HAL
open science

Modulation des mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines dans la dystrophie musculaire de Duchenne

Marion Wattin

To cite this version:

Marion Wattin. Modulation des mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1323 . tel-01771583

HAL Id: tel-01771583

https://theses.hal.science/tel-01771583

Submitted on 19 Apr 2018

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

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

N°d'ordre NNT : 2017LYSE1323

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 21/12/2017, par :

Marion WATTIN

Modulation des mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines dans la dystrophie musculaire de Duchenne

---

Devant le jury composé de :

Mme Lydie COMBARET	Directrice de recherche INRA	Rapporteur
Mr Abdel AOUACHERIA	Chargé de recherche CNRS	Rapporteur
Mme Catherine PAUL	Maître de Conférences EPHE	Examinateur
Mr Mathias FAURE	Professeur UCB Lyon1	Examinateur
Mme KRETZ-REMY Carole	Professeur UCB lyon1	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Mes tous premiers remerciements s'adressent à Mme Lydie COMBARET & Mr Abdel AOUACHERIA : Merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Mme Evelyne GOILLOT & Mr Sébastien GAUMER pour leur présence et leurs conseils avisés.

Mