donné le fait que l'identité du muscle est dictée par la cellule FC, le processus de fusion des myoblastes est cellule autonome et donc il ne subit pas l'effet de signaux externes (qui proviennent des tissus environnants).

Des études de pertes de fonction génétiques ont permis d'identifier les joueurs majeurs dans les différentes étapes amenant à la fusion qu'on peut subdiviser comme suit: la pré-fusion incluant la reconnaissance, migration et adhésion des cellules et la fusion incluant la signalisation et le réarrangement de l'actine. Les molécules ainsi identifiées sont résumées dans le table 1.II .

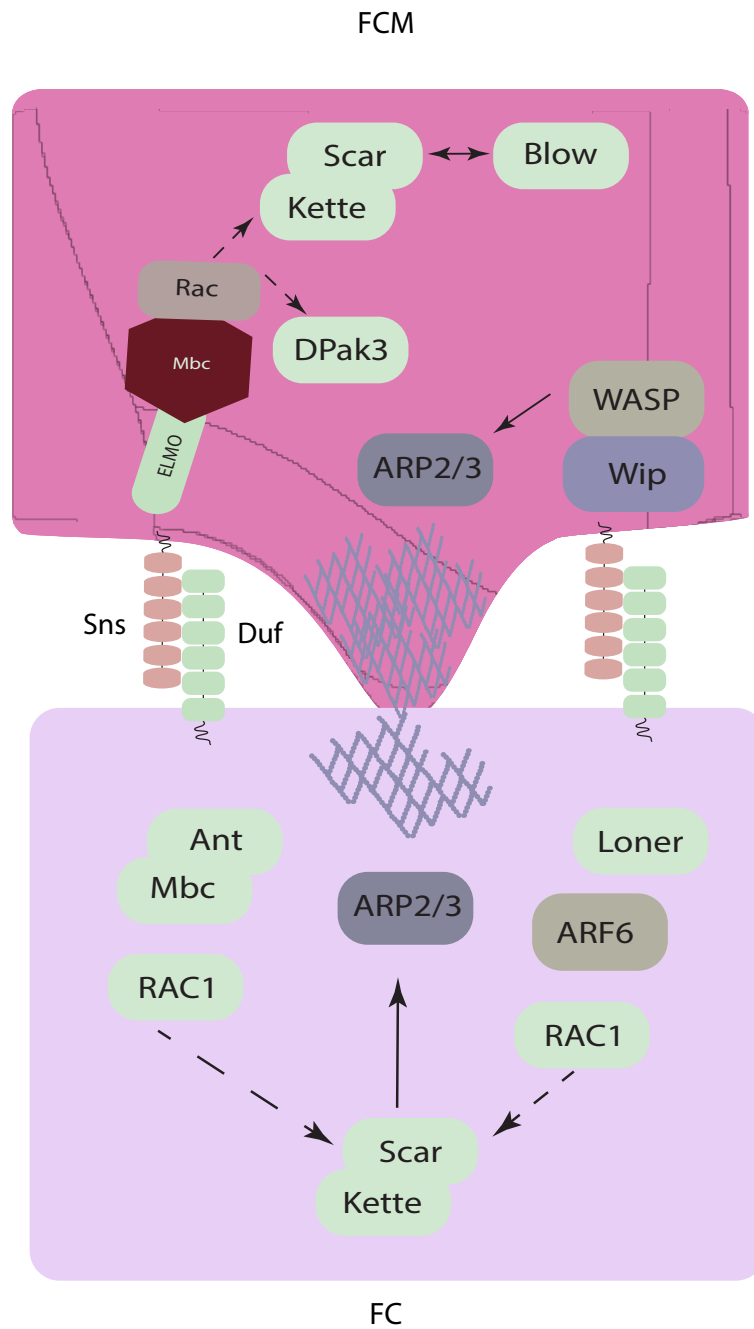
Les étapes de la pré-fusion sont régies par un ensemble de molécules. Chez la drosophile, les cellules fondatrices et les myoblastes compétentes pour la fusion se développent à proximité l'une de l'autre. De plus une fois que le myotube commence à se former, et au fur et à mesure que sa taille croît, il sera en contact direct avec des FCM prêtes à fusionner. Étant donné cette proximité, il est difficile de faire la différence entre les molécules qui jouent un rôle lors de la migration ou lors de l'adhésion. Par contre, certains indices semblent indiquer que les cellules FCM adoptant une forme de larve dictent la migration (Figure 1.5) [38]. Des expériences employant des cellules fixées ou des cellules vivantes ont montré que cette protrusion de la cellule FCM est orientée vers les cellules FC ou le myotube en formation [38, 39]. Des évidences directes ont montré que la migration des FCM est dépendante de molécules impliquées aussi

dans l'adhésion qui aident à leur donner une direction. Chez les cellules FC, on compte l'expression de protéines transmembranaires de la famille des Immunoglobulines incluant Kin-of-IrreC/Dumfounded (Kirre/Duf) et Roughest/Irregular-optic-chiasma-C (Rst/Irre-C). Appartenant à la même famille, Stick-and-Stones (Sns) est exprimé chez les cellules FCM et accomplit la fonction de reconnaissance et d'adhésion. [40-44] Une fois l'adhésion complétée, les mécanismes de remodelage de l'actine du cytosquelette se mettent en marche.

En aval, Antisocial ou Rolling pebbles (Ants ou Rols) est reconnu pour être impliqué dans le recyclage de Duf entre les rondes de fusion régulant ainsi la fusion des myoblastes. De plus, Ants relie Duf à des composantes régulant le cytosquelette tel que Myoblast City (Mbc) et Titin. La perte d'expression de chacune de ses composantes mène à un défaut de fusion [45, 46].

Le remodelage de l'actine dans les FCM mène à la formation de structures apparentées aux podosomes. Ils sont riches en actine filamenteuse et l'extrémité de la structure est enrichie de molécules d'adhésions et d'échafaudages [47]. La microscopie électronique a permis de voir les podosomes des FCM envahir les cellules FC qui présentent une fine couche d'actine. Ensuite, un pore de fusion est créé, l'actine polymérisée est dissoute, et ultimement, le contenu cytosolique des deux cellules s'intègre [48].

Outre Myoblast City et les facteurs de nucléation d'actine, d'autres régulateurs du cytosquelette ont été identifiés comme importants pour la fusion. Ces derniers sont énumérés dans la table 1.II.



**Figure 1.6 Programme moléculaire régulant la fusion des myoblastes chez la drosophile.**

Résumé des molécules impliquées dans la fusion de myoblastes. Voir le texte pour plus d'information. Inspiré de [2]

Fonction	Nom	Classe de protéines	Orthologues Vertébrés	Force du phénotype	Réf
Reconnaissance et adhésion cellulaire	Kirre/Duf	Superfamille des Immunoglobulines	Neph1,2,3	Pas de fusion	[40, 41]
	Rst/IrreC	Superfamille des Immunoglobulines	-	Pas de fusion	[40]
	Sns	Superfamille des Immunoglobulines	Nephrine	Pas de fusion	[42]
	Hibris	Superfamille des Immunoglobulines		Pas de fusion	[43, 44]
Remodelage du cytosquelette d'actine	Rols or Ants	Domaines d'interaction multi-protéines	Tanc1, Tanc2	Pas de fusion	[45, 49, 50]
	Elmo	Protéine adaptatrice SH2-SH3	Elmo	Pas de fusion	[51]
	Mbc	GEF	DOCK1	Pas de fusion	[38, 52, 53]
	Trio	GEF	TRIO	Non testé	[54]
	D-Titin	Protéine adaptatrice	Ttin	Non testé	[55, 56]
	Loner/Schizo	GEF	Brag2	Pas de fusion	[39, 57]
	ARF6	GTPase	Arf6	Non testé	[54]
	Blow	GTPase	-	Pas de fusion	[38, 58]
	Cdc42	GTPase	Cdc42	Non testé	[54]
	Rac1	GTPase	Rac1	Pas de fusion	[57, 59, 60]
	Scar/Wave	Complexe de nucleation d'actine	Wasp	Pas de fusion	[39]
	Arp2/3	Complexe de nucleation d'actine	Arp2/3	Pas de fusion	[39]
	Kette	Complexe de nucleation d'actine	Nap1	Pas de fusion	[58]

**Table 1. II : Molécules impliquées dans la fusion des myoblastes chez la drosophile.**  
Inspiré de [54].



### 1.1.5.2 Fusion des myoblastes chez les vertébrés

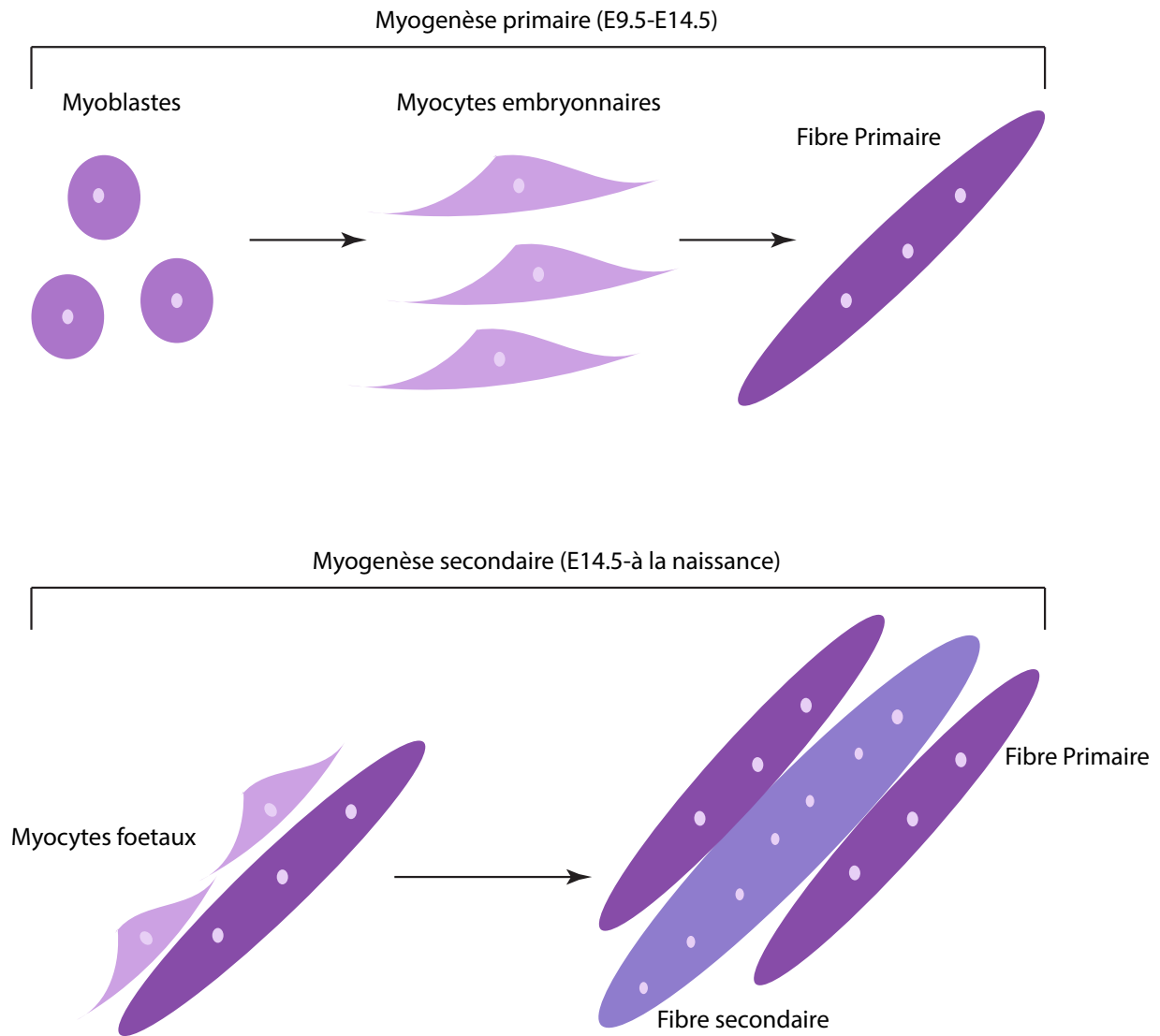
Comparativement à la drosophile, la fusion des myoblastes est peu comprise chez les vertébrés. La souris est un modèle majeur utilisé pour comprendre la formation des muscles chez les vertébrés.

Le développement embryonnaire des muscles des vertébrés se fait en 2 vagues : la myogenèse primaire et la myogenèse secondaire. La myogenèse primaire résulte de la fusion des myoblastes embryonnaires qui formeront les fibres primaires [61-63]. Ces dernières serviront d'échafaudage pour la vague suivante. La myogenèse secondaire donnera naissance aux fibres secondaires formées par la fusion des myoblastes fœtaux avec les fibres primaires (Figure 1.7). Ces myoblastes sont des cellules originaires d'une population distincte de progéniteurs et démontrent une capacité de prolifération et de fusion différentes que celle des myoblastes embryonnaires. Des expériences des traçages ont démontré que des myoblastes fœtaux sont capables de fusionner autant avec les fibres primaires que secondaires afin de contribuer à la croissance des fibres [24, 64].

À cette étape du développement, l'expression des chaînes lourdes de myosine commence à différer. Cette spécification détermine les fibres musculaires de type I (contraction lente) qui sont responsables du maintien de la posture et les fibres à contraction rapides qui sont responsables du mouvement [65]. Finalement, à l'âge adulte, une troisième population de précurseur est active, les cellules satellites adultes. Elles se situent entre la lame basale et la membrane plasmique de la myofibre [66]. Les myoblastes dérivés des cellules satellites sont responsables de la croissance et de la régénération du muscle [67-69].

Les lignées cellulaires de vertébrés et les myoblastes primaires ont permis d'étudier la fusion *in vitro*. Ces études ont révélé que la formation des myotubes multinucléés se faisait en plusieurs étapes. Au début, les myoblastes se différencient en myocytes allongés. Ils vont alors migrer, adhérer et fusionner à d'autres myocytes et ainsi donner naissance à de petits myotubes avec quelques noyaux. Ces derniers vont croître à travers la fusion avec d'autres myocytes [70].

La fusion entre myotubes a aussi été observée [71]. La fibre musculaire est alors complètement formée.



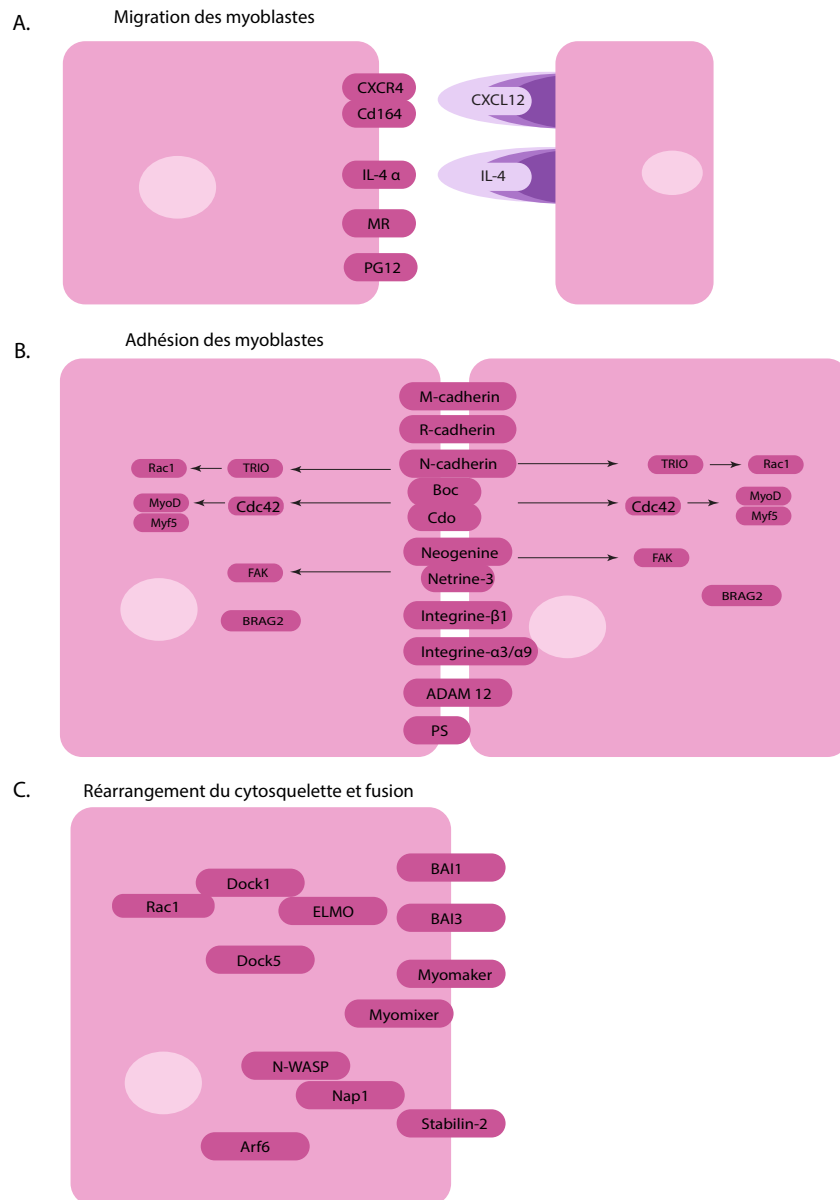
**Figure 1.7 Vagues de myogenèse.**

La myogenèse n'est complète qu'après plusieurs vagues de fusion. La myogenèse primaire comprend la fusion des myoblastes embryonnaires ce qui donnera naissance aux fibres primaires. La myogenèse secondaire est réalisée par la fusion des myoblastes foetaux qui donnera les fibres secondaires. La fusion fibre-fibre a aussi été observée. Inspiré de [72].

## 1.1.6 Mécanismes de signalisation régulant la fusion des vertébrés

Les voies de signalisation régissant la fusion des myoblastes des vertébrés sont moins connues que celles de la drosophile. Due à la difficulté de visualiser la fusion *in vivo*, la dissection des mécanismes doit souvent passer par l'utilisation des lignées cellulaires de vertébrés tels que les C2C12, Sol8 ou L6 ainsi que des cultures primaires isolées à partir de muscles de souris [73]. Comme décrit dans la section précédente, chez la drosophile, la fusion des myoblastes est médiée par 2 populations de cellules soit les FC et les FCM. Chez les vertébrés, cette notion de deux populations n'a à ce jour pas été montrée. Cette différence primordiale entre les deux systèmes alimente le débat à savoir si la machinerie moléculaire est conservée. Il est donc essentiel de déterminer s'il y a bel et bien conservation entre la drosophile et les vertébrés et quel est le degré de cette conservation s'il y a lieu. D'énormes efforts ont été déployés lors des dernières années afin d'élucider les mécanismes régulateurs de la fusion des myoblastes.

Chez les vertébrés tout comme chez la drosophile, la fusion est régie par 3 étapes : la migration, l'adhésion et la reconnaissance des partenaires, et finalement, le remodelage du cytosquelette d'actine et la fusion des membranes [74, 75]. Certaines molécules peuvent réguler positivement ou négativement chacune de ces étapes, et par conséquent, la fusion des myoblastes. Les molécules identifiées sont énumérées dans la figure 1.8 et seront discutées dans la section suivante selon l'étape où elles interviennent.



**Figure 1.8 Programme moléculaires des vertébrés.**

Résumé des molécules impliquées dans A) la migration des myoblastes. B) l'adhésion des myoblastes. C) Le réarrangement du cytosquelette et fusion. Voir le texte pour plus d'informations. Inspiré de [2]

### 1.1.6.1 La migration des myoblastes

Durant la myogenèse, les myoblastes rencontrent deux périodes importantes de migration. La première est celle de la migration des cellules progénitrices vers les futurs sites de musculature. La deuxième migration est celle des myoblastes qui se cherchent des partenaires de fusion [74, 75]. Cette migration permet d'amener les myoblastes en contact afin de permettre la fusion de leurs membranes. Une fois le myotube formé, les autres myoblastes sont redirigés vers lui. Cette constatation suggère que le myotube envoie des signaux pour attirer les cellules vers lui. En accord avec cette hypothèse, l'expression de plusieurs molécules fonctionnelles a été identifiée sur les myoblastes et les myotubes. Ces molécules influencent positivement ou négativement la migration des myoblastes [76]. La première catégorie permet aux myoblastes d'augmenter leur chance de trouver un partenaire, tandis que la deuxième catégorie ralentit la migration et par conséquent permet d'augmenter les chances de former un contact cellule-cellule avec les autres myoblastes et myotubes [77].

Parmi les facteurs positifs, NFATc2 joue un rôle important. Il est responsable de l'activation des gènes de la seconde phase de fusion [70, 78]. Les souris NFATc2<sup>-/-</sup> montrent des défauts de croissance des myotubes. La culture de cellules primaires montre que les myoblastes sont incapables de fusionner grâce à une incapacité des myoblastes de migrer et de fusionner à d'autres myoblastes ou myotubes [79].

NFATc2 régulent également d'autres facteurs importants à la migration des myoblastes. Des expériences *in vitro* ont montré que NFATc2 est responsable de l'expression de l'interleukine-4 (IL-4) dans les cellules musculaires [80]. Ce facteur est sécrété par les myotubes naissants et recrute les myoblastes qui eux expriment le récepteur IL-4 $\alpha$  [80, 81]. Les souris IL 4<sup>-/-</sup> présentent des muscles plus petits. De plus, les myoblastes primaires sont incapables de fusionner en culture [79-81]. En plus de réguler la migration, IL-4 est responsable de l'expression d'autres joueurs tels que les intégrines et le récepteur au Mannose (MR) [81, 82]. Ce récepteur transmembranaire de type I est directement lié à la migration. Les études *in vitro*

et *in vivo* ont démontré que les myoblastes MR<sup>-/-</sup> ont une fusion réduite probablement à cause d'un défaut de migration. Ce phénotype corrèle avec la baisse de motilité des myoblastes [82].

L'étude des myoblastes, à différents temps de la myogenèse, a permis d'observer la modulation de plusieurs chemokines et de leur récepteur. Le couple CXCR4-CXCL12 s'est avéré particulièrement actif lors de la prolifération et la phase finale de différenciation des myoblastes [76]. Les souris transgéniques de CXCR4 montrent un défaut de migration des myoblastes [83]. Les expériences *in vitro* démontrent le même défaut de migration qui se conclut par un défaut de fusion. Le récepteur CXCR4 est exprimé par les myoblastes tandis que les myotubes secrètent CXCL12 pour attirer les myoblastes mononucléés[83].

Corécepteur de CXCR4, la sialomucine CD164 voit son expression augmentée lors de la différenciation myogénique [84]. Bien que son rôle *in vivo* reste à démontrer, des expériences *in vitro* ont permis d'observer son rôle. L'absence de CD164 entraîne une diminution de la fusion des myoblastes tandis qu'une augmentation produit l'effet inverse. De plus, la migration induite par CXCL12 est inhibée en l'absence de CD164 [84, 85].

Comme décrit plus tôt, la régulation de la migration se fait aussi de façon négative par des molécules telle que la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) [77]. Ce facteur fait partie de la famille des prostaglandines. Les expériences réalisées à partir de culture de myoblastes primaires ont démontré que PGI<sub>2</sub> et son récepteur IP (récepteur de la Prostaglandine I<sub>2</sub>) sont exprimés à différentes étapes de la différenciation myogénique [77]. De plus, les cellules déficientes en PGI<sub>2</sub> montrent une augmentation de leur motilité et une baisse de la fusion. Ce résultat suggère que la migration doit être régulée et que PGI<sub>2</sub> agit comme un frein à celle-ci afin de permettre aux myoblastes d'établir des contacts cellule-cellule [77].

### **1.1.6.2 Adhésion et reconnaissance des myoblastes.**

À ce jour, les molécules d'adhésion ont été principalement étudiées dans les modèles *in vitro* et lors de la régénération des muscles chez la souris. Ces études ont révélé qu'il y a

beaucoup plus de molécules responsables de l'adhésion chez les vertébrés que chez la drosophile. La nécessité d'avoir une si grande diversité de molécules pour l'adhésion est encore inconnue. Seul Sns, exprimé chez la drosophile, est conservé chez la souris connue sous le nom Néphrine. Son rôle est essentiel pour le développement du rein [86]. Par contre, sa fonction n'est pas conservée pour la fusion des myoblastes, puisque le modèle de souris mutante ne montre aucun défaut musculaire, suggérant que Néphrine ne joue pas un rôle majeur dans la fusion des myoblastes chez les vertébrés [86].

Plusieurs études *in vitro* ont montré que lors de la migration, les myoblastes forment des lamellipodes et des filopodes afin de chercher des partenaires de fusion. Ces structures sont le premier point de contact entre deux myoblastes. Ces sites de contact donnent lieu à plusieurs changements dans la machinerie tant extracellulaire qu'intracellulaire. Parmi celles-ci, notons l'importance des cadhérines, des intégrines, des métalloprotéases et des phospholipides [87-92].

Les cadhérines N, M et R sont exprimées dans le tissu musculaire très tôt dans le développement [93-95]. L'activation des cadhérines entraîne la transduction du signal soit par l'interaction cadhérine-cadhérine ou par l'interaction avec le cytosquelette qui mène à l'activation de RhoA et à la transcription de gènes musculaires [96-99]. La M-cadhérine via l'interaction avec la Rho-GEF Trio active la petite GTPase Rac1 [100]. Les études de pertes de fonction de la M-cadhérine ont révélé une incapacité des myoblastes à fusionner *in vitro* [101]. Par contre, les souris M-cadhérine knock-out ne présente aucun défaut de développement ou lors de la régénération [102]. Les mêmes constatations sont faites pour N et R-cadhérine. Ces résultats suggèrent qu'il y a peut-être compensation entre les cadhérines [93, 102, 103]. Pour comprendre définitivement le rôle des cadhérines, il faudra générer des doubles voir des triples mutants.

Les protéines transmembranaires BOC et CDO sont membres de la superfamille des immunoglobulines [104]. Ces molécules sont responsables de l'activation post-traductionnelle de facteurs myogéniques tels que MyoD, Myf5 et myogénine [105]. BOC et CDO interagissent avec la M-cadhérine et la N-cadhérine de façon *cis* et se localisent au site de fusion [106]. Des études de perte de fonction ont révélé que l'absence de CDO mène à un retard de différenciation



myogénique autant *in vitro* qu'*in vivo* [105, 107]. À l'inverse, la surexpression de ces deux partenaires mène à une augmentation de la fusion [104, 106].

Dans le complexe M/N-cadhérine -BOC/CDO, on compte aussi le récepteur Néogénine et son ligand Nétrine-3. Leur expression est détectée dans les somites et est maintenue dans les muscles en développement [75, 108, 109]. Spécifiquement, Néogénine et Nétrine sont responsables de l'activation de FAK qui est essentiel pour la fusion des myoblastes [109, 110]. Bloquer l'expression de Néogénine mène à un blocage de la fusion. Tandis que la surexpression favorise la fusion. Finalement, la souris déficiente en Néogénine est viable, mais elle a des fibres musculaires plus petites que les souris de type sauvages [108, 109].

Lors de la fusion des myoblastes, les intégrines jouent un important rôle. Cette famille de récepteurs interagit avec la matrice extracellulaire et elle est exprimée à différentes étapes du développement musculaire [111]. La nécessité des intégrines  $\alpha 3$ ,  $\alpha 9$  et  $\beta$  a été montrée. L'élimination des intégrines  $\alpha 3$  et  $\alpha 9$  *in vitro* entraîne une diminution de la fusion [112, 113]. Leur implication lors de la fusion *in vivo* reste à élucider. *In vivo*, les souris intégrine  $\beta 1$  (*itg $\beta$ 1*) déficientes ne sont pas viables [114]. La dissection de ces mutants a permis d'observer des muscles réduits. De plus, les myoblastes isolés des souris *itg $\beta$ 1*<sup>-/-</sup> sont incapables de fusionner *in vitro*. Ce défaut est dû à une rupture des membranes et non à un défaut d'adhésion. [114]

Les intégrines peuvent interagir avec d'autres protéines dont ADAM12. Cette glycoprotéine est composée de plusieurs domaines. Notons la présence du domaine métalloprotéase et du domaine d'interaction avec les intégrines [115]. Le premier agit comme site d'interaction avec la matrice extracellulaire alors que le deuxième est le site d'interaction avec l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  dans le muscle [113]. Un groupe de chercheurs a utilisé des oligonucléotides anti-sens contre ADAM12. Ils ont observé que la fusion des myoblastes avec les myotubes était réduite [113]. Finalement, la souris déficiente en ADAM12 présente un développement et une régénération musculaire normaux [116].

Les changements observés au point de contact des myoblastes en fusion comprennent aussi des changements dans la membrane cellulaire. Parmi ceux-ci, notons l'importance de la

phosphatidylserine (PS). Ce phospholipide est asymétriquement distribué si bien qu'il est fortement présent au niveau de la partie intracellulaire de la membrane [117, 118]. Cette exposition est spécifique aux sites de fusion des myoblastes. Des études ont montré qu'à cet endroit, la membrane est plus fluide et que cette fluidité est absente des régions non-fusogéniques des myoblastes. [119, 120]. Le rôle de la PS est principalement caractérisé lors de l'apoptose. Brièvement, PS agit comme un signal de destruction. Une fois exposé par la cellule apoptotique, les macrophages seront capables de cibler cette cellule et de la phagocyter [117, 118]. Toutefois, un groupe de chercheurs a démontré que les C2C12 sont capables d'exposer de façon transitoire la PS [121, 122]. De façon intéressante, ces cellules ne sont pas apoptotiques [121, 122]. De plus, l'inhibition de la PS par annexine V bloque complètement la fusion. C'est une des premières évidences qui suggèrent la possibilité que PS peut activer des signaux de transduction.

### **1.1.6.3 Cytosquelette d'actine et fusion**

La migration et l'adhésion sont des étapes critiques à la fusion des myoblastes. Par contre, elles ne participent pas directement à la fusion des membranes. Une fois l'adhésion établit, les myoblastes activent une série de voies de signalisation intracellulaires qui remodèle le cytosquelette et mène à des changements dans les membranes menant à la fusion. Cette section détaille les différentes molécules impliquées dans ce processus.

Des études de microscopie ont révélé des changements dans le cytosquelette d'actine avant et après la fusion [123]. Lorsque deux myoblastes sont alignés, une dense feuille d'actine se forme le long des myoblastes. Cette feuille est prétendue donner la rigidité nécessaire aux membranes pour fusionner [124]. Plus le processus avance, plus il y a des ouvertures qui se forment dans cette feuille d'actine. Des pores de fusion voient le jour à partir de ces ouvertures. Dans le cas où l'actine est incapable de former ces structures, la fusion des myoblastes est significativement diminuée [2]. Contrairement aux molécules de migration et d'adhésion, les molécules modulant le cytosquelette sont bien conservées entre la drosophile et les vertébrés.

Parmi celles-ci, il y a les Facteurs d'Échange de nucléotides de Guanine (GEF), les petites GTPases et des molécules d'échafaudage.

#### **1.1.6.3.1 Facteurs d'échange de nucléotides de Guanine (GEF)**

Brefeldin A-resistant Arf GEF (Brag2) est l'homologue de Loner chez la drosophile. C'est une GEF capable d'activer l'ADP ribosylation factor 6 (ARF6) [57]. L'activation de ce dernier est responsable du transfert de Rac1 aux sites de fusion et joue un rôle dans l'adhérence cellulaire en contrôlant l'endocytose de l'intégrine  $\beta 1$  [125]. Une étude a utilisé des shRNA pour inhiber l'expression de Brag2 dans les C2C12 [126]. Il s'est avéré que la fusion des myoblastes avait diminué comparativement au contrôle. Les myotubes multinucléés sont incapables de prendre la forme allongée caractéristique des myotubes. Ce phénotype est expliqué par l'absence de Brag2 qui induit une baisse d'ARF6 présente. Ainsi, l'interaction entre intégrine  $\beta 1$  et paxilline est détruite [126]. Ce mécanisme est en partie responsable de l'élongation des myotubes [126].

TRIO est une GEF impliquée dans la formation du muscle. *In vitro*, l'absence de TRIO bloque la fusion, les souris TRIO déficientes ne sont pas viables. En effet, les embryons meurent entre 15 et 18 jours de développement. Leur dissection a permis d'observer des défauts musculaires, ainsi que neuronaux [127]. Le rôle de TRIO est associé spécifiquement à la myogenèse secondaire [127]. L'absence de TRIO empêche les M-cadhérines d'activer Rac1 [100].

Dans la famille des GEF régissant la fusion des myoblastes, il y a les membres de la famille des Dedicator of Cytokinesis (DOCK). Chez la drosophile, cette famille est représentée par Myoblast city (mbc). Ces protéines sont caractérisées par les domaines DHR1 et DHR2 qui respectivement sont capables de lier les lipides et responsable de l'activité GEF. Les DOCK sont sous-divisés en 4 groupes qui diffèrent selon la composition de domaines additionnels et de leur spécificité à activer Cdc42 ou Rac1 [128]. Dans les études de la fusion des myoblastes

chez le poisson-zèbre, dock1 et dock5 sont essentiels pour la fusion [129]. Chez les mammifères, Laurin et al. ont montré que l'absence de DOCK1 entraîne une musculature fortement réduite. De plus, les souris meurent à la naissance, leurs poumons étant incapables de gonfler. L'analyse détaillée des souris montre qu'il n'y a pas formation de fibres multinucléées, mais que les myoblastes s'allongent et demeurent mononucléés [130]. Comme DOCK5 présente le même schéma d'expression que DOCK1, son rôle a aussi été étudié. Les souris DOCK5<sup>-/-</sup> sont viables. Par contre, les doubles mutants DOCK1<sup>+/-</sup>DOCK5<sup>-/-</sup> présentent des fibres dont le diamètre est plus petit. De plus, les muscles des doubles mutants DOCK1<sup>-/-</sup>DOCK5<sup>+/-</sup> sont très affectés. Les cellules sont mononucléées et des défauts d'organisation de la MyHC, d'alignement et d'élongation ont également été observés [130]. Il y a donc aggravation du phénotype chez les souris DOCK1<sup>-/-</sup> lorsqu'un allèle de DOCK 5 est muté. Il est donc possible de conclure que DOCK5 et DOCK1 sont d'importants régulateurs de la fusion des myoblastes et qu'ils fonctionnent de façon redondante [130].

ELMO est une protéine d'échafaudage qui interagit avec certains membres de la famille des DOCK. ELMO a dans sa partie C-terminale un domaine PH et une région proline-riche qui ensemble médient l'interaction avec DOCK1. Donc ELMO, à travers son interaction avec DOCK1, est capable d'activer la signalisation par Rac1 [131]. L'activité d'ELMO est autorégulée par les domaines RBD, EID et EAD. Ceux-ci sont responsables des changements de conformation de la protéine soit de la forme fermée ou ouverte qui représentant la forme respectivement inactive et active [132]. Le rôle d'ELMO et son autorégulation, bien qu'étudié dans des modèles de migration cellulaire, restent encore à être explorés dans la fusion des myoblastes *in vivo*.

#### **1.1.6.3.2 Petites GTPases**

Tel que mentionné précédemment, ARF6 est une petite GTPase activée par la GEF Loner chez la drosophile. ARF6 se localise à la membrane plasmique et régule la structure de l'actine corticale, le trafic vésiculaire et la courbure de la membrane [57]. Tous ces événements sont importants pour la fusion des myoblastes. Des analyses biochimiques dans les C2C12 ont

établi que l'activation d'ARF6 est dépendante de M-Cadhérine et de TRIO. Ce complexe active alors Rac1. L'utilisation d'ARN d'interférence contre ARF6 réduit drastiquement la fusion dans les C2C12 [133].

Le rôle des petites GTPases dans la régulation du cytosquelette est bien établi. Chez la drosophile, dRac1 est essentiel à la fusion [59, 60]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été faites pour étudier la fonction de Rac1 et aussi de Cdc42 dans la fusion des myoblastes des vertébrés [134]. Les souris Rac1 conditionnelle Knockout (cKO) ou Cdc42 cKO présentent des fibres plus minces et plus courtes. De plus, ces fibres sont désorganisées. Les cultures des myoblastes primaires de ces souris transgéniques ont permis de voir que les cellules Rac1<sup>-/-</sup> ou Cdc42<sup>-/-</sup> sont incapables de former des fibres multinucléées. De façon intéressante, les mutants de Rac1 et Cdc42 sont capables de recruter les protéines du cytosquelette tel que  $\alpha$ - $\beta$  caténine, mais incapables de recruter vinculine, Vasp et les filaments d'actine. Finalement, l'analyse du recrutement du complexe ARP2/3 est différentes selon la petite GTPase. En effet, ARP2/3 est absent à la membrane des myoblastes Rac1<sup>-/-</sup>, tandis que le complexe est normal dans les cellules Cdc42<sup>-/-</sup> [134]. Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette étude. Premièrement, la réorganisation du cytosquelette est essentielle à la fusion des myoblastes. Deuxièmement, Rac1 et Cdc42 ne sont pas redondants dans leur fonction, mais activent différents signaux de transduction [134].

#### **1.1.6.3.3 Facteurs de nucléation d'actine**

L'activation des GEF et des petites GTPases mènent à la mise en marche du complexe ARP2/3 responsable de la polymérisation de l'actine aux sites de contact des myoblastes. Le complexe ARP2/3 est stimulé par plusieurs protéines de la famille des facteurs de promotion de la nucléation (NPF) dont N-Wasp et WAVE. Le rôle de la nucléation de l'actine et de N-Wasp sont essentiels à la fusion des myoblastes chez la drosophile [39, 135, 136]. Gruenbaum-Cohen et al. ont voulu étudier le rôle de N-Wasp dans la fusion des vertébrés. Les souris N-Wasp cKO ont un programme de différenciation myogénique normal. L'analyse *in vivo* a montré que les embryons développent un défaut de fusion à e14.5 jour du développement. Les fibres demeurent

mononuclées [137], phénocopiant les souris DOCK1 et Rac1. La même observation a été faite avec les myoblastes primaires obtenus des souris N-Wasp<sup>cko</sup> [137]. Parmi les protéines du complexe WAVE, il y a la Nck-associated protein 1 (Nap1), orthologue de kette chez la drosophile. L'inhibition de Nap1 dans les C2C12 par des shRNA révèle une accumulation de F-actine à la membrane ce qui concorde avec la diminution de la fusion dans ces cellules [90].

#### **1.1.6.4. Autres protéines membranaires**

##### **Myomaker**

Parmi les protéines impliquées dans la régulation de la fusion, il y a des molécules transmembranaires (Figure 1.8). Les dernières années de travaux ont révélé que Myomaker est essentiel dans la fusion. Myomaker a été identifié sous le nom de TMEM8c et son expression est spécifique aux cellules musculaires [138]. Myomaker est présent tant chez les mammifères que chez le poisson zèbre [139]. Dans les myoblastes, il est exprimé lors du développement et de la régénération. Son expression diminue après ces deux périodes. La génération de souris Myomaker<sup>-/-</sup> a permis d'observer une diminution drastique de la masse musculaire, de plus les souris meurent à la naissance dû à l'incapacité de leurs poumons de gonfler. L'analyse *ex vivo* a montré un blocage de fusion [138]. L'hypothèse selon laquelle Myomaker a une capacité à lui seul d'induire la fusion a été vérifiée. En utilisant des fibroblastes, cellules sans capacité de fusion, il a été possible de voir que la surexpression de Myomaker engendre la fusion de ces cellules avec des cellules C2C12 [138]. Malgré sa fonction, le mécanisme d'action de Myomaker demeure inconnu. Quels sont les domaines actifs? Quels signaux de transduction sont activés? Sont parmi les nombreuses questions qui restent à résoudre pour mieux comprendre cette molécule et son entière implication dans la fusion. Trois groupes ont récemment identifié Myomixer, un micropeptide, essentiel pour la fusion tel que montré par les souris mutantes correspondantes. Ce dernier peut induire les fibroblastes à fusionner entre eux. De plus, les expériences de population mixtes ont révélé que Myomixer est seulement requis chez un des deux partenaires impliqués dans la fusion. Ceci lui confère une vraie fonction

fusogène. L'interaction de Myomixer avec Myomaker demeure controversée et à confirmer [140-142]. Plus d'expériences sont requises afin de comprendre ces molécules et leur fonctionnement dans la fusion des myoblastes.

### **JamB/JamC**

Une étude chez le poisson zèbre a révélé le rôle des récepteurs JamB et JamC dans la fusion des myoblastes. Ces récepteurs sont caractérisés pour leur rôle dans la migration des leucocytes, la formation des jonctions serrées et de la spermatogenèse [143]. Leur domaine extracellulaire a des domaines appartenant à la superfamille des immunoglobulines et la région intracellulaire est principalement composée d'un motif PDZ. JamB et JamC sont co-exprimés dans les myoblastes [143]. L'interaction entre eux est essentielle pour la fusion des myoblastes tel que montré par les poisons zèbres mutants. Leur mécanisme d'action et leur rôle chez les mammifères demeurent à être déterminés [143].

### **BAI1 et BAI3**

Parmi les dernières découvertes se trouvent les récepteurs d'adhésion couplés aux protéines G: BAI1 et BAI3. Ces derniers sont exprimées à la surface des neurones et des myoblastes [144-150]. Impliqué dans la phagocytose, BAI1 active le complexe ELMO/DOCK/Rac et déclenche les changements du cytosquelette nécessaires au processus [144]. BAI3, quant à lui, a un rôle dans le développement des synapses [145, 148]. Un rôle pour BAI1 et BAI3 a été rapporté dans la fusion des myoblastes [149, 150]. Ces récepteurs seront discutés dans la prochaine section.

## **1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G**



## 1.2.1 Généralités

Dans le génome humain, plus de 800 gènes codent pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), soit 4 % du génome. Cette énorme famille de protéines est caractérisée par 7 domaines transmembranaires. Cette architecture est conservée à travers l'évolution. En effet, les levures comptent 3 RCPG, le *Dicotysetium* en a 50. Le nombre augmente dramatiquement à 200 chez la drosophile, 700 chez le poisson-zèbre et 1300 chez la souris [151, 152].

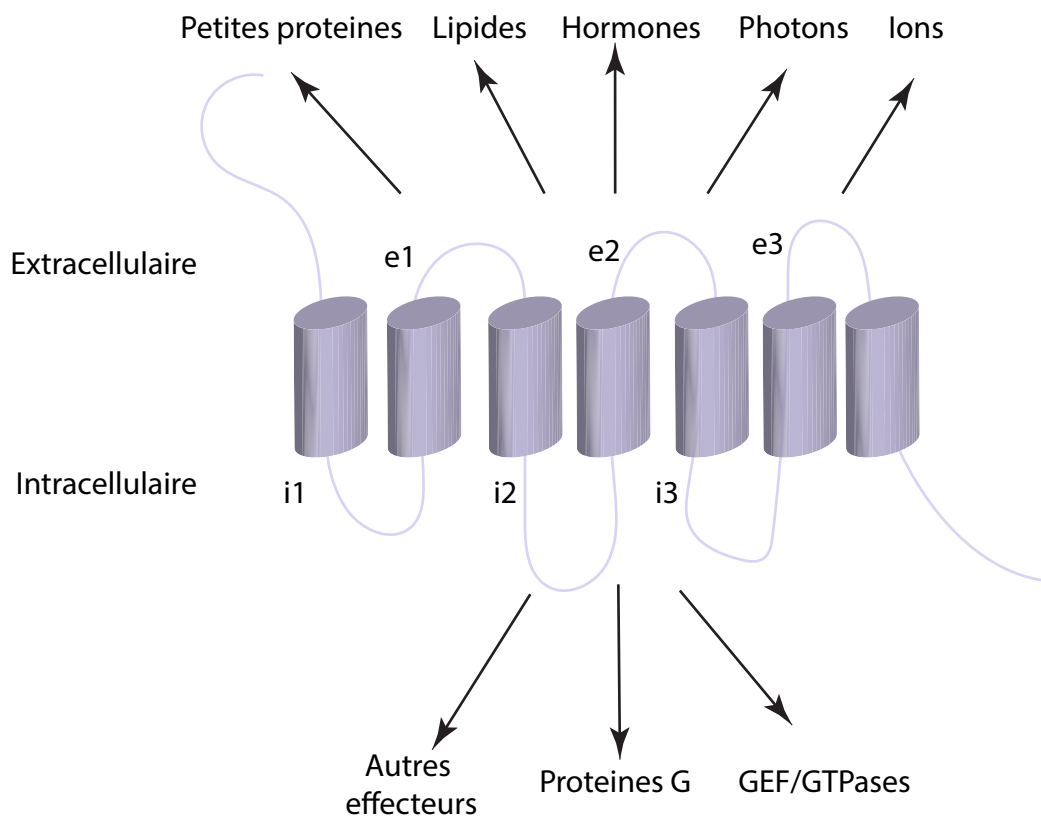
Les RCPG sont ubiquitaires (i.e. chaque cellule exprime au moins un RCPG) ce qui les rend impliqués dans presque tous les aspects biologiques, par exemple le développement, l'activité neuronale, la fonction cardiaque, les sens (goût, odorat, vue), la contraction, la migration cellulaire [153]. Étant donné leurs multiples implications, des mutations dans les RCPG sont liées à des troubles chez l'humain comme des problèmes reproductifs, immunologiques, métaboliques, cardiovasculaires ainsi que les cancers. Les RCPG sont donc de très bonnes cibles thérapeutiques. Plus de 40 % des médicaments présentes sur le marché les ont comme cibles [153].

La diversité des RCPG est aussi démontrée par la variété de ligands avec qui ils interagissent. En effet, parmi les ligands, il y a des hormones, des lipides, de petites protéines, mais aussi des photons et des ions. L'interaction du ligand avec son récepteur induit un changement de conformation [154]. Les ligands agonistes activent le récepteur en lui permettant d'adopter une conformation active. Ce mode d'activation est représenté par l'exemple de l'adénosine et son récepteur dont la conformation et son changement sont bien décrits. Une fois le récepteur activé, il transmet le signal extracellulaire vers l'intracellulaire. Cette activation mène à celle des protéines G ainsi que d'autres effecteurs. Les antagonistes quant à eux inhibent l'activation du récepteur et le maintiennent dans une conformation inactive [154].

### **1.2.1.1 Structure des RCPG**

Les RCPG partagent plusieurs structures communes : une partie aminoterminal (N-terminal), 7 domaines transmembranaires connectés par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires et finalement, une partie carboxyle-terminal (C-terminal). De façon fonctionnelle, le ligand se lie à la partie N-term (Figure 1.9). Des changements conformationnels surviennent et activent les protéines G hétérodimériques ainsi que différents effecteurs intracellulaires comme les arrestines [155, 156].

Les RCPG peuvent être activés par une variété de partenaires. Chacun d'eux va favoriser potentiellement une certaine conformation. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'un même RCPG puisse activer plusieurs voies de signalisation [155]. Afin de comprendre ses différentes conformations des techniques telle la mutagenèse dirigée, la modélisation et la cristallographie aux rayons X ont été développées. Cette dernière technologie a révolutionné l'études des protéines. Elle permet de voir la structure des protéines ce qui donne des informations essentielles sur leur fonction, leurs interactions avec d'autres protéines et les changements de conformation. Ensemble, ces méthodes ont permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'activation des RCPG [157, 158].



**Figure 1.9 Structure des RCPG.**

Principalement constituée d'une région N-terminale, 3 boucles extracellulaire (e1, e2, e3), de 3 boucles intracellulaires (i1, i2, i3) et une région C-terminale. Les RCPG peuvent interagir avec une variété de ligands avec les régions extracellulaire et intracellulaire. Ils peuvent alors activer différents mécanismes à travers leur interaction avec les protéines G, les GEF ou autres effecteurs. Inspiré de [155]

### **1.2.1.2 Familles des RCPG**

Le nombre élevé de RCPG exige une classification pour les regrouper en sous-famille. Plusieurs systèmes ont été utilisés à travers le temps. Le séquençage du génome humain a permis de faire une analyse phylogénique de RCPG. Ils ont été regroupés en 5 groupes : les Glutamates (G), Rhodopsine (R), Adhésion (A), Frizzled/Taste (F) et Sécrétine (S) [159] (Figure 1.10).

Les différentes sous-familles sont caractérisées par :

- Glutamates (G) : 15 membres
- Rhodopsine (R) : 701 membres
- Adhésion (A) : 33 membres
- Frizzled/Taste (F) : 24 membres
- Sécrétine(S) : 15 membres

La prochaine section traitera de la famille des RCPG d'adhésion puisque cette thèse porte sur un membre de cette famille.

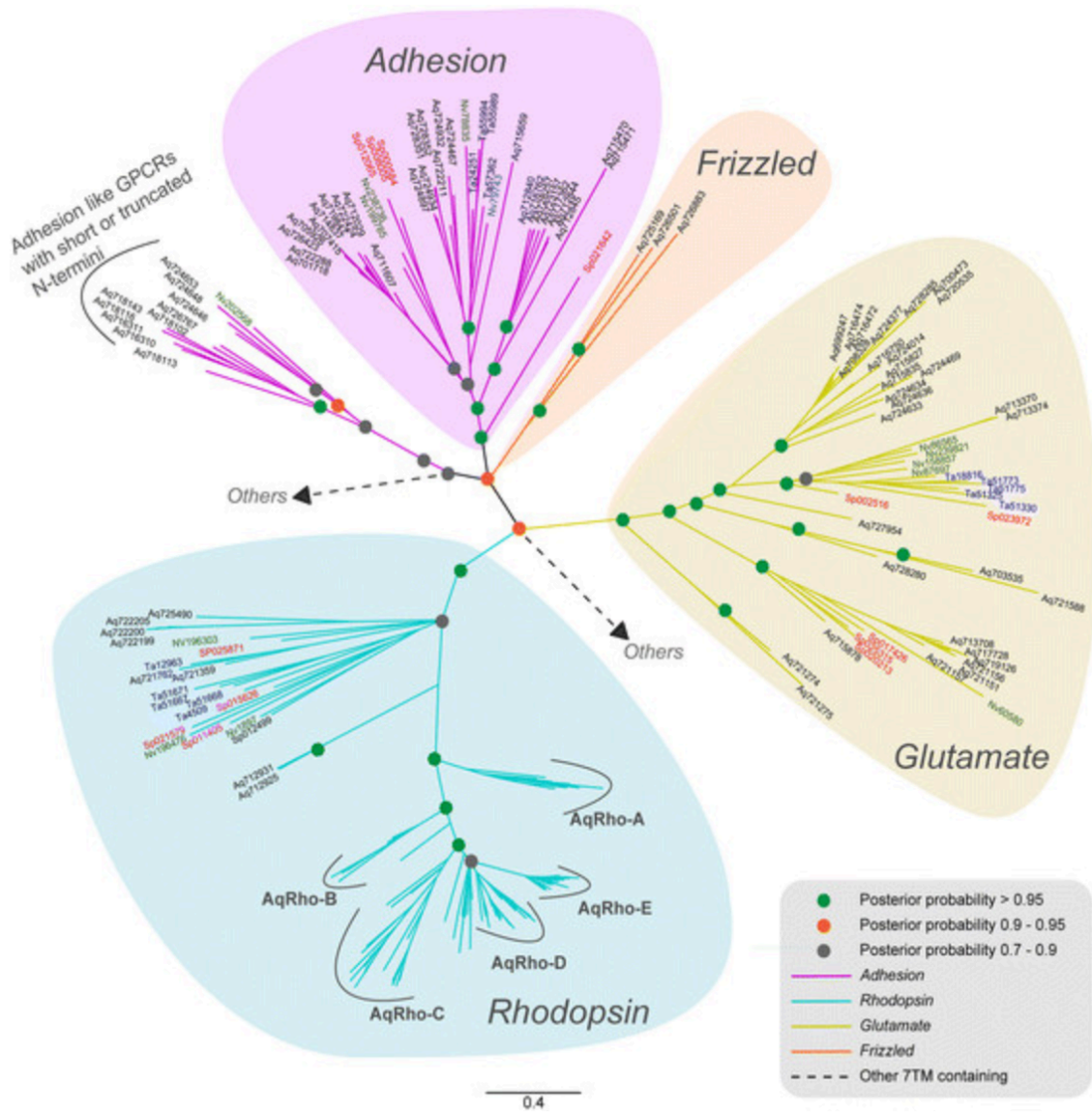


Figure 1.10 Classification GRAF des 5 familles de RCPG. [160]

### 1.2.1.3 Signalisation canonique des RCPG

Tel que discuté plus tôt, l'interaction du ligand avec son récepteur induit les changements nécessaires de la conformation afin de transmettre le signal à la partie intracellulaire. Ainsi les protéines G hétérodimériques seront activées et recrutent d'autres effecteurs, c'est la voie canonique [154].

Les protéines G hétérodimériques incluent les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  sont divisées en 4 familles tandis que plusieurs sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont identifiées.

#### 1.2.1.3.1 Sous-unités $\alpha$

Les sous-unités  $\alpha$  partagent une séquence d'acides aminés conservée entre 45-80 %. Ces protéines ont été divisées en 4 sous-familles soit :  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  et  $G_{12/13}$  qui sont résumées dans la table 1.III [161, 162]. Sous le stade inactif, la sous-unité  $\alpha$  lie le GDP et les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  forment ainsi un hétéromère capable de se lier au récepteur. Lorsque le récepteur est activé par le ligand, il change de conformation. La sous-unité  $\alpha$  liée au GDP répond à ce stimulus par un changement de conformation. Il diminue la liaison du GDP forçant son détachement. Ceci libère le site actif de la sous-unité. Cette cavité est remplie par le GTP dont la concentration est environ 20 fois plus élevée que le GDP dans le cytosol. La liaison du GTP permet à la sous-unité  $\alpha$  d'adopter sa conformation active et de se dissocier des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Ce stade actif demeure jusqu'à ce que le GTP est hydrolysé en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$ . Cette étape est favorisée par l'activité GAP des régulateurs de la signalisation des RCPG (RGS). Ceux-ci permettent d'accélérer l'activité GTPase ce qui favorise une transition vers la liaison avec le GDP. Cette déphosphorylation du GTP permet de mettre fin à la signalisation [163]. La sous-unité  $\alpha$  se réassocie alors aux  $\beta/\gamma$  et au récepteur [164-167]. Le tout est schématiquement représenté dans la figure 1.11.

### 1.2.1.3.2 Sous-unités $\beta/\gamma$

Il y a 5 différentes sous-unités  $\beta$  et plus de 12 sous-unités  $\gamma$  décrites à ce jour. Cette variété permet un grand nombre de combinaisons. Par contre, ces combinaisons peuvent être limitées par une incompatibilité entre les sous-unités, mais aussi par une expression spécifique à certains tissus [168, 169]. Des études ont aussi montré que les combinaisons de  $\beta$  et  $\gamma$  ont une préférence pour certaines sous-unités  $\alpha$  [170]. Fonctionnellement,  $\beta/\gamma$  affectent différents effecteurs tels que les canaux ioniques et la cascade de signalisation PLC. Finalement, le rôle complet du dimère  $\beta-\gamma$  dans la signalisation des RCPG reste à être élucidé [169].

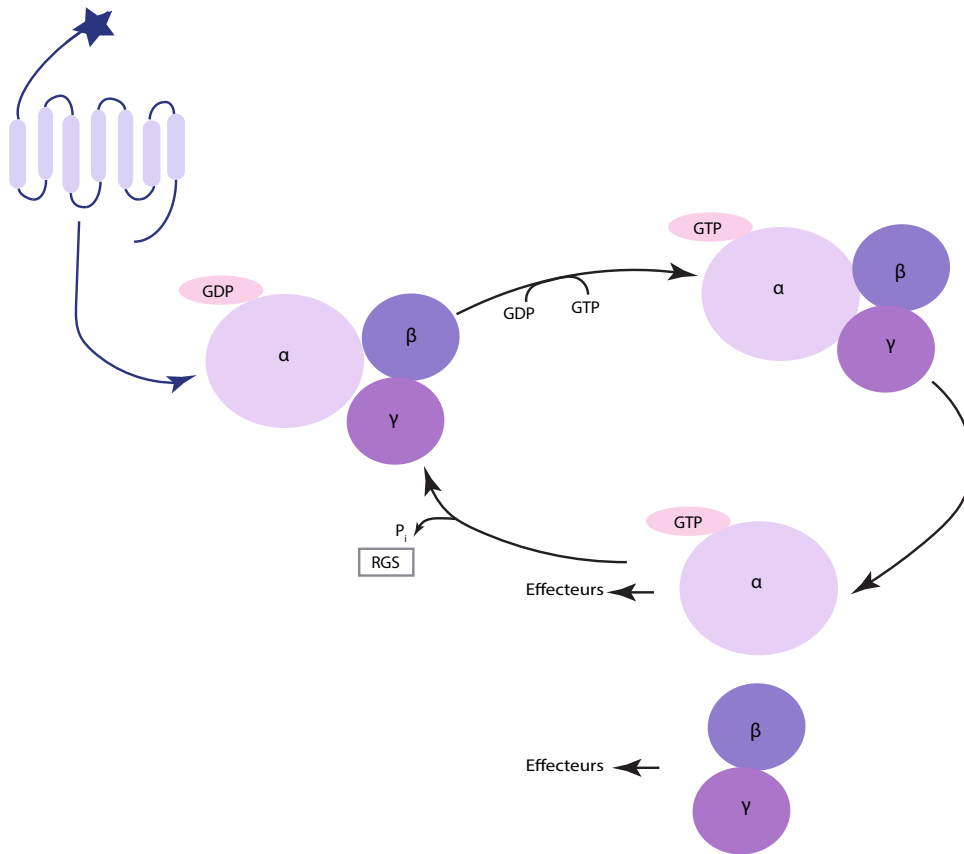
Parmi les différents effecteurs des sous-unités, le complexe ELMO/DOCK a récemment été lié à la signalisation canonique des RCPG. Lors de la migration cellulaire guidée par le chemo-attractant CXCL12 active son RCPG CXCR4 qui transmet le signal aux protéines G. Une première étude a montré que la partie N-terminale de ELMO interagit avec les sous-unités  $\beta/\gamma$  [171]. Cette interaction est importante pour la translocation d'ELMO1 à la membrane et pour la stabilisation du complexe ELMO/DOCK [171]. Un autre groupe a montré qu'ELMO1 peut interagir avec  $G\alpha_{i2}$  dans un contexte de migration et d'invasion cellulaire [172]. La région d'interaction est encore inconnue. À ce stade, les questions demeurent quant à savoir comment ELMO choisit de se lier à la sous-unité  $\alpha$  plutôt qu'à  $\beta/\gamma$  ? Est-ce que ces interactions surviennent dans les mêmes cellules ? Est-ce que la nature du RCPG ou du ligand influence ces interactions ?

Family	Subtype	Effectors	Expression	Disease relevance	Pharmacological modulation
$G_s\alpha$	$G_{s(S)}\alpha$ $G_{s(L)}\alpha$ $G_{s(XL)}\alpha$ $G_{olf}\alpha$	Adenylyl cyclases $\uparrow$ ( $G_{s(XL)}, olf\alpha$ ) Maxi K channel $\uparrow$ ( $G_s\alpha$ ) Src tyrosine kinases (c-Src, Hck) $\uparrow$ ( $G_s\alpha$ ) GTPase of tubulin $\uparrow$ ( $G_s\alpha$ )	$G_s\alpha$ : ubiquitous $G_{olf}\alpha$ : olfactory neurons, certain CNS ganglia; digestive and urogenital tract	$G_{s(XL)}\alpha$ : brachydactyly, trauma-related bleeding tendency, neurological problems $G_s\alpha$ : McCune–Albright syndrome, cholera, pseudohypoparathyroidism type Ia/b, testotoxicosis, adenomas of pituitary and thyroid $G_{olf}\alpha$ : whooping cough, adrenal and ovarian adenomas $G_s\alpha$ : congenital cone dysfunction, night blindness	$G_s\alpha$ : CTX $G_{olf}\alpha$ : CTX
$G_{i/o}\alpha$	$G_{o1}\alpha$ $G_{o2}\alpha$ $G_{i1-13}\alpha$ $G_z\alpha$ $G_{11/2}\alpha$ $G_{gust}\alpha$	Adenylyl cyclase $\downarrow$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) Rap1GAPII-dependent ERK/MAPkinase activation $\uparrow$ ( $G_i\alpha$ ) $Ca^{2+}$ channels $\downarrow$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) $K^+$ channels $\uparrow$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) GTPase of tubulin $\uparrow$ ( $G_i\alpha$ ) Src tyrosine kinases (c-Src, Hck) $\uparrow$ ( $G_i\alpha$ ) Rap1GAP $\uparrow$ ( $G_z\alpha$ ) GRIN1-mediated activation of Cdc42 $\uparrow$ ( $G_{i,o,z}\alpha$ ) cGMP-PDE $\uparrow$ ( $G_i\alpha$ ) $G_{gust}\alpha$ : ?	$G_{o1-2}\alpha$ : neurons, neuroendocrine cells, astroglia, heart $G_{i1-13}\alpha$ : neurons and many others $G_z\alpha$ : platelets, neurons, adrenal chromaffin cells, neurosecretory cells $G_{11}\alpha$ : rod outer segments, taste buds $G_{i2}\alpha$ : cone outer segments $G_{gust}\alpha$ : sweet and/or bitter taste buds, chemoreceptor cells in the airways	$G_{o1/2}\alpha$ : PTX $G_{i1-13}\alpha$ : PTX $G_z\alpha$ : ? $G_{11/2}\alpha$ : PTX, CTX $G_{gust}\alpha$ : PTX	
$G_{q/11}\alpha$	$G_q\alpha$ $G_{11}\alpha$ $G_{14}\alpha$ $G_{15}\alpha$ $G_{16}\alpha$	Phospholipase C $\beta$ isoforms $\uparrow$ p63-RhoGEF $\uparrow$ ( $G_{q/11}\alpha$ ) Bruton's tyrosine kinase $\uparrow$ ( $G_q\alpha$ ) $K^+$ channels $\uparrow$ ( $G_q\alpha$ )	$G_{q/11}\alpha$ : ubiquitous $G_{15/16}\alpha$ : hematopoietic cells	$G_{q/11}\alpha$ : dermal hyperpigmentation and melanocytosis?	$G_{q/11}\alpha$ : YM-254890 $G_{14}\alpha$ : ? $G_{15}\alpha$ : ? $G_{16}\alpha$ : ?
$G_{12/13}\alpha$	$G\alpha_{12}$ $G\alpha_{13}$	Phospholipase D $\uparrow$ Phospholipase C $\epsilon$ $\uparrow$ NHE-1 $\uparrow$ iNOS $\uparrow$ E-cadherin-mediated cell adhesion: $\uparrow$ p115RhoGEF $\uparrow$ PDZ-RhoGEF $\uparrow$ Leukaemia-associated RhoGEF (LARG) $\uparrow$ Radixin $\uparrow$ Protein phosphatase 5 (PP5) $\uparrow$ AKAP110-mediated activation of PKA $\uparrow$ HSP90 $\uparrow$	Ubiquitous	Recent SNPs identified but no disease correlation yet	$G_{12}\alpha$ : ? $G_{13}\alpha$ : ?
$G\beta/\gamma$	$\beta_{1-5}$ $\gamma_{1-12}$	PLC $\beta$ s $\uparrow$ Adenylyl cyclase I $\downarrow$ Adenylyl cyclases II, IV, VII $\uparrow$ PI-3 kinases $\uparrow$ $K^+$ channels (GIRK1,2,4) $\uparrow$ $Ca^{2+}$ (N-, P/Q-, R-type) channels $\downarrow$ P-Rex1 (guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rac) $\uparrow$ c-Jun N-terminal kinase (JNK) $\uparrow$ Src kinases $\uparrow$ Tubulin GTPase activity $\uparrow$ G-protein-coupled receptor kinase recruitment to membrane $\uparrow$ Protein kinase D $\uparrow$ Bruton's tyrosine kinase $\uparrow$ p114-RhoGEF $\uparrow$	$\beta_1\gamma_1$ : retinal rod cells $\beta_3\gamma_8$ : retinal cone cells $\beta_5$ : neurons and neuroendocrine organs $\beta_{5(L)}$ : retina Most cell types express multiple $\beta$ and $\gamma$ subtypes	$G\beta_3$ : atherosclerosis, hypertension, metabolic syndrome	$G\beta\gamma$ : ?

CTX=cholera toxin; PTX=pertussis toxin;  $\uparrow$ =enhances function;  $\downarrow$ =reduces function; YM-254890=a cyclic depsipeptide isolated from *Chromobacterium* sp QS3666.

**Table 1.III : Fonctions des différentes familles de Protéines G hétérotrimériques [169]**





**Figure 1.11 Le cycle d'activation des protéines G.**

Un récepteur actif active les protéines G en les faisant passer d'un état lié au GDP à un autre lié au GTP. Ceci permet à la sous-unité  $\alpha$  de se dissocier du complexe  $\beta\gamma$ . Chacun a alors la capacité de signaler à différents effecteurs. La signalisation est ensuite arrêtée par l'activité GAP des RGS qui favorise l'hydrolyse du GTP en GDP. Inspiré de [169]

### 1.2.1.3.3 Les $\beta$ -arrestines

Suite à leur activation, les RCPG sont phosphorylés à leur queue C-terminale ainsi que les boucles intracellulaires par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). Ces évènements agissent comme signal au recrutement de la  $\beta$ -arrestine [173]. Les  $\beta$ -arrestines sont ubiquitaires. La première fois qu'elles ont été décrites, c'est pour leur rôle dans la désensibilisation du récepteur RCPG  $\beta$ -adrénergique [174]. La liaison de la  $\beta$ -arrestine au RCPG permet d'enclencher plusieurs évènements importants dans le cycle de signalisation des RCPG comme l'ubiquitination, l'endocytose et la désensibilisation [173].

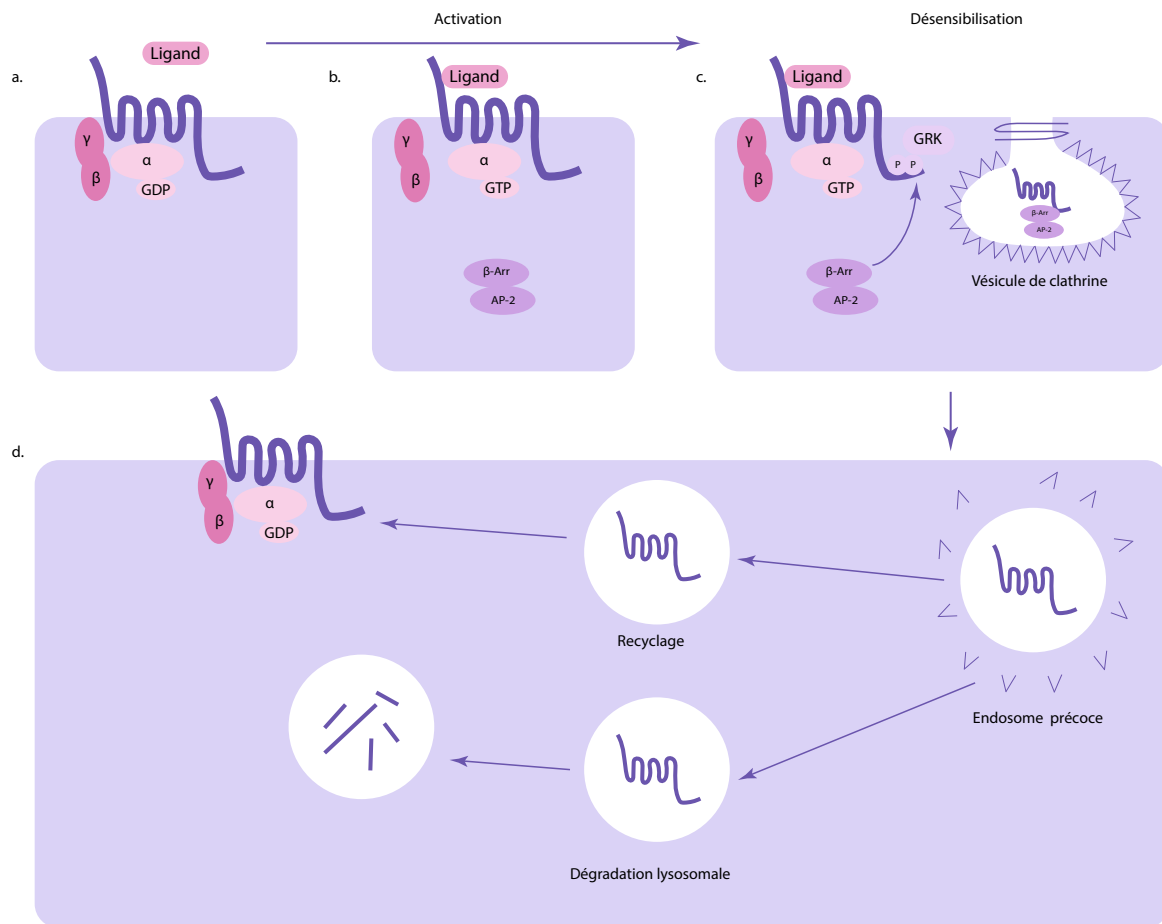
Il existe 2 formes de  $\beta$ -arrestines :  $\beta$ -arrestine 1 et 2 ( $\beta$ -Arr1/2). Elles partagent une séquence à 78% similaire ainsi qu'une structure conservée. Une des principales différences entre les 2 est leur localisation dans la cellule.  $\beta$ -Arr1 s'accumule dans le noyau tandis que  $\beta$ -Arr2 s'accumule dans le cytoplasme. Cette différence s'explique par la présence d'une séquence qui permet l'export de  $\beta$ -Arr2 du noyau. Cette séquence est absente chez  $\beta$ -Arr1 [175, 176].

Selon la fonction à accomplir,  $\beta$ -Arr1 et  $\beta$ -Arr2 subissent certaines modifications post-traductionnelles. Les  $\beta$ -arrestines sont constitutivement phosphorylées et doivent être déphosphorylées dans leur région C-terminale afin de pouvoir internaliser le récepteur et de recruter la clathérine. La déphosphorylation n'est, par contre, pas nécessaire pour le mécanisme de désensibilisation des RCPG. Autre exemple de modification posttraductionnelle est l'ubiquitination de la  $\beta$ -Arr en complexe avec le récepteur qui permet de prolonger la signalisation de la cascade MAPK [177, 178]. D'autres modifications de  $\beta$ -Arr telles que la S-nitrosylation et la SUMOylation ont été rapportées, mais leur effet sur la fonction des  $\beta$ -arrestines restent à être exploré [179, 180].

Les  $\beta$ -arrestines jouent un rôle primordial dans le cycle de vie du récepteur qui inclut la désensibilisation et l'internalisation. La première survient lorsque la stimulation répétée par le ligand conduit à une diminution de la réponse. À ce moment, le récepteur est phosphorylé dans la partie intracellulaire, ceci permet le recrutement de la  $\beta$ -arrestine qui va inhiber l'interaction des protéines G avec le récepteur. Plusieurs études ont montré que la phosphorylation du RCPG par les GRK, PKA ou PKC (dans le cas d'une désensibilisation hétérologue) était critique pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine [181-184].

La  $\beta$ -arrestine agit comme protéine adaptatrice et recrute la clatherine et AP-2. Le récepteur est alors entouré par ces calvéoles couvrant de clatherine. Grâce à l'activité GTPase de la dynamine, ces vésicules sont détachées de la membrane plasmique et acheminées vers les endosomes précoces. Le récepteur y est alors recyclé et réacheminé vers la membrane. Les vésicules de clatherine peuvent aussi se retrouver dans des endosomes matures, le récepteur est alors dégradé par des lysosomes [174, 185]. Il est intéressant de noter que certains RCPG peuvent être internalisés sans les  $\beta$ -arrestines. Par contre, le recyclage a impérativement besoin des  $\beta$ -arrestines [186].

Ainsi le cycle de l'activation du recyclage ou de la dégradation est résumé dans la figure 1.12.



**Figure 1.12 Cycle d'activation et de désensibilisation d'un RCPG.**

a) État de base du récepteur. Lorsqu'il n'est pas actif, les protéines G sont liées à la membrane et au récepteur. La sous-unité  $\alpha$  est liée au GDP. b) La liaison d'un ligand au RCPG l'active. Ceci entraîne l'activation intracellulaire des protéines G qui signalent à différents effecteurs. Il y a alors réponse biologique. c) L'activation continue du RCPG mène à sa désensibilisation qui commence par la phosphorylation du récepteur par GRK qui permet ensuite le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et AP-2. Les vésicules de clathrine englobant le récepteur sont alors formées. d) Le récepteur, selon sa nature, est soit dégradé ou recyclé pour un nouveau cycle d'activation. Inspiré de [187]

## 1.2.2 RCPG d'adhésion

Notre étude porte sur le RCPG BAI3 qui appartient à la sous-famille des RCPG d'adhésion. Cette famille contient 33 membres qui sont classés en 8 sous-familles selon la composition de la région extracellulaire (Figure 1.13) [188]. EMR1 (paralogue de F4/80 murin) est le premier récepteur d'adhésion à avoir été identifié grâce à la technique du clonage de l'ADNc à la fin des années 80.

Les membres de la famille des RCPG d'adhésion sont composés d'un grand domaine extracellulaire contenant différents domaines impliqués dans l'interaction cellule-cellule et l'interaction cellule-matrice. La partie extracellulaire contient également le domaine d'auto-clivage GAIN suivi des 7 domaines transmembranaires et d'une longue partie intracellulaire.

Les RCPG d'adhésion sont impliqués dans le développement des neurones, du système immunitaires, des muscles squelettiques et dans la progression du cancer. Au niveau cellulaire, ils jouent un rôle dans des événements tels que la polarité cellulaire et la migration des cellules. La table 1.IV résume les différentes implications biologiques des membres de cette famille [189, 190].

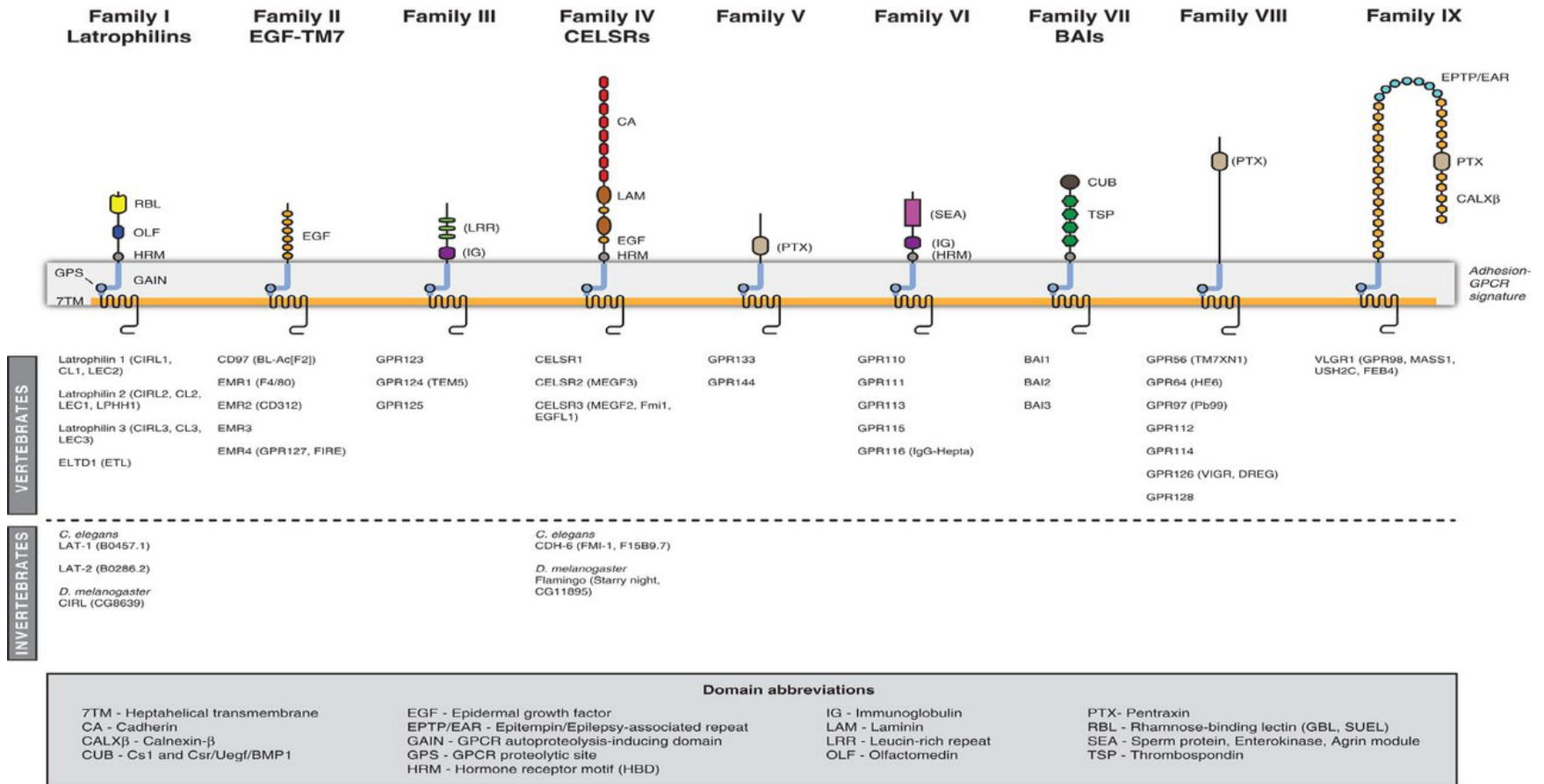


Figure 1.13 Représentations des 33 membres de la famille des RCPG d'adhésion. [191]

Family/receptor	Species	Evidence	Phenotype	Cellular context	References
Family I (latrophilins)					
Latrophilin 1	Mouse	Null allele	Abnormal maternal attendance to litters	Unknown	(157)
Latrophilin 3	Human	Genetic linkage analysis	Susceptibility to ADHD	Unknown	(158)
	Zebrafish	Null allele	Developmental defects of the dopaminergic system and enhanced locomotor activity	Neurogenesis, migration	(159)
LAT-1	<i>C. elegans</i>	Null allele	Anterior-posterior tissue polarity defect during embryogenesis	PCP, migration, differentiation	(25, 77)
ELTD1	Mouse	Null allele	Cardiac hypertrophy after pressure overload	Unknown	(160)
Family II (EGF-TM7)					
CD97	Mouse	Transgene overexpression ( <i>villin</i> promoter)	Stronger adherens junctions in intestinal epithelia, attenuation of experimental colitis	Adhesion	(124)
		Transgene overexpression ( <i>thyroglobulin</i> promoter)	Increased vascular invasion and lung metastasis in a model of follicular thyroid cancer	Migration	(127)
	Mouse	Null allele	Protection from experimental arthritis	Adhesion?	(65)
EMR1	Mouse	Null allele	Enhanced granulopoiesis Defective peripheral immune tolerance	Adhesion? Migration?	(64) (161)
Family III					
GPR124	Mouse	Null allele	Embryonic lethality from CNS-specific angiogenesis arrest; defective palate and lung development	Migration	(162–164)
		Transgene overexpression ( <i>Tie2</i> promoter)	CNS-specific hyperproliferative vascular malformations	Migration	(162)
Family IV (CELSRs)					
FMI-1	<i>C. elegans</i>	Null or hypomorphic allele	Navigation defects of motor, pioneer, and follower axons	Migration, adhesion	(33, 35)
Flamingo/FMI-1	<i>Drosophila</i>	Null allele Various alleles	Distorted wing cell planar polarity Altered polarity of cuticular structures	PCP PCP	(21) (165)
		Transgene overexpression	Non-autonomous neuronal connectivity	Migration, adhesion	(146)
CELSR1	Mouse	Spontaneous nonsynonymous NTF mutations	Severe neural tube defects, disrupted inner ear hair cell planar polarity, homozygous mice embryonic lethal	PCP	(166)
		Conditional null allele	Defects in the orientation of hair outgrowth	PCP	(167)
		Spontaneous nonsynonymous NTF mutation or null allele	Defects in hindbrain neuron migration	Migration	(168)
	Zebrafish	Gene knockdown	Epiboly defects	PCP, C+E, migration, adhesion	(123)
CELSR2	Human	SNPs in GWA study	Associated with LDL cholesterol or early-onset myocardial infarction	Unknown	(169, 170)*
	Mouse	<i>LacZ</i> knock-in null allele	Defective ependymal cilia development and planarity	PCP, ciliogenesis	(171)
CELSR3	Mouse	Null allele	Neonatal death from ventilation failure, axonal fascicle anomalies	Migration	(22)
		Conditional null allele in forebrain sectors	Absence of cortico-subcortical connections	Migration	(172)
CELSR2/3 (DKO)	Mouse	<i>Celsr2 LacZ</i> knock-in null allele, <i>Celsr3</i> conditional null allele	Lethal hydrocephalus	PCP, ciliogenesis	(171, 172)
CELSR1, CELSR2, CELSR3	Mouse	<i>Celsr1</i> null or mutant allele, <i>Celsr2 LacZ</i> knock-in null allele, <i>Celsr3</i> null or conditional null allele	Defective facial branchiomotor neuron migration	Migration	(22, 168, 171, 172)
CELSR3; CELSR2/3 (DKO)		<i>Celsr3</i> null or conditional null allele, <i>Celsr2/3</i> null allele	Defective pancreatic $\beta$ cell differentiation	PCP	(22, 173)

**Table 1.IV : Fonctions physiologiques des RCPG d'Adhésions. [191]**

Family/receptor	Species	Evidence	Phenotype	Cellular context	References
Family V					
GPR133	Human Mouse	SNP in GWA study Selective sweep in mice selected for extreme body weight	Associated with height Associated with weight	Unknown Unknown	(174)* (175)
Family VI					
GPR116	Mouse	Conditional null allele	Glucose intolerance, insulin resistance	Unknown	(176)
Family VII (BAIs)					
BAI2	Mouse	Null allele	Antidepressant-like behavior, increased hippocampal cell proliferation	Unknown	(177)
BAI3	Linkage analysis, GWA confirmed		Associated with early-onset thromboembolism	Unknown	(178)
Family VIII					
GPR56	Human Mouse	Mutations Null allele	BFPP Neuronal ectopia in the cerebral cortex Malformation of the rostral cerebellum	Unknown Adhesion Adhesion	(20) (179) (32)
GPR64	Mouse	Null allele	Reduced fertility (defective testis development) Male infertility (fluid dysregulation in the efferent ducts)	Adhesion Unknown	(180) (181)
GPR126	Human Zebrafish Mouse	SNPs in GWA study Hypomorphic alleles Null allele	Associated with height or pulmonary function Defective Schwann cell myelination Embryonic lethality (cardiovascular failure) Severe hypomyelinating peripheral neuropathy	Unknown Differentiation Unknown Differentiation	(182, 183) (184) (185) (186)
Family IX					
VLGR1	Human  Mouse	Nonsense mutation (deletion of the C terminus) Various mutations SNP in GWA study Spontaneous nonsense mutations, NTF-only knock-in allele, Null allele Null allele, NTF-only knock-in allele	Familial febrile and afebrile seizures  Usher syndrome type 2 Increased risk of bone fractures Audiogenic seizure phenotype  Abnormal stereocilia development, impaired cochlea function, deafness Mild impaired visual function Decreased bone mineral density, mechanical fragility of bones, altered osteoblast/osteoclast function	Unknown  Unknown Unknown Unknown Adhesion, ciliogenesis Unknown Unknown	(187)  (188, 189) (190) (191–193)  (24, 192–194) (24, 147, 192) (190, 193)

\*Confirmed in other GWA studies.

**Table1. IV : Fonctions physiologiques des RCPG d'adhésions (suite). [191]**



### 1.2.2.1 Activation des RCPG d'adhésion

Le mode d'activation de cette famille des RCPG n'est pas encore complètement compris. Les études portant sur la structure de cette famille ont révélé la présence du domaine GAIN. Ce dernier est le dénominateur commun à tous les récepteurs d'adhésion et à travers sa capacité d'autoclivage, il est responsable de l'activation du récepteur. Le clivage ne survient pas dans tous les RCPG d'adhésion, son importance et son avènement font l'objet de plusieurs investigations. Au sein du GAIN, la région responsable du clivage est composée de 40 acides aminés nommés GPS [145, 192]. Le clivage des RCPG d'adhésion survient dans le réticulum endoplasmique [192, 193]. À la suite du clivage, le récepteur est acheminé à la surface de la cellule où les parties N- et C-terminales demeurent liées de façon non covalente. L'interaction de la région N-terminale avec certains ligands peut entraîner le détachement de cette région à des fins de signalisation.

À ce jour, plusieurs scénarios d'activation ont été observés comme l'absence de clivage ou encore l'échange de la partie extracellulaire avec d'autres RCPG suite au clivage. Le type de cellule et le ligand liant le récepteur semblent dicter la présence ou non du clivage [190, 194, 195].

Récemment, une étude a identifié une séquence dans la région C-terminale du domaine GAIN nommé séquence Stachel qui est spécifique à chaque RCPG. Après le clivage ou un changement de conformation de la région extracellulaire du récepteur, la séquence Stachel peut activer la signalisation canonique intracellulaire des protéines G [196, 197]. Les différentes façons d'activer les RCPGs, leurs ligands ainsi que les conditions de leur activation demeurent inconnues.

### **1.2.2.2 La sous-famille VII-Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI)**

La sous-famille VII des RCPG d'adhésion inclut 3 membres BAI1, BAI2 et BAI3 (ADGRB1-3). Cette famille a d'abord été identifiée dans le cerveau où elle y est fortement exprimée. Ces RCPGs sont des protéines de 200 kDa environ. Ils sont caractérisés par une région extracellulaire qui contient des domaines répétés de thrombospondines (TSR), un motif PDZ dans la queue C-terminale et le domaine de liaison à ELMO (EBS). La composition de la partie N-terminale du récepteur varie d'un membre à l'autre. Par exemple, BAI1 a un domaine RGD capable de lier les intégrines qui est absent des autres BAI alors que BAI3 est le seul membre où un domaine CUB est identifié [190, 198, 199]. Les structures et les différences entre les membres de la famille BAI sont représentées dans la figure 1.14.

#### **1.2.2.2.1 BAI1**

BAI1 est le premier membre de la famille à avoir été identifiée. En effet, il est une cible du gène suppresseur de tumeur p53 [200]. Son expression a été détectée dans les neurones, les cellules gliales, les macrophages et plus récemment dans les tissus musculaires [144, 150, 201, 202]. Dans les neurones, tout comme BAI3, BAI1 est enrichi aux synapses ce qui suggère un rôle potentiel à cet endroit.

BAI1 a été le sujet de plusieurs études. Il joue un rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse et retarde la progression de tumeur tels les glioblastomes [146]. Ceci est possible grâce à son domaine extracellulaire. Il interfère avec le fonctionnement du facteur angiogénique VEGF. Alors que le domaine GAIN est présent chez BAI1, BAI2 et BAI3, l'autoclivage semble survenir selon le type de cellules. Ainsi BAI1 est clivé dans le cerveau de souris et dans les glioblastomes, mais il demeure intact dans l'hippocampe et dans les neurones corticaux [146, 192, 202]. Le clivage de BAI1 au site de clivage GPS génère un fragment de 120 kDa et le clivage de ce dernier par une métalloprotéase génère un second de 40 kDa nommés Vasculostatine 120 et 40

(Vstat120, Vstat40)[203, 204]. Ces fragments à travers les thrombospondines interagissent avec le récepteur CD36 exprimé par plusieurs types cellulaires. Cette interaction déclenche une cascade de signalisation proapoptotique et inhibe ainsi l'angiogenèse [146, 203-205].

BAI1 est aussi exprimé par les macrophages où il interagit avec la PS des cellules apoptotiques ou avec les lipopolysaccharides des bactéries Gram négatifs [144, 206]. Une fois l'interaction établie, BAI1 active le complexe intracellulaire ELMO/DOCK/Rac, modulateur du cytosquelette d'actine, les macrophages sont alors capables de phagocyter ces cellules [144, 206]. Plus récemment, l'expression de BAI1 a été détectée dans les cellules du muscle squelettique. La perte de BAI1 mène à une diminution de la taille des myofibres et à une régénération moins efficace chez la souris. Il a ensuite été montré que BAI1 interagit avec la PS exposée sur les myoblastes apoptotiques. Dans cette étude, les myoblastes en apoptose semblent essentiels à la formation des fibres musculaires [150]. Cette conclusion est contraire à celles des études précédentes qui montrent que les myoblastes qui expose la PS durant la fusion ne sont pas apoptotiques [121]. D'un autre point de vue, elle amène un nouveau concept, celui qui suggère que les myoblastes en apoptose à la suite d'une blessure peuvent participer à la régénération du muscle en fournissant un élément essentiel : la phosphatidylserine.

#### **1.2.2.2.2 BAI2**

BAI2 est exprimé fortement dans le cerveau tout comme BAI1 et BAI3. Son rôle demeure toutefois incompris. Durant les tests de comportement, les souris BAI2 nulle montrent un changement drastique par rapport aux souris contrôle. Ainsi elles sont plus actives et montrent une plus grande résistance à la dépression suite à des situations sociales stressantes [207]. Lorsque leur cerveau a été analysé, une plus grande neurogenèse avait eu lieu dans l'hippocampe où BAI2 est fortement présent. Pour expliquer ce phénomène, une étude a montré que l'absence de BAI2 corrèle avec une augmentation du facteur VEGF qui induit un plus grand niveau de neurogenèse [208, 209]. Les chercheurs ont conclu que l'absence de BAI2 permettait de résister à la

dépression ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante dans ce domaine. À ce jour, les mécanismes moléculaires demeurent inconnus tout comme l'implication de BAI2 dans d'autres événements biologiques.

#### **1.2.2.2.3 BAI3**

BAI3 est le troisième membre de la sous-famille BAI. Il a fait l'objet de plusieurs études pour tenter de comprendre son rôle dans le cerveau. BAI3, comme BAI1, est exprimé fortement aux synapses [147]. Différents groupes ont montré que BAI3 régule la connectivité et l'excitation des synapses en plus de la formation du cerebellum chez la souris [145, 210-212]. L'utilisation de shRNA chez la souris P7 permet de bloquer l'expression de BAI3. Cette absence entraîne une connectivité déficiente entre les cellules de Purkinje et les fibres grimpanes. Plus tard, à P21, la souris montre un défaut entre la connectivité des cellules de Purkinje et les fibres parallèles [210].

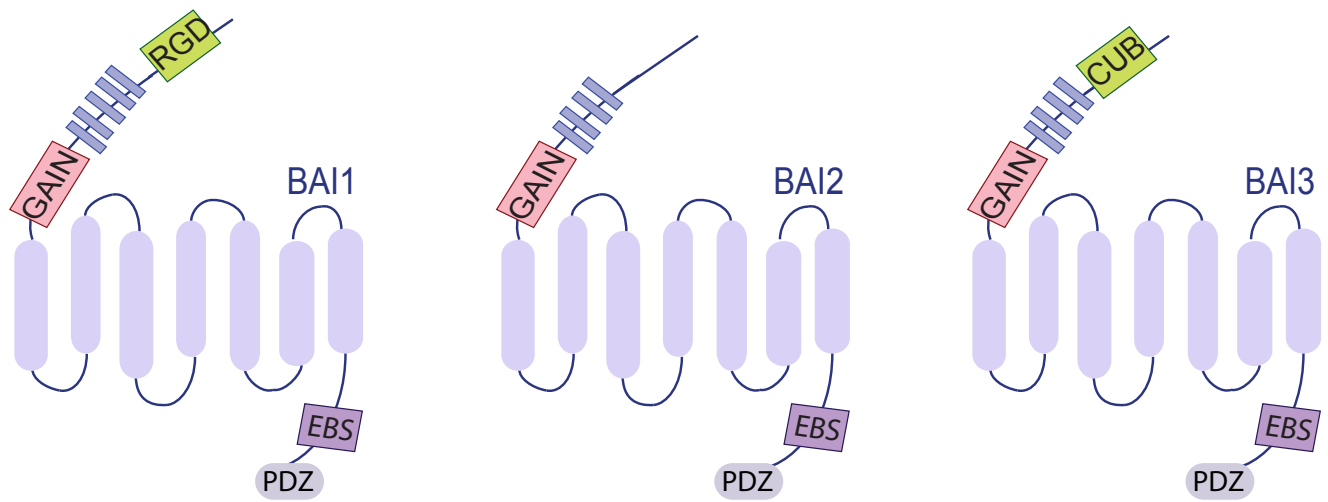
Ce rôle dans le développement des synapses est attribué à l'interaction de BAI3 avec les petites protéines sécrétées de la famille des C1q-Like complément (C1qL). Cette famille contient 4 membres : C1qL1-4 qui sont largement exprimés dans le cerveau par différentes cellules et à différents moments du développement [213].

L'interaction de C1qL1 et BAI3 promeut le développement des synapses et participe à la compétition des fibres grimpanes en éliminant les cellules supplémentaires [210]. Dans ce cas, les cellules de Purkinje expriment BAI3 alors que les fibres grimpanes expriment C1qL1. Finalement, les analyses biochimiques ont permis de comprendre que l'interaction de C1qL1 est médiée par le domaine CUB dans la région extracellulaire de BAI3. Ce domaine est présent seulement chez BAI3 [210].

L'interaction entre C1qL3 et BAI3 a aussi été étudiée. Elle semble jouer un rôle dans le développement des neurones de l'hippocampe. Ainsi la surexpression de C1qL3 mène à une baisse de la densité des synapses [211]. De façon intéressante, C1qL3 interagit avec les TSR de BAI3. Ainsi, le phénotype des synapses peut être rétabli par

l'expression des TSR [145, 212]. Pour conclure, les C1qL semblent être exprimés par différents types cellulaires, à différents moments et interagissent avec différents domaines de BAI3 [145, 210-213]. Ces multiples combinaisons peuvent participer à la spécificité de la réponse du récepteur BAI3. Plus d'études sont nécessaires afin de comprendre l'implication complète de ces interactions.

Concernant BAI3, plusieurs questions demeurent sans réponses comme son mode d'activation, la présence de l'autoclivage et la possibilité d'interaction avec d'autres partenaires que les C1qL par exemple.



**Figure 1.14 Sous-famille des RCPG d'adhésion : BAI.**

Alors que la région intracellulaire est semblable entre les 3 récepteurs avec la présence des domaines EBS et PDZ, la région extracellulaire diffère. BAI1 possède un domaine RGD exclusif et 5 domaines TSR. BAI2 possède 4 domaines TSR. BAI3 possède un domaine CUB et 4 domaines TSR. Le domaine GAIN est commun aux 3 récepteurs tout comme les domaines intracellulaires EBS et PDZ. Inspiré de [199].

## Objectifs de la recherche

La fusion des myoblastes est un évènement essentiel à la formation des muscles squelettiques. La drosophile est un modèle important dans la découverte des molécules qui régissent ce phénomène. Ainsi les récepteurs exprimés à la surface des FCM interagissent avec ceux des FC. Ceci entraînera l'activation des cascades capable de moduler le cytosquelette d'actine. Les études chez les vertébrés ont établi que l'importance du cytosquelette et de ses modulateurs est conservée à travers les espèces. Par contre, les récepteurs de surface ne sont pas conservés de la drosophile aux vertébrés. Notre objectif principal est d'identifier une telle protéine.

Nous avons alors établi comme hypothèse de départ que : la molécule transmembranaire exprimée à la surface de la cellule capable d'interagir avec le complexe ELMO/DOCK/Rac (régulateur du cytosquelette) serait un joueur important dans la fusion de myoblastes.

### Objectif 1

L'objectif du le chapitre 2 est d'identifier la protéine transmembranaire capable de réguler la fusion des myoblastes en régulant le complexe ELMO/DOCK. Nous avons identifié la famille des RCPG BAI comme candidats potentiels à la régulation de la fusion des myoblastes. Notre étude a révélé un rôle essentiel pour le RCPG BAI3 puisqu'en son absence la fusion est bloquée. De plus, nous avons établi que BAI3 interagit avec le complexe ELMO/DOCK/Rac et que cette interaction est essentielle à la fusion des myoblastes tant *in vitro* qu'*in vivo*.

### Objectif 2

BAI3 recrute ELMO/DOCK à la membrane afin que la fusion des myoblastes puisse se faire. Cette constatation suggère que la fusion des myoblastes est un évènement finement régulé. Ce qui mène aux questions : y-a-t-il des mécanismes régulant BAI3? et si oui quels sont-ils? Nous avons alors comme objectif de comprendre comment BAI3 est régulé. Nous avons émis 2 hypothèses 1) BAI3 interagit avec un ou plusieurs

partenaires qui régulent son activation 2) une fois activé, BAI3 est capable de signaler par la voie canonique des protéines G. Nos expériences ont répondu à l'hypothèse en identifiant C1qL4 comme un partenaire inhibiteur de l'activité de BAI3. En la présence de C1qL4 la fusion des myoblastes est bloquée. Un nouveau partenaire de BAI3 a aussi été identifié : Stabilin-2 qui active BAI3. Finalement, l'hypothèse 2 a été confirmée. Nous avons détecté une activation des protéines G et ses dernières contribuent au recrutement du complexe ELMO/DOCK.



## **CHAPITRE 2**

# **LE RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G BAI3 PROMEUT LA FUSION DES MYOBLASTES CHEZ LES VERTÉBRÉS**

## **Contributions Figures**

Figure 2.1 (A,C-G): Noumeira Hamoud

Figure 2.1 (B) : Jean-François Côté

Figure 2.2 : Noumeira Hamoud

Figure 2.3 : Noumeira Hamoud

Figure 2.4 (A): Louis-Philippe Croteau

Figure 2.4 (C-F) : Noumeira Hamoud

Figure 2-S1 (A): Jean-François Côté

Figure 2S1 (B) : Jean-François Côté

Figure 2S2 : Noumeira Hamoud

Figure 2S3 : Noumeira Hamoud

Figure 2S4 (A-C) : Noumeira Hamoud

Figure 2S4 (D-F) : Viviane Tran

Figure 2S5 : Noumeira Hamoud

Figure 2S6 : Noumeira Hamoud

Figure 2S7 : Noumeira Hamoud

Figure 2S8 : Noumeira Hamoud

Figure 2S9 : Noumeira Hamoud

Figure 2S10 (A) : Louis-Philippe Croteau

Figure 2S10 (B): Noumeira Hamoud

Movie S1 : Noumeira Hamoud

Design expérimental : Jean-François Côté

Réalisations des expériences : Noumeira Hamoud, Viviane Tran et Louis-Philippe Croteau

Analyses des données : Noumeira Hamoud, Viviane Tran, Louis-Philippe Croteau, Artur Kania, et Jean-François Côté

Écriture du manuscrit : Artur Kania et Jean-François Côté

# **The G-Protein Coupled Receptor BAI3 promotes myoblast fusion in vertebrates**

Noumeira Hamoud<sup>1,2</sup>, Viviane Tran<sup>1,3</sup>, Louis-Philippe Croteau<sup>1,2</sup>, Artur Kania<sup>1,2,4,5</sup> and Jean-François Côté<sup>1-4\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

<sup>2</sup>Département de Médecine (Programmes de Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

<sup>3</sup>Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

<sup>4</sup>Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

<sup>5</sup>Departments of Biology, and Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

\* Corresponding author:

Jean-François Côté, Ph.D

IRCM

110 avenue des pins ouest

Montréal (QC) Canada

H2W 1R7

Email: [jean-francois.cote@ircm.qc.ca](mailto:jean-francois.cote@ircm.qc.ca)

Phone: (514) 987-5647

Fax: (514) 987-5624

Publié dans: Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America (PNAS) en mars 2014

## Significance Statement

Myoblast fusion is essential for multinucleated muscle fiber formation. Regulators of fusion have been identified in *Drosophila*, but the molecular mechanisms controlling vertebrate myoblast fusion are poorly understood. We describe here the first *in vivo* functional evidence that the GPCR BAI3 is a receptor controlling myoblast fusion in developing vertebrate muscles. We show that BAI3 binds the intracellular effector of myoblast fusion ELMO/DOCK1, and that this binding is obligatory for fusion. Using *in vivo* manipulations in the chicken embryo, we demonstrate that BAI3 binding to ELMO is essential for myoblast fusion. These experiments identify BAI3 as a long sought-after receptor controlling vertebrate myoblast fusion.

## Abstract

Muscle fibers form as a result of myoblast fusion yet the cell surface receptors regulating this process are unknown in vertebrates. In *Drosophila*, muscle fusion involves the activation of the Rac pathway by the guanine exchange factor Myoblast City and its scaffolding protein ELMO, downstream of cell surface cell adhesion receptors. We previously showed that the mammalian orthologue of Myoblast City, DOCK1, functions in an evolutionarily conserved manner to promote myoblast fusion in mice. In search for regulators of myoblast fusion, we identified the G-Protein Coupled Receptor Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI3) as a cell surface protein that interacts with ELMO. In cultured cells, BAI3 or ELMO1/2 loss of function severely impaired myoblast fusion without affecting differentiation, and cannot be rescued by re-expression of BAI3 mutants deficient in ELMO-binding. The related BAI protein family member, BAI1, is functionally distinct from BAI3, since it cannot rescue the myoblast fusion defects caused by the loss of BAI3 function. Finally, embryonic muscle precursor expression of a BAI3 mutant unable to bind ELMO was sufficient to block myoblast fusion *in vivo*. Collectively, our findings provide a role for BAI3 in the relay of extracellular fusion signals to their intracellular effectors identifying it as an essential transmembrane protein for embryonic vertebrate myoblast fusion.

**Keywords:** myotube formation / myogenesis / ced-12 / model system / Rho GTPases

## INTRODUCTION

The identity of molecular networks that control embryonic myogenesis and adult muscle regeneration is being unraveled [214]. The intricacy of such networks reflects the complicated cascade of events underlying muscle development: myoblasts and satellite cells are first specified from precursors, then migrate to a precise location where they proliferate and fuse, and finally differentiate into post-mitotic myofibers [2]. Myoblast fusion is a critical step for the formation of embryonic muscle fibers, determines muscle size and controls adult muscle regeneration [2], but its initiation remains poorly understood in vertebrates [215].

Genetic studies in *Drosophila* were instrumental in identifying the molecules that control myoblast fusion by relaying signals from the cell surface to the actin cytoskeleton [2]. Cell adhesion receptors are expressed on two genetically distinguishable cell populations of founder and fusion competent myoblasts and are critical to promote myoblast fusion [2]. Dumbfounded/Kin-of-IrreC and Roughest/Irregular-optic-chiasma-C are expressed on the founder myoblasts and associate with Stick and Stones and Hibris found at the surface of fusion competent myoblasts to trigger intracellular signaling cascades leading to fusion [40-43]. The signaling intermediates include scaffold proteins (ELMO, Blown Fuse, Antisocial) [38, 45, 51], kinase (p21-Activated Kinase) [216], GEFs (Myoblast City (MBC), Loner) [52, 57], GTPase (Rac) [57, 59] and actin nucleation regulators (Kette, WAVE, WASP, WASP-Interacting Protein) [39, 58, 217-219]. Some of these proteins ultimately promote the formation of actin-driven podosome-like structures in the fusion competent cells that invade founder cells and promote membrane fusion [48, 220].

These findings raise the question of the identity of *in vivo* regulators of myoblast fusion in vertebrates. Previously, we demonstrated that the myoblast fusion function of DOCK1 (orthologue of MBC) is conserved from flies to mice [130]. Extending this observation, conditional inactivation of Rac1 or N-WASP in developing mouse myoblasts was shown to impair fusion, further supporting an essential and evolutionarily conserved role for these genes in the fusion process [134, 137]. However, mammalian orthologues of fly pro-fusion receptors,

Nephrin and Neph proteins, do not appear to be key regulators of primary myoblast fusion in mice [86, 221]. Myomaker, or Transmembrane protein 8C, was recently shown to be essential for myoblast fusion but its precise function remains to be defined [138]. A number of cell adhesion proteins and pro-migratory receptors, including Integrin  $\beta$ 1, Talin1/2, CDON/Brother of CDON and M-/N-Cadherins are implicated in myoblast fusion in cell culture models and *in vivo* studies also support a contribution of Integrin  $\beta$ 1 and Talin1/2 to fusion [102, 105, 114, 222, 223]. Recently, activation of the Brain Angiogenesis Inhibitor 1 (BAI1) receptor by apoptotic cells residing in regenerating muscles was shown to promote myoblast fusion in muscle repair [150]. Thus, the canonical cell surface receptors that control vertebrate primary myoblast fusion through the conserved DOCK1-Rac pathway have remained elusive.

BAI proteins belong to the cell adhesion subfamily of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) and are characterized by long extracellular domains (ECDs) and intracellular domains (ICDs) [145]. BAI3 regulates synapse density by binding to C1Q-like proteins, a family of small secreted proteins highly expressed in the brain, via its Thrombospondin repeats (TSRs) [145]. BAI1 recruits ELMO/DOCK1 and acts as an apoptotic cell clearance receptor by engaging phosphatidylserine exposed on the outer leaflet of dying cells via its TSRs [144]. Recent data demonstrated the presence of a GPCR-Autoproteolysis Inducing domain (GAIN) in ECDs of some cell adhesion GPCRs that is involved in auto-proteolysis [192]. In cancer cells, the BAI1 ECD is shed and cleaved into smaller fragments that display anti-angiogenic properties [203].

Here, we present evidence for the identity of a transmembrane protein that orchestrates myoblast fusion by relaying cell surface signals to the underlying cytoskeleton. We identify the GPCR BAI3 as a novel interactor of ELMO/DOCK1 in myoblasts, whose downregulation in cultured myoblasts abolishes fusion. Rescue experiments demonstrate that BAI3 engages the ELMO/DOCK1 pathway to mediate myoblast fusion. Finally, we show that interfering *in vivo* with BAI3's ability to interact with ELMO, impaired primary myoblast fusion. Collectively, these results identify BAI3 as an indispensable protein for myoblast fusion *in vivo*.

## RESULTS

**The GPCR BAI3, an ELMO-binding receptor, is expressed in myoblasts.** We reasoned that a myoblast cell surface receptor that binds directly to the ELMO/DOCK1 GEF module might relay an extracellular signal to the cytoskeleton during fusion in vertebrates. We carried out a yeast two-hybrid screen to identify proteins that interact with ELMO1, and identified two potential candidate transmembrane receptors. One of them is the previously reported ELMO-interacting BAI1 GPCR [144] and the other was the related receptor BAI3 (**Fig. 2-1A**). Identity conservation between individual BAI protein family members is approximately 40% and largely restricted to the TSRs, GAIN domain, 7 transmembrane domains and a short C-terminal region predicted to be  $\alpha$ -helical [146]. Notably, BAI1 is characterized by five TSRs while BAI2/3 have only four and additionally lack a R-G-D motif found exclusively on BAI1 (**Fig. 2-1A**). Our yeast two-hybrid screen suggests that ELMO1-interacting domains of BAI proteins are in the conserved predicted  $\alpha$ -helical region at the C-terminus (**Fig. 2-1A; SI Appendix S1A**).

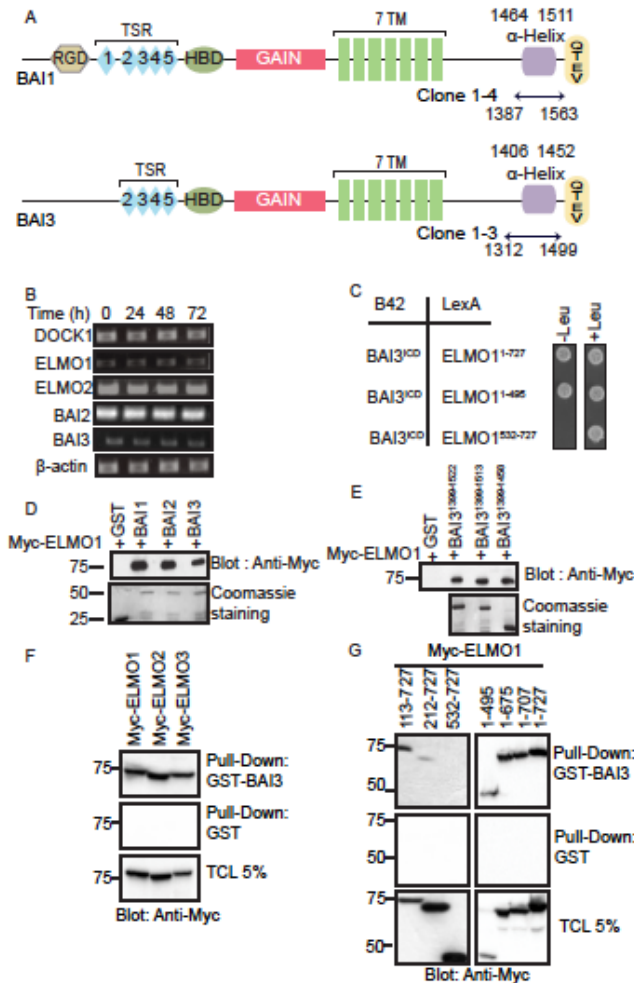
Semi-quantitative RT-PCR assays were performed to establish which DOCK, ELMO and BAI members are expressed in C2C12, a myoblast differentiation and fusion model cell line. In these, we detected constant expression levels of DOCK1 and DOCK4 mRNAs, while DOCK5 mRNA levels increased upon differentiation (**Fig 2-1B, SI Appendix S1B**). ELMO2, BAI2 and BAI3 transcripts were also readily detected in C2C12 cells (**Fig 2-1B**). ELMO1 expression levels were apparently lower, whilst DOCK2-3, ELMO3 and BAI1 transcripts were below the limit of detection in this assay (**Fig. 2-1B, SI Appendix S1B**). These data suggest that BAI2 and BAI3 could be transmembrane proteins regulating myoblast fusion in vertebrates.

We next validated the interaction of ELMO1 with BAI3 in independent yeast two-hybrid assays. Full length ELMO1 and its N-terminal half (amino acids 1-495), but not the C-terminus (amino acids 532-727), interacted with amino acids 1400-1522 of BAI3 (**Fig. 2-1C**), similar to the characterized ELMO1-BAI1 interaction [144]. The C-termini of BAI1, BAI2 and BAI3 precipitated Myc-ELMO1 in a GST pull-down assay suggesting that ELMO-binding is a conserved feature of BAI receptors (**Fig. 2-1D**). Using a series of GST-BAI3 C-terminus fusion



proteins that contained BAI3 amino acids 1399-1522, 1399-1513, 1399-1458, we identified a minimal BAI3 region required for ELMO-binding (**Fig. 2-1E**). Furthermore, GST BAI3 was found to interact with ELMO1, ELMO2, and ELMO3 highlighting that binding to BAI receptors is a conserved feature of the ELMO family of proteins (**Fig.2-1F**).

Next, a panel of ELMO1 and ELMO2 mutants was used to identify a minimal region responsible for binding to BAI3. In yeast two-hybrid interaction assays, specific N-terminal and C-terminal fragments of ELMO1 (amino acids 1-113, 1-212, 1-315 and 315-727) failed to bind BAI3 (**SI Appendix S2A**). Furthermore, internal deletions in full length ELMO1, namely those deleting ( $\Delta$ ) amino acids 114-524, 213-524 or 310-492, also abolished the interaction between ELMO1 and BAI3 (**SI Appendix S2A**). Finally, recombinant GST-BAI3 was able to precipitate Myc-ELMO1 N- and C-terminal deletion mutants encompassing amino acids 113-727, 212-727, 1-495, 1-675 and 1-707 and Myc-ELMO2 mutants 1-534 and 1-699 (**Fig. 2-1G, Fig S2B**). Collectively, these data establish that BAI2/BAI3 are ELMO-binding transmembrane proteins expressed in myoblasts.



**Figure 2.1 The GPCR BAI3 is expressed in myoblasts and interacts with ELMO family of proteins.**

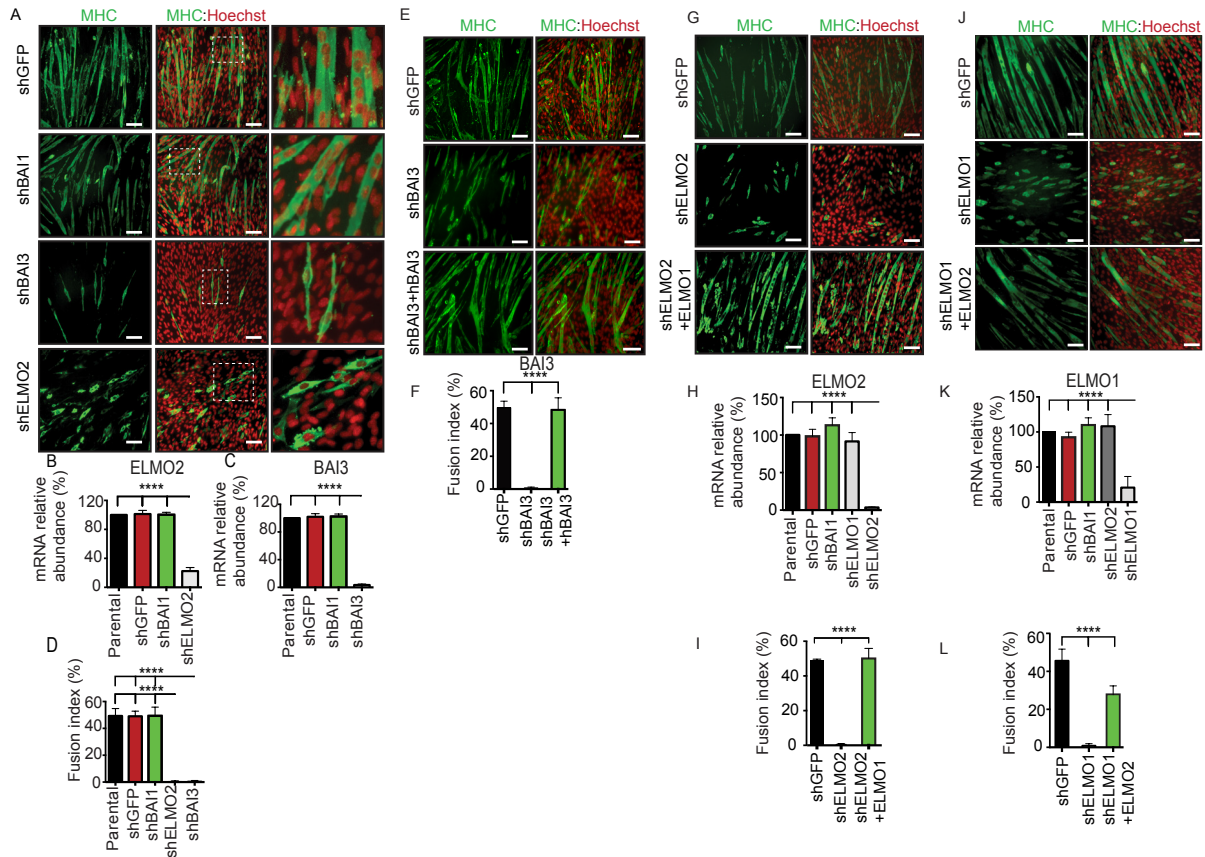
(A) Schematic representation of mBAI1 and mBAI3 receptors isolated as ELMO-binding partners in a yeast two-hybrid screen. Four identical BAI1 clones and three identical BAI3 clones were recovered from the screen and the binding regions are denoted in the schematics. Important structural domains are shown (TSR, Thrombospondin repeats; HBD, Hormone-Binding domain; TM, Transmembrane domains;  $\alpha$ -Helix, predicted  $\alpha$ -helix (see **Supplemental SI Appendix S1A**); QTEV, binding sequence for PDZ domains). (B) Expression of DOCK1, ELMO1, ELMO2, BAI2 and BAI3 mRNAs in differentiating C2C12 myoblasts (0-72hrs) was measured by semi-quantitative RT-PCR. (C) The N-terminus of ELMO1 is required for BAI3-binding. Yeasts were co-transformed with the indicated LexA-fusion ELMO constructs and a

B42-fusion of BAI3 construct intracellular domain (ICD) and were grown on selective (-leu) and non-selective plates (+leu) to assay for protein-protein interaction. **(D)** The C-termini of BAI1, BAI2 and BAI3 interact with ELMO1. HEK293 cells were transfected with Myc-ELMO1 and cleared lysate was subjected to GST pull-downs with the indicated GST-BAI fusion proteins or GST alone. Bound Myc-ELMO1 was detected by immunoblotting. **(E)** Identification of the minimal BAI3 region sufficient for interaction with ELMO1. Cleared lysates as in (D) were subjected to pull-down assays with the indicated GST-BAI3 fragments. Bound Myc-ELMO1 was detected by immunoblotting. **(F)** The BAI3 C-terminus binds ELMO1-3. HEK293 cells were transfected with Myc-ELMO1, Myc-ELMO2 or Myc-ELMO3 and clarified lysates were subjected to GST-BAI3 pull downs. Bound Myc-ELMO1-3 were detected by immunoblotting. **(G)** Mapping the BAI3-binding site on ELMO1. HEK293 cells were transfected with a panel of Myc-ELMO1 constructs and clarified lysates were subjected to GST-BAI3 pull downs. Bound Myc-ELMO1 fragments were detected by immunoblotting. TCL, Total Cell Lysate.

**BAI3 and ELMO1/2 are essential for myoblast fusion.** To directly test the requirement for BAI2, BAI3 and ELMO1/2 in myoblast fusion, we generated a loss of function of these proteins by expressing shRNAs from the pSIREN-RetroQ retroviral vector that also co-expresses the ZsGreen GFP protein. Stable C2C12 cell lines expressing ZsGreen GFP and shRNAs specifically targeting murine ELMO1, ELMO2, BAI1, BAI2 or BAI3 were generated by retroviral infections and cells expressing high levels of GFP were selected via Fluorescence-Activated Cell Sorting and switched to differentiation conditions. Real-time Q-PCR analyses confirmed the decrease in BAI3 (95%), BAI2 (74%), ELMO1 (82%) and ELMO2 (92%) mRNAs in their respective knockdown conditions (**Fig. 2-2B-C, SI Appendix S3 and SI Appendix S4**). Multiple and independent shRNAs targeting ELMO1, ELMO2 and BAI3 robustly blocked myoblast fusion and quantification of fusion from multiple microscopic images revealed that most MHC-positive C2C12 cells in BAI3, ELMO1 and ELMO2 knockdown conditions were mono-nucleated (**Fig. 2-2A-D and SI Appendix S3**). These knockdowns were specific such that shRNAs against ELMO1 or ELMO2 only affected their target mRNA and did not knockdown the other gene (**Fig. 2-2G-L**). In contrast, expression of an empty vector or shRNAs targeting BAI1 or BAI2 had no impact on myoblast fusion (**Fig. 2-2A-D, SI Appendix S3 and SI Appendix S4**). We found in some experiments that knockdown with one shRNA against BAI3 affected the number of MHC-positive cells appearing during differentiation in comparison to cells expressing shGFP (**Fig. 2-2A**). However, this was not observed with an independent shRNA sequence that target BAI3 and blocks fusion (**SI Appendix S3**). To rule out a major contribution of BAI3 or ELMO2 to myoblast differentiation, we monitored the expression of Myogenin, Troponin-T, MHC and MyoD during differentiation and found that this process was not affected by depletion of either BAI3 or ELMO2 excluding a central role for these proteins in myoblast differentiation (**SI Appendix S5**). In addition, myoblast fusion was also impaired when BAI3 or ELMO2, but not BAI1, were downregulated by shRNAs in the Sol8 myoblast cell line (**SI Appendix S6**).

To confirm the specificity of the knockdown phenotypes, we carried out rescue experiments in stable C2C12 cell lines expressing BAI3, ELMO1 and ELMO2 shRNAs (**Fig. 2-2E, G, J**). The expression of murine Myc-ELMO1 in ELMO2 shRNA cells and of murine Myc-ELMO2 in ELMO1 shRNA cells restored myoblast fusion (**Fig. 2G-L**). These data suggest

that ELMO1/2 carry out similar functions during fusion and that a threshold level of their expression is critical for efficient fusion. Likewise, expression of Flag-hBAI3 C-terminus fusion to mVenus (Flag-BAI3) rescued the myoblast fusion defect in cells in which endogenous BAI3 is depleted (**Fig. 2-2E, F**). Collectively, these results establish BAI3 and ELMO1/2 as essential effectors of vertebrate myoblast fusion.



**Figure 2.2 BAI3, ELMO1 and ELMO2 are essential for myoblast fusion.**

(A-L) C2C12 cells expressing GFP (no hairpin) or shRNAs targeting BAI1, BAI3, ELMO1 or ELMO2 were generated by retro-infections. (A) Downregulation of BAI3 and ELMO2 impairs myoblast fusion after 48 hrs in differentiation conditions. Dotted white boxes are shown at a higher magnification in the right panels. (B-C) Real-time Q-RT-PCR amplifications against BAI3 or ELMO2 were performed to confirm specific knockdowns. (D) Quantification of experiments shown in (A). (E-L) Expression of hBAI3 in BAI3-shRNA, Myc-ELMO1 in ELMO2-shRNA and Myc-ELMO2 in ELMO1-shRNA C2C12 cells restored myoblast fusion. (E, G, J) Representative images of myoblast fusion for the indicated conditions. (F, I, L) Quantification of experiments shown in (E, G, J). (H, K) Real-time Q-RT-PCR amplifications against ELMO1 or ELMO2 were performed to confirm specific knockdowns. (A, E, G and J) Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MHC, MF20 antibody (red)) and nuclei

revealed by Hoechst (blue). Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100  $\mu\text{m}$ .  
One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

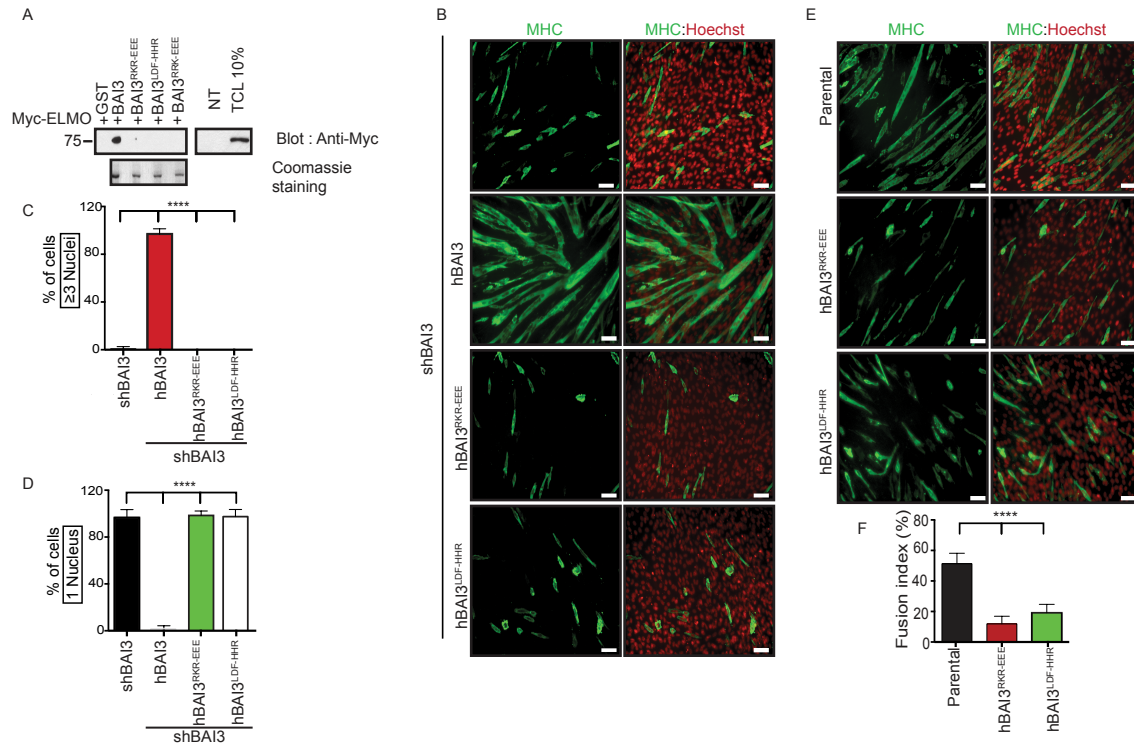
**Lack of myoblast fusion functional redundancy of BAI proteins.** BAI3 and BAI2 proteins differ significantly from BAI1 in their extracellular domains (**Fig. 2-1A**). To address the significance of this divergence, we tested whether BAI1 can functionally substitute for BAI3 in myoblast fusion. To do this, we assayed myoblast fusion in C2C12 cells in which BAI3 protein levels were reduced but which also expressed a BAI1-eGFP fusion protein. In such cells, myoblast fusion remained severely reduced indicating that BAI1 cannot functionally substitute for BAI3, suggesting that the structural basis for their functional divergence might reside in their extracellular domains (**SI Appendix S7**).

**Expression of BAI3 promotes myoblast fusion.** Expression level or activity of BAI3 might be a limiting factor for myoblast fusion. To investigate this, we tested whether over-expression of Flag-BAI3 in the parental C2C12 cell line could promote myoblast fusion and found that expression of BAI3 potentiated myoblast fusion in comparison to control cells (**SI Appendix S8**). We also tested whether BAI3 could further potentiate myoblast fusion when co-expressed with Myc-ELMO2 and Flag-DOCK1 or if overexpression of ELMO2 and DOCK1 alone was sufficient to enhance fusion. Co-expression of BAI3 alongside either ELMO2 or ELMO2/DOCK1 did not further enhance fusion in comparison to cells expressing BAI3 alone (**SI Appendix S8**). Finally, expression of ELMO2/DOCK1 in C2C12 was not sufficient to enhance cell-cell fusion (**SI Appendix S8**). While loss-of-function of BAI2 suggested that this receptor might not be involved in myoblast fusion, we noted that its knockdown was not as efficient as the one of BAI3 (**SI Appendix S4A,B**). We therefore tested if the myoblast fusion promoting activity of BAI3 was also present in BAI2. However, overexpression of Flag-BAI2 failed to promote myoblast fusion (**SI Appendix S4E,F**).

**Binding of ELMO to BAI3 is essential for myoblast fusion.** To investigate if physical coupling between BAI3 and ELMO is required for myoblast fusion, we next asked whether BAI proteins with mutations in the ELMO-interacting domain could functionally rescue the loss of BAI3 function. We derived a panel of GST-BAI3 proteins with mutations in the ELMO-binding site, which did not interact with ELMO1 in pull-down assays (**Fig. 2-3A** and **SI Appendix S1A**). We noted that similar mutations in BAI2 also abrogated ELMO-binding (**Fig S4D**). Two of



these mutations were then introduced into the full length Flag-BAI3 fusion protein and the ability of such mutants to localize to the cell surface was confirmed by staining non-permeabilized myoblasts with an anti-Flag antibody (**SI Appendix S9**). While expression of the wild type Flag-BAI3 robustly rescued the fusion defects caused by the loss of endogenous BAI3, the ELMO1 binding-deficient Flag-BAI3<sup>RKR/EEE</sup> and Flag-BAI3<sup>LDF/HHR</sup> mutant proteins failed to restore myoblast fusion (**Fig. 2-3B-D**). Such BAI3 mutants were also able to completely block myoblast fusion when expressed in the parental C2C12 cells with normal endogenous levels of BAI3 suggesting that they might be acting as dominant negative variants of BAI3 (**Fig. 2-3E-F**). In addition, this result suggests that functional BAI3 is required on both fusion partners since cells expressing dominant-negative BAI3 constructs fail to fuse with neighboring wild-type cells (**Fig. 2-3E**). Together, these data demonstrate that BAI3-ELMO coupling is an essential signaling step for primary myoblast fusion.



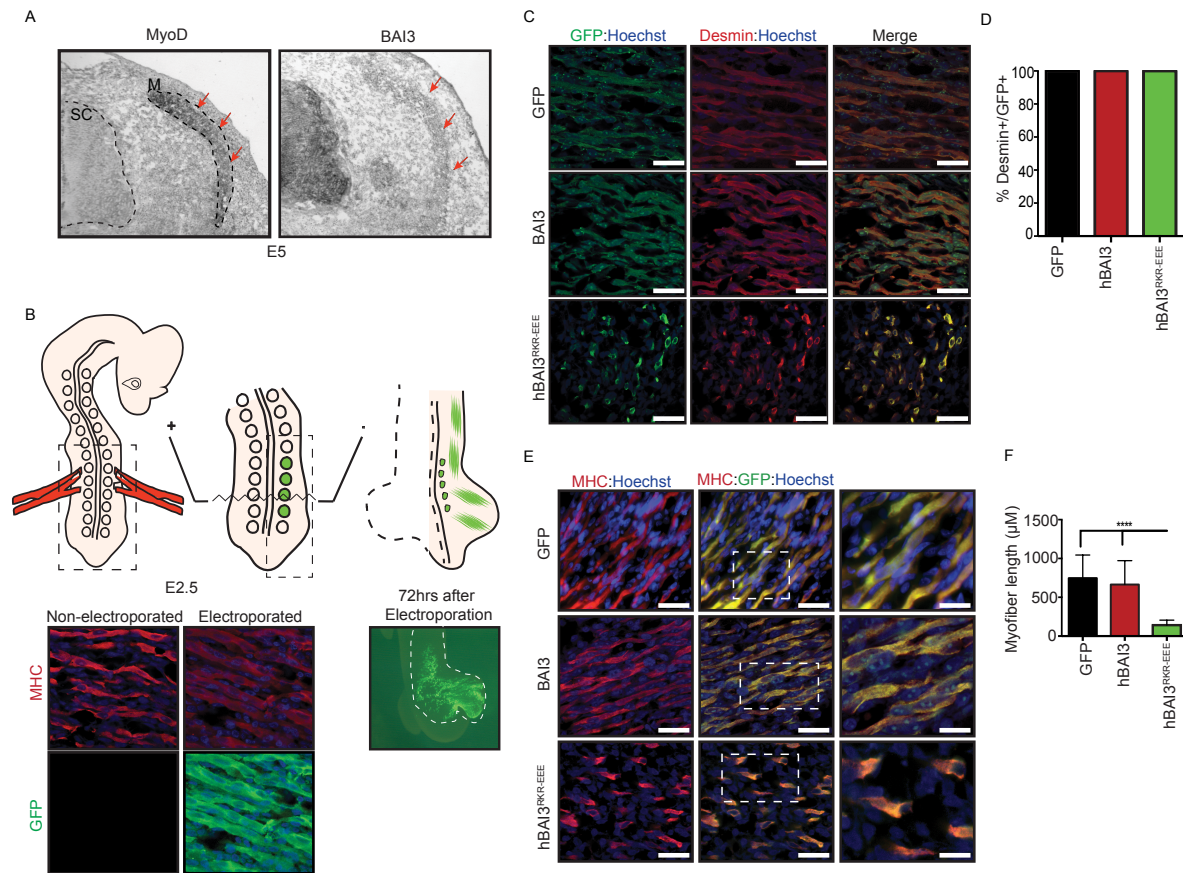
**Figure 2.3 BAI3 coupling to ELMO2 is necessary for myoblast fusion.**

(A) Identification of BAI3 residues important for interaction to ELMO1. HEK293 cells were transfected with Myc-ELMO1 and clarified lysates were subjected to pull-downs with GST alone, GST-BAI3 or the indicated mutants of BAI3. Bound Myc-ELMO1 was detected by immunoblotting. TCL, Total Cell Lysate. (B) Expression of BAI3 mutants unable to engage ELMO fails to rescue myoblast fusion in C2C12 cells depleted of BAI3. Experiments were carried out as in Fig. 2. (C) Quantification of fibers with 3 nuclei and more and (D) quantification of fibers with 1 nucleus. (E) Overexpression of BAI3 mutants lacking ELMO-binding activity blocks myoblast fusion in parental C2C12 cells. Cells were transfected with the indicated BAI3 mutants and differentiated for 48 hours prior to analyzing fusion. (F) Quantification of the experiment shown in (E). Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100  $\mu$ m. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

**BAI3 is essential *in vivo* for myoblast fusion.** Previous studies have taken advantage of the accessibility of the *in ovo* development of chicken embryos in order to manipulate *in vivo* the function of genes involved in myogenesis [224]. Myoblasts actively populate limb buds at Hamburger-Hamilton (HH) Stage 18 and undergo fusion at HH Stage 20 [225, 226]. Using *in situ* hybridization of anti-sense DIG-labeled riboprobes we found that during these stages, BAI3, but not BAI1 and BAI2, mRNA is co-expressed by muscle precursors that also express the myocyte differentiation marker MyoD (**Fig. 2-4A** and **SI Appendix S10**). In agreement with published data [148], we also found BAI1, BAI2 and BAI3 mRNAs in the developing spinal cord (**Fig. 2-4A** and **SI Appendix S10**).

To test the function of BAI3 in myoblast fusion *in vivo*, we used *in ovo* electroporation to express BAI3 proteins in developing myoblasts, as previously described [224]. GFP-encoding expression plasmid or human Flag-BAI3-mVenus protein or human Flag-BAI3<sup>RKR/EEE</sup> mutant encoding expression plasmids were microinjected into the somitocoel of developing interlimb somites of HH Stage 12-17 embryos and a current was applied (**Fig. 2-4B**). Seventy-two hours later, at a time when myoblast fusion produces many multinucleated fibers, embryos were fixed, sectioned and stained with anti-Desmin and anti-MHC antibodies to assay for differentiation and myoblast fusion. This transfection approach was highly efficient as most cells expressed GFP. None of the expression constructs impaired myoblast differentiation since GFP<sup>+</sup> cells expressed apparently normal levels of Desmin and MHC under all conditions (**Fig. 2-4C-D**). Expression of wild type BAI3 had no impact on muscle development and multinucleated muscle fibers could be detected with similar frequencies to that in GFP-expressing fibers (**Fig. 2-4E-F**). In marked contrast, expression of the ELMO1 interaction domain mutant BAI3<sup>RKR/EEE</sup> blocked myoblast fusion such that only mono-nucleated MHC-expressing muscle fibers were observed (**Fig. 2-4E-F**). To confirm that we were observing mononucleated cells and not an artifact of the sectioning plane, we performed 3D reconstructions of whole mount developing limb muscles expressing either GFP or BAI3<sup>RKR/EEE</sup> (**Supp. Movie S1**). While the global signal was weaker than on sections due to imaging of native GFP fluorescence, we observed long GFP<sup>+</sup> fibers in GFP control muscles while only individual mVenus positive cells were observed in muscles expressing BAI3<sup>RKR/EEE</sup> (**Supp. Movie S1**). These results indicate that BAI3 functions

*in vivo* as a promoter of myoblast fusion by coupling the cell membrane to the ELMO/DOCK1 pathway.



**Figure 2.4 The interaction of BAI3 with ELMO is essential *in vivo* for myoblast fusion.**

(A) *In situ hybridization* of anti-sense DIG-labeled riboprobes demonstrates that BAI3 (right panel) is co-expressed by muscle precursors that also express the myocyte differentiation marker MyoD (left panel) in the developing muscles of E5 chicken embryos. BAI3 is also expressed in the spinal cord. SC: Spinal Cord. M: Muscle. (B) Schematic of the strategy to express constructs in muscle progenitors. Somitocoeloms of interlimb somites of embryos between 13-18HH (E2.5) were microinjected with plasmids and electroporated as indicated. 72 hours after electroporation embryos expressing GFP were collected and analyzed for myoblast fusion. Identical muscle development takes place in non-electroporated and electroporated (GFP plasmid) sides of the embryo as demonstrated by staining for MHC and GFP. (C) Differentiation of myoblasts is not

impaired by expression of GFP, BAI3 or the indicated mutant of BAI3 lacking ELMO-binding activity. Cryosections were stained with anti-Desmin and anti-GFP antibodies. **(D)** Quantification of cells double positive for Desmin and GFP. **(E)** Expression of BAI3 lacking ELMO-binding activity, but not GFP or wild-type BAI3, blocks myoblast fusion *in vivo*. Cryosections as in (C) were stained with anti-MHC and anti-GFP antibodies and nuclei revealed with Hoechst. **(E)** Length of myofibers was quantified ( $\mu\text{M}$ ) in the indicated conditions. Error bars indicate standard deviation. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## DISCUSSION

The nature of the transmembrane proteins initiating myoblast fusion in vertebrates has thus far remained elusive. Intracellular signaling molecules such as DOCK1 and Rac1 play a conserved role in primary myoblast fusion in both flies and mice, yet there is little evidence to suggest that *Drosophila* myoblast pro-fusion receptors regulate primary fusion in vertebrates [130, 134]. In this study, we aimed to identify such cell surface receptors and link them to key components of the myoblast fusion pathway, namely ELMO-DOCK1-Rac. We describe here the finding that the GPCR BAI3 binds ELMO proteins in myoblasts and that this interaction is obligatory for myoblast fusion in cell lines. Using *in ovo* chicken embryo somite electroporation we expressed a loss-of-function mutant of BAI3 and observed a robust block in myoblast fusion *in vivo*. To our knowledge, this work is the first documentation of a transmembrane protein that engages the conserved ELMO-DOCK1-Rac pathway to promote primary myoblast fusion.

Another BAI-family member, BAI1, was recently reported to promote myoblast fusion in the context of muscle cells undergoing apoptosis [150]. Remarkably, the dying myoblasts are not engulfed but instead enhance myoblast fusion in a BAI1-ELMO-dependent manner. However, although BAI1-null animals exhibit a reduction in their ability to repair injured muscle, they do not display major defects in muscle development. These results argue for a specialized function of BAI1 in muscle regeneration and an indirect role in fusion [150, 227]. While our work does not rule out that BAI3 could also contribute to muscle regeneration, it highlights the unique ability of this GPCR to mediate primary myoblast fusion during embryonic development. Both BAI3 and BAI1 [150] depend on their common ability to bind ELMO-DOCK1 to play their respective functions during embryonic myogenesis and adult muscle regeneration. We were unable to rescue myoblast fusion defects in cells deficient in BAI3 via overexpression of BAI1. The numbers of TSRs in BAI1 (5) and BAI3 (4), in addition to an integrin-binding R-G-D motif found exclusively in BAI1, are distinctive features of these receptors (**Fig 1A**). Our data therefore suggest that the extracellular domain of BAI3 contains a unique function in the context of myoblast fusion. Furthermore, our knockdown and overexpression experiments suggest that BAI2 is unessential for myoblast fusion and mouse

null for BAI2 is viable and no defects in muscles were reported [207]. In this study, we uncovered a missing link in the understanding of vertebrate myogenesis by defining one of the first myoblast pro-fusion receptor essential during primary embryonic myoblast fusion *in vivo*.

Our results suggest that functional BAI3 is required on both fusion partners. This is similar to additional vertebrate myoblast fusion components studied *in vivo* including DOCK1, Rac1, CDC42 and N-WASP [130, 134, 137]. In contrast, the recently identified fusogenic transmembrane protein Myomaker is required only in one of the two fusion partners and its forced expression in fibroblasts is sufficient to induce fibroblast-myoblast fusion [138]. As Myomaker-induced myoblast fusion is also dependent on the actin cytoskeleton, it will be interesting to investigate whether the BAI3-ELMO-DOCK1-Rac1 pathway can crosstalk with Myomaker to promote fusion. We also found that ELMO1 and ELMO2 function similarly in myoblast fusion as loss-of-function of individual components revealed similar phenotypes. In addition, the loss-of-functions could be rescued with expression of the reciprocal ELMO proteins. Collectively, these data suggest that a threshold level of total ELMO1/2 is required for efficient myoblast fusion most likely to efficiently scaffold the recruitment of DOCK1 to BAI3 to orchestrate Rac signaling. Interestingly, ELMO1 mice are viable and an upregulation of ELMO2 in these animals was observed [228]. Generating ELMO2-null mice will test if both genes must be inactivated in myoblasts to interfere with myoblast fusion.

Based on *Drosophila* and zebrafish findings [2, 86], we expected that the vertebrate transmembrane proteins coupling to ELMO-DOCK1-Rac would be similar in structure to canonical cell adhesion proteins. We were surprised to uncover such a profound role in primary myoblast fusion for a member of the large family of GPCRs. Recently, Pavlath and colleagues reported that several GPCRs are expressed in myoblasts [229]. In particular, the mouse Odorant Receptor 23 is critical for myoblast migration *in vitro* and is important for muscle regeneration *in vivo* [229]. These findings suggest that GPCRs could have multiple functions during myogenesis such as controlling migration, myoblast-myoblast or myoblast-myotube adhesion and myoblast fusion. Our data suggest that BAI3-ELMO signaling is operating specifically at the step of myoblast fusion. In myoblast cell lines, depletion of BAI3 or ELMO1/2 did not interfere with cell differentiation. *In vivo*, we observed that myoblasts expressing BAI3

uncoupled from ELMO still migrated efficiently in the limb buds of chick embryos. This is consistent with previous findings demonstrating that myoblasts lacking DOCK1 or Rac1 have normal migratory behaviors *in vivo* in mice [130, 134].



## **MATERIAL AND METHODS**

Antibodies, plasmids, yeast two-hybrid assays, Generation of small hairpin RNAs (shRNAs) stable C2C12 cell lines, cell culture and transfections, mRNA isolation and Q-RT-PCR, protein binding assays, *in situ* hybridization, immunofluorescence, immunohistochemistry, *in ovo* electroporation and statistical analyses are described in the **SI Experimental Procedures**.

### **Myoblast fusion assay and quantification**

Differentiation of C2C12 and Sol8 myoblasts was induced by replacing the growth medium with differentiation medium (DMEM supplemented with 2% horse serum and penicillin/streptomycin). Cells were allowed to differentiate for 0-48 hrs, or up to 96 hrs for some experiments, prior to analyses including biochemical and immunostaining. To quantify myoblast fusion, MHC positive cells with 3 nuclei or more were considered as multinucleated myofibers and the fusion index was calculated by dividing the numbers of nuclei in multinucleated fibers by the total number of nuclei for each described conditions. In chick embryos, the difference between the tested conditions was assessed by measurement of the fiber length ( $\mu\text{m}$ ) using the Volocity image analysis software (Perkin Elmer).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank M. Laurin, Dr. D. Hipfner and Dr. J-P. Gratton of IRCM for helpful discussions. We recognize the technical support of N. Fradet and M. Liang. We acknowledge Dr T.C. Südhof (Stanford University) for support and the generous gift of plasmids. This work was funded by CIHR grants to J.F.C. (MOP-77591) and to A.K. (MOP-97758 and MOP-77556). N.H. and L.P.C were supported in part, by the Programmes de Biologie Moléculaire funds from the Université de Montréal. V.T. and L. P. C. are recipients of, respectfully, M.Sc. and Ph. D. studentships from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). J.F.C. is a recipient of a Senior Investigator Award from the FRQ-S.

## **Supplemental material to:**

### **The G-Protein Coupled Receptor BAI3 controls myoblast fusion in vertebrates**

Noumeira Hamoud, Viviane Tran, Louis-Philippe Croteau, Artur Kania and Jean-François Côté

- Supplemental materials and methods
- Supplemental references
- Supplemental figure legends
- Supplemental figures
- Supplemental Tables

## SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

### Antibodies

Mouse monoclonal anti-Myc (9E10) was obtained from Santa Cruz. Mouse monoclonal anti-MyoD was from Pharmingen. Mouse monoclonal antibodies anti-Flag (M2), anti-Troponin-T, anti-Desmin and anti-Tubulin were from Sigma-Aldrich. Sheep polyclonal anti-GFP antibodies were from AbD SeroTec. Monoclonal antibodies anti-Myogenin and anti-Myosin Heavy Chain (MF20) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA).

### Plasmids, mutagenesis and yeast two-hybrid interaction assays

pSIREN-RetroQ-ZsGreen retroviral vector was obtained from Clontech. Full length human Flag-BAI3-mVenus and Flag-BAI2-mVenus in the pCAGG plasmid were kind gifts of Dr. T. Südhof (Stanford University) [145]. pCMV-Flag-Bai3-mVenus mutants were generated by site-directed mutagenesis (Clontech). Full-length human BAI1 cDNA lacking the stop codon (cloned in pENTR223.1) was obtained from Open Biosystems. The BAI1 cDNA was recombined, using the LR Clonase II enzyme mix, into pcDNA3-DEST47 (Invitrogen) and the final vector was verified by sequencing. To generate a panel of Glutathione *S*-transferase (GST)-fusion proteins of the C-terminal ends of human BAI1, mouse BAI2 and human BAI3, the corresponding coding sequences were amplified by PCR and cloned into BamHI/XhoI sites of the pGEX4T1 plasmid (GE Healthcare Life Sciences). Specifically, the BAI1 and BAI3 fragments were amplified from plasmids obtained commercially (Open Biosystems; OHS5894-202502838 and OHS1770-202319474, respectively) while the BAI2 fragment was amplified from reverse-transcribed (random primed) mouse brain total RNA. pGEX4T1 BAI3 and BAI2 mutants were generated by site-directed mutagenesis. pcDNA3.1 Myc-ELMO1, Myc-ELMO2 and Myc-ELMO3 (and derivative) plasmids were previously described [230]. pCNX2-Flag-DOCK1 plasmid was a kind gift of Dr M. Matsuda (Kyoto University). The yeast two-hybrid screen was carried out in collaboration with Hybrigenics (France) to identify ELMO1-binding proteins [132]. To validate the interaction between ELMO proteins and BAI3, the C-Terminus of BAI3 was amplified by PCR and cloned into BglII/XhoI sites of pJG4-5alt. Yeasts were co-transformed with B42-tagged BAI3 and individual ELMO1 fragments as LexA-fusions. To identify protein-protein interactions, double transformants were grown on selective medium (-

Histidine, -Tryptophan, -Leucine), or on non-selective medium, as a control for transformation (-Histidine, -Tryptophan), as previously described [132].

### **Generation of small hairpin RNAs (shRNAs) stable C2C12 cell lines**

shRNA plasmids were constructed using the pSIREN-RetroQ-ZsGreen retroviral vector (Clontech). Several shRNA DNA oligonucleotides were designed against each gene, according to the protocol accompanying the pSIREN-RetroQ retroviral vectors, to specifically knockdown BAI1, BAI2, BAI3, ELMO1 or ELMO2 (See **Supplemental Table 1** for nucleotide sequences). Primers were annealed and cloned into the BamHI/EcoRI digested pSIREN-RetroQ-ZsGFP vector. Ecotropic Phoenix retrovirus packaging cells were transfected with purified pSIREN-RetroQ-ZsGreen (empty) or the pSIREN shRNA constructs described above. High titer retroviral supernatants were collected 48 hours post-transfection, filtered and mixed with polybrene (Sigma) at a 5µg/ml final concentration. Sparsely plated and exponentially growing C2C12 (10 cm plates) were infected twice (t=0hrs and t=24hrs) with the viral supernatants supplemented with FBS (20% final). At t=48hrs, myoblasts were harvested and cells expressing ZsGreen GFP were enriched using a MOFLO cell sorter (Beckman Coulter). Cells were allowed to recover for 2 passages prior to analysis in myoblast fusion assays. Multiple cell lines were generated for each shRNA and cells were only kept for short-term experiments. Fresh infections were performed to reproduce experiments. Gene knockdown efficiency was assessed by real-time Q-RT-PCR.

### **Cell culture and transfections**

C2C12 (ATCC) and Sol8 (kind gift of Dr J. Drouin, IRCM) mouse myoblasts were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 20% FBS (vol/vol) and a mixture of penicillin and streptomycin (Gibco). C2C12 were typically transfected in 6 well plates (50% confluency; 4 µg of plasmid DNA) using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). HEK293T cells and the retroviral packaging cell line ecoPhoenix (obtained from Dr Nolan, Stanford) were grown in DMEM (supplemented with 10% FBS and penicillin and streptomycin) and transfected in 10 cm tissue culture plates (50% confluence; 10 µg of plasmid DNA) using a standard calcium phosphate precipitation protocol.

### **mRNA isolation and real-time quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR)**

Total RNA was extracted from the indicated Sol8, C2C12 and C2C12-shRNA lines using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer protocol. Total RNAs were treated with DNase1 (Invitrogen) and cDNAs were generated using the M-MuLV Reverse Transcriptase and random primers (NEB), as recommended by the manufacturer. Specific knockdown of the genes of interest was confirmed by real-time Q-PCR in an Mx3005P (Stratagene) system using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reaction specificity was assessed by melt curve analyses for each primer set. The TATA box gene was used as an internal control. All real-time Q-PCR reactions were carried out as follow: 5 min at 45°C, 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Primers used in Q-PCR analyses are described in **Supplemental Table 1**.

### **Western blot and protein-protein interaction assays**

For GST pull-down assays, HEK293 cells expressing ELMO proteins of interest were lysed for 10 min in Nonidet-P40 buffer (150mM NaCl, 50 mM Tris pH7.5, 1% Nonidet-P40). GST-fusion proteins were expressed in BL21 bacteria and purified with glutathione-Sepharose 4B following the manufacturer protocol (Amersham, Piscataway, NJ). Equal amounts of GST-fusion protein fragments (BAI1, BAI2 or BAI3) were incubated with 500 µg of total protein extract of the indicated conditions. After 90 minutes incubation, the beads were washed three times with lysis buffer and proteins were next eluted and analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with the indicated antibodies. For analysis of total cell extracts, proteins were extracted in Radio Immuno-Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris pH7.5, 0,1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% Nonidet P-40 buffer, 150 mM NaCl, 5mM EDTA) and analyzed as above.

### **Chick embryos and *in ovo* electroporation**

Fertilized chick eggs (Couvoir Simetin, Québec, Canada) were stored at 18°C and incubated at 38.5°C under 95% humidity for developmental staging according to standard protocols [225]. Chick somite electroporation was performed at stage E2.5 (between HH stage 13-18) through a small eggshell window under a Zeiss Discovery V12 stereomicroscope. Briefly, DNA plasmids (pEGFP-N2, pCAGG-Flag-BAI3-mVenus and pCAGG-Flag-BAI3-mutant-mVenus) were suspended in TE buffer pH 7.5 (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA) at 5 µg/µl and microinjected

into the somitocoel of interlimb somites (I to IV according to [224]). Chick embryos were then electroporated with platinum/iridium electrodes and a TSS20 Ovodyne electroporator (settings: 25 Volts, 5 pulses) and 200  $\mu$ L of a penicillin-streptomycin solution was added at the microinjection site. Shell windows were sealed with Parafilm and eggs were incubated for 72 hrs at 38.5°C. Embryos were then collected and those expressing GFP or mVenus were selected for histology and immunohistochemistry analyses.

### **In situ hybridization**

Chick embryos were fixed in a 4% solution of paraformaldehyde (Sigma) in PBS, equilibrated with 30% sucrose in PBS, embedded in O.C.T. (Sakura Finetek), and stored at -80°C. Twelve micrometer sections were collected using a Leica cryostat microtome. *In situ* mRNA detection was performed as described [231, 232].

### **Immunofluorescence and immunohistochemistry**

C2C12 and Sol8 myoblasts were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with a PBS/0.2% Triton X-100 solution for 10 min prior to incubation in blocking buffer (PBS/1% BSA) for 1h. Cells were next incubated with the primary antibody recognizing MHC (MF20, dilution 1:20 (Developmental Hybridoma)) diluted in blocking buffer. Cells were washed with PBS and incubated with an Alexa 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibody (dilution 1:2500; Invitrogen) for 1 hour. Hoechst (dilution 1:10000; Invitrogen) was used to reveal nuclei. GFP/mVenus positive chick embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 1h at room temperature and washed three times with PBS. They were then incubated overnight in 30% sucrose solution at 4°C and embedded in OCT prior to cryosectioning. 8  $\mu$ m sections were stained as described above for cells with the following modifications: sections were washed in PBS/0.1% Triton X-100 and the Alexa 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibody was used at a 1:2500 dilution. Pictures were taken with the Axiovert microscope (Zeiss) at an objective of 20x and with a confocal microscope LSM700 (Zeiss) at an objective of 100X. In both cases, the images were analyzed using the Volocity software, as described above.

### **3D reconstruction of chick embryos developing muscle**

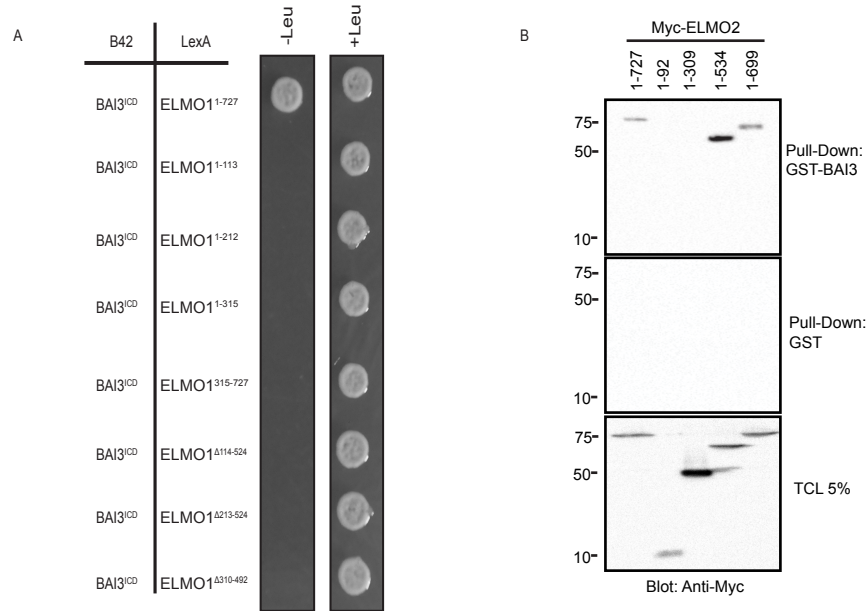
Embryos were electroporated as described above followed by a clearing treatment. Briefly, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 1h at room temperature and washed three times with PBS. They were incubated 1 hour in 25% formamide/10%PEG solution at room temperature followed by incubation in 50% formamide/20%PEG for one hour at room temperature. Embryos were incubated overnight in a fresh 50% formamide/20%PEG solution. After clearing, whole embryos were mounted on a depression slide in 50% formamide/20%PEG. Next, Z stack images were taken with a LSM700 confocal microscope (Zeiss) using a 20X objective. The Imaris software was used to create 3D reconstructions of the electroporated muscles from the Z stacks. Finally, the 3D images were assembled in an animation to visualize the muscle tissue at different angles.

### **Statistical analyses**

Data is expressed as mean  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. Statistical comparisons between samples were done with one-way ANOVA test using the Prism Graph software. P value  $<0.05$  was considered as significant.

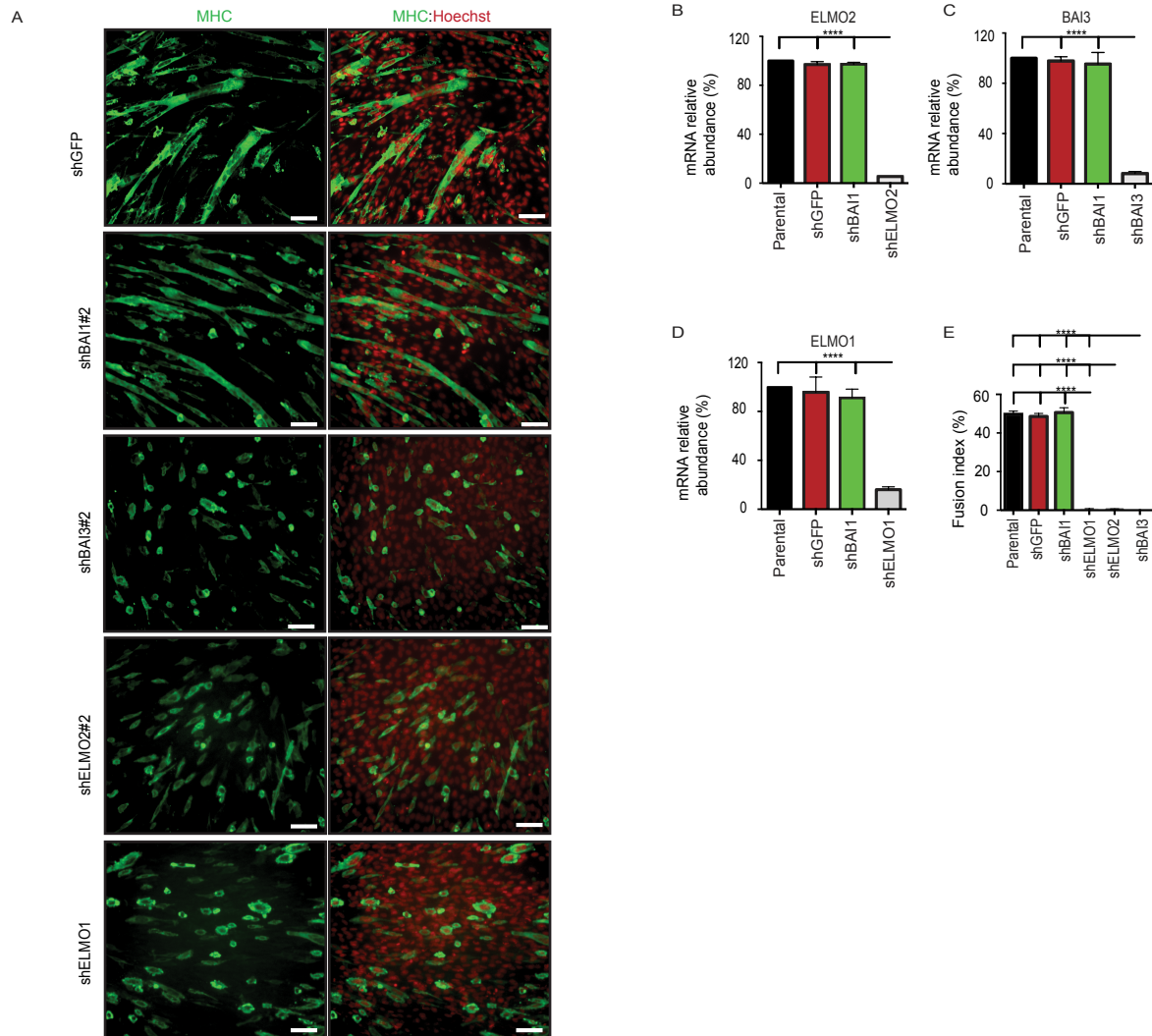






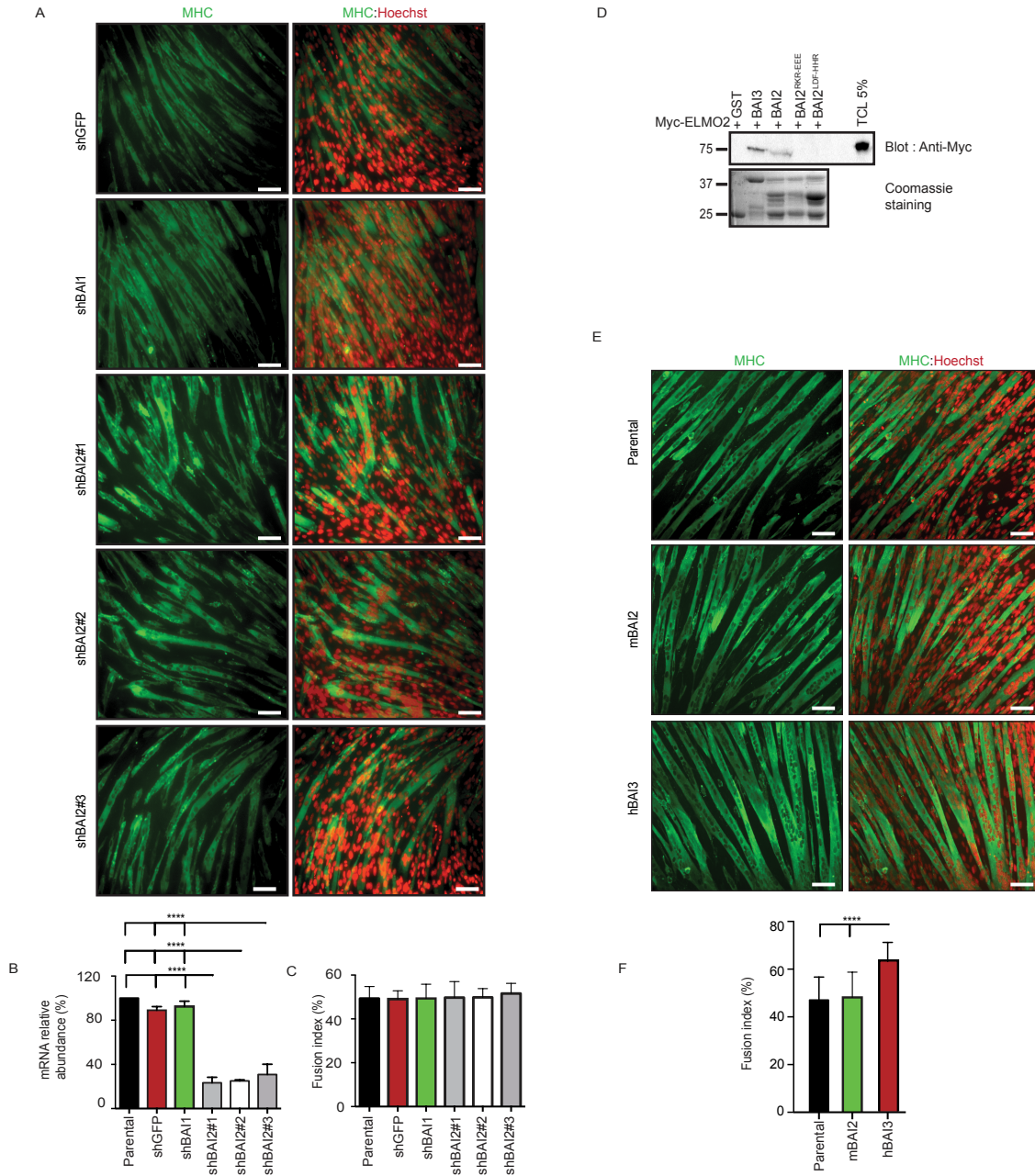
**Figure 2-S2 N-terminal region of ELMO2 interacts with BAI3**

(A) Yeast strain EGY48 was co-transformed with the indicated LexA fusion ELMO1 constructs and the B42 fusion construct of BAI3 intracellular domain (ICD) and were grown on selective medium (-his, -trp, -leu) to assay for protein-protein interaction and on non-selective (-his, -trp) medium to confirm co-transformation of the indicated plasmids. While ELMO1<sup>1-727</sup> interacts with BAI3 ICD, all other ELMO1 fragments tested lacked binding activity toward BAI3. (B) N-terminal region in ELMO2, similar to ELMO1, mediates binding to BAI3. HEK293 cells were transfected with a panel of Myc-ELMO2 constructs and clarified lysates were subjected to GST-BAI3 pull downs. Bound Myc-ELMO2 fragments were detected by immunoblotting. TCL, Total Cell Lysate.



**Figure 2-S3 Additional and independent shRNAs confirm that BAI3 and ELMO1/2 are essential for myoblast fusion.**

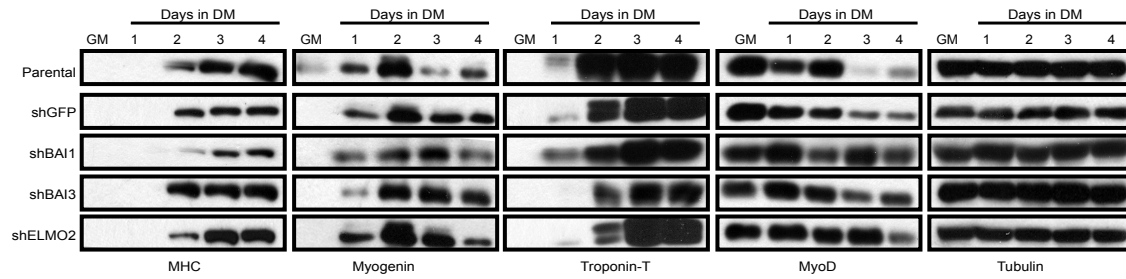
(A-E) C2C12 cells expressing GFP (no hairpin) or shRNAs targeting BAI1, BAI3, ELMO1 or ELMO2 were generated by retro-infections. (A) Downregulation of BAI3, ELMO1 or ELMO2 impairs myoblast fusion after 48 hrs of differentiation. (B-D) Real-time Q-RT-PCRs confirm BAI3, ELMO1 or ELMO2 specific knockdowns in the indicated cell lines. (E) Quantification of experiments shown in (A).



**Figure 2-S4 BAI2 is not a pro-fusion receptor in myoblasts.**

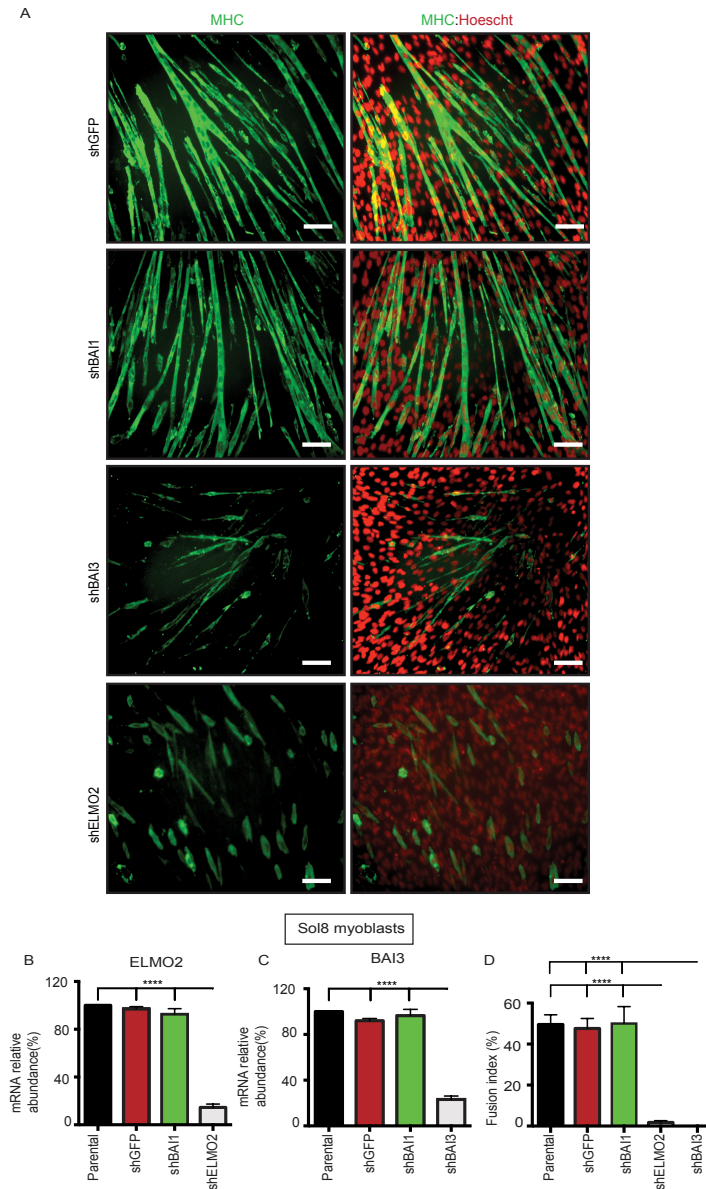
(A) BAI2 is not required for myoblast fusion. C2C12 cells expressing GFP (no hairpin), shRNA against BAI1 or three independent shRNAs against BAI2 were generated by retro-infections. (B) Real-time Q-RT-PCRs confirm BAI2 specific knockdown in the indicated cell lines. (C) Quantification of experiments shown in (A). (D) Identification of BAI2 residues important for

interaction to ELMO2. HEK293 cells were transfected with Myc-ELMO2 and clarified lysates were subjected to pull-downs with GST alone, GST-BAI2 or the indicated mutants of BAI2. Bound Myc-ELMO2 was detected by immunoblotting. TCL, Total Cell Lysate. (E) Overexpression of BAI2 does not enhance myoblast fusion. C2C12 cells were mock transfected or transfected with: Flag-BAI3-mVenus, Flag-BAI2-mVenus. Cells were allowed to differentiate for 48 hours and fusion was assessed. (F) Quantification of experiments shown in (E). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MHC, MF20 antibody) and nuclei revealed by Hoechst. Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100  $\mu$ m. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



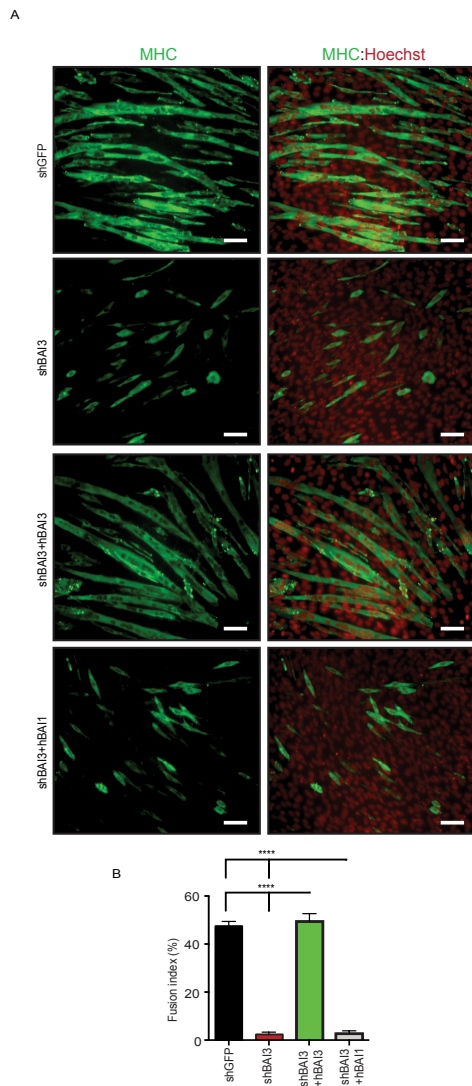
**Figure 2-S5 Myoblast differentiation is not affected by downregulation of BAI3 or ELMO2.**

Cell lysates from the indicated cells were prepared during C2C12 differentiation. Expression of differentiation markers was analyzed by immunoblotting using antibody against MHC, Myogenin, Troponin-T and MyoD. Equal loading was verified by immunoblotting with anti-Tubulin.



**Figure 2-S6 BAI3 and ELMO2 are essential for fusion in the Sol8 myoblast cell line.**

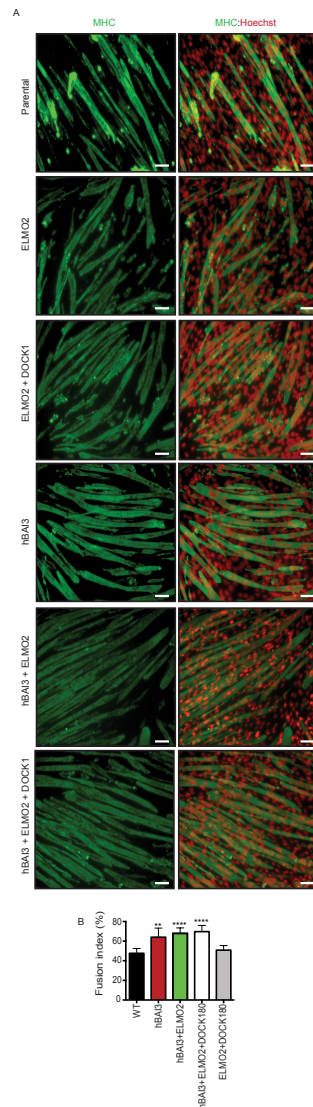
(A-D) Sol8 cells expressing GFP (no hairpin) or shRNAs targeting BAI1, BAI3 or ELMO2 were generated by retro-infections. (A) Downregulation of BAI3 and ELMO2 impairs myoblast fusion after 48 hrs in differentiation conditions. (B-C) Real-time Q-RT-PCRs confirm BAI3 and ELMO2 specific knockdowns in the indicated cell lines. (D) Quantification of experiments shown in (A). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MHC, MF20 antibody) and nuclei revealed by Hoechst. Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100  $\mu$ m. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P$ <0.0001.



**Figure 2-S7 BAI1 cannot functionally replace BAI3 during C2C12 myoblast fusion.**

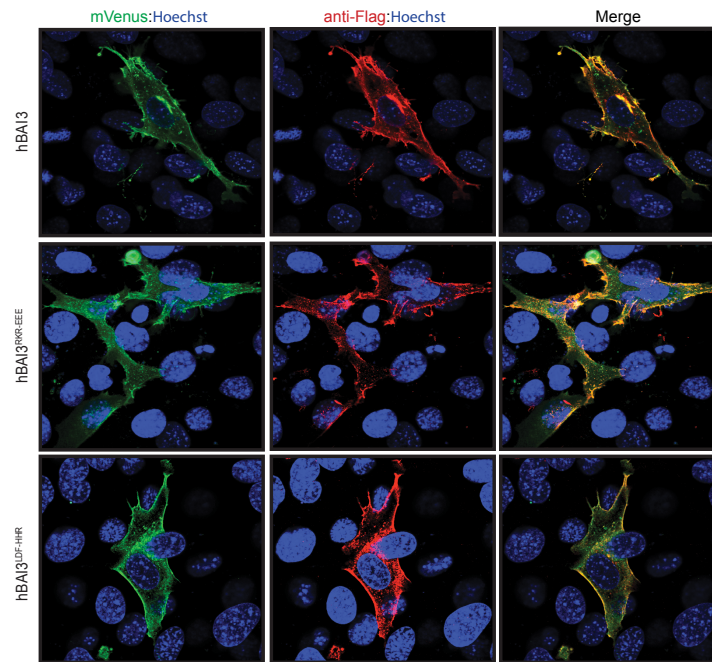
(A) C2C12 cells expressing GFP (no hairpin) or shRNA targeting BAI3 were generated by retro-infections. The shBAI3 cells were transfected with either Flag-BAI3-mVenus or BAI1-eGFP to assess the potential of these related receptors to rescue myoblast fusion in BAI3 depleted cells. (B) Quantification of experiments shown in (A). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MHC, MF20 antibody) and nuclei revealed by Hoechst. Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100  $\mu$ m. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P$ <0.0001.





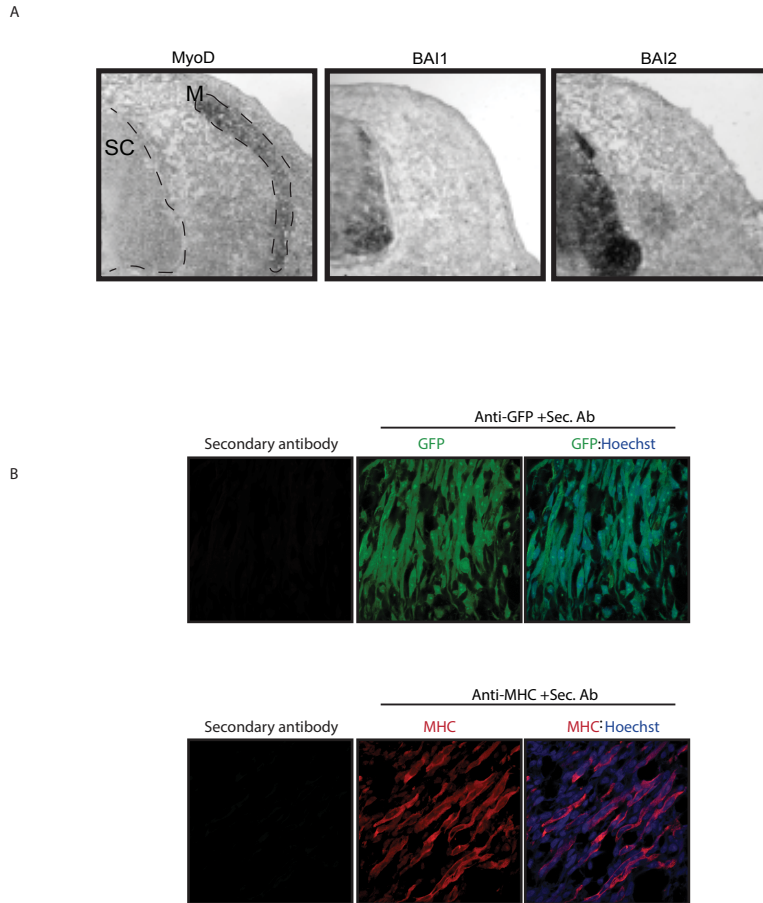
**Figure 2-S8 BAI3 expression promotes myoblast fusion.**

(A) C2C12 cells were mock transfected or transfected with: Myc-ELMO2, Myc-ELMO2 and Flag-DOCK1, Flag-BAI3-mVenus, Flag-BAI3-mVenus and Myc-ELMO2, or Flag-BAI3-mVenus with Myc-ELMO2 and Flag-DOCK1. Cells were allowed to differentiate for 48 hours and fusion was assessed. (B) Quantification of experiments shown in (A). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MHC, MF20 antibody) and nuclei revealed by Hoechst. Error bars indicate standard deviation. Scale bar represent 100 μm. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test calculated the P values; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



**Figure 2-S9 BAI3 mutants lacking ELMO-binding activity correctly localize to the plasma membrane.**

C2C12 cells were transfected with mVenus-tagged Flag-BAI3, Flag-BAI3<sup>RKR-EEE</sup> or Flag-BAI3<sup>LDF-HHR</sup>. Expressed proteins were identified by the mVenus signal. Localization of the BAI3 receptors at the cell surface was confirmed by staining non-permeabilized cells with an anti-Flag antibody. Nuclei revealed by Hoechst.



**Figure 2-S10 BAI1 and BAI2 are highly expressed in the spinal cord but not in the developing muscles of chicken embryos.**

(A) *In situ hybridization* of anti-sense DIG-labeled riboprobes demonstrates BAI1 and BAI2 expression in the spinal cord of chicken embryos but not in muscle precursors that express the myocyte differentiation marker MyoD. SC: Spinal Cord. M: Muscle. (B) GFP, Myosin Heavy Chain and Desmin antibodies are specific. Sections were stained as described in the methods but with omission of the primary antibodies. Other sections were stained with anti-MHC and anti-GFP antibodies and nuclei revealed with Hoechst. These experiments confirm the specific staining for GFP, MHC and Desmin.

	Forward	Reverse
Cloning of the C-terminus of hBAI1 (for GST pull-downs)	5'- AGG ATC CCA TCC GGG ACC CAG CAC G -3'	5'- ACT CGA GGA CCT CGG TCT GGA GGT CGA T -3'
Cloning of the C-terminus of mBAI2 (for GST pull-downs)	5'- AGG ATC CCC CCG TAC AGT GCC TGG TTC T -3'	5'- ACT CGA GCA CCT CTG TCT GGA AGT CGC C -3'
Cloning of the C-terminus of hBAI3 (for GST pull-downs)	5'- AGG ATC CTC AAG AAG TGA AAC TGG ATC AAC GAT ATC A -3'	5'- ACT CGA GAA CTT CTG TTT GAA AGT CAC CCT CTT GC -3'
Cloning of the hBAI3 del 1 mutant (for GST pull-downs)	5'- AGG ATC CTC AAG AAG TGA AAC TGG ATC AAC GAT ATC A -3'	5'- ACT CGA GTT GCA CAT CCA GAG GCA AAT TCA G -3'
Cloning of the hBAI3 del 2 mutant (for GST pull-downs)	5'- AGG ATC CTC AAG AAG TGA AAC TGG ATC AAC GAT ATC A -3'	5'- ACT CGA GAC TGC TTG TAT TTG GTA TAT CCC GAA ATC TG -3'
Generation of hBAI3 RKR-EEE mutant (full length and GST clone)	5'- GAC TTT GAG AAG GTC ATG CAT ACA GAG GAG GAG CAT ATG GAA CTA TTT CAA GAA CTA -3'	5'- TAG TTC TTG AAA TAG TTC CAT ATG CTC CTC CTC TGT ATG CAT GAC CTT CTC AAA GTC -3'
Generation of hBAI3 LDF-HHR mutant (full length and GST clone)	5'- AGA AAA TCA CGA TAT TCA GAC CAT CAC T GAG AAG GTC ATGCAT ACA AGG T	5'- CCT TGT ATG CAT GAC CTT CTC ACG GTG ATG GTC TGA ATA TCG TGA TCT TCT T -3'
Generation of hBAI3 RRR-EEE mutant ((full length and GST clone)	5'- CGA TAT CAA TGA GTT CTT TAG AGG AAG AAG AAT CAC GAT ATT CAG ACC TTG AC -3'	5'- GTC AAG GTC TGA ATA TCG TGA TTC TTC TTC CTC TAA AGA ACT CAT TGA TAT CG -3'
Generation of mBAI2 RKR-EEE mutant (for GST pull-downs)	5'- GGA CTT GGA CTT TGA GAA GGT GAT GCA CAC TGA GGA AGA GCA CTC GGA ACT CTA C -3'	5'- GTA GAG TTC CGA GTG CTC TTC CTC AGT GTG CAT CAC CTT CTC AAA GTC CAA GTC C -3'
Generation of mBAI2 LDF-HHR mutant (for GST pull-downs)	5'- GCG AAA GAA GCT TCG GTA TTC GGA CCA CCA CCG TGA GAA GGT GAT GCA CAC TCG GAA A -3'	5'- TTT CCG AGT GTG CAT CAC CTT CTC ACG GTG GTG GTC CGA ATA CCG AAG CTT CTT TCG C -3'
mDOCK1 RT-PCR	5'- GGC CTA CAC TTT GCT TCT GC -3'	5'- TAC TGC TCC GCA AGT TCC TT -3'
mDOCK2 RT-PCR	5'- CGA GCT ACT CAG CCA GAA CC -3'	5'- AAC TGG CTC AAA AGC TGC AT -3'
mDOCK3 RT-PCR	5'- AGA ATG GAC AGC CAC CAA AC -3'	5'- ATG GGG TGG AGA GGA GAC TT -3'
mDOCK4 RT-PCR	5'- GAT CAG CCA GTG TCA GAC GA -3'	5'- CAG AAT CTG TGC CTG CTC AA -3'
mDOCK5 RT-PCR	5'- GAG GGC CTA GGC AGT CTC TT -3'	5'- ACT GGG TCA GCA ACC TCA AG -3'
mELMO1 q- RT-PCR	5'- ACG ACT TTC ACC CGA TGT TC -3'	5'- TGC AGC TTG CTT TTG AAC TG -3'
mELMO2 q-RT-PCR	5'- TCA CCA AGA TGG ATC CCA AT -3'	5'- GGA GTC TGG GTG AAG TCC AA -3'
mELMO3 RT-PCR	5'- TTG TAT GTG CTG CAG GCT CT -3'	5'- CCT AAC TTG CCG AAC TCT CG -3'
mBAI1 RT-PCR	5'- GTA TGC TCC AGT ACC TGC GGT GA -3'	5'- GCT GGA CCA TTC GIT CCA GIT TC T -3'
mBAI2 RT-PCR	5'- GAG CTG CAG ACT AAA CTC TGC AG -3'	5'-CTG GAC ACC TCT TCT CAC TGC AG -3'
mBAI3 RT-PCR	5'- CAG TGT GAA GGC ACA GGT GAA G -3'	5'-CAT TCC ATC ACC TGC CAG CAT C -3'
mBAI3 q-RT-PCR	5'- CGG CCC ATT AAG AGA ATC AAG GGT T -3'	5'- CTC CAT ACT GAG GAG GTG TGC AT -3'
mELMO2 q-RT-PCR	5'- TGA CCA AGA TGG ATC CCA AT -3'	5'- GGA GTC TGG GTG AAG TCC AA -3'
TATA box q-RT-PCR (for normalization)	5'- GCT GAA TAT AAT CCC AAG CGA TTT -3'	5'- GCA GTT GTC CGT GGC TCT CT -3'

**Table 2-SI : Various primers used in this study**

	Forward	Reverse	Functionality <sup>1</sup>
shRNA against mBAI1 (pos 2257)	5'- GAT CCA GGC TTC CGC ATG AAG GAT TTT CAA GAG AAA TCC TTC ATG CCG AAG CCT TTT TTA GAT CTG -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AAG GCT TCC GCA TGA AGG ATT TCT CTT GAA AAT CCT TCA TGC GGA AGC CTG -3'	?
shRNA against mBAI2 (pos 1610)	5'-GAT CCA GGC AGC TGG CGA GAT CAT TTT CAA GAG AAA TGA TCT CGC CAG CTG CCT TTT TTC TCG AGG -3'	5'- AAT TCC TCG AGA AAA AAG GCA GCT GGC GAG ATC ATT TCT CTT GAA AAT GAT CTC GCC AGC TGC CTG -3'	YES
shRNA against mBAI2 (pos 3380)	5'- GAT CCA GGG TCC AGC AGC AGT CAT TTT CAA GAG AAA TGA CTG CTG CTG GAC CCT TTT TTC TCG AGG -3'	5'- AAT TCC TCG AGA AAA AAG GGT CCA GCA GCA GTC ATT TCT CTT GAA AAT GAC TGC TGC TGG ACC CTG -3'	YES
shRNA against mBAI2 (pos 2950)	5'- GAT CCA GGC TGT GTC TGT TGG CTT TTT CAA GAG AAA AGC CAA CAG ACA CAG CCT TTT TTC TCG AGG -3'	5'- AAT TCC TCG AGA AAA AAG GCT GTG TCT GTT GGC TTT TCT CTT GAA AAA GCC AAC AGA CAC AGC CTG -3'	YES
shRNA against mBAI3 (pos 76)	5'- GAT CCA AGA CTT CTG GTG TTC CAC TTT TCA AGA GAA AGT GGA ACA CCA GAA GTC TTT TTT TAG ATC TG -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AAA GAC TTC TGG TGT TCC ACT TTC AAG TCT TG -3'	NO
shRNA against mBAI3 (pos 3587)	5'-GAT CCA GCC GAT CAG TGC TTC ATA ATT CAA GAG ATT ATG AAG CAC TGA TCG GCT TTT TTA GAT CTG -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AAG CCG ATC AGT GCT TCA TAA TCT CTT GAA TTA TGA AGC ACT GAT CCG CTG -3'	YES
shRNA against mBAI3 (pos 1538)	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AGC CCA GCA CCT TAT GAA ATT CTC TTG AAA TTT CAT AAG GTG CTG GGC TG -3'	5'- GAT CCA GCC CAG CAC CTT ATG AAA TTT CAA GAG AAT TTCTG -3'	YES
shRNA against mELMO2 (pos 1899)	5'- GAT CCA GGC CTT CTC CAT CCT GTA TTT CAA GAG AAT ACA GGA TGG AGA AGG CCT TTT TTA GAT CTG-3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AAG GCC TTC TCC ATC CTG TAT TCT CTT GAA ATA CAG GAT GGA GAA GGC CTG-3'	YES
shRNA against mELMO2 (pos 1917)	5'-GAT CCG GCC TTC TCC ATC CTG TAT TTC AAG AGA AAT ATG GAT TCA AAG TGC CTT TTT AGA TCT G -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AGG CAC TTT GAA TCC ATA TTT CTC TTG AAA TAC AGG ATG GAG AAG GCCG -3'	YES
shRNA against mELMO2 (pos 218)	5'- GAT CCA ATC TTA CAA CTG GCC GTC TCT TCA AGA GAG AGA CGG CCA GTT GTA AGA TTT TTT TAG ATC TG -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AAA TCT TAC AAC TGG CCG TCT CTC TCT TGA AGA GAC GGC CAG TTG TAA GAT TG -3'	NO
shRNA against mELMO1 (pos 104)	5'- GAT CCG CCA CTG TCT GCC ATT ATA TTC AAG AGA TAT AAT GGC AGA CAG TGG CTT TTT AGA TCT G -3'	5'- AAT TCA GAT CTA AAA AGC CAC TGT CTG CCA TTA TAT CTC TTG AAT ATA ATG GCA GAC AGT GGC G -3'	YES

<sup>1</sup>Functionality confirmed by q-RT-PCR and fusion phenotype

**Table 2-SII : Short-hairpin RNAs (shRNAs) used in C2C12 and Sol8 knockdown experiments.**

	Forward	Reverse
BAI1 #1	5'-CAATCGCTGAGGTCCACAGATAAC-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAAGAAGGGTCCATAGCACACGC-3'
BAI1 #2	5'-TTGTGTCGTAAGATCCTCCACG-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGGTCAATAATGTCTTGTCCACCAG-3'
BAI2 #1	5'-TGCTGATGACCTGGAAGAAAACC-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGATGGGGAAGTTGATGTCGCTGGAC-3'
BAI2 #2	5'-TTCCTCTCATCCTTCTGTGGG-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTCTGGGCGAGTTTTCATTTC-3'
BAI3 #1	5'-GGTGCGAACCAGAAGTGTGTATC-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTGTGGCATTGAGAGGACATCG-3'
BAI3 #2	5'-GTGCCAAGTGTGGAGTAGTTCAAC-3'	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGGCTTCTATCATCCGTTCCTGAGG-3'
MyoD	5'-CTTCTATGACGCCGTGCT-3'	5'-GTCTTGGAGCTTGGCTGAACGCTAATACGACTCACTATAGGG-3'

<sup>2</sup>BAI1 mRNA is not expressed in C2C12 and Sol8 cell lines.

**Table 2-SIII : Primers used to amplify anti-sense probes for In Situ Hybridization (ISH) on chicken embryo tissues.**

## **CHAPITRE 3**

# **LA RÉGULATION SPATIO-TEMPORELLE DU RÉCEPTEUR COUPLÉ AUX PROTÉINES G BAI3 ET SA SIGNALISATION CANONIQUE ET NON- CANONIQUE PAR LES PROTÉINES C1Q-LIKE ET STABILIN-2 CONTRÔLE LA FUSION DES MYOBLASTES.**

## **Préface**

Le chapitre 2 a permis de répondre à une importante question de la myogenèse. Soit quelle molécule de surface régule la fusion des myoblastes chez les vertébrés. L'identification du RCPG d'adhésion BAI3 répond à cette question. De plus, BAI3 est capable de lier le complexe ELMO/DOCK/Rac. L'interaction entre BAI3 et ELMO est essentielle pour la fusion. Les expériences *in vitro* autant qu'*in vivo* ont montré que l'abolition de cette interaction mène à un blocage de la fusion des myoblastes. Comme la fusion est un processus régulé de façon très précise, alors son régulateur BAI3 subit probablement une régulation tout aussi précise. Pour répondre à cette présomption, le chapitre 3 a comme objectif de comprendre comment BAI3 est régulé. Premièrement, en identifiant ses partenaires d'interaction extracellulaire qui peuvent réguler son activation et dans un deuxième temps vérifier si le recrutement du complexe ELMO/DOCK est dû à la signalisation canonique qui survient suite à l'activation du RCPG BAI3.



## **Contributions**

Figure 3.1 : Noumeira Hamoud

Figure 3.2 : Noumeira Hamoud

Figure 3.3 : Noumeira Hamoud

Figure 3.3 (g) : Ariane Pelletier

Figure 3.4 : Noumeira Hamoud

Figure 3.5 : Noumeira Hamoud

Figure 3.6 : Noumeira Hamoud

Figure 3.7 : Noumeira Hamoud

Figure 3S1 : Noumeira Hamoud

Figure 3S2 : Noumeira Hamoud

Figure 3S3 : Noumeira Hamoud

Figure 3S4 : Noumeira Hamoud

Figure 3S5 : Noumeira Hamoud

Design expérimental : Jean-François Côté

Réalisations des expériences : Noumeira Hamoud et Ariane Pelletier

Analyses des données : Noumeira Hamoud, Artur Kania, Michel Bouvier et Jean-François Côté

Écriture du manuscrit : Jean-François Côté avec la contribution de tous les auteurs

## **Spatiotemporal regulation of G-Protein Coupled Receptor BAI3 canonical and non-canonical signaling by C1q-Like proteins and Stabilin-2 controls myoblast fusion**

Noumeira Hamoud<sup>1,2</sup>, Ariane Pelletier<sup>1</sup>, Artur Kania<sup>1,2,3,4</sup>, Michel Bouvier<sup>5,6</sup> and Jean-François Côté<sup>1,2,4,6\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada H2W 1R7.

<sup>2</sup>Département de Médecine (Programmes de Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

<sup>3</sup>Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

<sup>4</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 1A3.

<sup>5</sup>Institut de Recherches en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7.

<sup>6</sup>Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

\*Corresponding author:

Jean-François Côté, Ph.D.

IRCM

110, Avenue des Pins Ouest

Montréal (QC) Canada

H2W 1R7

Email: [jean-francois.cote@ircm.qc.ca](mailto:jean-francois.cote@ircm.qc.ca)

Phone: (514) 987-5647

En révision à Nature Communications en octobre 2017.

## ABSTRACT

Myoblast fusion is a tightly regulated process fundamental for the formation, maintenance and regeneration of muscle fibers. BAI3 is a cell surface protein that orchestrates myoblast fusion via the Elmo/Dock1 complex and Rac1. However, the mechanisms regulating BAI3 activity during fusion remain elusive. We describe two proteins that repress or activate BAI3 in muscle progenitors. We found that the secreted C1q-like1-4 proteins repress myoblast fusion *in vitro* and *in vivo* by specifically interacting with BAI3. Using proteomic approaches, we identified Stabilin-2 as a protein that specifically interacts with BAI3 and activates its myoblast fusion promoting activity. We resolve a longstanding question by demonstrating that Stabilin-2 is a molecular signal that stimulates the GPCR activity of BAI3. The resulting activated heterotrimeric G-proteins contribute to the initial recruitment of Elmo proteins to the membrane, which are then stabilized on BAI3 through a direct interaction. Collectively, our results demonstrate that the activity of BAI3 is spatiotemporally regulated during the continuum of myoblast fusion.

Fusion of myoblasts during embryonic myogenesis, or of satellite cell-derived adult myoblasts during muscle regeneration, is central to the formation and maintenance of multinucleated fibres [2, 233, 234]. The identity of the genes and the molecular mechanisms controlling myoblast fusion remain incompletely defined. By merging the power of genetics and tissue imaging, *Drosophila* studies have pioneered the identification of some of the genes controlling the first myoblast fusion events during embryonic development. The current view is that cell adhesion receptors activate signalling pathways that engage actin, allowing primary myoblast fusion in flies [135]. While less is known about the molecular mechanisms promoting myoblast fusion in vertebrates, orthologues of the fly proteins, including the guanine exchange factor DOCK1, the GTPase Rac1 and the actin nucleator N-WASP, have been demonstrated to play an evolutionarily conserved and essential role in cell-cell fusion *in vivo* in mice [130, 134, 137]. Recently, a set of vertebrate cell surface proteins controlling fusion have been uncovered. First, myoblast specific proteins with *bona fide* fusogenic activity were uncovered. Myomaker, a myoblast fusogenic protein specifically expressed at the time of fusion, is almost exclusively composed of transmembrane segments and is vital for fusion *in vivo* [138, 235]. In agreement with its essential fusogenic function in mice, *MYOMAKER* mutations in humans are responsible for the Carey-Fineman-Ziter syndrome, a group of congenital myopathies that originate from defective myoblast fusion [236]. Myomixer (also known as Myomerger or Minion), a membrane microprotein of only 84 amino acids also expressed at the time of fusion, is similarly essential for myoblast fusion *in vivo* and is suspected to function in partner with Myomaker [140-142]. Second, Stabilin-2 was identified as the first phosphatidylserine receptor specifically regulated during myoblast differentiation [237] and is thought to transduce the enigmatic pro-fusion signals triggered by the non-apoptotic phosphatidylserine exposed by myoblasts [238]. Third, the related G-protein Coupled Receptors (GPCRs) BAI1 and BAI3 promote myoblast fusion by directly coupling to the evolutionarily conserved Elmo/Dock Rac1-specific guanine nucleotide exchange complex [149, 150]. The fact that BAI1 and BAI3 are expressed in progenitors and that their expressions are not further increased during differentiation raises the question on the molecular mechanisms that ensures the tight regulation of their pro-fusion activities.

BAI1 and BAI3 belong to the family of Adhesion GPCRs that are defined by long extracellular and intracellular domains [191]. BAI-family are more specifically characterized by

the presence of thrombospondin repeats (TSRs) in their extracellular domains as well as an Elmo-binding site in their intracellular tail [144, 149]. In addition, the presence of a GPCR Auto-proteolysis-Inducing (GAIN) domain in the extracellular domains is a signature of Adhesion GPCRs [191-193]. Auto-cleavage of Adhesion GPCRs is expected to contribute to their ability to activate canonical heterotrimeric G-proteins signaling [239]. BAI1 uses its extracellular domain to interact with apoptotic myoblasts and this transmits a signal, via the ELMO/Dock1 complex, that promotes fusion and muscle repair *in vivo* [150]. We demonstrated that uncoupling BAI3 from binding to Elmo blocks embryonic myoblast fusion *in vivo* in chick embryos [149]. The only described ligands for BAI3 are the C1q-Like 1-4 (C1qL1-4; also known as CTRPs [240, 241]) secreted proteins [145]. Interplay between C1qL1 or C1qL3 and BAI3 was reported to regulate synapse formation and maintenance *in vivo* [210-212], but the contribution of C1qL1-4 to myoblast fusion has not been investigated. While non-canonical Elmo-binding and Rac1 signaling mediated by BAI1 and BAI3 are essential to promote fusion, whether these BAI-family receptors activate canonical heterotrimeric G-proteins toward cell-cell fusion is an unresolved question. Therefore, revealing the identity of the molecules that control BAI3 activity is needed to understand how this receptor promotes cell fusion.

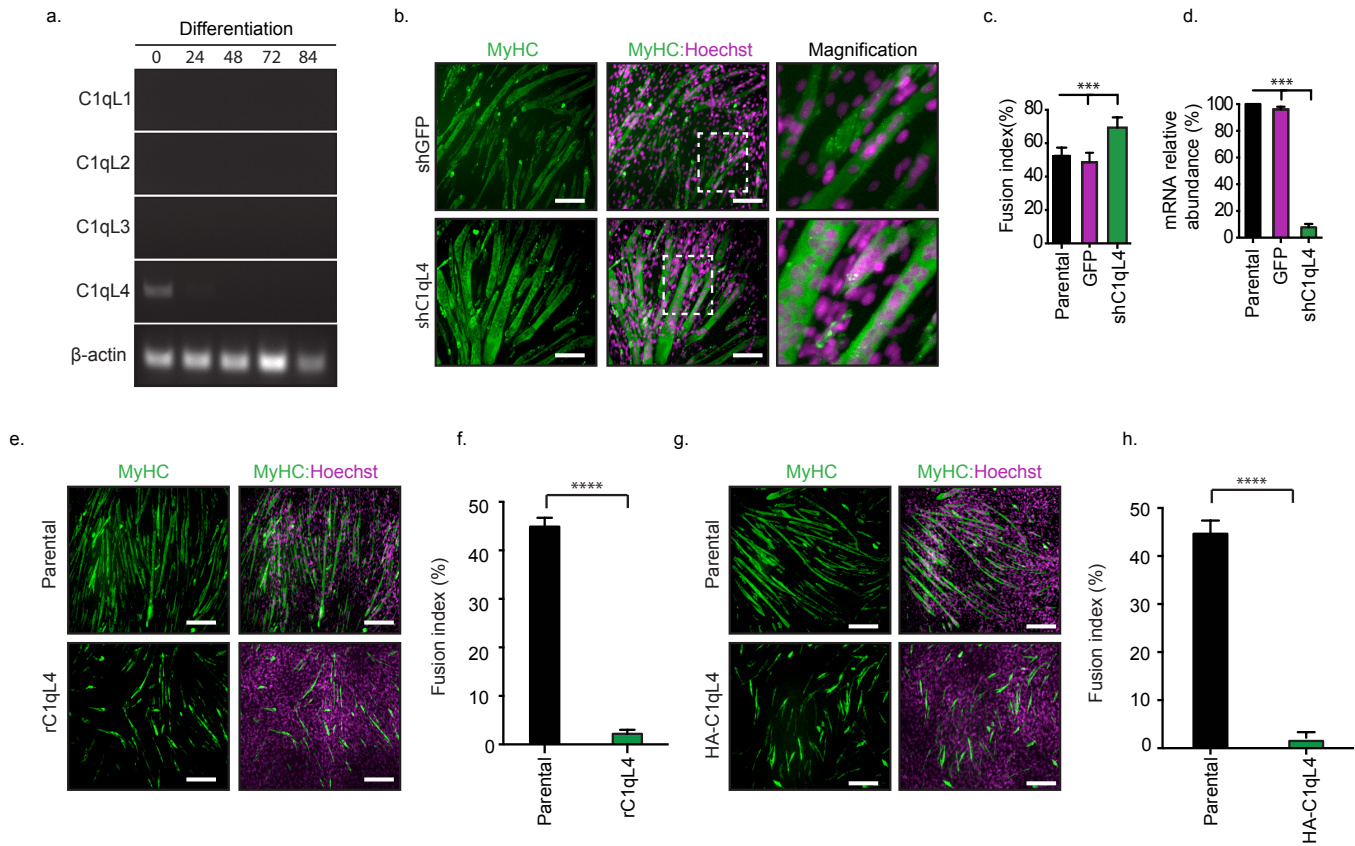
In this study, we aimed to identify the negative and positive regulators of BAI3 during myoblast fusion. We report that C1qL1-4 proteins act as inhibitors of myoblast fusion *in vitro* and *in vivo* by specifically interacting with BAI3. Searching for ligand(s) that have the potential to activate BAI3, we affinity purified Stabilin-2 and validated the existence of a BAI3/Stabilin-2 complex. Mixed populations cell fusion assays revealed that BAI3 and Stabilin-2 are required on the same cell to promote myoblast fusion. We found that Stabilin-2 promotes myoblast fusion by activating the canonical GPCR activity of BAI3 which contributes to recruit Elmo proteins to the membrane.

## RESULTS

**The family of C1qL1-4 proteins negatively regulates myoblasts fusion.** We recently identified BAI3 as a cell surface protein promoting cell fusion [149]. While the expression of Myomaker, Myomixer and Stabilin-2 is up-regulated at the time of fusion, BAI1 and BAI3 are already expressed in progenitor cells. Hence, we hypothesized that pro-fusion activity of BAI3 is controlled by negative and positive regulators. We first explored the only identified ligands of BAI3, C1qL1-4 [145], as candidates to modulate myoblast fusion. We first conducted gene expression analyses to establish if C1qL-4 members are expressed in C2C12, a well characterized *in vitro* model of mouse myoblast differentiation and cell-cell fusion. *C1qL4* mRNA expression was detected during myoblast proliferation, but its expression decreased rapidly upon switching the cells into differentiation conditions (24-84 hrs) (Figure 3.1a). In contrast, the mRNA transcripts of *C1qL1*, *C1qL2* and *C1qL3* were below the limit of detection of this assay (Figure 3.1a). These unexpected data suggest that C1qL4 is unlikely to be acting as a positive regulator of myoblast fusion.

To test if C1qL4 could be a negative regulator of myoblast fusion, we conducted a stable shRNA-mediated depletion of C1qL4 in C2C12 cells. When we quantified the fusion index i.e. number of nuclei per Myosin Heavy Chain (MyHC)-positive myotube of three nuclei and more, we found that depletion of C1qL4 significantly increased the efficiency of myoblast fusion after 48 hrs of differentiation (Figure 3.1b-c). The efficiency of *C1qL4* mRNA knockdown was confirmed by real-time quantitative PCR (Q-RT-PCR) (Figure 3.1d). This observation could be reproduced using an independent shRNA targeting *C1qL4* (Supplementary Figure 3.1a). Furthermore, we conducted the same experiment using another myoblast cell line, Sol8, which led to further confirmation that depletion of C1qL4 increases the efficiency of myoblast fusion (Supplementary Figure 3.1d-f). We also monitored the expression of MyoD, Myogenin, Troponin T and MHC during differentiation, and we could demonstrate that their levels are not affected by the knockdown of C1qL4, hence ruling out that depletion of C1qL4 facilitates the establishment of the differentiation program (Supplementary Figure 3.1g). We also found that the fusion index of control and C1qL4-depleted cells is identical 24 hrs after post-differentiation

and that the increase in fusion in response to C1qL4 depletion is observable only starting at 48 hrs (Supplementary Figure 3.1h-i). We next used a gain-of-function approach to confirm the inhibitory function of C1qL1-4 proteins on fusion. We first treated C2C12 with either 100 ng/ml of bacterially expressed and purified GST or recombinant C1qL4 and found that C1qL4 robustly blocked myoblast fusion (Figure 3.1e-f and Supplementary Figure 3.1j). We next overexpressed HA-alone or HA-tagged C1qL4 in C2C12 cells and found that the secreted exogenous HA-C1qL4 led to a block in fusion (Figure 3.1g-h). We next assessed if the other members of the C1qL-family can also negatively regulate fusion. To achieve this, we generated serum-free conditioned media (CM) of secreted HA-tagged C1qL1, C1qL2, C1qL3 or C1qL4 from transfected HEK293T cells. When the conditioned media were added to the differentiation media of C2C12 cells, we found that all four C1qL members prevented myoblast fusion (Supplementary Figure 3.1k-m). Collectively, these results demonstrate that C1qL1-4 proteins are negative regulators of the myoblast fusion process.



**Figure 3.1. C1q-Like proteins negatively regulate myoblasts fusion.**

a) Expression levels of *C1qL1-4* mRNAs during C2C12 myoblasts differentiation (0-84h) was measured by semi-quantitative RT-PCR.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. (b-d) C2C12 cells expressing an empty vector (GFP) or an shRNA targeting *C1qL4* were generated by retroviral infections. b) Downregulation of *C1qL4* increases myoblast fusion after 48h of differentiation. Dotted white boxes are shown at higher magnification in the right panels. c) To quantify myoblast fusion MHC positive cells with 3 nuclei or more were considered as multinucleated myofibers and the fusion index was calculated by dividing the numbers of nuclei in multinucleated fibers by the total number of nuclei for each described condition. Quantification of experiments shown in (b). d) Real-time Q-RT-PCR amplifications of *C1qL4* were performed to confirm the specific knockdown. e-h) Addition of recombinant C1qL4



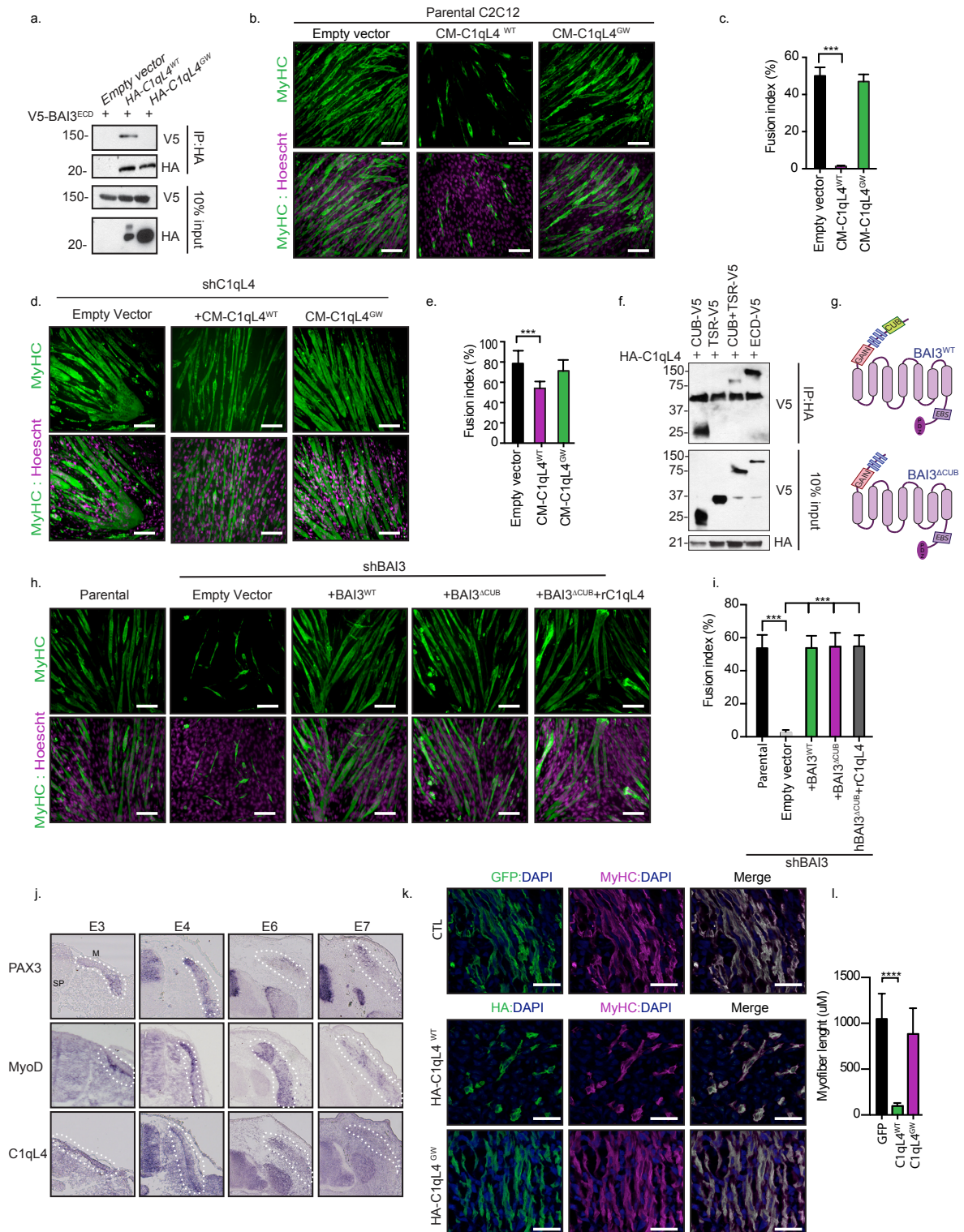
(rC1qL4), or plasmid-mediated expression of HA-C1qL4, blocks C2C12 myoblast fusion. e, g) Representative images of myoblast fusion from the indicated conditions. f, h) Quantification of experiments shown in (e, g). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100 $\mu$ m. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\*P<0.0001.

**C1qL4 signals via BAI3 to negatively control myoblast fusion.** The C1qL1-4 protein family remain poorly characterized and may have additional target receptor(s) in addition to BAI-family GPCRs. To determine if the inhibitory function of C1qL4 on myoblast fusion is specifically due to its interaction with BAI3, we generated a mutant of C1qL4 impaired for binding to BAI3. Exploiting the crystal structure of C1qL1, a BAI3-binding deficient mutant of C1qL1 was previously generated by introducing two N-glycosylation sites in its C1q domain which abolished C1qL1/BAI3 interactions [210]. Guided by the structure of C1qL1, we engineered two synonymous N-linked glycosylation sites at amino acid 172 and 203 in the C1q domain of C1qL4 and termed this variant the glycan wedge mutant (C1qL4<sup>GW</sup>). We biochemically confirmed the loss of interaction between C1qL4<sup>GW</sup> and BAI3 by co-immunoprecipitation assays (Figure 3.2a). To determine whether the BAI3-binding activity of C1qL4 is required to inhibit myoblast fusion, we added conditioned media containing either HA-C1qL4<sup>WT</sup> or HA-C1qL4<sup>GW</sup> to the differentiation media of C2C12 cells and conducted a differentiation assay. While HA-C1qL4<sup>WT</sup> blocked myoblast fusion, the HA-C1qL4<sup>GW</sup> mutant had no impact (Figure 3.2b-c). We next attempted to rescue the increase in fusion observed following shRNA-mediated depletion of endogenous C1qL4 by adding exogenous HA-C1qL4<sup>WT</sup> or HA-C1qL4<sup>GW</sup>. While addition of the CM-C1qL4<sup>WT</sup> restored a normal fusion rate (approximately 50%), the CM-C1qL4<sup>GW</sup> had no functional impact (Figure 3.2d-e). These results underline the importance of C1qL4 binding to BAI3 to inhibit myoblast fusion.

To further confirm that C1qL4 is functioning as a BAI3 ligand to inhibit fusion, we next designed a mutant of BAI3 deficient in C1qL4-binding. Although the exact mechanism whereby C1qL-family proteins interact with BAI3 remain unclear, one study has pointed a key role for the Thrombospondin Repeats (TSRs) for binding C1qL3 [145] while another one highlighted that the N-Terminal CUB domain is responsible for binding to C1qL1 [210]. To determine the mechanism of the C1qL4/BAI3 interaction, we generated soluble fragments of each domain of the BAI3 extracellular region and tested their ability to interact with HA-C1qL4 by a co-immunoprecipitation approach. These experiments revealed that the CUB domain of BAI3 is the minimal and essential region carrying C1qL4-binding activity and that the TSRs are unable to bind C1qL4 (Figure 3.2f). To directly assess if C1qL4 binding to BAI3 inhibits myoblast fusion, we generated a BAI3 mutant that is devoid of C1qL4-binding activity (Flag-BAI3<sup>ΔCUB</sup>)

(Figure 3.2g). Importantly, we found that the deletion of the CUB domain does not alter the ability of this mutant to reach the cell surface (Supplementary Figure 2a). Re-expression of Flag-BAI3<sup>ΔCUB</sup> in BAI3-depleted C2C12 cells revealed that the CUB domain is dispensable for myoblast fusion (Figure 2 h-i). While addition of recombinant C1qL4 inhibited myoblast fusion in cells expressing Flag-BAI3<sup>WT</sup> (Supplementary Figure 3.S2b-c), it failed to inhibit fusion in cells overexpressing Flag-BAI3<sup>ΔCUB</sup> (Figure 3.2 h-i). These results define the mechanism of interaction between C1qL4 and BAI3 and demonstrate that this coupling is essential to block the cell fusion activity of BAI3.

To determine the *in vivo* relevance of these findings, we turned to a gene expression approach in the developing muscle of the chicken embryo. We first determined if C1qL4 is expressed in the muscle of developing chicken embryos. We carried out *in-situ* hybridization assays with anti-sense digoxigenin-labeled riboprobes targeting *Pax3*, *MyoD* and *C1qL4* on sections of embryos. We found that during stage HH23 (embryonic day 4), *C1qL4* is co-expressed by muscle precursors that are positive for the myocyte differentiation markers *Pax3* and *MyoD* (Figure 3.2 j). The expression of C1qL4 decreased at embryonic day 6 and was absent at day 7 (Figure 3.2 j), which is reminiscent of what we observed during C2C12 differentiation. *C1qL4* is also expressed in the developing spinal cord, as previously reported [213]. We next forced the expression of either GFP alone, HA-C1qL4<sup>WT</sup> or HA-C1qL4<sup>GW</sup> in developing muscles via a somite electroporation approach [3, 149, 224]. While expression of GFP did not affect myoblast fusion *in vivo*, exogenous HA-C1qL4<sup>WT</sup> inhibited fusion and, strikingly, expression of HA-C1qL4<sup>GW</sup> had no effect (Figure 3.2k, l). Collectively, these data identify C1qL4, via specific binding to BAI3, as a spatiotemporal negative regulator of myoblast fusion in vertebrates.



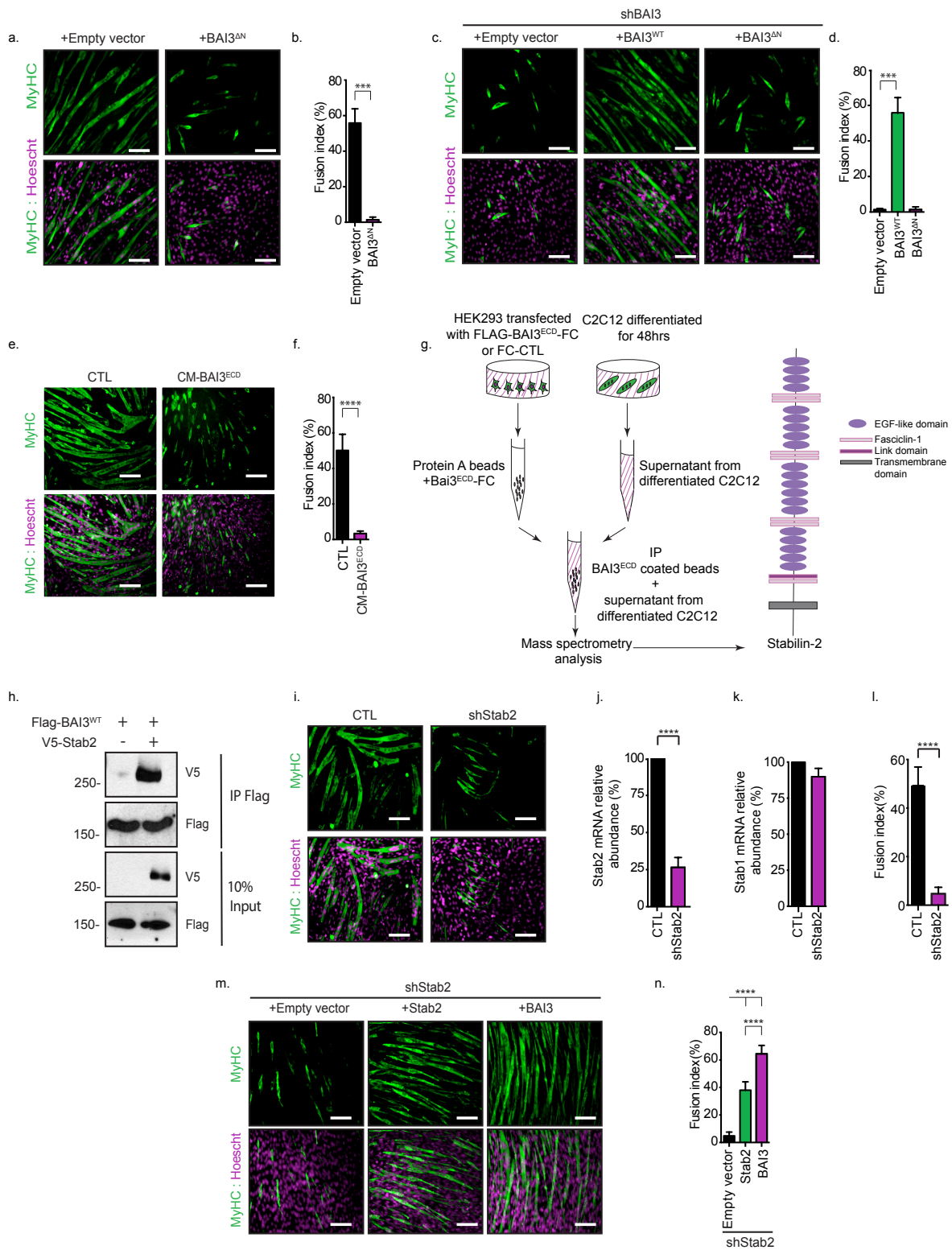
**Figure 3.2: C1qL4 acts as a BAI3 ligand to negatively control myoblast fusion.**

a) Generation of a C1qL4 mutant unable to bind BAI3. Anti-HA immunoprecipitations (IP) of HA-C1qL4<sup>WT</sup> or HA-C1qL4<sup>GW</sup> was carried out to assess the interaction with V5-BAI3<sup>ECD</sup>. The HA-C1qL4<sup>GW</sup> mutant is defective to interact with V5-BAI3<sup>ECD</sup>. b) Treatment of C2C12 cells with C1qL4<sup>WT</sup> conditioned media (CM) blocks myoblast fusion. C1qL4<sup>GW</sup> conditioned media had no effect on myoblast fusion. c) Quantification of experiments shown in (b). d) C2C12 cells expressing a shC1qL4 display normal myoblast fusion when treated with HA-C1qL4<sup>WT</sup> conditioned media. HA-C1qL4<sup>GW</sup> was unable to revert the increased fusion following C1qL4 depletion. e) Quantification of experiments shown in (d). f) The CUB domain of BAI3 is the minimal region necessary for interaction with C1qL4. IPs of HA-C1qL4 were carried out to assess which part of the BAI3 extracellular domains is responsible for the interaction with the ligand. g) Schematic representation of BAI3<sup>WT</sup> and mutant where the CUB domain was deleted. h) The CUB domain is dispensable for myoblast fusion. Expression of either BAI3<sup>WT</sup> or BAI3<sup>ΔCUB</sup> restores fusion in C2C12 cells depleted of endogenous BAI3 by shRNA. i) Quantification of experiments shown in (h). j) *In situ* hybridizations of anti-sense DIG-labeled riboprobes demonstrate that C1qL4 (bottom) is expressed in muscle cells that also express the myocyte differentiations PAX3 and MyoD (upper panels) in developing chicken embryos. C1qL4 is also expressed in the spinal cord. SC, spinal cord; M, muscle. k) Expression of HA-C1qL4<sup>WT</sup> in muscle progenitors blocks myoblast fusion *in ovo* in chick embryos. In contrast, C1qL4 deficient in BAI3-binding (HA-C1qL4<sup>GW</sup>) has no effect on myoblast fusion. l) Length of myofibers (μm) were quantified in the indicated conditions. Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100 μm. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\*P<0.0001.

**Stabilin-2 is a new BAI3-interacting transmembrane proteins.** Having established C1qL1-4 proteins as inhibitory ligands of BAI3 during myoblast fusion, we next searched for ligands that could be responsible for its activation. We first investigated whether the extracellular region of BAI3 was required for cell fusion. We found that a BAI3 mutant lacking the extracellular region, BAI3<sup>AN</sup>, blocks cell fusion when expressed in myoblasts (Figure 3.3a-b). In contrast to BAI3<sup>WT</sup>, BAI3<sup>AN</sup> was also unable to rescue fusion in C2C12 depleted of endogenous BAI3 (Figure 3.3 c-d). We concluded that the signal that promotes myoblast fusion requires the extracellular region of BAI3. We then reasoned that if the extracellular portion of BAI3 is binding a ligand essential for differentiation, adding a recombinant and soluble portion of the extracellular part of BAI3 should act as a decoy receptor and consequently inhibit fusion. We therefore differentiated C2C12 cells in the presence of conditioned media enriched with either Fc alone or the soluble extracellular region of BAI3 (BAI3<sup>ECD</sup>). Myoblast fusion was robustly impaired in the presence of BAI3<sup>ECD</sup> in comparison to the control condition (Figure 3.3e-f). To identify the functional region in the extracellular portion of BAI3 responsible for trapping the putative ligand, we conducted a similar experiment where the BAI3<sup>ECD</sup> was further fragmented into domains: CUB alone, TSRs alone and the CUB-TSRs chimera. We found that the addition of the TSRs domain alone was the minimal region of BAI3 sufficient to robustly impair myoblast fusion (Supplementary Figure 3. S3a-b). These experiments suggested that C2C12 express a critical BAI3-interacting protein that promotes myoblast fusion.

To identify such candidate BAI3-binding proteins, we purified a Fc-alone or a Fc-fusion of the BAI3<sup>ECD</sup> from transfected HEK293T cells and used them to affinity purify proteins from the conditioned media of differentiating C2C12 (pooled from t=0, 24 and 48 hrs), and bound proteins were then identified by mass spectrometry. Several components of the extracellular matrix, including Tenascin C, Biglycan, Periostin and Midkine, were identified in the Fc-BAI3<sup>ECD</sup> purification (Supplementary Figure 3c). Attractively, a candidate receptor protein, Stabilin-2 (Figure 3.3g), caught our attention as it was recently reported to be a regulator of myoblast fusion [237, 238]. The low number of peptides for Stabilin-2 following affinity purification of the BAI3<sup>ECD</sup> fragment likely reflect the purification of a poorly abundant shed extracellular fragment of this receptor. To independently confirm the interaction of Flag-BAI3<sup>ECD</sup> with Stabilin-2, C2C12 cells were transfected with V5-tagged Stabilin-2 and we

carried out a co-immunoprecipitation assay that demonstrated the binding of the two proteins (Supplementary Figure 3.S3d). Furthermore, we could also detect binding between the full-length Flag-BAI3 and V5-Stabilin-2 proteins (Figure 3.3h). To further dissect the interaction between Stabilin-2 and BAI3, we conducted a co-immunoprecipitation assay that revealed that Stabilin-2 is unable to bind BAI3<sup>ΔN</sup> probably because of the missing TSRs domain in this mutant (Supplementary Figure 3.S3e). We next depleted Stabilin-2 by shRNA in C2C12 cells and conducted differentiation assays that confirmed the previously reported function of Stabilin-2 as a promoter of myoblast fusion (Figure 3.3i-l). We found that the defect in myoblast fusion in cells where Stabilin-2 was depleted by shRNA could be rescued by expression of either V5-Stabilin-2 or Flag-BAI3 (Figure 3.3m-n). In summary, we demonstrated that, among new candidate BAI3-binding proteins, Stabilin-2 physically and functionally interacts with BAI3 during myoblast fusion.

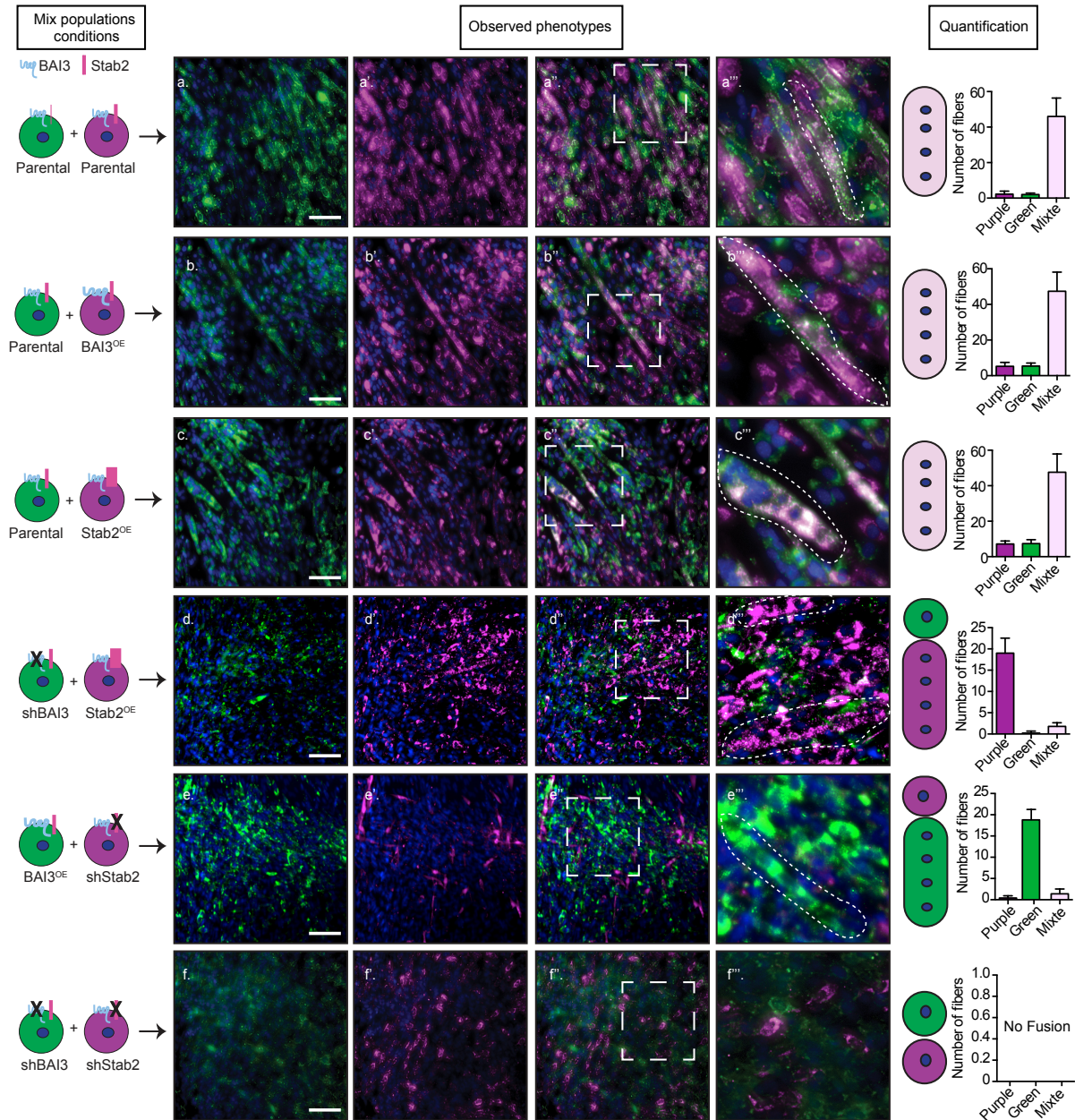




### **Figure 3.3. Stabilin-2 is a new binding partner of BAI3.**

A BAI3 mutant lacking the extracellular domain, BAI3<sup>ΔN</sup>, is defective to promote myoblast fusion. a) Expression of Flag-BAI3<sup>ΔN</sup> blocks myoblast fusion in parental C2C12 cells. b) Quantification of experiments shown in (a). c) Re-expression of Flag-BAI3<sup>ΔN</sup> is unable to restore myoblast fusion in C2C12 cells depleted of endogenous BAI3. d) Quantification of experiments shown in (c). e) The BAI3<sup>ECD</sup> acts as a decoy receptor. C2C12 treated with BAI3<sup>ECD</sup> conditioned media display a block in myoblast fusion. f) Quantification of the experiment shown in a). g) Affinity purification followed by mass spectrometry analyses uncover new potential BAI3-interacting partners, including Stabilin-2. h) IP of Flag-tagged Stabilin-2 was carried out to assess its interaction with full length BAI3. i-l) C2C12 cells expressing GFP or shRNAs targeting C1qL4 were generated by retroviral infections. i) Downregulation of Stabilin-2 decreases myoblast fusion after 48h differentiation condition. j, k) Real-time Q-RT-PCR amplifications of Stabilin-1 and Stabilin-2 were performed to confirm the specificity of the knockdowns. l) Quantification of experiments shown in (i). m) Fusion is restored in C2C12 cells depleted of Stabilin-2 (shStb2) following expression of either human V5-Stabilin-2 or Flag-BAI3. n) Quantification of experiments shown in (m). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100 μm. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\*P<0.0001.

**BAI3 and Stabilin-2 interact *in cis* to promote myoblast fusion.** We hypothesized that BAI3 and Stabilin-2 found at the cell surface of two fusing myoblasts may functionally interact either *in cis* (i.e. both receptors on the same cell) or *in trans* (i.e. one receptor on each cell). To address these possibilities, we developed a mixed myoblast population assay by co-incubating at a 1:1 ratio different populations of myoblasts, pre-stained with the general membrane dyes PKH26-GL (red; pseudo colored purple) or PHK67 (green), prior to conducting fusion assays. As a positive control for the assay, we found that when green and purple parental C2C12 myoblasts were mixed, myotubes formed efficiently and were double positive for green and purple (Figure 4a). Likewise, if we mixed parental myoblasts with either myoblasts overexpressing Flag-BAI3 or V5-Stabilin-2, the resulting myotubes were composed of the two cell populations (Figure 3.4b-c). In contrast, when green C2C12 depleted of BAI3 were mixed with purple C2C12 overexpressing V5-Stabilin-2, the myotubes that formed were mainly purple and the green C2C12 depleted of BAI3 remained mononucleated (Figure 3.4d). Likewise, when purple C2C12 depleted of Stabilin-2 were mixed with green C2C12 overexpressing Flag-BAI3, the myotubes that formed were mainly green and the purple C2C12 depleted of Stabilin-2 remained mononucleated (Figure 3.4e). Finally, we mixed C2C12 depleted of BAI3 with C2C12 depleted of Stabilin-2 and observed that all cells remained mononucleated (Figure 3.4f). Collectively, these results suggest that BAI3 and Stabilin-2 act *in cis* such that they are both required at the surface of the same myoblast for efficient fusion to occur.



**Figure 3.4. BAI3 and Stabilin-2 interact *in cis* in myoblasts to promote cell fusion.**

Stabilin-2 and BAI3 are required on the same myoblast to promote cell fusion. a) Parental C2C12 cells were stained with membrane dyes (see Methods) and mixed in a 1:1 ratio. 24 hrs after plating, cells were switched into differentiation conditions for 48 hrs. b) Parental C2C12 mixed with C2C12 overexpressing Flag-BAI3. c) Parental C2C12 (green) mixed with C2C12 overexpressing V5-Stab2 (purple). Cell fusion was intact and mixed fibers were observed after

differentiation. d) C2C12 expressing shRNA against BAI3 (green) are mixed with C2C12 overexpressing Stab2 (purple). Cells without BAI3 were unable to fuse and mix with other population after differentiation. e) C2C12 expressing shRNA against Stab2 (purple) were mixed with C2C12 overexpressing BAI3 (green). Mixed fibers were not observed and only cells expressing both receptors were able to fuse together after differentiation. f) Cells expressing shRNA against Stab2 and BAI3 were mixed and no fusion was observed following differentiation. The quantification of the phenotypes was analyzed from multiple images. Scale bar=100  $\mu$ m

**Auto-proteolysis of BAI3 is not required for its function as a promoter of myoblast fusion.**

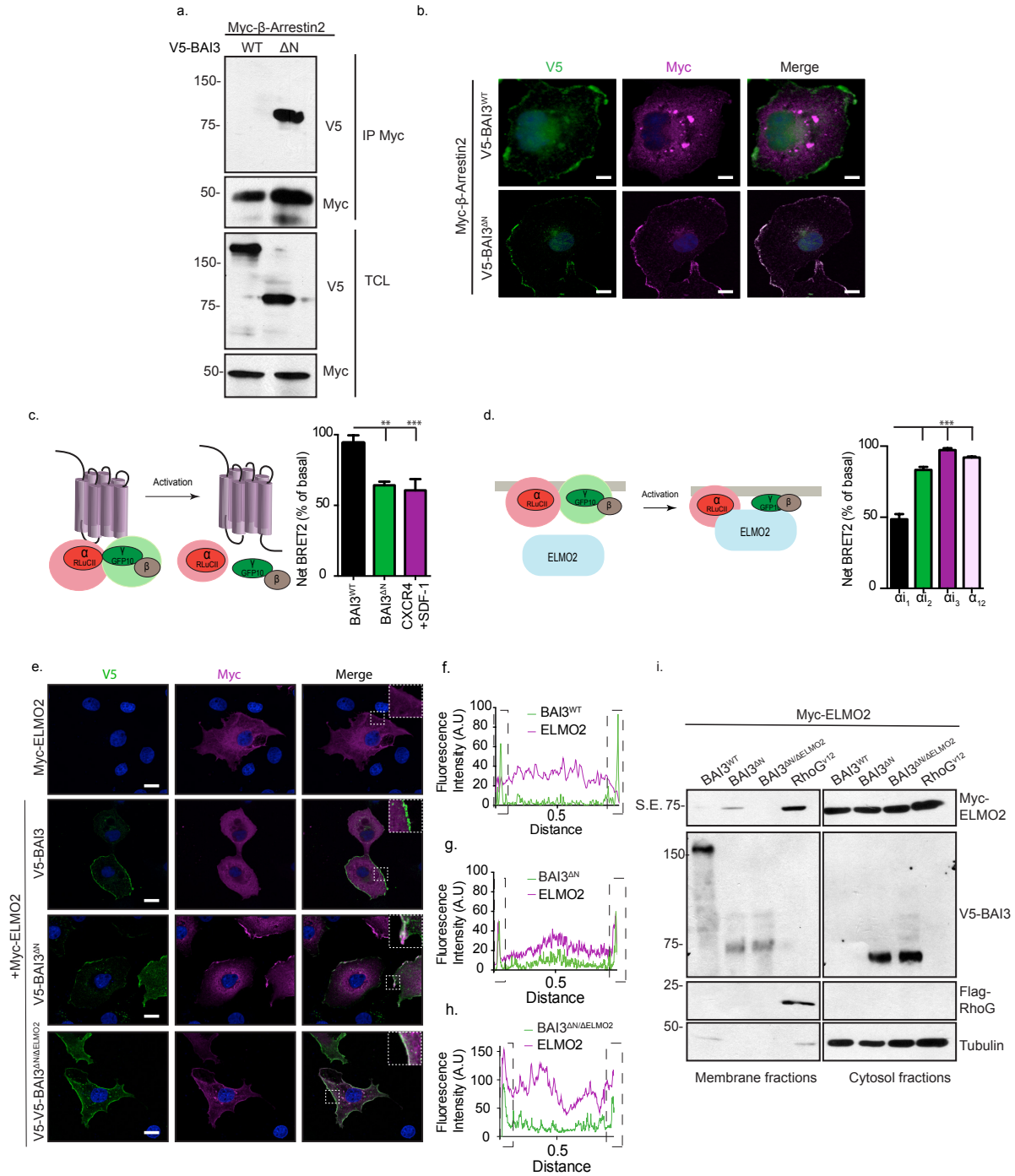
While a non-canonical interaction of BAI3 to Elmo is essential for myoblast fusion [149], whether intrinsic GPCR activity is present in BAI3 and is required in this biological context is unexplored. Most Adhesion GPCRs require cleavage to reveal their GPCR activity [192, 193], including BAI1 [203-205, 242]. To investigate if a pool of BAI3 must undergo GAIN-mediated auto-cleavage to promote myoblast fusion, we generated a mutant of the GAIN domain by replacing a conserved arginine for cleavage identified in other Adhesion-GPCR GAIN domains [192], namely arginine 836, by an alanine (BAI3<sup>R836A</sup>) (see schematic in Supplementary Figure 3.S4a). If BAI3 undergoes GAIN-mediated cleavage, this should generate a soluble fragment of approximately 120kDa. When Flag-tagged BAI3<sup>WT</sup> or BAI3<sup>R836A</sup> were overexpressed in HEK293T, we failed to detect a cleaved fragment either in the supernatants (enriched by Flag immunoprecipitation) or in the total cell lysates (Supplementary Figure 3.S4b). We next considered that auto-cleavage of BAI3 could require additional factors specifically expressed during myoblast differentiation. Therefore, we expressed Flag-BAI3 in C2C12 cells and analyzed if BAI3 was cleaved at t=0, t=24 or 48 hrs post-differentiation. These experiments demonstrated that the bulk of exogenous BAI3 remained a full-length protein during myoblast fusion (Supplementary Figure 3.S4c). We next hypothesized that BAI3 may need to complex with Stabilin-2 to adopt a productive conformation for auto-cleavage. We found that co-expression of V5-tagged Stabilin-2 with Flag-BAI3 did not induce any cleavage of BAI3 (Supplementary Figure 3.4d). To exclude that only a small pool of BAI3 may be cleaved and important for myoblast fusion, we conducted rescue assays with a panel of BAI3 GAIN mutants in BAI3-depleted C2C12 cells (BAI3<sup>R836A</sup>, BAI3<sup>L837A</sup>, BAI3<sup>S838A</sup>). We first confirmed that mutations in the GAIN domain of BAI3 did not impair its ability to localize at the cell surface of C2C12 cells (Supplementary Figure 3.S4e). Importantly, the aforementioned BAI3 GAIN-domain mutants rescued the myoblast fusion defect of BAI3-depleted C2C12 cells as efficiently as BAI3<sup>WT</sup> (Supplementary Figure 3.S4f-g). Collectively, these data strongly suggest that BAI3 cleavage is not required for the receptor to promote myoblast fusion and reveal a rare case of cleavage-independent signaling and biological activity for an Adhesion GPCR.

**BAI3 mediates the activation of heterotrimeric G-proteins to promote the recruitment of Elmo at the membrane.** While it remains unknown whether BAI3 functions as a canonical

GPCR by activating heterotrimeric G-proteins, a previous study has demonstrated that an engineered cleaved form of BAI1, i.e. mimicking GAIN cleavage, displays intrinsic GPCR activity [242]. A similar mutant of BAI3, termed V5-tagged BAI3<sup>ΔN</sup> (used in Figure 3.3a), was tested for its ability to couple to  $\beta$ -Arrestin2 as a surrogate for canonical GPCR signaling. These experiments revealed that BAI3<sup>ΔN</sup>, in contrast to BAI3<sup>WT</sup>, robustly co-precipitated with  $\beta$ -Arrestin (Figure 3.5a). Supporting these biochemical observations,  $\beta$ -Arrestin also strongly colocalized with BAI3<sup>ΔN</sup> but not with V5-BAI3<sup>WT</sup>, at the plasma membrane suggesting that the mutant receptor exists in an activated state (Figure 3.5b). We next directly investigated if BAI3 can mediate canonical GPCR activity, i.e. by activating heterotrimeric G-proteins, using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2 (BRET2) assay. While the basal BRET2 signal from RlucII-tagged  $G_{\alpha i1}$  and GFP10-tagged  $G_{\gamma 2}$  was unaffected by expression of BAI3<sup>WT</sup>, a decrease in the signal was observable upon expression of BAI3<sup>ΔN</sup> (Figure 3.5c), indicative of BAI3-mediated activations of  $G_{\alpha i1}$ . As a positive control, we found that stimulation of the canonical GPCR CXCR4 with its ligand CXCL12 also led to a decrease in the BRET2 signal in agreement with its ability to promote the dissociation of the heterotrimeric G-proteins complex into  $G_{\alpha i1}$  and  $G_{\beta\gamma}$  (Figure 3.5c) [243]. Notably, we failed to detect GPCR activity in BAI3<sup>ΔN</sup> when different RlucII- $G_{\alpha}$  subunits were tested in this BRET2 assay ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_q$ ; Supplementary figure 3.S5). Interestingly, even if BAI3<sup>ΔN</sup> activates G-proteins, it is unable to promote myoblast fusion (Figure 3.3a-d). This result is consistent with the observed requirement for the extracellular domain for Stabilin-2 binding and to promote cell fusion (Figure 3.3). Hence, the GPCR activity is not sufficient and that the N-terminus of BAI3 is also required to promote myoblast fusion. Collectively, these experiments revealed that BAI3 displays regulated canonical GPCR activity.

Elmo proteins have been reported as potential effectors of  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\beta\gamma}$  proteins [172, 244]. Hence, BAI3-mediated activation of  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\beta\gamma}$  could contribute to recruit Elmo proteins to the receptor to promote fusion. We therefore tested if Elmo2 can interact with  $G_{\alpha i}$  or  $G_{\beta\gamma}$  subunits in living cells. When we expressed Myc-Elmo2, we found that the basal BRET2 signal from RlucII-tagged  $G_{\alpha i1}$  and GFP10-tagged  $G_{\gamma 2}$  decreased (Figure 3.5d), which is in agreement with previous reports suggesting that Elmo2 may directly interact with G-proteins [171, 172].

However, Elmo2 did not affect the coupling of  $G_{\alpha i2}$ ,  $G_{\alpha i3}$  or, as a control,  $G_{\alpha 12}$  to GFP10- $G_{\gamma 2}$  (Figure 3.5d). These observations led us to directly explore if the canonical GPCR activity of BAI3 may facilitate the recruitment of Elmo2 to the membrane. We found that Myc-Elmo2 was distributed in the cytosol when expressed alone or co-expressed with BAI3<sup>WT</sup> (Figure 3.5e-f). However, BAI3<sup>ΔN</sup> promoted the recruitment of Elmo2 at the membrane (Figure 5e, g). To assess if the recruitment of Elmo2 at the membrane was driven by the activation of G-proteins, or alternatively directly by the C-terminal Elmo-binding region of BAI3, we generated a BAI3<sup>ΔN</sup> mutant lacking Elmo-binding activity (BAI3<sup>ΔN/ΔELMO</sup>). Surprisingly, we found that BAI3<sup>ΔN/ΔELMO</sup> was able to recruit Elmo2, albeit less efficiently than the wild receptor, to the membrane (Figure 3.5e, h). These experiments therefore revealed a contribution of the canonical GPCR activity of BAI3 to recruit Elmo at the membrane. We next carried out a biochemical cell fractionation assay, initially developed to assay the RhoG-mediated recruitment of Elmo at the membrane [132, 245], to further assess the mechanism leading to Elmo recruitment to the membrane. These experiments revealed that BAI3<sup>ΔN</sup>, similar to active RhoG, efficiently promoted the translocation of Myc-Elmo2 in the membrane biochemical fraction (Figure 3.5i). BAI3 possesses an Elmo-binding site at its C-terminus that may also participate to recruit Elmo proteins to the membrane. To test this, we used the BAI3<sup>ΔN/ΔELMO</sup>, i.e. lacking the Elmo-binding site, and found that it was incapable of promoting the translocation of Myc-Elmo2 to the membrane (Figure 3.5i). Together, these data demonstrate that activation of G-proteins by BAI3 promotes the initial recruitment of Elmo proteins at the membrane, as observed by immunofluorescence, and that a direct interaction of Elmo2 with the C-terminus of BAI3 is additionally required for their tight anchoring to the membrane.



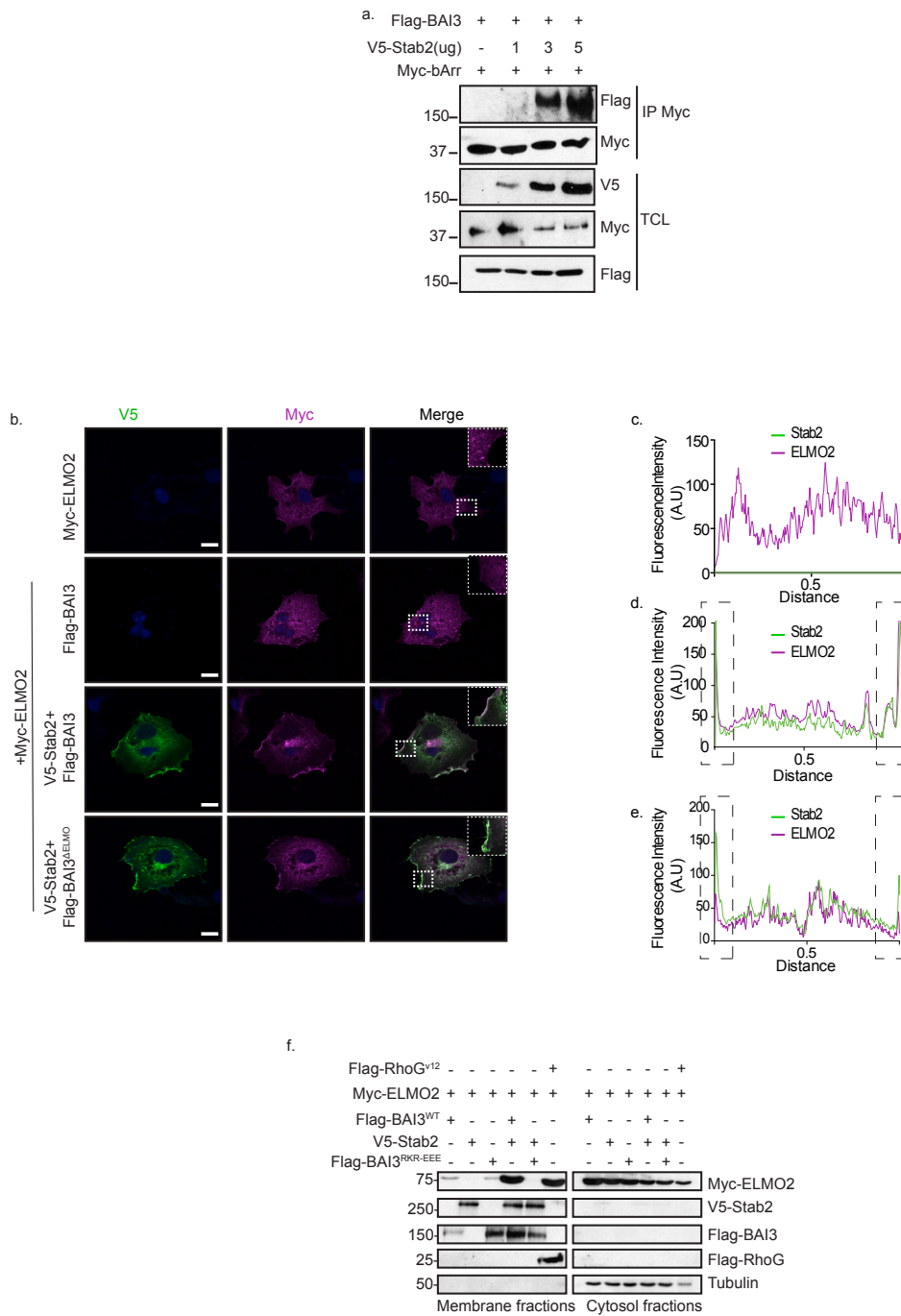
**Figure 3.5. Canonical and non-canonical signaling from BAI3 are required to promote the recruitment of ELMO at the membrane.**

a) A mutant of BAI3 lacking the extracellular domain, BAI3<sup>ΔN</sup>, robustly interacts with β-Arrestin2. IPs of Myc-β-Arrestin2 revealed an interaction with Flag-BAI3<sup>ΔN</sup> but not with



BAI3<sup>WT</sup>. b) Immunofluorescence experiments assessing the ability of BAI3<sup>WT</sup> or BAI3<sup>ΔN</sup> (green) to recruit Myc-β-Arrestin2 (purple) at the membrane. c) Effect of BAI3<sup>WT</sup> and BAI3<sup>ΔN</sup> on BRET2 signal between G proteins G<sub>αi1</sub>-RlucII and GFP10-G<sub>γ2</sub> in cells co-transfected with the untagged G<sub>β</sub>. d) Effect of ELMO2 on the BRET2 signal between G proteins G<sub>αi1</sub>-RlucII and GFP10-G<sub>γ2</sub> in cells cotransfected with the untagged G<sub>β</sub>. Net BRET2 signal is normalized to basal BRET2 signal. e-h). BAI3<sup>ΔN</sup> promotes the recruitment of ELMO2 at the membrane. e) Immunofluorescence assessing ELMO2 (purple) recruitment at the membrane in the presence of either Flag-tagged BAI3<sup>WT</sup>, BAI3<sup>ΔN</sup> or BAI3<sup>ΔN/ΔELMO2</sup> (green). f-h) Quantification of experiments shown in (e). i) Membrane fractionation experiments of HEK293 cells followed by Western blot analyses demonstrate the ability of BAI3<sup>ΔN</sup> to recruit ELMO2 at the membrane.

**Stabilin-2 promotes the GPCR activity of BAI3 and facilitates the recruitment of Elmo2 at the membrane.** Having established that an engineered truncated and GPCR competent form of BAI3 activates G-proteins to promote the recruitment of Elmo2 at the membrane, we next sought to determine if the formation of a heterodimer complex composed of Stabilin-2 and BAI3 could be a physiological signal that activates BAI3 signaling. We first monitored the interaction of  $\beta$ -Arrestin2 with full length BAI3, as a surrogate for activation of the receptor, upon expression of increasing amounts of Stabilin-2. These co-immunoprecipitation assays demonstrated that V5-tagged Stabilin-2 promotes the interaction of Myc- $\beta$ -Arrestin2 with wild-type Flag-BAI3 (Figure 3.6a). Next, we investigated if Stabilin-2-mediated activation of BAI3 GPCR activity is sufficient to recruit Elmo2 at the membrane, a key step for myoblast fusion [149]. We found that Myc-Elmo2 was distributed in the cytosol when expressed alone or co-expressed with BAI3<sup>WT</sup> (Figure 3.6b-c). However, expression of Stabilin-2 with BAI3 promoted a recruitment of Elmo2 at the membrane (Figure 3.6b, d). To assess if the recruitment of Elmo2 at the membrane was driven by the activation of G-proteins, or alternatively more directly by the C-terminal Elmo-binding region of BAI3, we expressed Stabilin-2 with the BAI3<sup>ΔELMO</sup> mutant. The Stabilin-2/BAI3<sup>ΔELMO</sup> complex was able to recruit Elmo2 at the membrane, albeit less efficiently than the wild receptor (Figure 3.6b, e). To further confirm these results, we carried out cell fractionation assays that revealed that Myc-Elmo2 was not significantly recruited to the membrane fraction when Flag-BAI3<sup>WT</sup>, Flag-BAI3<sup>ΔELMO</sup> or V5-Stabilin-2 were expressed alone (Figure 3.6f). However, co-expression of Stabilin-2 with BAI3<sup>WT</sup>, but not BAI3<sup>ΔELMO</sup>, led to a robust translocation of Elmo2 to the membrane (Figure 3.6f). Together, these data define that Stabilin-2 promotes the canonical GPCR activity BAI3 for recruitment of Elmo at the membrane followed by their tight anchoring to BAI3 via a direct interaction with the ELMO-binding site (EBS) of BAI3.



**Figure 3.6. Stabilin-2 promotes BAI3 GPCR activity and facilitates the recruitment of ELMO2 at the membrane.**

a) Stabilin-2 activates BAI3. Increasing amount of Stab2 leads to an increase in  $\beta$ -arrestin2 coupling to BAI3. b) Immunofluorescence experiments assessing ELMO2 (purple) recruitment

at the membrane in the presence of either Flag-tagged BAI3<sup>WT</sup>, Stab2 or BAI3<sup>ΔELMO2</sup> (green). c-e) Quantification of experiments shown in (b). f) Membrane fractionation experiments followed by Western blot analyses of HEK293 cells demonstrate that Stabilin-2 cooperates with BAI3 to promote the recruitment of ELMO2 at the membrane.

## DISCUSSION

We previously identified the cell surface protein BAI3 as a promoter of myoblast fusion via its signaling through the evolutionarily conserved Elmo/Dock complex that orchestrates the activity of Rac1 [130, 149]. BAI3, in contrast to other recently identified cell surface proteins that promote cell fusion (Myomaker, Myomixer and Stabilin-2), is not regulated at the transcription level which suggests that molecular mechanisms must be in place to tightly control its ability to induce cell fusion. Here, we identified the signals that spatiotemporally control the activity of BAI3 during myoblast fusion. We found that C1qL1-4 proteins negatively regulate cell-cell fusion by specifically engaging BAI3. The pattern of expression of *C1qL4* that we describe here in C2C12 myoblasts and in the developing muscle of chick embryos is consistent with this protein being expressed prior to the timing when myoblast fusion is fully deployed and that its expression is shut down at the time when fusion is taking place. Hence, these secreted proteins may provide checkpoints that allow myoblast fusion to occur at precise times in *in vivo* contexts such as embryonic development or muscle regeneration. Elegant genetic and functional studies have revealed that interplay between C1qL1/3 and BAI3 proteins is important in the formation and maintenance of excitatory neuronal synapses [210-212]. Whether these interactions are strictly involved in cell-cell adhesion or if they can also generate specific signaling downstream of BAI3 during fusion or synaptogenesis remains unexplored.

A key finding of our study is that Stabilin-2 was identified as a novel BAI3-interactor. Interestingly, we found that BAI3 is not auto-processed by its GAIN domain and that its extracellular domain is instead important to bind Stabilin-2. Stabilin-1 and Stabilin-2 have broad biological roles as scavenger receptors (e.g. for oxidized low-density lipoproteins [246]) and phosphatidylserine receptors (e.g. for the clearance of apoptotic cells [247-249]). Atypical transient exposure of phosphatidylserine at the surface of fusogenic cells (including myoblasts, trophoblasts and macrophages) is viewed as a pro-fusion signal [121, 122], and Stabilin-2 was found to be the missing receptor to transduce this signal [237, 238]. Our results suggest that Stabilin-2 transmits its pro-fusion signals in myoblasts via the Elmo-Dock pathway by heterodimerizing with BAI3. Similarly, Stabilin-2 promotes the engulfment of apoptotic cells

by heterodimerizing with Integrin  $\alpha\beta5$ , an integrin known to signal via Dock1 during engulfment [247, 250]. Stabilin-2 therefore appears to have evolved to co-opt the Elmo-Dock pathway by interactions with other transmembrane receptors that can directly bind to it.

Our study is the first to demonstrate that BAI3 displays canonical GPCR activity. A recent study revealed that an engineered truncation in BAI1, designed to mimic GAIN-mediated auto-cleavage, leads to activation of  $G\alpha12$  and downstream RhoA signaling [242]. We generated a similar mutant of BAI3 (BAI3<sup>ΔN</sup>) and used BRET2 biosensors to assay its ability to activate G-proteins. We found that BAI3 activates  $G\alpha i1$ , but not  $G\alpha i2$ ,  $G\alpha i3$  or  $G\alpha12$ . This difference in signaling between BAI1 and BAI3 may explain in part why BAI1 is unable to rescue the fusion defects observed in BAI3-depleted myoblasts [149]. We identified Stabilin-2, which is up-regulated at the time of fusion [237, 238], as the first physiological signal to activate a full-length BAI-family GPCR.

BAI-family GPCRs have an Elmo-binding site at their C-terminus that can readily bind to Elmo proteins *in vitro* [144, 149]. Our assumption was that Elmo proteins would robustly co-localize with BAI3, but instead, we consistently observed a lack of co-localization between Elmo and BAI3 when the proteins were expressed in cells. These observations strongly suggest that the Elmo-binding site on BAI3 is “masked” at the basal state. Indeed, we found that artificial (expression of BAI3<sup>ΔN</sup>) or physiological (co-expression with Stabilin-2) activation of BAI3 leads to Elmo translocation to the membrane and co-localization with BAI3 proteins. Our results revealed that the recruitment of Elmo proteins to BAI3 occurs in a two-step manner. First, the BAI3-mediated activation of G-proteins provide a signal sufficient to recruit a pool of Elmo at the membrane. We reached this conclusion by using mutants of BAI3 lacking Elmo-binding activity but capable of activating G-proteins. Mechanistically, we found that expression of Myc-Elmo2 can modulate the BRET2 signal of the  $G\alpha i1$ -LucII/ $G\beta$ / $G\gamma$ -GFP10 complex in cells. Furthermore, these data agree with previous reports that identified interactions between Elmo and  $G\alpha i1$  and  $G\beta\gamma$  in cancer cells [171, 172]. Second, biochemical cell fractionation and co-localization assays revealed that the Elmo-binding site of BAI3 is also required to bind Elmo and anchor it at the receptor in a stringent membrane fractionation assay. Functionally, this is in

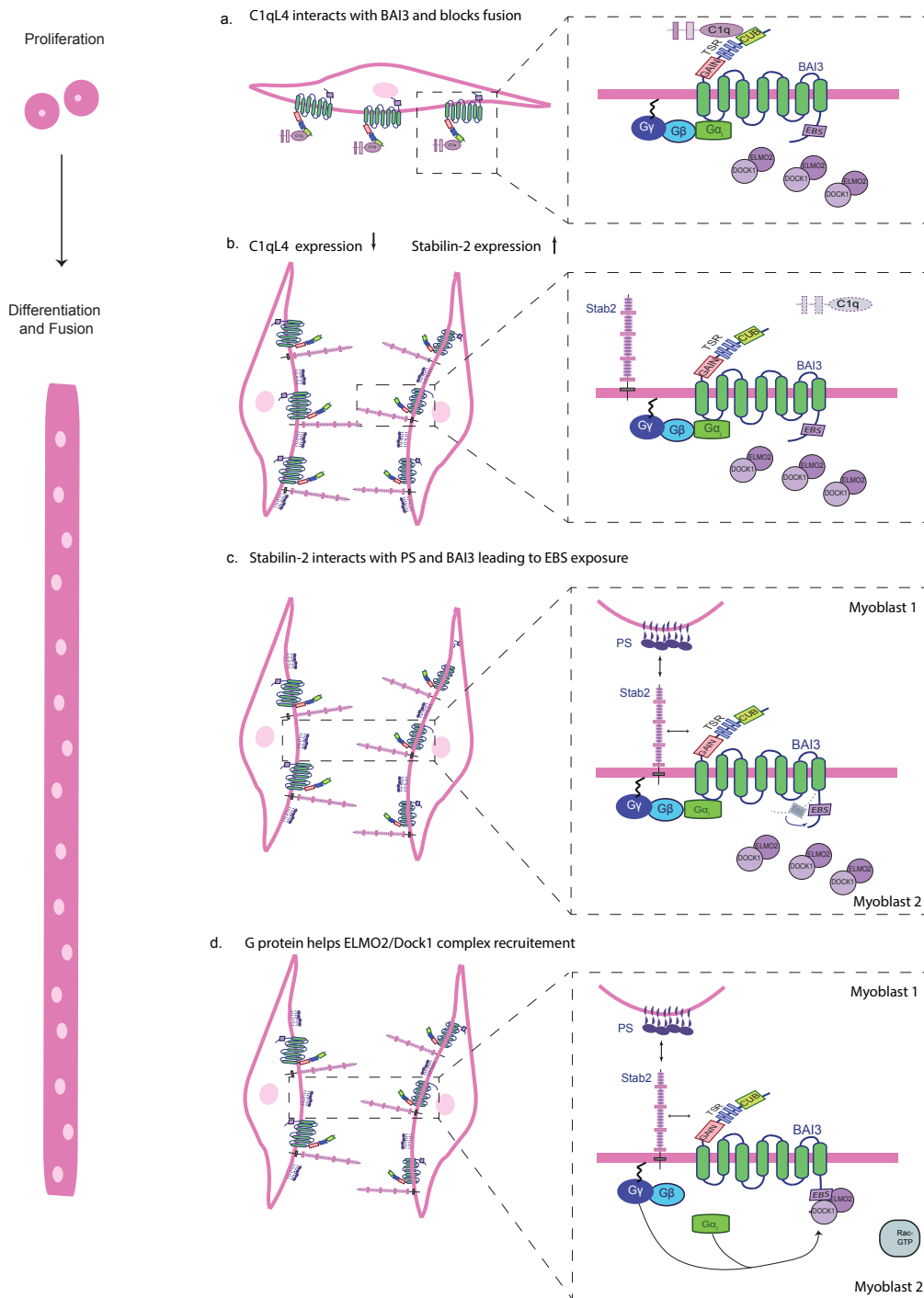
line with the observations that direct Elmo-binding to BAI1 or BAI3 is essential for myoblast fusion [149, 150].

Myoblast fusion in *Drosophila* is driven by two distinct cell populations: the fusion competent and the founder myoblasts [2]. The existence of such populations has however not yet been established in vertebrates. In this respect, we wanted to understand the interaction mechanism between Stabilin-2 and BAI3 on the fusing myoblasts. We hypothesized two scenarios: 1- both receptors could be required on the same myoblast (*in cis*) or 2-each receptor could be asymmetrically distributed on each fusing cell (*in trans*). Our results revealed that the Stabilin-2/BAI3 complex functions *in cis* to promote fusion and that both fusing myoblasts require both receptors on their surface. These observations are therefore in line with the current view of one population of myoblasts fusing together in vertebrates.

In Figure 3.7, we propose a model where: a) proliferating and early differentiating myoblasts express C1qL4 to maintain BAI3 inactive; b) expression of *C1qL4* is turned off while *Stabilin-2* expression is upregulated during differentiation as depicted in Figure 3.1-2; c) Stabilin-2, bound to phosphatidylserine exposed on the target myoblast [237, 238] enters into a heterodimeric complex with BAI3 that promote its GPCR activity and G-protein-mediated recruitment of Elmo; d) the Elmo-binding site of BAI3 becomes exposed to tightly binds Elmo proteins for Elmo/Dock-mediated activation of Rac1. Both in *Drosophila* and vertebrate contexts, the function of Rac1 activated by Elmo/Dock during cell-cell fusion remains unclear, but presumably involves reorganization of the actin cytoskeleton. The Stabilin-2/BAI3/Elmo/Dock/Rac1 pathway functions together with additional cell surface and transmembrane proteins. Cell-cell adhesion molecules, including Cdo/Boc and Cadherins, are suggested to bring the membrane of the two fusing myoblasts in proximity [97, 100, 104, 107, 251, 252]. Remodeling of the cytoskeleton by the Stabilin-2/BAI3/Elmo/Dock/Rac1 pathway could be involved to drive protrusions to further increase the proximity of the myoblast membranes, similar to what is observed in *Drosophila* [48]. Finally, the fusogenic proteins Myomaker and Myomixer cooperate to generate fusion pores and allow the two different myoblast membranes to fuse [140-142]. It remains to be explored if these cell surface and transmembrane proteins are functioning in parallel pathways or if additional connections

between them further integrate the myoblast fusion process. Finally, overexpression of BAI3 or Myomaker can increase myoblast fusion such that large fibers can be obtain in culture models [138, 235]. While attractive, it still remains to be demonstrated if improving the efficiency of cell fusion could improve muscle regeneration or repair in myopathies. Because GPCRs are well established pharmacological targets [153], the search for small molecules capable of activating BAI3 could reveal approaches to improve myoblast fusion *in vivo*.





**Figure 3.7: Working model**

a) In muscle progenitors, BAI3 activity is inhibited by the interaction of the small secreted protein C1qL4 with the CUB domain in the extracellular region of BAI3. b) When

differentiation is triggered, the expression of C1qL4 is decreased while the expression of Stabilin-2 increases. c) Stabilin-2 is reported to interact with PS expressed by partner myoblast [238] The interaction between BAI3 and Stabilin-2 leads to the exposure of the ELMO Binding site and the activation of the canonical signaling of G protein. d) These events recruit ELMO2 at the membrane where it will interact with the EBS of BAI3 to promote Dock1/Rac1-mediated cytoskeleton rearrangements for myoblast fusion.

## METHODS

### Antibodies

Mouse monoclonal anti-Myc (9E10) and anti-HA were obtained from Santa Cruz Biotechnologies. Mouse monoclonal anti-MyoD was from Pharmingen. Mouse monoclonal antibodies anti-Flag (M2), anti-Troponin-T, anti-Desmin, anti-V5 and anti-Tubulin were from Sigma-Aldrich. Sheep polyclonal anti-GFP antibodies were from AbD SeroTec. Monoclonal antibodies anti-Myogenin and anti-Myosin Heavy Chain (MF20) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, IA).

### Plasmids

All plasmids, and their derivatives, are listed in Supplemental Table 1. Briefly, pSIREN-RetroQ-ZsGreen retroviral vector was obtained from Clontech. Full length human Flag-BAI3-mVenus in the pCAGG plasmid was previously reported and is a kind gift of Dr. T.C. Südhof (Stanford University) [145]. pCAGGS-Flag-BAI3-mVenus mutants (R836A, L837A and S838G) were generated by site-directed mutagenesis (Clontech). The introduction of the N-linked glycosylation sites in the gC1q domain of C1qL4 (Q191N, N192S, Y193T, T224N, K226S) was done by mutagenesis to generate the pDisplay-HA-C1qL4<sup>GW</sup>. To generate a Glutathione *S*-transferase (GST)-fusion protein of C1qL4, the corresponding coding sequences was amplified by PCR from pDisplay-HA-C1qL4 (kind gift of Dr. T. Südhof (Stanford University)) and cloned into BamHI/XhoI sites of the pGEX4T1 plasmid (GE Healthcare Life Sciences). The pcDNA5-V5-Stabilin-2 plasmid was a kind gift from Dr. Harris [246] and pcDNA3-HA-C1qL1, 2 and 3 plasmids were a kind gift from Dr. Wong were previously described [240]. All additional mutants in the pCAGGS and pIRES vectors (see **Supplemental table 1** for plasmids list) were generated with the HiFi assembly kit according to manufacturer's protocol (NEB). Insert were generated by PCR (see **Supplemental table 2** for nucleotide sequence) and mixed with the vector at a ratio of 1:2. The reaction was incubated in a thermocycler at 50°C for 15 minutes. Subsequently, the samples were transformed and clones were screened and validated by sequencing.

### **Small hairpin RNAs (shRNAs) for stable downregulation of gene expression in C2C12 cells**

shRNA plasmids were constructed using the pSIREN-RetroQ-ZsGreen retroviral vector (Clontech) as previously described [149]. Several shRNA DNA oligonucleotides were designed to specifically knockdown BAI3, C1qL4 and Stabilin-2, according to the protocol accompanying the pSIREN-RetroQ retroviral vectors (see **Supplemental Table 2** for nucleotide sequences). Primers were annealed and cloned into the BamHI/EcoRI digested pSIREN-RetroQ-ZsGFP vector. Ecotropic Phoenix retrovirus packaging cells were transfected with purified pSIREN-RetroQ-ZsGreen constructs described above. The supernatants were collected 48 hours post-transfection, filtered and mixed with polybrene (Sigma) at a 5µg/ml final concentration. C2C12 plated at low confluence were infected twice ever 24 hrs with the viral supernatants supplemented with FBS (20% final). At t=48hrs, myoblasts expressing ZsGreen were sorted using a MOFLO cell sorter (Beckman Coulter). Gene knockdown efficiency was assessed by real-time Q-RT-PCR (see **Supplemental Table 2** for primers used).

### **Cell culture and transfections**

C2C12 (ATCC) and Sol8 (kind gift of Dr. J. Drouin, IRCM) mouse myoblasts were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 20% FBS (vol/vol) and a mixture of penicillin and streptomycin (Gibco). C2C12 were typically transfected in 6 well plates (50% confluency; 4 µg of plasmid DNA) using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). COS7, HEK293T cells and the retroviral packaging cell line ecoPhoenix were grown in DMEM (supplemented with 10% FBS and penicillin and streptomycin) and transfected in 10 cm tissue culture plates (50% confluence; 10 µg of plasmid DNA) using a standard calcium phosphate precipitation protocol.

### **Conditioned media production**

Flag-BAI3<sup>ECD</sup>, V5-BAI3<sup>CUB</sup>, V5-BAI3<sup>TSR</sup>, V5-BAI3<sup>CUB+TSR</sup>, V5-BAI3<sup>ECD</sup> or HA-C1qL4 were transfected and expressed in HEK293T cells grown to confluence in a serum-free media (DMEM with penicillin and streptomycin). 48 hours after transfection, supernatants were harvested and centrifuged 5 min at 1000x RPM. The pellets were discarded and 10% of the conditioned media (containing the secreted protein fragments) were diluted in serum-free media and then supplemented with 2% horse serum and used in C2C12 differentiation assays.

### **mRNA isolation, semi-quantitative PCR and real-time quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR)**

Total RNA was extracted from the indicated Sol8, C2C12 and C2C12-shRNA lines as previously described [149]. Briefly, TRIZOL reagent (Invitrogen) was used according to the manufacturer protocol. Total RNAs were treated with DNase1 (Invitrogen) and cDNAs were generated using the M-MuLV Reverse Transcriptase and random primers (NEB), as recommended by the manufacturer. Specific knockdown of the genes of interest was confirmed by real-time Q-PCR in an Mx3005P (Stratagene) system using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reaction specificity was assessed by melt curve analyses for each primer set. The TATA box gene was used as an internal control. All real-time Q-PCR reactions were carried out as follow: 5 min at 45°C, 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Primers used in Q-PCR analyses are described in **Supplemental Table 2**. C1qL family semi-quantitative PCR was performed using primers listed in the Supplemental table 2. The PCR cycles were carried as follow: 30 sec at 95 °C, followed by 30 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 57°C, final extension at 68°C for 5 min.

### **Western blot and protein-protein interaction assays**

The C1qL4 GST-fusion protein was expressed in BL21 bacteria and purified with glutathione-sepharose 4B following manufacturer recommendations (Amersham, Piscataway, NJ). The GST moiety was removed by thrombin digestion using the manufacturer digestion buffer at 4°C for an overnight reaction (VWR). Finally, the biotinylated thrombin was removed using streptavidin beads for 30 minutes at 4°C. Purified rC1qL4 was analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie staining to assure protein integrity or degradation. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with the indicated antibodies. For analysis of total cell extracts, proteins were extracted in Radio Immuno-Precipitation Assay (RIPA) buffer (50mM Tris pH7.5, 0,1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% Nonidet P-40 buffer, 150 mM NaCl, 5mM EDTA). Membrane fractionation experiments were conducted using HEK293 cells transfected with the appropriate vectors (Flag-BAI3<sup>WT</sup>, Flag- BAI3<sup>ΔN</sup>, Flag- BAI3<sup>ΔN/ΔELMO</sup>, V5-Stab2 and Myc-ELMO2). 48 hours post-transfection, cells were harvested in PBS and centrifuged at 2000 RPM for 5 min. Cells pellets were suspended in Buffer A (10mM HEPES, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5 DTT and 0.05% NP-40) and a protease inhibitor cocktail. The cells were then subjected

to freeze and thaw to lyse the cells. The lysates were centrifuged and the supernatant was the cytosolic fraction. The pellets corresponding to the membrane fractions were further washed in Buffer A before extraction of the membrane enriched proteins with 1% Triton. The cytosolic and membrane fractions were analyzed by Western blot.

### **Chick embryos and *in ovo* electroporation**

Experiments were carried out as previously described [149]. Briefly, fertilized chick eggs were incubated at 38.5°C under 95% humidity for developmental staging according to standard protocols [225]. Chick somite electroporation was performed at stage E2.5 (between HH stage 13-18). DNA plasmids (pEGFP-N2, pCAGG-HA-C1qL4<sup>WT</sup> and pCAGG- HA-C1qL4<sup>N-Glyc</sup>) were suspended in TE buffer pH 7.5 (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA) at 5 µg/µl and microinjected into the somitocoel of interlimb somites (I to IV according to [224]). Chick embryos were then electroporated with platinum/iridium electrodes and 200 µL of a penicillin-streptomycin solution was added at the microinjection site. Shell windows were sealed and eggs were incubated for 72 hrs at 38.5°C. Embryos were then collected and those expressing GFP were selected for further analyses.

### **In situ hybridization**

Chick embryos were fixed in a 4% solution of paraformaldehyde (Sigma) in PBS, equilibrated with 30% sucrose in PBS, embedded in O.C.T. (Sakura Finetek), and stored at -80°C. Twelve micrometer sections were collected using a Leica cryostat microtome. *In situ* mRNA hybridization and detection were performed as described [253].

### **Immunofluorescence and immunohistochemistry**

C2C12 and Sol8 myoblasts were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with a PBS/0.2% Triton X-100 solution for 10 min prior to incubation in blocking buffer (PBS/1% BSA) for 1h. Cells were next incubated with the primary antibody recognizing MHC (MF20, dilution 1:20 (Developmental Hybridoma)) diluted in blocking buffer. Cells were washed with PBS and incubated with an Alexa 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibody (dilution 1:2500; Invitrogen) for 1 hour. Hoechst (dilution 1:10000; Invitrogen) was used to reveal nuclei. GFP/mVenus positive chick embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 1h at room

temperature and washed three times with PBS. They were then incubated overnight in 30% sucrose solution at 4°C and embedded in OCT prior to cryosectioning. 8 µm sections were stained as described above for cells with the following modifications: sections were washed in PBS/0.1% Triton X-100 and the Alexa 568 conjugated goat anti-mouse secondary antibody was used at a 1:2500 dilution. Pictures were taken with the Axiovert microscope (Zeiss) at an objective of 20x and with a confocal microscope LSM700 (Zeiss) at an objective of 100X. In both cases, the images were analyzed using the Volocity software, as described above.

### **Bioluminescence Resonance Energy Transfer 2 (BRET2)**

To conduct the BRET experiments, cells were transfected with either BAI3<sup>WT</sup>, BAI3<sup>ΔN</sup> or CXCR4 (used as a positive control). To generate BRET signal, RLucII (energy acceptor) and GFP<sub>10</sub> (energy donor) were fused to G proteins alpha and beta, respectively. 48 hours after transfection, cells were washed and the RLucII substrate Coelentrazine 400a solution (Biotum) was added and to generate light with a maximal light peak at 400nm. BRET signal was measured with a BRET<sub>2480-YFP</sub> filter of the Mithras LB940 multimode Microplate reader (Berthold Technologies). BRET2 ratio is calculated as the light emitted by the acceptor over the light emitted by the donor. To calculate the net BRET2 signal, the background signal was subtracted from the RLucII alone transfection condition.

### **Mixed population myoblast assay**

C2C12 expressing the indicated shRNA or protein were stained with lipophilic cell tracking dyes PHK26 (red, pseudo-colored purple) or PHK67 (green) (Sigma-Aldrich). Staining was conducted according to the manufacturer's protocol. Cells were mixed at a ratio 1:1 and plated in 6-well plates. Differentiation was induced the next day for 48 hours. Images were acquired with an Axiovert microscope (Zeiss) at an objective of 20x and with a confocal microscope LSM700 (Zeiss) at an objective of 100X. In both cases, the images were analyzed using the Volocity software.

### **Statistical analyses**

Data is expressed as mean  $\pm$  Standard deviation from at least 3 independent experiments. Statistical comparisons between samples were done with one-way ANOVA test followed by a Bonferroni test using the Prism Graph software. P value  $<0.05$  was considered as significant.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. D.R. Hipfner for critical reading of the manuscript. We recognize the technical support of M. Liang. We acknowledge Dr Ed. Harris (University of Nebraska) and Dr W. Wong (John Hopkins University) for generous gifts of plasmids. We acknowledge Dr T.C. Südhof (Stanford University) for support and sharing reagents. This work was funded by CIHR grants to J.F.C. (PJT-153065), M.B. (FDN-148431) and A.K. (MOP-77556 and MOP-97758). N.H. is a recipient of a Ph. D. studentship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). M.B. holds a Canada Research Chairs in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. J.F.C. is a recipient of a Senior Investigator Award from the FRQ-S and holds the TRANSAT chair in Breast Cancer Research.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

J-F.C. designed the research; N.H., A.P. performed the research; N.H., M.B., A.K. and J-F.C. analyzed the data; J-F.C. wrote the paper with input from all authors.

## **ADDITIONAL INFORMATION**

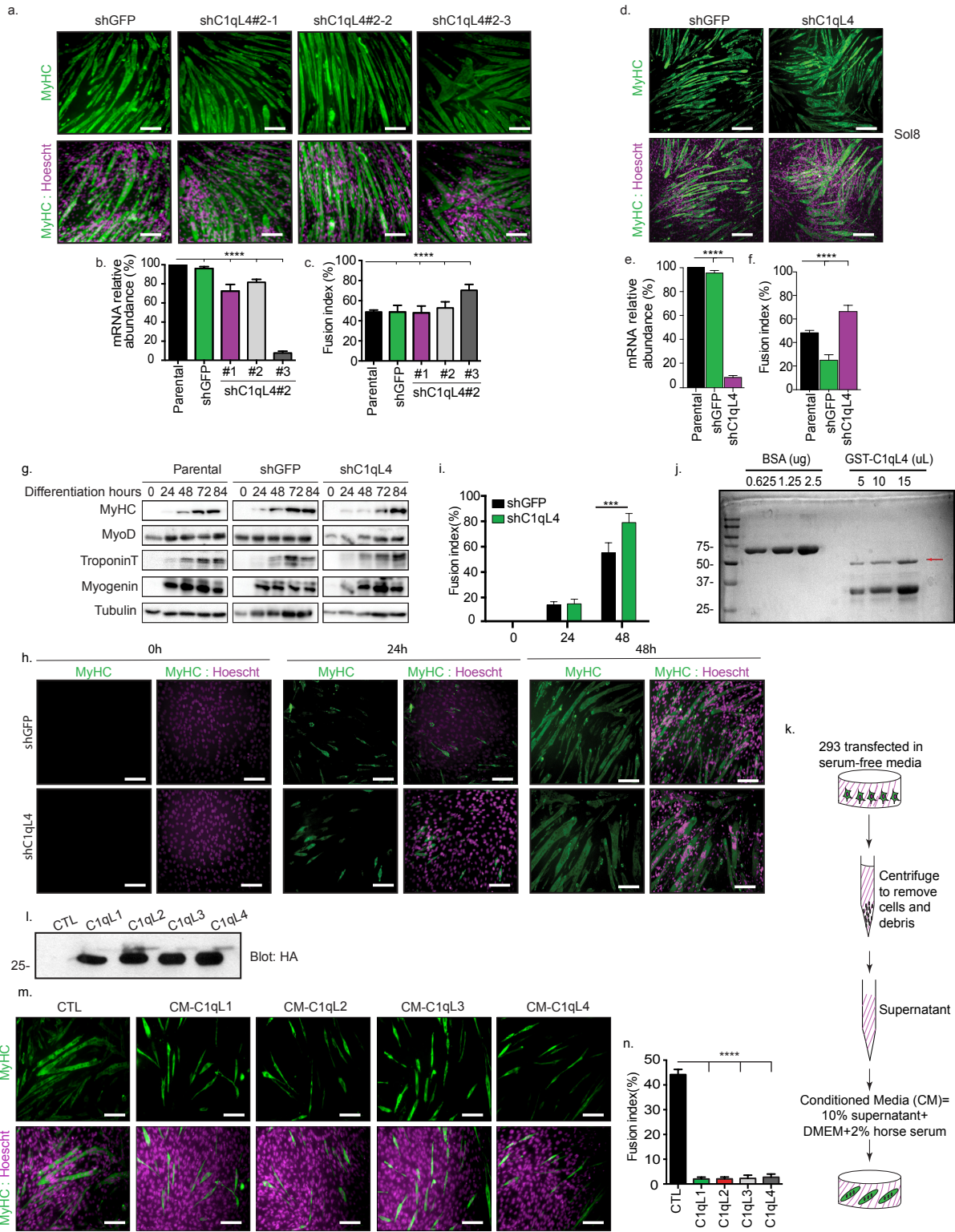
**Supplementary information** accompanies this paper.

## **Supplementary material to:**

### **Spatiotemporal regulation of G-Protein Coupled Receptor BAI3 canonical and non-canonical signaling by C1q-Like proteins and Stabilin-2 controls myoblast fusion**

Noumeira Hamoud, Ariane Pelletier, Artur Kania, Michel Bouvier and Jean-François Côté

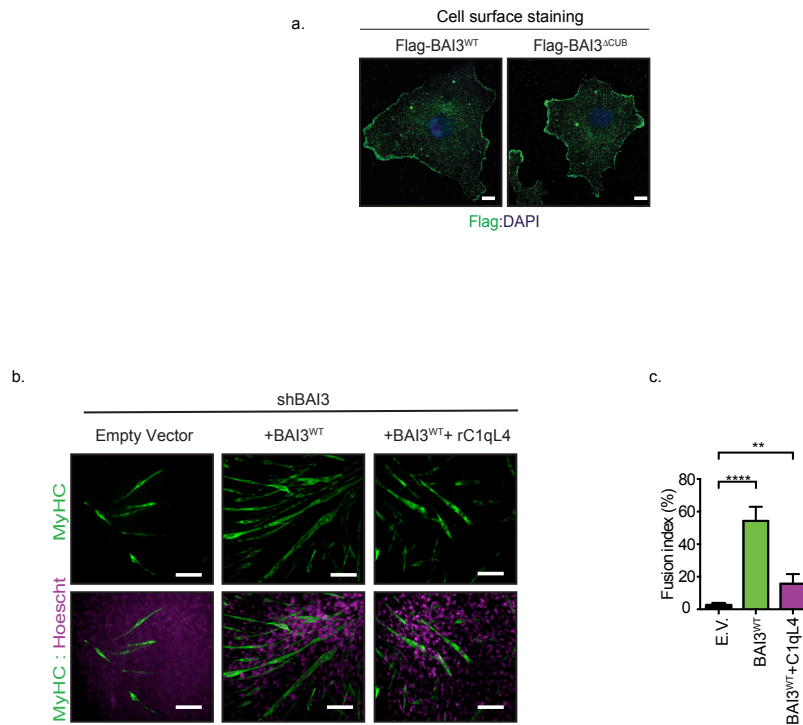
- **Supplementary figure legends**
- **Supplementary figures**
- **Supplementary tables**



Supplementary figure 1

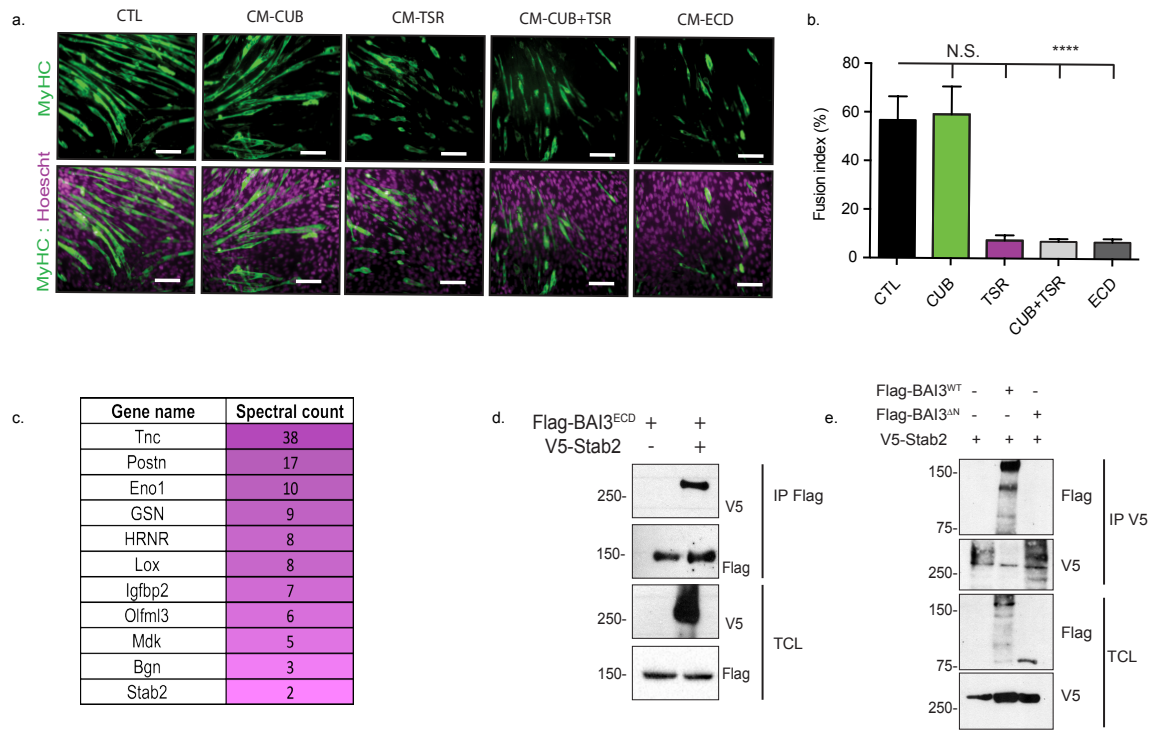
**Figure 3-S1. C1qL4 family proteins inhibit myoblast fusion.**

a-f) C2C12 or Sol8 expressing an empty vector (GFP) or an shRNA targeting C1qL4 were generated by retroviral infections. a, d) Downregulation of *C1qL4* increases myoblast fusion after 48 hours of differentiation in both cell types. b, e) Real-time Q-RT-PCR amplifications were performed to confirm the specific knockdown of *C1qL4*. c, f) Quantifications of experiments shown in (a, d). g) *C1qL4* knockdown has no effect on myoblast differentiation. Differentiation markers of cells depleted from *C1qL4* were expressed at the same time point as in the parental cell line C2C12 expressing GFP from 24-84 hours of differentiation. h) C1qL4 does not induce premature fusion. Same rate of differentiation was observed between control cells and ShC1qL4 cells. Increased fusion was observed at 48 hours of differentiation but not at  $t=0$  or  $t=24$ . i) Quantification of experiment shown in (h). j) Recombinant C1qL4 purified from bacteria. SDS-PAGE gel analysis followed by Coomassie staining to assess protein integrity. k-m) C1qL-family members are able to inhibit myoblast fusion. k) Schematic representation of conditioned media experimental procedure. l) C1qL-family members expression in conditioned media: C1qL1, C1qL2, C1qL3 and Cq1L4. m) Parental C2C12 treated with conditioned media show that C1qL1-4 inhibit fusion. n) Quantification of experiments shown in (m). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100um. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\* $P < 0.0001$ .



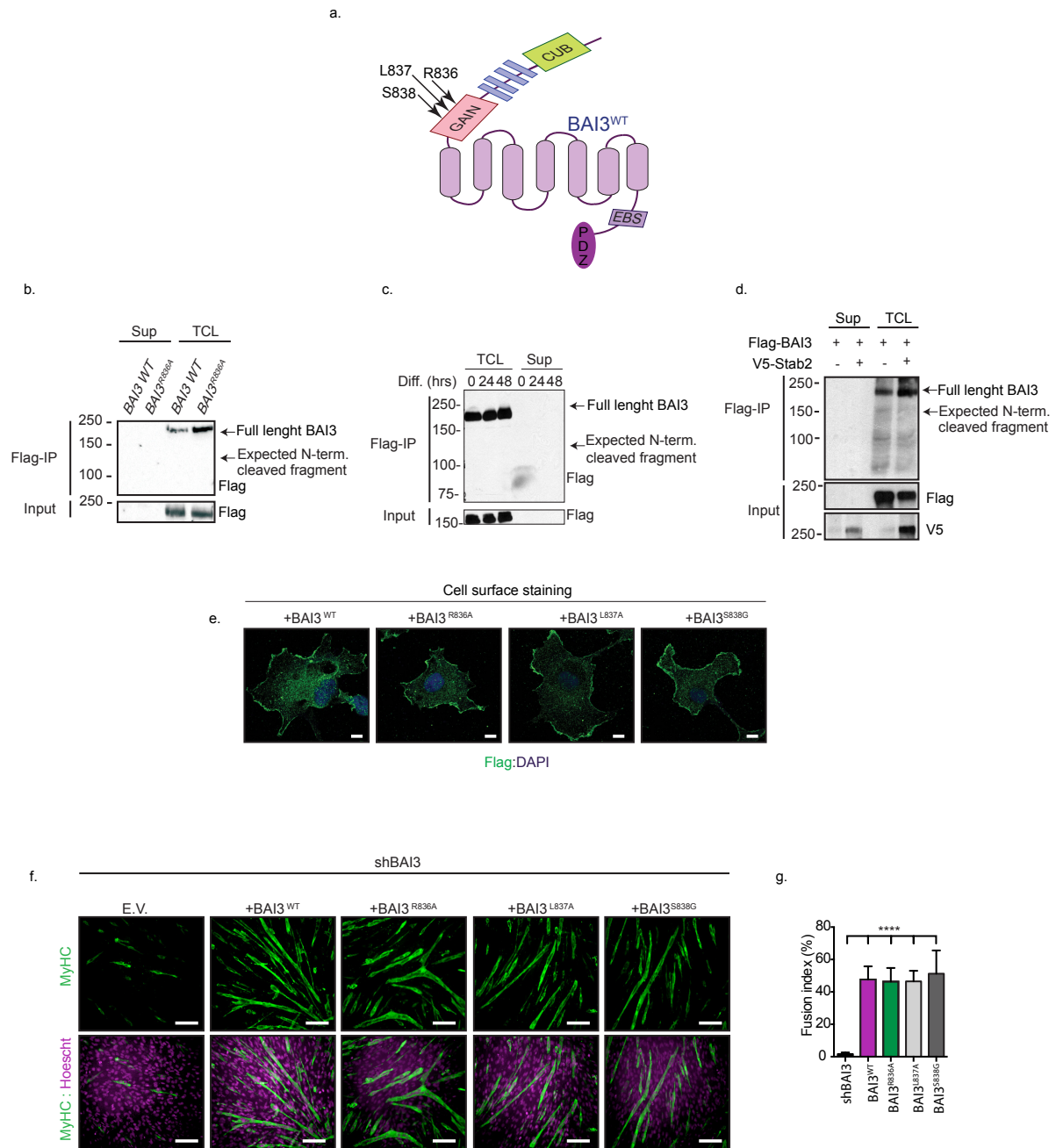
### Figure 3-S2. C1qL4 specifically interacts with BAI3 to inhibit myoblast fusion.

a) BAI3 mutant lacking the CUB domain correctly localizes to the plasma membrane. C2C12 were transfected with mVenus-tagged Flag-BAI3 or Flag –BAI3<sup>ΔCUB</sup>. Cell expressing the constructs were identified by mVenus and localization of the BAI3 receptors was confirmed by staining non-permeabilized cells with an anti-Flag antibody. b) C1qL4 inhibits myoblast fusion through its interaction with BAI3. ShBAI3 cells were transfected with BAI3 receptor to rescue myoblast fusion. Recombinant C1qL4 was added and a decrease in myoblast fusion was observed compared to BAI3 alone. c) Quantification of experiments shown in (b). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100um. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*P<0.0001.



**Figure 3-S3. The extracellular region of BAI3 interacts with Stabilin-2.**

a) C2C12 cells were treated with conditioned media containing extracellular fragments of BAI3: CUB alone, TSRs alone, TSRs+CUB or the full ECD. The TSRs region was the minimal required to inhibit myoblast fusion. b) Quantification of experiment shown in (a). c) Mass spectrometry analysis reveals Stabilin-2 as a new potential interacting candidate for BAI3. d) Mass spectrometry validation. BAI<sup>ECD</sup> is able to interact with Stabilin-2. IP of Flag-tagged Stabilin-2 was carried out to assess its interaction with extracellular region of BAI3. e) Stabilin-2 interacts with the TSR region. IP-V5 tagged Stabilin-2 fails to interact with BAI3 lacking TSR region. Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100um. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\*\*P<0.0001.

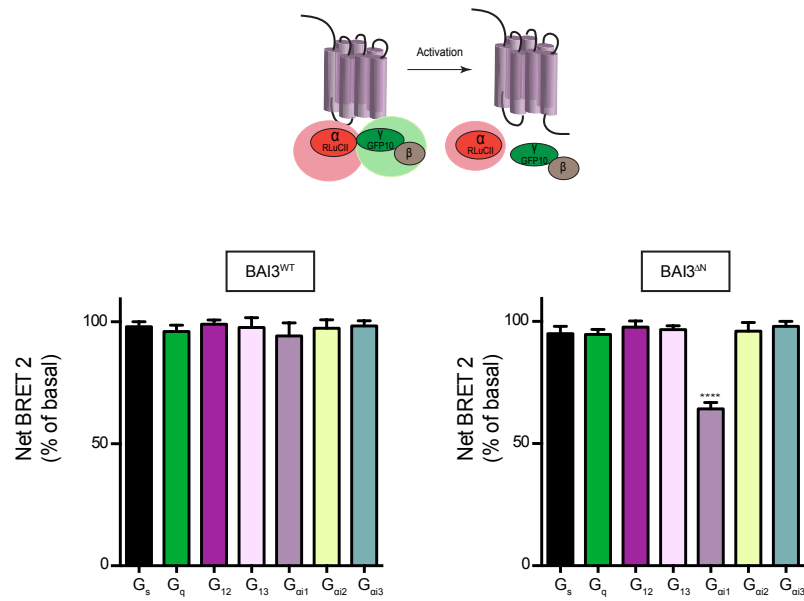


**Figure 3-S4. BAI3 promotes myoblast fusion in an auto-proteolytic independent manner.**

a) Schematic representation of BAI3 mutants targeting 3 potential cleavage sites in the GAIN domain. b) Overexpression of either Flag-BAI3 or a BAI3 mutant in the GAIN generates full-

length proteins. IP of Flag-BAI3 or Flag-BAI3<sup>R836A</sup> from both the cell culture supernatants and total cell lysates of transfected 293T cells. c) BAI3 is not auto-processed during C2C12 cells differentiation. IP of Flag-BAI3 from the cell culture supernatants and total cell lysates from differentiating C2C12 transfected with Flag-BAI3. d) Stabilin-2 does not induce BAI3 auto-cleavage. IPs of Flag-BAI3 from cell culture supernatants and total cell lysates from 293T transfected cells were carried out to detect BAI3 protein integrity following V5-Stabilin-2 co-expression. e-g) BAI3 auto-cleavage is not required for myoblast fusion. e) Mutations in the GAIN domain of BAI3 does not affect the trafficking of the receptor to the cell surface. Localization of the Flag-BAI3 proteins (WT, R836A, L837A or S838G) at the cell surface was assessed by staining the non-permabilized cells with the anti-Flag antibody. f) The myoblast fusion defect of C2C12 cells depleted of endogenous BAI3 is rescued as efficiently by Flag-BAI3 mutants in the GAIN in comparison to the wild-type protein. g) Quantification of experiments shown in (f). Myofibers were stained for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF20 antibody (green)) and nuclei were revealed by Hoechst (purple). Error bars indicate standard deviation. Scale bar=100um. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test was used to calculate the p values; \*\*\*P<0.0001.





**Figure 3-S5. G protein subunits screen.**

Effect of  $BAI3^{WT}$  and  $BAI3^{\Delta N}$  on BRET2 signal between G-proteins  $G_{\alpha i1}$ -RlucII and GFP10- $G_{\gamma 2}$  in cells co-transfected with the untagged  $G_{\beta}$ . Net BRET2 signal is normalized to basal BRET2 signal.

Plasmid	Description	Purpose	Source
pCAGGS-FLAG-BAI3 delta cub -mVenus	Human BAI3 with the deletion of the CUB domain	Myoblast fusion assay	This study
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>ECD</sup>	N-terminal region of BAI3 with flag tag	mass spectrometry experiment	T.Sudhof
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>L837A</sup> -mVenus	Human BAI3 with a point mutation in the GAIN domain	Myoblast fusion assay	This study
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>R836A</sup> -mVenus	Human BAI3 with a point mutation in the GAIN domain	Myoblast fusion assay	This study
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>RKR-EEE</sup> -mVenus	Human BAI3 with a point mutation in the alpha-helix	Myoblast fusion assay	This study
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>S838G</sup> -mVenus	Human BAI3 with a point mutation in the GAIN domain	Myoblast fusion assay	This study
pCAGGS-Flag-BAI3 <sup>WT</sup> -mVenus	Human BAI3 with the Flag tag		T. Sudhof
pCAGGS-HA-C1qL4-N-Glyc	C1qL4 with N-glycosylation bridge in the C1q domain	Chick electroporation experiment	This study
pCAGGS-HA-C1qL4 <sup>WT</sup>	C1qL4 WT insert in pCAGGS backbone plasmid	Chick electroporation experiment	This study
pCAGGS-V5-BAI3 <sup>Active</sup>	Constitutively active BAI3 mutant	BRET2 experiment	This study
pCAGGS-V5-BAI3 <sup>Active/RKR-EEE</sup>	Constitutively active BAI3 mutant with ELMO2 interaction site mutation	protein-protein interaction experiment	This study
pCAGGS-V5-BAI3 <sup>WT</sup>	BAI3 WT inserted in pCDNA plasmid	BRET2 experiment	This study
pCDNA-ELMO2-RLUCII	ELMO2 tagged with RLUCII in c-terminus	BRET2 experiment	This study
pCDNA3-hC1qL1-HA	human C1qL1 with HA tag	Myoblast fusion assay	Wong Lab
pCDNA3-mC1qL2-HA	mouse C1qL2 with HA tag	Myoblast fusion assay	Wong Lab
pCDNA3-mC1qL3-HA	mouse C1qL3 with HA tag	Myoblast fusion assay	Wong Lab
pCDNA3-Myc-Arrestin2	B-Arrestin2 tagged with myc	protein-protein interaction experiment	M.Bouvier
pCDNA5-V5-STAB2	Stabilin-2 full length with V5 tag	protein-protein interaction experiment	E. Harris
pDisplay-HA-C1QL4	Mouse C1qL4 with the HA tag	protein-protein interaction experiment	T.Sudhof
pDisplay-HA-C1QL4 <sup>N-GLYC</sup>	C1qL4 with N-glycosylation bridge in the C1q domain	protein-protein interaction experiment	This study
pEZY-Flag-RhoG <sup>G12V</sup>	Constitutively active RhoG mutant	protein-protein interaction experiment	
pIRES-V5-BAI1-ECD	N-terminal region of BAI1 with V5 tag	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI2-ECD	N-terminal region of BAI2 with V5 tag	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3-CUB	BAI3 CUB domain	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3-CUB+TSR	BAI3 CUB Domain together with TSR domain	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3-ECD	Complete N-terminal region of BAI3	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3-TSR	BAI3 TSR domain	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3 <sup>active</sup>	Constitutively active BAI3 mutant tagged with V5	protein-protein interaction experiment	This study
pIRES-V5-BAI3 <sup>WT</sup>	Human BAI3 with the V5 tag	protein-protein interaction experiment	This study

**Table 3-SI:** Various plasmids used in this study

	Forward	Reverse
C1ql.1 RT-PCR	5' ACG AGG TGC TCA AGT TTG 3'	5' ATT TGT TGC TGT TGC CCC 3'
C1ql.2 RT-PCR	5' TAC GAG GTG CTC AAG TTC G 3'	5' TGT TAT TGT TGC CGC CGT G 3'
C1ql.3 RT-PCR	5' GGT TTC CGA GAT TGG TTA CC 3'	5' CGC ACC TGG TTG TTT TTG 3'
C1ql.4 RT-PCR	5' AGG GTT ATG AAG TGT TGC G 3'	5' GGG TAG ATG ATG AAT CCT GAG AAG 3'
TATA Q-RT-PCR	5' GCT GAA TAT AAT CCC AAG CGA TTT 3'	5' GCA GTT GTC CGT GGC TCT CT 3'
Cloning of the N-terminus of BAI1 (for protein-protein interaction)	5' C GGT CTC GAT TCT ACG GCC GCC GGA GCA GAC GC 3'	5' CT GCA GAA TTC TCA GGG CCT GCA GGT GCG CGT 3'
Cloning of the N-terminus of BAI2 (for protein-protein interaction)	5' C GGT CTC GAT TCT ACG CTC GCC ACG GCC TTC GAC 3'	5' GTC GAA GGC CGT GGC CAG CGT AGA ATC GAG ACC G 3'
Cloning of mC1ql.4 in pCAGGS vector ( for chick electroporation)	5' GAA TTC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT 3'	5' GGT ACC TCA GTC CGG GTA GAT GAT GA 3'
Cloning of CUB domain (for protein-protein interaction and fusion assays)	5' CCT CGG TCT CGA TTC TAC GCG TAG TAC TTG TTC AAC TTT GGT GAA GGG AGT CAT 3'	5' GGT GAT GGT GAT GGT GAC GCG TCT CGA GGT TCA ATA CCA AAA ACT CAA AAA AAG ATT TCT GAT CTT CT 3'
Cloning of TSR domain (for protein-protein interaction and fusion assays)	5' CCT CGG TCT CGA TTC TAC GCG TAG TAC TGT GGA AGA GTG GTC CCA GT 3'	5' GGT GAT GGT GAT GGT GAC GCG TCT CGA GAG GGC ATC GCT GCT CAT 3'
Generation of mC1ql.4 Q191N N192S Y193T mutant (for fusion assay, chick electroporation and protein-protein interaction)	5' CGC CAT TGC TCA GGA TGC GGA TAA TAG CAC CGA CTA TGC CAG CAA CAG CG 3'	5' CGC TGT TGC TGG CAT AGT CGG TGC TAT TAT CCG CAT CCT GAG CAA TGG CG 3'
Generation of mC1ql.4 T224N K226S mutant (for fusion assay, chick electroporation and protein-protein interaction)	5' GGT GCA CGG CGG GAA CAA CAA TAG CTA CAG CAC CTT CTC AGG 3'	5' CCT GAG AAG GTG CTG TAG CTA TTG TTG TTC CCG CCG TGC ACC 3'
Cloning of hBai3 R836A mutant (full length)	5' CAT CCC ATA CGA AAT GCT TAT GTG ATA GTC TCT CTA CCT TC 3'	5' GAA GGT AGA GAG ACT ATC ACA TAA GCA TTT CGT ATG GGA TG 3'
Cloning of hBai3 S838G mutant (full length)	5' ATG CTT ATG TGA TCG TCT CGG TAC CTT CGC CAT TTT GGC T 3'	5' AGC CAA AAT GGC GAA GGT ACC GAG ACG ATC ACA TAA GCA T 3'
Cloning of hBai3 Active mutant	5' CCT CGG TCT CGA TTC TAC GCG TAG TAC TAT AAT CAT GGA ATC CTC TGG GAC 3'	5' GGT GAT GGT GAT GGT GAC GCG TCT CGA GAA CTT CTG TTT GAA AGT CAC C 3'
Cloning of mELMO2 tagged with RLUCII (for BRE12)	5' GGA GAC CCA AGC TGG CTA GCA TGC CGC CTC CGT CTG 3'	5' GTC ATG GTG GCG GGA AGC TTG CCA TAG TGA TAG ACG AAG TCA TAG CT 3'
mC1ql.4 Q-RT-PCR	5' CGA AGG GAT CCA TGG TGC TGC TGC TGG TAG CCA TC 3'	5' CGA AGA AGC TTC TGT CCG TTC TTC ATC AGA TCG GCC CAC AT 3'

**Table 3-SII: Various Primers used in this study**

	Forward	Reverse	Functionality <sup>1</sup>
shRNA against mC1qL4 (Pos 331)	5' GAT CCG CCT TCT ACG CGG GTC TAA TTC AAG AGA TTA GAC CCG CGT AGA AGG CCT TTT TTA GAT CTG 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA AAG GCC TTC TAC GCG GGT CTA ATC TCT TGA ATT AGA CCC GCG TAG AAG GCG 3'	NO
shRNA against mC1qL4 (Pos 655)	5' GAT CCG CAC GGC GGG AAC ACC AAT TTC AAG AGA ATT GGT GTT CCC GCC GTG CTT TTT AGA TCT G 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA AGC ACG GCG GGA ACA CCA ATT CTC TTG AAA TTG GTG TTC CCG CCG TGC G 3'	YES
shRNA against mC1qL4 (Pos 560)	5' GAT CCG GAT CAG AAC TAC GAC TAT TTC AAG AGA ATA GTC GTA GTT CTG ATC CTT TTT AGA TCT G 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA AGG ATC AGA ACT ACG ACT ATT CTC TTG AAA TAG TCG TAG TTC TGA TCC G 3'	YES
shRNA against mC1qL4 (Pos 53)	5' GAT CCG ACC AAC ACA CTA TGA GAT GCT ATT CAA GAG ATA GCA TCT CAT AGT GTG TTG GTC TTT TTT AGA TCT G 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA AAG ACC AAC ACA CTA TGA GAT GCT ATC TCT TGA ATA GCA TCT CAT AGT GTG TTG GTC G 3'	NO
shRNA against mC1qL4 (Pos 355)	5' GAT CCC CTC ACG AGG GTT ATG AAG TGT TTT CAA GAG AAA CAC TTC ATA ACC CTC GTG AGG TTT TTA GAT CTG 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA ACC TCA CGA GGG TTA TGA AGT GTT TCT CTT GAA AAC ACT TCA TAA CCC TCG TGA GGG 3'	NO
shRNA against mC1qL4 (Pos 582)	5' GAT CCA CTA TGC CAG CAA CAG CGT CAT TTT CAA GAG AAA TGA CGC TGT TGC TGG CAT AGT TTT TTA GAT CTG 3'	5' AAT TCA GAT CTA AAA AAC TAT GCC AGC AAC AGC GTC ATT TCT CTT GAA AAT GAC GCT GTT GCT GGC ATA GTG 3'	YES
shRNA against mStab2 (pos 3731)	5' GCT CCA ATA AAC TAC ACC AAT TTT CAA GAG AAA TGA CGC TGT TGC TGG CAT AGT TTT TTA GAT CTG 3'	5'CAGATCTAAAAAACTATGCCAGCAACAGCGTCATTCTC TTGAAAATTGGTGTAGTTTATTGGAGC 3'	NO
shRNA against mStab2 (pos 6248)	5' CCC ATG TCA TAA GAA TGC GAA TTT CAA GAG AAA TGA CGC TGT TGC TGG CAT AGT TTT TTA GAT CTG 3'	5'CAGATCTAAAAAACTATGCCAGCAACAGCGTCATTCTC TTGAAATTCGATTCTTATGACATGGG 3'	YES

<sup>1</sup> Functionality was confirmed by Q-RT-PCR and myoblast fusion assay phenotype.

**Table 3-SIII:** Short-hairpin RNAs (shRNAs) used in C2C12 and Sol8 knockdown experiments.

	Forward	Reverse
PAX3	5' AGC AGA GCA ACT GGA AGA GC 3'	5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGG TGT GAT CTA GCC GCT GAC TG 3'
C1ql4	5' CTG AAG TCG GTG GGA TCA TT 3'	5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGG AGG TTG CTT ATG GCA AAT GG 3'
MyoD	5' CTT CTA TGA CGA CCC GTG CT 3'	5' GTC TTG GAG CTT GGC TGA ACG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG 3'

**Table 3-SIV:** Primers used to amplify anti-sens probes for In Situ Hybridization (ISH) on chicken embryo tissues.

## **Discussion**

La fusion des myoblastes est une étape importante pour le développement musculaire. Alors que le mécanisme a été profondément décrit chez la drosophile, les molécules et leur fonctions identifiées ne sont pas systématiquement conservés chez les espèces supérieures. Ainsi, des études ont démontré que DOCK1, Rac1, Cdc42 et N-Wasp, tous des régulateurs du cytosquelette, sont essentielles à la fusion des myoblastes tant chez la drosophile que chez la souris. Au moment de commencer la thèse, aucune molécule à la surface des myoblastes et capable de réguler le cytosquelette lors de la fusion n'était connue. Ainsi, l'objectif principal de la thèse est d'identifier le récepteur membranaire capable de réguler la fusion des myoblastes chez les vertébrés.

Les études génétiques chez la drosophile ont identifié des protéines de la famille des immunoglobulines Duf et Sns exprimés par les cellules FC et FCM respectivement. Ces protéines membranaires sont essentielles à la fusion des myoblastes de drosophile. Alors que la machinerie régulatrice du cytosquelette est conservée entre la mouche et les vertébrés, des équipes ont voulu voir si les molécules de surface de la drosophile étaient aussi conservées. Il a alors été découvert que l'orthologue de Sns correspond à Néphrine [254]. Son expression a été détectée dans le muscle en développement et lors de la fusion des myoblastes en culture [86]. Les souris totalement déficientes en Néphrine vivent quelques jours seulement après la naissance. Les analyses ont révélé que la mort est due à un problème lié au fonctionnement des reins alors que les muscles ne présentent aucun phénotype anormal [255, 256]. Kirrel, l'orthologue de Duf chez la drosophile, est connu sous le nom de neph1, neph2 et neph3 chez les mammifères. Tout comme Néphrine, les souris KO de neph1 présentent des problèmes rénaux, mais aucun défaut musculaire n'est rapporté [221]. Les phénotypes des souris neph peuvent être dus à la redondance puisqu'il y a plusieurs neph exprimées. Neph2 et 3 n'ont pas été testées en souris à ce jour. Ces études permettent de conclure que Néphrine n'est pas un récepteur majeur de la fusion des myoblastes des vertébrés. La question demeure à savoir quelle molécule de surface régule la fusion des myoblastes chez les vertébrés.

Ainsi les récepteurs de fusion semblent spécifiques aux vertébrés. Précédemment, le rôle de DOCK a été très bien établi dans la fusion. Comme ELMO interagit avec ce dernier, il a été utilisé comme proie dans une expérience de criblage de type Yeast Two-Hybrid. C'est alors que le RCPG BAI3 a été identifié. Avec cette méthode, peu de candidats furent identifiés. Il se peut donc que plusieurs interacteurs potentiels d'ELMO et des joueurs importants pour la fusion des myoblastes aient été manqués. Avec l'avancée des dernières années dans le domaine de la spectrométrie de masse, il serait pertinent de refaire cette expérience de criblage afin d'avoir une perspective plus complète des molécules impliquées autour d'ELMO. Ainsi la méthode comme le BIO-ID qui utilise la biotinylation d'un grand nombre de protéines à proximité de la proie. Ainsi, il sera possible de reconfirmer l'interaction avec le RCPG BAI3, mais aussi de nouveaux joueurs dans la fusion des myoblastes. Ces partenariats pourront ensuite être confirmés par des techniques d'interaction protéines-protéines.

L'utilisation des shRNA pour inhiber l'expression de BAI3 dans les C2C12 a montré l'incapacité de ces myoblastes à former des fibres multinucléées. De plus, l'interaction entre BAI3 mutant (incapable de lier ELMO2) a mené à un blocage de la fusion tant dans les C2C12 (*in vitro*) que dans l'embryon de poulet (*in vivo*). Ceci fait de BAI3 le premier récepteur régulant la fusion des myoblastes à travers le complexe ELMO/DOCK et le cytosquelette d'actine. De façon intéressante, une étude récente a montré qu'un autre récepteur de la famille des RCPG d'adhésion, GPR124, est aussi capable de lier le complexe ELMO/DOCK dans un contexte d'adhésion cellulaire lors de l'angiogenèse [257]. La question est alors est-ce que le fait de lier ELMO/DOCK est une caractéristique commune des RCPG d'adhésion et que ce complexe est alors impliqué dans plusieurs processus biologiques?

Récemment une molécule exprimée à la surface cellulaire a été trouvée. Le groupe d'Olson a identifié et caractérisé Myomaker [138]. Il est exprimé lors du développement spécifiquement dans les tissus musculaires et présente un profil d'expression similaire à celui de MyoD et Myf5. Ceci suggère un rôle important dans le muscle. Les souris Myomaker KO ne sont pas viables et l'analyse des muscles a montré des fibres mononucléées. La surexpression de



Myomaker dans les C2C12 a entraîné une plus forte fusion comparativement aux conditions contrôles. Pour explorer la fonction fusogène de Myomaker, des fibroblastes, cellules incapables de fusionner, ont été utilisées. La surexpression de Myomaker dans ces cellules a été insuffisante à induire la fusion. De plus, une élégante expérience utilisant les fibroblastes en culture avec des C2C12 a permis d'apprécier le pouvoir fusogène de Myomaker. Cette découverte fait de Myomaker le premier fusogène dans le muscle identifié chez les vertébrés [138].

Lors de la régénération, suite à une blessure par exemple, Myomaker est fortement exprimé. Pour étudier son rôle, des souris dont les cellules satellites sont déficientes en Myomaker ont été générées. Ces souris ont un taux de régénération très faible par rapport aux souris contrôles [235]. Ces observations permettent de renforcer l'hypothèse qui suggère que le développement et la régénération sont contrôlées par le même programme génétique.

Le mécanisme d'action ou partenaires d'interaction de Myomaker restent à être identifiés. Myomixer, aussi connu sous le nom de Myomerge et Minion, a récemment été découvert [140-142]. Cette micro-protéine est essentielle à la fusion car en son absence aucune fusion n'est observée chez les souris ou les myoblastes primaires. Des expériences de populations mixtes ont montré que Myomixer est nécessaire dans au moins un des partenaires de fusion. L'interaction entre Myomixer et Myomaker est suggérée par un des groupes, par contre elle est controversée et reste à confirmer [140-142].

Ces nouvelles découvertes ajoutent à la compréhension des joueurs régissant la fusion des myoblastes chez les vertébrés. Alors que plus d'études sont requises pour bien comprendre ces molécules, il est possible d'imaginer plusieurs scénarios où BAI3, Myomaker et Myomixer influencent la fusion des myoblastes.

D'abord, BAI3/ELMO/DOCK, Myomaker et Myomixer agissent tous dans des voies parallèles et il n'y a simplement aucune interaction entre eux. Ensuite, il est possible que

Myomaker puisse interagir avec le complexe ELMO/DOCK et ainsi participer au remodelage du cytosquelette. Pour répondre à ces questions, des tests d'interaction comme des immunoprécipitation peuvent être utilisés. Si une interaction est détectée, les sites peuvent être identifiés et des mutants peuvent être générés afin de vérifier l'importance de cette interaction lors de la fusion en utilisant des cellules C2C12, des myoblastes primaires et des embryons de poulet *in vivo*.

Un troisième scénario peut être exploré. Tel que décrit dans le chapitre 1, la fusion des myoblastes est complétée à la suite de i) la migration des cellules l'une vers l'autre ii) l'adhésion des myoblastes et finalement iii) le remodelage du cytosquelette et la fusion des membranes. La dernière étape peut être subdivisée en sous-étapes qui se déclinent comme suit : la modulation du cytosquelette, formation de protrusion (qui demeure hypothétique chez les vertébrés et reste à démontrer) et modification de la fluidité des membranes pour compléter la fusion. Il est alors possible d'imaginer que le rôle du complexe BAI3/ELMO agit sur la modification du cytosquelette menant à la formation de protrusion. Myomaker lui, serait alors impliqué dans la fluidité de la membrane. Il n'y aurait pas une interaction directe entre BAI3 et Myomaker. La réponse à cette question peut être fragmentée en plusieurs expériences. D'abord il serait utile de générer des lignées de myoblastes stables exprimant Myomaker-GFP ou BAI3-Tomato. La microscopie en temps réel peut alors être utilisée pour suivre la localisation de ces protéines lors de la fusion. Il serait alors raisonnable de s'attendre à ce que BAI3 et Myomaker soient localisés aux sites de fusion et non diffus à travers la membrane cellulaire. Pour voir si Myomaker influence vraiment la fluidité de la membrane lors de la fusion, des cellules exprimant Myomaker peuvent être comparés avec les myoblastes déficients en Myomaker. De plus au sein des myoblastes en fusion, la fluidité des sites de fusion peut être comparée aux sites adjacents qui ne fusionnent pas. Ce type d'expériences permettra de comprendre le rôle précis de Myomaker dans la fusion. Le rôle de BAI3 dans la structure des myoblastes peut être exploré en utilisant la microscopie électronique. Des myoblastes exprimant BAI3 peuvent être comparés avec des myoblastes sans BAI3 endogènes. Si BAI3 est impliqué dans la formation de structure tel que les protrusions, il sera ainsi possible de l'observer. Cet ensemble d'expérience peut

fournir des informations intéressantes afin de comprendre comment la fusion est structurellement régulée par BAI3 et Myomaker.

### **La famille des Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI) dans la fusion des myoblastes**

Jusqu'à tout récemment, la famille des BAI avaient un rôle dans l'inhibition de l'angiogenèse des glioblastomes et dans le développement des neurones [146]. De plus, BAI1 exprimé par les macrophages a été montré capable de réguler la phagocytose à travers son interaction avec la PS des cellules apoptotiques et avec le complexe ELMO/DOCK pour remodeler le cytosquelette. L'équipe Ravichandran a décrit le rôle de BAI1 dans la fusion des myoblastes. L'étude véhicule deux messages 1) BAI1 est impliqué dans la fusion des myoblastes surtout durant la régénération et 2) l'action de BAI1 est due à son interaction avec la PS exposée à la surface de myoblastes apoptotiques [150]. Même si l'idée que les myoblastes en apoptose peuvent participer à la fusion des myoblastes lors de la régénération est intéressante, par contre les résultats de cette étude demeurent controversés. En effet, des études ont clairement démontré que les myoblastes doivent exposer la PS afin de pouvoir fusionner, mais que ce signal n'est pas apoptotique [122, 258]. Ensuite, aucune expression de BAI1 n'a pu être détectée dans les myoblastes en développement ou en régénération par un groupe travaillant sur Stabilin-2 ainsi que dans le chapitre 2 de la thèse [238].

La fonction de BAI2 a jusqu'à présent été limitée à un rôle neurologique [207]. Les mécanismes exacts régulant BAI2 ou régulés par lui sont encore inconnus. Dans les myoblastes, BAI2 est exprimé de façon stable lors de la différenciation. L'utilisation des shRNA contre BAI2 n'a entraîné aucun changement dans la fusion des myoblastes comparativement aux conditions contrôles suggérant qu'il ne joue pas de rôle prédominant dans la fusion des myoblastes. Il demeure par contre plausible que BAI2 soit capable de compenser pour la perte de BAI3 dans certaines situations, par exemple *in vivo*.

BAI3 est le troisième et dernier membre de cette famille. Il joue un rôle important dans la formation des synapses. Pour accomplir ce rôle, BAI3 interagit avec la famille de protéines sécrétées C1qL. Au moment de commencer la thèse, c'était les seuls ligands connus. Le profil d'expression global des C1qL n'est pas encore connu. Par contre, les membres C1qL1, 2 et 3 sont fortement exprimés dans le cerveau alors que C1qL4 est exprimé dans le muscle et les adipocytes durant le développement [213, 259]. Une expression spécifique dans les tissus et dans le temps suggère un rôle important de ces molécules. Tel que décrit précédemment, dans les synapses, c'est C1qL1 et C1qL3 qui interagissent avec BAI3 pour réguler leur développement. Le rôle de C1qL2 est encore indéfini. Finalement, le dernier membre de la famille, C1qL4 interagit avec BAI3 pour inhiber son activité. Comme l'ont révélé les expériences en C2C12. Ainsi la présence de C1qL4 bloque la fusion alors qu'en son absence (inhibition par shRNA) la fusion est augmentée par environ 20% par rapport aux conditions contrôles. De plus *in vivo*, le mutant de C1qL4 incapable de lier BAI3 n'a eu aucun effet sur la formation des myotubes alors que le C1qL4 sauvage bloque complètement la formation de fibres multinucléées. La fonction inhibitrice de C1qL4 a aussi été rapportée lors de l'adipogenèse. L'expression de C1qL4 dans les adipocytes ou encore l'utilisation de C1qL4 recombinant ont dans les deux cas conduit à une inhibition de l'adipogenèse [259]. Il est toutefois inconnu si BAI3 est impliqué dans ce processus ou non. La famille C1qL semble impliquée dans différents événements biologiques et y jouer un important rôle. Réaliser un PCR quantitatif en temps réel (Q-PCR), contrairement au PCR semi-quantitatif réalisé dans le chapitre 3, permettra définitivement de voir s'il y a une réelle variation lors de la différenciation des C2C12. Ceci pourrait ouvrir la porte à l'exploration des mécanismes qui régulent l'expression des différents gènes du mécanisme.

Il serait ensuite intéressant de découvrir le profil d'expression de C1qL1-4 dans tous les tissus et à différents stades du développement. De plus, dans le contexte tant musculaire que des adipocytes, l'expression de C1qL4 semble très précisément régulée dans le temps. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes qui régissent l'expression et possiblement les mécanismes de dégradation des C1qL. Ceci permettra d'utiliser les C1qL dans des stratégies thérapeutiques visant les dystrophies comme la transplantation de myoblastes par exemple. Puis,

C1qL possède un domaine commun C1q qui est réputé avoir plusieurs partenaires potentiels. L'identification de ces molécules permettra sans doute de comprendre différents processus où les C1qL sont impliqués et qui sont encore incompris à ce jour.

Comme C1qL4 s'est avéré un inhibiteur du récepteur BAI3, une expérience de spectrométrie de masse a été réalisée afin d'identifier des nouveaux partenaires. Étonnamment, le récepteur transmembranaire Stabilin-2 a été identifié tel que rapporté dans le chapitre 3. Des 3 récepteurs connus liant la PS i.e. TIM4, BAI1 et Stabilin-2, ce dernier est le seul exprimé dans les myoblastes [238]. L'équipe Kim a révélé que Stab-2 interagit avec la PS des myoblastes non-apoptotiques pour compléter la fusion, tel que démontré par les expériences faites en fibroblastes. Premièrement, la surexpression de Stab-2 dans les fibroblastes leur permet de fusionner. Deuxièmement, l'utilisation d'un anticorps contre la PS bloque la fusion malgré la présence de Stab-2. La question demeure à savoir si Stab-2 fait partie d'un mécanisme responsable de l'exposition de la PS ou si le récepteur agit sûrement au sein d'un mécanisme qui relâit le signal pour la fusion.

Les souris Stab-2 KO sont viables, mais ont des fibres musculaires plus petites. La quantification révèle que moins d'événements de fusion ont eu lieu comparativement aux souris contrôle. Ce phénotype faible insinue que le récepteur est soit non essentiel au processus ou bien qu'il y ait un autre mécanisme en place pour compenser la perte de Stab-2. Dans un contexte de phagocytose de cellules apoptotiques, Stab-2 est activé par la PS puis son interaction avec l'intégrine  $\alpha\beta 5$  permet le recrutement de GULP et du complexe ELMO/DOCK qui activeront Rac1 à leur tour [247]. Ainsi un modèle similaire peut s'appliquer pour expliquer la fusion des myoblastes. L'interaction de Stab-2 et BAI3 a été montrée *in vitro*, de plus cette interaction est capable de recruter le complexe ELMO2/DOCK pour l'activation de Rac1. Dans une expérience employant des C2C12 où l'expression de Stab-2 endogène a été inhibée, BAI3 seul a été capable de restaurer une fusion normale et comparable au contrôle. Ainsi, le phénotype des souris KO peut être expliqué par la présence de BAI3 qui génère la fusion encore présente. Pour répondre à la question d'interdépendance et de redondance de ces deux récepteurs, il serait intéressant de

planifier des expériences de sauvetage dans les souris Stab-2 KO. Ainsi après l'induction de blessures par la cardiotoxine, la technologie des adénovirus peut être employée pour délivrer le récepteur BAI3 au site où la régénération aura lieu. Si l'hypothèse est vraie, alors la régénération sera grandement améliorée comparativement aux souris Stab-2 KO. Finalement, la génération de souris transgéniques double KO Stab-2 et BAI3 permettra d'apprécier la nécessité de ce complexe de signalisation ou de révéler des nouveaux mécanismes et joueurs compensatoires. Finalement, L'utilisation de la technologie d'interférence de l'ARN en épingle à cheveux (shRNA) peut expliquer certains résultats dû à l'inhibition incomplète du gène. La restauration de la fusion par BAI3 dans les cellules shStab2 peut s'expliquer par le fait que les cellules expriment encore un faible taux de Stab2 exprimé. pour remédier à cette situation et être certain de l'impact de chaque protéine, la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 semble appropriée. Cette dernière permettra de générer des cellules où le gène sera complètement inhibé. Les expériences de sauvetage pourront permettre des conclusions plus définitives sur le rôles de chacune des protéines du complexes Stab2-BAI3.

L'identification de Stab-2 comme partenaire de BAI3 a soulevé une autre question ; celle de la symétrie dans la fusion. Chez la drosophile, la fusion est le résultat des cellules FCM et FC, deux populations de myoblastes très distinctes l'une de l'autre. Chez les vertébrés seule une population de myoblastes a été identifiée à ce jour [2]. Les expériences de populations mixtes ont montré que les molécules identifiées importantes pour la fusion sont toutes requises sur les deux myoblastes fusionnant. C'est le cas pour les protéines du cytosquelette comme N-wasp et les protéines à la surface membranaire comme Myomaker [137, 138]. Le même type d'expérience a été réalisé pour BAI3 et Stab-2, le résultat indique que les deux récepteurs sont nécessaires sur le même myoblaste afin que la fusion puisse avoir lieu. Ceci renforce le fait qu'une seule population de myoblastes existe. La découverte de Myomixer semble défier ce modèle. En effet, l'expérience de population mixte, employant C2C12-fibroblastes ou fibroblastes-fibroblastes, a montré que seulement un partenaire a besoin d'exprimer Myomixer [141, 142]. En conclusion, *in vivo*, il est fort possible que plus qu'une population soit responsable du développement musculaire. Pour répondre définitivement à cette question une expérience de séquençage de cellule unique pourrait être réalisée. Ainsi, s'il y a plus qu'une

population, les différents profils peuvent être comparés et des marqueurs peuvent être identifiés. Aussi les différents types peuvent être isolés et des expériences de populations mixtes pourront être réalisées. Dans un premier temps, les différents types pourront être mixés entre eux. Ensuite, ils peuvent être mixés avec des cellules sans pouvoir de fusion tels les fibroblastes. Ainsi les types fusogènes peuvent être identifiés. Ceci peut offrir la possibilité de répondre à d'innombrables questions relatives à la fusion et à d'autres étapes du développement. Ces populations identifiées peuvent même être testées *in vivo* par des greffes sur les différents tissus. L'embryon de poulet peut s'avérer un excellent choix de modèle. Il a les mêmes étapes de développement que la souris et l'humain. Il a l'avantage non négligeable de donner accès à des structures à toutes les étapes de la formation du muscle. Il sera ainsi possible d'avoir accès à des tissus tels les somites, le myotome jusqu'au muscle squelettique. Différentes hypothèses peuvent être formulées. Certaines populations peuvent influencer l'orientation des fibres par exemple, alors que d'autres peuvent sécréter différents facteurs qui influencent la fusion, alors que d'autres encore sont responsables de la fusion primaire, alors qu'une autre peut servir à la croissance des fibres. L'information ainsi obtenue sera complète pour la recherche des différents types de populations, le moment de leur apparition et leur influence sur le développement du tissu musculaire.

### **L'activité RCPG de BAI3**

BAI3 est un RCPG d'adhésion. Cette famille semble différée des autres RCPG par son mode d'activation. En effet, le domaine d'auto-clivage GAIN semble le moyen essentiel au déclenchement de l'activité RCPG. Par contre, la présence du GAIN n'assure pas l'activation du récepteur. Tel est le cas de BAI3. Différentes tentatives d'observer le clivage ont été infructueuses (voir le chapitre 3). De plus, des mutants ponctuels aux sites potentiels au clivage dans le GAIN de BAI3 ont pu restaurer la fusion dans les C2C12 où le récepteur endogène a été déplété. Cette expérience démontre que le fonctionnement de BAI3 est indépendant du clivage. À ce stade, il y a toujours l'hypothèse qui stipule que le clivage de BAI3 est processus et tissu

spécifique. Par contre, l'hypothèse s'affaiblit lorsque la structure cristalline du domaine GAIN a été réalisée. En effet, elle ne démontre aucun clivage dans ce domaine de BAI3 [192].

Une équipe a généré un mutant de BAI1 dont la partie extracellulaire a été délétée. Ce mutant a permis d'observer une augmentation de l'activité de BAI1. En effet le mutant active la signalisation Rho via les protéines  $G\alpha_{12/13}$  [242]. Le même type de mutant a été généré pour voir si BAI3 pouvait activer la signalisation canonique des RCPG. Ainsi BAI3<sup>AN-term</sup> active les protéines  $G\alpha_{i1}$  et déclenche la signalisation de désensibilisation des RCPG montré par la présence de la  $\beta$ -arrestine. Comme la partie extracellulaire est essentielle pour la fusion des myoblastes, l'activation de BAI3 doit se faire à travers l'interaction avec son partenaire. Ainsi, Stabilin-2 est capable d'activer la signalisation RCPG de BAI3 comme le montre la présence de la  $\beta$ -arrestine lorsque les deux récepteurs sont présents.

L'activité de BAI3 pourrait aussi être régulée par d'autres molécules. L'expérience de spectrométrie de masse qui a permis d'identifier Stab-2 a aussi révélé d'autres partenaires d'interaction potentiels de BAI3 : Tenascine C, Midkine et Periostine (voir chapitre 3). Ces molécules sont des composantes de la matrice extracellulaire. Le fait que BAI3 peut interagir avec la matrice extracellulaire pour réguler la fusion est encore inconnu. Pour cette raison, il serait intéressant d'étudier le rôle de ces molécules dans la fusion des myoblastes. L'interaction avec BAI3 doit être confirmée, ensuite des études de gain ou perte de fonction peuvent être réalisées. De plus, il serait intéressant d'étudier si ces molécules peuvent activer BAI3. Les essais BRET, développés dans le chapitre 3, peuvent être utiles pour répondre à cette question.

La signalisation canonique activée par BAI3 semble responsable du recrutement du complexe ELMO/DOCK à la membrane. Comme montré dans le chapitre 3, ELMO2 interagit également avec les protéines G. En effet, une expérience de BRET2 a révélé qu'ELMO2 active  $G\alpha_{i1}$ . Ce résultat est cohérent avec les études ayant montré qu'ELMO1 peut interagir avec  $G\alpha_{i2}$  et  $\beta/\gamma$  [171, 172]. À la lumière de ces résultats, il est possible de supposer que la spécificité de l'interaction est due soit à une différence entre ELMO1 et ELMO2, soit au processus biologique



ou bien encore à la nature du récepteur et de son ligand. Pour répondre à ces questions différentes expériences peuvent être réalisées. D'abord, la différence d'interaction entre ELMO1 et 2 peut être observée par des immunoprécipitations qui testeront toutes les  $G\alpha$  avec chacun des ELMO. Ensuite, la génération d'un mutant d'ELMO2 qui ne lie pas  $G\alpha_{i1}$  pourra être testé dans la fusion des myoblastes. Si l'interaction avec  $G\alpha_{i1}$  est spécifique, alors la fusion sera bloquée. Finalement pour tester l'importance du récepteur dans cette signalisation, la technologie BRET2 peut être utilisée. Ainsi une condition exprimant BAI3 et ELMO2 sera comparée à une où BAI1 et ELMO2 seront exprimés, l'activation de différentes  $G\alpha$  pourra alors être mesurée. Ainsi, si le récepteur influence l'activation et l'interaction, il sera possible de voir une sous-unité plus activée dans un contexte et non dans l'autre. Ces informations permettront de comprendre avec une grande précision l'implication de chaque joueur dans le mécanisme de fusion.

Les RCPG sont parmi les molécules les plus ciblées pour le développement de thérapies. Le fait que BAI3 démontre une activité RCPG canonique permet d'ouvrir tout un éventail de possibilités au développement de nouveaux médicaments pour traiter des maladies comme les dystrophies. Pour la première fois, la fusion des myoblastes a été liée à une myopathie. Le syndrome de Carey-Fineman-Ziter est causé par une mutation autosomale récessive du gène de Myomaker. Cette myopathie se caractérise par une faiblesse des muscles faciaux, de l'hypoplasie musculaire générale et de la scoliose entre autres [236]. Probablement qu'en explorant les mutations des autres régulateurs de fusion, il sera peut possible d'y lier des maladies non expliquées jusqu'à maintenant. D'un point de vue thérapeutique, l'idée de pouvoir améliorer la fusion des myoblastes, par l'activation de BAI3 par une molécule devient intéressante. Déterminer la meilleure façon de trouver cette molécule est encore difficile. Différents cribles à haut débit peuvent être imaginés. Par exemple, une librairie de petites molécules qui serait testée sur des cellules surexprimant BAI3. L'activité de BAI3 peut être mesurée par la technologie BRET qui peut monitorer l'activation ou non de Rac1. La petite molécule ainsi identifiée peut ensuite être testée sur les myoblastes pour voir si elle est capable d'augmenter la fusion. Une autre façon d'identifier un potentiel activateur de BAI3 est d'utiliser la structure afin de définir précisément la poche d'interaction avec une molécule potentielle. Cette dernière sera possible lorsque le défi de la cristallographie sera relevé. Finalement, une

fois que la petite molécule capable d'activer BAI3 est identifiée, elle pourra être testée en souris dans un contexte de régénération. Les muscles pourront être suivis pour voir si la régénération est plus efficace que chez les souris contrôle qui n'ont pas reçu la petite molécule. Si ces expériences sont concluantes peut-être que la petite molécule peut être testée en tant que thérapie chez des patients qui souffrent de dystrophie. Des biopsies ainsi que les différentes façons de mesurer la masse musculaire peuvent être utilisées pour voir l'efficacité du traitement et si la condition des patients s'améliore.

## Conclusion

En conclusion, la thèse a permis de répondre à plusieurs questions sur les mécanismes régulant la fusion des myoblastes chez les vertébrés. Alors que la membrane à la surface des myoblastes était inconnue, le RCPG BAI3 a été identifié comme le premier récepteur régulant directement la fusion. De plus, BAI3 est régulé négativement par l'interaction avec la protéine sécrétée C1qL4. Cette dernière est réprimée une fois que les cellules qui le stade de prolifération et entrent en différenciation. Ceci concorde avec l'expression de Stabilin-2. Ce récepteur transmembranaire est connu pour son interaction avec PS exposé par les myoblastes en fusion. Stabilin-2 interagit alors avec BAI3 et l'active. Le récepteur actif déclenche la signalisation canonique des RCPG. Les sous-unités  $\alpha$  recrutent le complexe ELMO/DOCK à la membrane. Ce complexe est stabilisé avec la région en hélice  $\alpha$  de la partie C-terminale de BAI3. Rac1 devient alors fonctionnel. Cette activation est présumée participer à la formation de structure comme un podosome pour envahir la cellule partenaire et compléter la fusion.

Avec ce mécanisme plusieurs questions demeurent comme: quelle est sa position dans la séquence d'étapes menant à la fusion? Différentes expériences génétiques, telles que décrites précédemment, peuvent être réalisées afin de déterminer l'ordre dans lequel chaque molécule exerce sa fonction. De plus, ceci peut être accompagné d'expériences de microscopie pour étudier la présence s'il y a lieu de structures spécifiques aux différentes étapes comme des protrusions qui montrent l'invasion d'un myoblaste par un autre. La compréhension de la régulation des différentes molécules impliquées dans ce mécanisme peut aussi fournir des indices sur les moyens de les manipuler. Avec l'identification de la mutation de Myomaker causant le syndrome Carey-Finneman-Ziter, il devient irréfutable que certaines dystrophies sont causées par un défaut dans la fusion des myoblastes. Sa complète compréhension mènera à l'amélioration des traitements de ces maladies et possiblement à leurs guérisons.

## Bibliographie

1. Rossi, G. and G. Messina, *Comparative myogenesis in teleosts and mammals*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(16): p. 3081-99.
2. Abmayr, S.M. and G.K. Pavlath, *Myoblast fusion: lessons from flies and mice*. Development, 2012. **139**(4): p. 641-56.
3. Hirst, C.E. and C. Marcelle, *The avian embryo as a model system for skeletal myogenesis*. Results Probl Cell Differ, 2015. **56**: p. 99-122.
4. Frontera, W.R. and J. Ochala, *Skeletal muscle: a brief review of structure and function*. Calcif Tissue Int, 2015. **96**(3): p. 183-95.
5. Musumeci, G., et al., *Somitogenesis: From somite to skeletal muscle*. Acta Histochem, 2015. **117**(4-5): p. 313-28.
6. Christ, B., R. Huang, and M. Scaal, *Formation and differentiation of the avian sclerotome*. Anat Embryol (Berl), 2004. **208**(5): p. 333-50.
7. Scaal, M. and B. Christ, *Formation and differentiation of the avian dermomyotome*. Anat Embryol (Berl), 2004. **208**(6): p. 411-24.
8. Hatta, K., et al., *Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos*. Dev Biol, 1987. **120**(1): p. 215-27.
9. Marcelle, C., M.R. Stark, and M. Bronner-Fraser, *Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite*. Development, 1997. **124**(20): p. 3955-63.
10. Gros, J., O. Serralbo, and C. Marcelle, *WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 589-93.
11. Sambasivan, R. and S. Tajbakhsh, *Skeletal muscle stem cell birth and properties*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 870-82.
12. Choi, J., et al., *MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7988-92.
13. Sassoon, D.A., *Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis*. Dev Biol, 1993. **156**(1): p. 11-23.
14. Berkes, C.A. and S.J. Tapscott, *MyoD and the transcriptional control of myogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 585-95.
15. Rudnicki, M.A., et al., *Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development*. Cell, 1992. **71**(3): p. 383-90.
16. Rudnicki, M.A., et al., *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1351-9.
17. Tajbakhsh, S., et al., *Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD*. Cell, 1997. **89**(1): p. 127-38.
18. Hastay, P., et al., *Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene*. Nature, 1993. **364**(6437): p. 501-6.
19. Nabeshima, Y., et al., *Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect*. Nature, 1993. **364**(6437): p. 532-5.

20. Bober, E., et al., *Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells*. *Development*, 1994. **120**(3): p. 603-12.
21. Daston, G., et al., *Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse*. *Development*, 1996. **122**(3): p. 1017-27.
22. Tremblay, P., et al., *A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors*. *Dev Biol*, 1998. **203**(1): p. 49-61.
23. Seale, P., et al., *Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells*. *Cell*, 2000. **102**(6): p. 777-86.
24. Hutcheson, D.A., et al., *Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin*. *Genes Dev*, 2009. **23**(8): p. 997-1013.
25. Relaix, F., et al., *Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development*. *Genes Dev*, 2004. **18**(9): p. 1088-105.
26. Maqbool, T. and K. Jagla, *Genetic control of muscle development: learning from Drosophila*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2007. **28**(7-8): p. 397-407.
27. Vignery, A., *Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism*. *Int J Exp Pathol*, 2000. **81**(5): p. 291-304.
28. Kaji, K. and A. Kudo, *The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals*. *Reproduction*, 2004. **127**(4): p. 423-9.
29. Kaji, K., et al., *Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion*. *Dev Biol*, 2002. **247**(2): p. 327-34.
30. Le Naour, F., et al., *Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice*. *Science*, 2000. **287**(5451): p. 319-21.
31. Mi, S., et al., *Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. *Nature*, 2000. **403**(6771): p. 785-9.
32. Pijnenborg, R., et al., *Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals*. *Placenta*, 1981. **2**(1): p. 71-91.
33. Baylies, M.K., M. Bate, and M. Ruiz Gomez, *Myogenesis: a view from Drosophila*. *Cell*, 1998. **93**(6): p. 921-7.
34. Bate, M., *The embryonic development of larval muscles in Drosophila*. *Development*, 1990. **110**(3): p. 791-804.
35. Tixier, V., L. Bataille, and K. Jagla, *Diversification of muscle types: recent insights from Drosophila*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(18): p. 3019-27.
36. Duan, H., J.B. Skeath, and H.T. Nguyen, *Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development*. *Development*, 2001. **128**(22): p. 4489-500.
37. Ruiz-Gomez, M., et al., *myoblasts incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in Drosophila*. *Development*, 2002. **129**(1): p. 133-41.
38. Doberstein, S.K., et al., *Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(6): p. 1249-61.

39. Richardson, B.E., et al., *SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion*. *Development*, 2007. **134**(24): p. 4357-67.
40. Strunkelberg, M., et al., *rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in Drosophila*. *Development*, 2001. **128**(21): p. 4229-39.
41. Ruiz-Gomez, M., et al., *Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion*. *Cell*, 2000. **102**(2): p. 189-98.
42. Bour, B.A., et al., *Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion*. *Genes Dev*, 2000. **14**(12): p. 1498-511.
43. Artero, R.D., I. Castanon, and M.K. Baylies, *The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling*. *Development*, 2001. **128**(21): p. 4251-64.
44. Dworak, H.A., et al., *Characterization of Drosophila hibris, a gene related to human nephrin*. *Development*, 2001. **128**(21): p. 4265-76.
45. Chen, E.H. and E.N. Olson, *Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in Drosophila*. *Dev Cell*, 2001. **1**(5): p. 705-15.
46. Bulchand, S., et al., *The intracellular domain of Dumbfounded affects myoblast fusion efficiency and interacts with Rolling pebbles and Loner*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9374.
47. Gimona, M., et al., *Assembly and biological role of podosomes and invadopodia*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 235-41.
48. Sens, K.L., et al., *An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(5): p. 1013-27.
49. Menon, S.D. and W. Chia, *Drosophila rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded*. *Dev Cell*, 2001. **1**(5): p. 691-703.
50. Rau, A., et al., *rolling pebbles (rols) is required in Drosophila muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion*. *Development*, 2001. **128**(24): p. 5061-73.
51. Geisbrecht, E.R., et al., *Drosophila ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization*. *Dev Biol*, 2008. **314**(1): p. 137-49.
52. Rushton, E., et al., *Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for Drosophila muscle development*. *Development*, 1995. **121**(7): p. 1979-88.
53. Erickson, M.R., B.J. Galletta, and S.M. Abmayr, *Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(3): p. 589-603.
54. Richardson, B.E., S.J. Nowak, and M.K. Baylies, *Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives*. *Traffic*, 2008. **9**(7): p. 1050-9.
55. Zhang, Y., et al., *Drosophila D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation*. *J Cell Sci*, 2000. **113 ( Pt 17)**: p. 3103-15.
56. Machado, C. and D.J. Andrew, *D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(3): p. 639-52.
57. Chen, E.H., et al., *Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6*. *Cell*, 2003. **114**(6): p. 751-62.
58. Schroter, R.H., et al., *kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in Drosophila*. *Development*, 2004. **131**(18): p. 4501-9.
59. Hakeda-Suzuki, S., et al., *Rac function and regulation during Drosophila development*. *Nature*, 2002. **416**(6879): p. 438-42.

60. Luo, L., et al., *Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion*. Genes Dev, 1994. **8**(15): p. 1787-802.
61. Kelly, A.M. and S.I. Zacks, *The histogenesis of rat intercostal muscle*. J Cell Biol, 1969. **42**(1): p. 135-53.
62. Ontell, M. and K. Kozeka, *Organogenesis of the mouse extensor digitorum logus muscle: a quantitative study*. Am J Anat, 1984. **171**(2): p. 149-61.
63. Ross, J.J., M.J. Duxson, and A.J. Harris, *Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles*. Development, 1987. **100**(3): p. 383-94.
64. Biressi, S., M. Molinaro, and G. Cossu, *Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development*. Dev Biol, 2007. **308**(2): p. 281-93.
65. Lyons, G.E., et al., *The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo*. J Cell Biol, 1990. **111**(4): p. 1465-76.
66. Lepper, C. and C.M. Fan, *Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells*. Genesis, 2010. **48**(7): p. 424-36.
67. Lepper, C., T.A. Partridge, and C.M. Fan, *An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3639-46.
68. Murphy, M.M., et al., *Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3625-37.
69. Sambasivan, R., et al., *Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3647-56.
70. Horsley, V. and G.K. Pavlath, *Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion*. Cells Tissues Organs, 2004. **176**(1-3): p. 67-78.
71. Robertson, T.A., et al., *Fusion between myogenic cells in vivo: an ultrastructural study in regenerating murine skeletal muscle*. J Struct Biol, 1990. **105**(1-3): p. 170-82.
72. Hindi, S.M., M.M. Tajrishi, and A. Kumar, *Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion*. Sci Signal, 2013. **6**(272): p. re2.
73. Engel, L.C., M.W. Egar, and R.J. Przybylski, *Morphological characterization of actively fusing L6 myoblasts*. Eur J Cell Biol, 1986. **39**(2): p. 360-5.
74. Powell, J.A., *Development of normal and genetically dystrophic mouse muscle in tissue culture. I. Prefusion and fusion activities of muscle cells: phase contrast and time lapse study*. Exp Cell Res, 1973. **80**(2): p. 251-64.
75. Krauss, R.S., et al., *Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2355-62.
76. Griffin, C.A., et al., *Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 18): p. 3052-60.
77. Bondesen, B.A., et al., *Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3338-45.
78. Pavlath, G.K. and V. Horsley, *Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size*. Cell Cycle, 2003. **2**(5): p. 420-3.
79. Horsley, V., et al., *Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway*. J Cell Biol, 2001. **153**(2): p. 329-38.
80. Horsley, V., et al., *IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth*. Cell, 2003. **113**(4): p. 483-94.

81. Lafreniere, J.F., et al., *Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(7): p. 1127-41.
82. Jansen, K.M. and G.K. Pavlath, *Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(3): p. 403-13.
83. Vasyutina, E., et al., *CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells*. *Genes Dev*, 2005. **19**(18): p. 2187-98.
84. Bae, G.U., et al., *Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(13): p. 8301-9.
85. Lee, Y.N., J.S. Kang, and R.S. Krauss, *Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(22): p. 7696-706.
86. Sohn, R.L., et al., *A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(23): p. 9274-9.
87. Yoon, S., et al., *C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia*. *Dev Biol*, 2007. **301**(1): p. 70-81.
88. Mukai, A., et al., *Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(17): p. 3052-63.
89. Mukai, A. and N. Hashimoto, *Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(2): p. 387-97.
90. Nowak, S.J., et al., *Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 18): p. 3282-93.
91. Stadler, B., T.M. Blattler, and A. Franco-Obregon, *Time-lapse imaging of in vitro myogenesis using atomic force microscopy*. *J Microsc*, 2010. **237**(1): p. 63-9.
92. Abramovici, H. and S.H. Gee, *Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2007. **64**(7): p. 549-67.
93. Radice, G.L., et al., *Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin*. *Dev Biol*, 1997. **181**(1): p. 64-78.
94. Donalies, M., et al., *Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(18): p. 8024-8.
95. Moore, R. and F.S. Walsh, *The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle*. *Development*, 1993. **117**(4): p. 1409-20.
96. Geiger, B., et al., *Cytoplasmic control of cell adhesion*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1992. **57**: p. 631-42.
97. Charrasse, S., et al., *N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(5): p. 953-65.
98. Wei, L., et al., *RhoA signaling via serum response factor plays an obligatory role in myogenic differentiation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30287-94.
99. Yap, A.S. and E.M. Kovacs, *Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(1): p. 11-6.
100. Charrasse, S., et al., *M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(5): p. 1734-43.



101. Zeschnigk, M., et al., *Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells*. J Cell Sci, 1995. **108 ( Pt 9)**: p. 2973-81.
102. Hollnagel, A., et al., *The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration*. Mol Cell Biol, 2002. **22(13)**: p. 4760-70.
103. Dahl, U., et al., *Genetic dissection of cadherin function during nephrogenesis*. Mol Cell Biol, 2002. **22(5)**: p. 1474-87.
104. Kang, J.S., et al., *BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation*. EMBO J, 2002. **21(1-2)**: p. 114-24.
105. Cole, F., et al., *Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO*. Dev Cell, 2004. **7(6)**: p. 843-54.
106. Kang, J.S., et al., *Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100(7)**: p. 3989-94.
107. Kang, J.S., et al., *CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation*. J Cell Biol, 1998. **143(2)**: p. 403-13.
108. Kang, J.S., et al., *Netrins and neogenin promote myotube formation*. J Cell Biol, 2004. **167(3)**: p. 493-504.
109. Bae, G.U., et al., *Neogenin regulates skeletal myofiber size and focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase activities in vivo and in vitro*. Mol Biol Cell, 2009. **20(23)**: p. 4920-31.
110. Quach, N.L., et al., *Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion*. Mol Biol Cell, 2009. **20(14)**: p. 3422-35.
111. Gullberg, D., et al., *Integrins during muscle development and in muscular dystrophies*. Front Biosci, 1998. **3**: p. D1039-50.
112. Brzoska, E., et al., *Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro*. Differentiation, 2006. **74(2-3)**: p. 105-18.
113. Lafuste, P., et al., *ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation*. Mol Biol Cell, 2005. **16(2)**: p. 861-70.
114. Schwander, M., et al., *Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly*. Dev Cell, 2003. **4(5)**: p. 673-85.
115. White, J.M., *ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15(5)**: p. 598-606.
116. Kurisaki, T., et al., *Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23(1)**: p. 55-61.
117. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med, 1995. **182(5)**: p. 1545-56.
118. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182(5)**: p. 1597-601.
119. Herman, B.A. and S.M. Fernandez, *Changes in membrane dynamics associated with myogenic cell fusion*. J Cell Physiol, 1978. **94(3)**: p. 253-63.
120. Wakelam, M.J., *The fusion of myoblasts*. Biochem J, 1985. **228(1)**: p. 1-12.

121. Van den Eijnde, S.M., et al., *Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis*. *Cell Death Differ*, 1997. **4**(4): p. 311-6.
122. van den Eijnde, S.M., et al., *Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 20): p. 3631-42.
123. Fulton, A.B., et al., *Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells*. *J Cell Biol*, 1981. **91**(1): p. 103-12.
124. Duan, R. and P.J. Gallagher, *Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA*. *Dev Biol*, 2009. **325**(2): p. 374-85.
125. Dunphy, J.L., et al., *The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins*. *Curr Biol*, 2006. **16**(3): p. 315-20.
126. Pajcini, K.V., et al., *Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(5): p. 1005-19.
127. O'Brien, S.P., et al., *Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 12074-8.
128. Cote, J.F. and K. Vuori, *GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways*. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(8): p. 383-93.
129. Moore, C.A., et al., *A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion*. *Development*, 2007. **134**(17): p. 3145-53.
130. Laurin, M., et al., *The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(40): p. 15446-51.
131. Komander, D., et al., *An alpha-helical extension of the ELMO1 pleckstrin homology domain mediates direct interaction to DOCK180 and is critical in Rac signaling*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 4837-51.
132. Patel, M., et al., *An evolutionarily conserved autoinhibitory molecular switch in ELMO proteins regulates Rac signaling*. *Curr Biol*, 2010. **20**(22): p. 2021-7.
133. Bach, A.S., et al., *ADP-ribosylation factor 6 regulates mammalian myoblast fusion through phospholipase D1 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling pathways*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(14): p. 2412-24.
134. Vasyutina, E., et al., *The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(22): p. 8935-40.
135. Haralalka, S. and S.M. Abmayr, *Myoblast fusion in Drosophila*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(18): p. 3007-13.
136. Onel, S.F. and R. Renkawitz-Pohl, *FuRMAS: triggering myoblast fusion in Drosophila*. *Dev Dyn*, 2009. **238**(6): p. 1513-25.
137. Gruenbaum-Cohen, Y., et al., *The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11211-6.
138. Millay, D.P., et al., *Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation*. *Nature*, 2013. **499**(7458): p. 301-5.
139. Zhang, W. and S. Roy, *Myomaker is required for the fusion of fast-twitch myocytes in the zebrafish embryo*. *Dev Biol*, 2017. **423**(1): p. 24-33.
140. Bi, P., et al., *Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer*. *Science*, 2017. **356**(6335): p. 323-327.

141. Zhang, Q., et al., *The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15664.
142. Quinn, M.E., et al., *Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15665.
143. Powell, G.T. and G.J. Wright, *Jamb and jamc are essential for vertebrate myocyte fusion*. PLoS Biol, 2011. **9**(12): p. e1001216.
144. Park, D., et al., *BAIL is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 430-4.
145. Bolliger, M.F., D.C. Martinelli, and T.C. Sudhof, *The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2534-9.
146. Cork, S.M. and E.G. Van Meir, *Emerging roles for the BAIL protein family in the regulation of phagocytosis, synaptogenesis, neurovasculature, and tumor development*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(8): p. 743-52.
147. Duman, J.G., Y.K. Tu, and K.F. Tolias, *Emerging Roles of BAI Adhesion-GPCRs in Synapse Development and Plasticity*. Neural Plast, 2016. **2016**: p. 8301737.
148. Kee, H.J., et al., *Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 307-16.
149. Hamoud, N., et al., *G-protein coupled receptor BAI3 promotes myoblast fusion in vertebrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(10): p. 3745-50.
150. Hochreiter-Hufford, A.E., et al., *Phosphatidylserine receptor BAIL and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 263-7.
151. Gloriam, D.E., R. Fredriksson, and H.B. Schioth, *The G protein-coupled receptor subset of the rat genome*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 338.
152. Hanlon, C.D. and D.J. Andrew, *Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family*. J Cell Sci, 2015. **128**(19): p. 3533-42.
153. Stoy, H. and V.V. Gurevich, *How genetic errors in GPCRs affect their function: Possible therapeutic strategies*. Genes Dis, 2015. **2**(2): p. 108-132.
154. Venkatakrisnan, A.J., et al., *Molecular signatures of G-protein-coupled receptors*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 185-94.
155. Kobilka, B.K. and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(8): p. 397-406.
156. Dror, R.O., et al., *Identification of two distinct inactive conformations of the beta2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4689-94.
157. Tate, C.G. and G.F. Schertler, *Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(4): p. 386-95.
158. Shi, Y., *A glimpse of structural biology through X-ray crystallography*. Cell, 2014. **159**(5): p. 995-1014.
159. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
160. Krishnan, A., et al., *The GPCR repertoire in the demosponge Amphimedon queenslandica: insights into the GPCR system at the early divergence of animals*. BMC Evol Biol, 2014. **14**: p. 270.

161. Neer, E.J., *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. Cell, 1995. **80**(2): p. 249-57.
162. Hamm, H.E. and A. Gilchrist, *Heterotrimeric G proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 189-96.
163. De Vries, L., et al., *The regulator of G protein signaling family*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 235-71.
164. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 60-71.
165. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *How do receptors activate G proteins?* Adv Protein Chem, 2007. **74**: p. 67-93.
166. Oldham, W.M., et al., *Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 772-7.
167. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *Structural basis of function in heterotrimeric G proteins*. Q Rev Biophys, 2006. **39**(2): p. 117-66.
168. Sondek, J., et al., *Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 369-74.
169. Milligan, G. and E. Kostenis, *Heterotrimeric G-proteins: a short history*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S46-55.
170. Dingus, J., et al., *G Protein betagamma dimer formation: Gbeta and Ggamma differentially determine efficiency of in vitro dimer formation*. Biochemistry, 2005. **44**(35): p. 11882-90.
171. Wang, Y., et al., *ELMO1 Directly Interacts with Gbetagamma Subunit to Transduce GPCR Signaling to Rac1 Activation in Chemotaxis*. J Cancer, 2016. **7**(8): p. 973-83.
172. Li, H., et al., *Association between Galphai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1706.
173. Ranjan, R., et al., *Novel Structural Insights into GPCR-beta-Arrestin Interaction and Signaling*. Trends Cell Biol, 2017.
174. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
175. Kohout, T.A., et al., *beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1601-6.
176. Scott, M.G., et al., *Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37693-701.
177. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14498-506.
178. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15315-24.
179. Ozawa, K., et al., *S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking*. Mol Cell, 2008. **31**(3): p. 395-405.
180. Wyatt, D., et al., *Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3884-93.

181. Benovic, J.L., et al., *Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(9): p. 2797-801.
182. Benovic, J.L., et al., *Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 8879-82.
183. Bouvier, M., et al., *Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization*. Nature, 1988. **333**(6171): p. 370-3.
184. Pitcher, J., et al., *Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms*. Biochemistry, 1992. **31**(12): p. 3193-7.
185. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
186. Vines, C.M., et al., *N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41581-4.
187. Calebiro, D., et al., *Signaling by internalized G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(5): p. 221-8.
188. Bjarnadottir, T.K., et al., *The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors*. Genomics, 2004. **84**(1): p. 23-33.
189. Liebscher, I., T. Schoneberg, and S. Promel, *Progress in demystification of adhesion G protein-coupled receptors*. Biol Chem, 2013. **394**(8): p. 937-50.
190. Hamann, J., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(2): p. 338-67.
191. Langenhan, T., G. Aust, and J. Hamann, *Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage*. Sci Signal, 2013. **6**(276): p. re3.
192. Arac, D., et al., *A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis*. EMBO J, 2012. **31**(6): p. 1364-78.
193. Promel, S., T. Langenhan, and D. Arac, *Matching structure with function: the GAIN domain of adhesion-GPCR and PKD1-like proteins*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(8): p. 470-8.
194. Huang, Y.S., et al., *Activation of myeloid cell-specific adhesion class G protein-coupled receptor EMR2 via ligation-induced translocation and interaction of receptor subunits in lipid raft microdomains*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(8): p. 1408-20.
195. Silva, J.P., et al., *Functional cross-interaction of the fragments produced by the cleavage of distinct adhesion G-protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6495-506.
196. Scholz, N., et al., *The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation*. Cell Rep, 2015. **11**(6): p. 866-874.
197. Salzman, G.S., et al., *Stachel-independent modulation of GPR56/ADGRG1 signaling by synthetic ligands directed to its extracellular region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(38): p. 10095-10100.
198. Park, D. and K.S. Ravichandran, *Emerging roles of brain-specific angiogenesis inhibitor 1*. Adv Exp Med Biol, 2010. **706**: p. 167-78.
199. Stephenson, J.R., R.H. Purcell, and R.A. Hall, *The BAI subfamily of adhesion GPCRs: synaptic regulation and beyond*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(4): p. 208-15.

200. Nishimori, H., et al., *A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis*. *Oncogene*, 1997. **15**(18): p. 2145-50.
201. Mori, K., et al., *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is expressed in human cerebral neuronal cells*. *Neurosci Res*, 2002. **43**(1): p. 69-74.
202. Duman, J.G., et al., *The adhesion-GPCR BAI1 regulates synaptogenesis by controlling the recruitment of the Par3/Tiam1 polarity complex to synaptic sites*. *J Neurosci*, 2013. **33**(16): p. 6964-78.
203. Kaur, B., et al., *Vasculostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor*. *Oncogene*, 2005. **24**(22): p. 3632-42.
204. Kaur, B., et al., *Vasculostatin inhibits intracranial glioma growth and negatively regulates in vivo angiogenesis through a CD36-dependent mechanism*. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 1212-20.
205. Cork, S.M., et al., *A proprotein convertase/MMP-14 proteolytic cascade releases a novel 40 kDa vasculostatin from tumor suppressor BAI1*. *Oncogene*, 2012. **31**(50): p. 5144-52.
206. Das, S., et al., *Brain angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is a pattern recognition receptor that mediates macrophage binding and engulfment of Gram-negative bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(5): p. 2136-41.
207. Okajima, D., G. Kudo, and H. Yokota, *Antidepressant-like behavior in brain-specific angiogenesis inhibitor 2-deficient mice*. *J Physiol Sci*, 2011. **61**(1): p. 47-54.
208. Jeong, B.C., et al., *Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 regulates VEGF through GABP that acts as a transcriptional repressor*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(2): p. 669-76.
209. Warner-Schmidt, J.L. and R.S. Duman, *VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(11): p. 4647-52.
210. Kakegawa, W., et al., *Anterograde Clq11 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum*. *Neuron*, 2015. **85**(2): p. 316-29.
211. Martinelli, D.C., et al., *Expression of Clq13 in Discrete Neuronal Populations Controls Efferent Synapse Numbers and Diverse Behaviors*. *Neuron*, 2016. **91**(5): p. 1034-1051.
212. Sigoillot, S.M., et al., *The Secreted Protein CIQL1 and Its Receptor BAI3 Control the Synaptic Connectivity of Excitatory Inputs Converging on Cerebellar Purkinje Cells*. *Cell Rep*, 2015.
213. Iijima, T., et al., *Distinct expression of Clq-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins*. *Eur J Neurosci*, 2010. **31**(9): p. 1606-15.
214. Bentzinger, C.F., Y.X. Wang, and M.A. Rudnicki, *Building muscle: molecular regulation of myogenesis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(2).
215. Powell, G.T. and G.J. Wright, *Do muscle founder cells exist in vertebrates?* *Trends Cell Biol*, 2012. **22**(8): p. 391-6.
216. Duan, R., et al., *Group I PAKs function downstream of Rac to promote podosome invasion during myoblast fusion in vivo*. *J Cell Biol*, 2012. **199**(1): p. 169-85.
217. Schafer, G., et al., *The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in Drosophila*. *Dev Biol*, 2007. **304**(2): p. 664-74.

218. Massarwa, R., et al., *WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in Drosophila*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 557-69.
219. Kim, S., et al., *A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 571-86.
220. Haralalka, S., et al., *Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in Drosophila*. Development, 2011. **138**(8): p. 1551-62.
221. Donoviel, D.B., et al., *Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4829-36.
222. Charlton, C.A., et al., *Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture*. J Cell Biol, 1997. **138**(2): p. 331-6.
223. Conti, F.J., et al., *Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions*. Development, 2009. **136**(21): p. 3597-606.
224. Scaal, M., et al., *In ovo electroporation of avian somites*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 643-50.
225. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951*. Dev Dyn, 1992. **195**(4): p. 231-72.
226. Mok, G.F. and D. Sweetman, *Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development*. Reproduction, 2011. **141**(3): p. 301-12.
227. Yu, S.F. and M.K. Baylies, *Cell biology: Death brings new life to muscle*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 196-7.
228. Elliott, M.R., et al., *Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 333-7.
229. Griffin, C.A., K.A. Kafadar, and G.K. Pavlath, *MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration*. Dev Cell, 2009. **17**(5): p. 649-61.
230. Patel, M., et al., *The Arf family GTPase Arl4A complexes with ELMO proteins to promote actin cytoskeleton remodeling and reveals a versatile Ras-binding domain in the ELMO proteins family*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 38969-79.
231. Schaeren-Wiemers, N. and A. Gerfin-Moser, *A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes*. Histochemistry, 1993. **100**(6): p. 431-40.
232. Palmesino, E., et al., *Genetic analysis of DSCAM's role as a Netrin-1 receptor in vertebrates*. J Neurosci, 2012. **32**(2): p. 411-6.
233. Demonbreun, A.R., B.H. Biersmith, and E.M. McNally, *Membrane fusion in muscle development and repair*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **45**: p. 48-56.
234. Kim, J.H., et al., *Mechanisms of myoblast fusion during muscle development*. Curr Opin Genet Dev, 2015. **32**: p. 162-70.
235. Millay, D.P., et al., *Myomaker is essential for muscle regeneration*. Genes Dev, 2014. **28**(15): p. 1641-6.
236. Di Gioia, S.A., et al., *A defect in myoblast fusion underlies Carey-Fineman-Ziter syndrome*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 16077.
237. Kim, G.W., S.Y. Park, and I.S. Kim, *Novel function of stabilin-2 in myoblast fusion: the recognition of extracellular phosphatidylserine as a "fuse-me" signal*. BMB Rep, 2016. **49**(6): p. 303-4.

238. Park, S.Y., et al., *Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10871.
239. Kishore, A. and R.A. Hall, *Versatile Signaling Activity of Adhesion GPCRs*. Handb Exp Pharmacol, 2016. **234**: p. 127-146.
240. Seldin, M.M., et al., *Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11968-80.
241. Wong, G.W., et al., *Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions*. Biochem J, 2008. **416**(2): p. 161-77.
242. Stephenson, J.R., et al., *Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 signaling, regulation, and enrichment in the postsynaptic density*. J Biol Chem, 2013. **288**(31): p. 22248-56.
243. Quoyer, J., et al., *Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(52): p. E5088-97.
244. Fritsch, R., et al., *RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms*. Cell, 2013. **153**(5): p. 1050-63.
245. Katoh, H. and M. Negishi, *RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 461-4.
246. Hare, A.K. and E.N. Harris, *Tissue-specific splice variants of HARE/Stabilin-2 are expressed in bone marrow, lymph node, and spleen*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **456**(1): p. 257-61.
247. Kim, S., et al., *Cross talk between engulfment receptors stabilin-2 and integrin alphavbeta5 orchestrates engulfment of phosphatidylserine-exposed erythrocytes*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(14): p. 2698-708.
248. Park, S.Y., et al., *Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 192-201.
249. Park, S.Y., et al., *Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(17): p. 5288-98.
250. Albert, M.L., J.I. Kim, and R.B. Birge, *alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(12): p. 899-905.
251. Kang, J.S., et al., *CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family*. J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 203-13.
252. Charrasse, S., et al., *RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 749-59.
253. Poliak, S., et al., *Synergistic integration of Netrin and ephrin axon guidance signals by spinal motor neurons*. Elife, 2015. **4**.
254. Tryggvason, K., *Nephrin: role in normal kidney and in disease*. Adv Nephrol Necker Hosp, 2001. **31**: p. 221-34.
255. Putaala, H., et al., *The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(1): p. 1-8.
256. Rantanen, M., et al., *Nephrin TRAP mice lack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(6): p. 1586-94.



257. Hernandez-Vasquez, M.N., et al., *Cell adhesion controlled by adhesion G protein-coupled receptor GPR124/ADGRA2 is mediated by a protein complex comprising intersectins and Elmo-Dock*. J Biol Chem, 2017. **292**(29): p. 12178-12191.
258. Jeong, J. and I.M. Conboy, *Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(1): p. 9-13.
259. Wei, Z., et al., *Clq/tumor necrosis factor-related protein 11 (CTRP11), a novel adipose stroma-derived regulator of adipogenesis*. J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10214-29.





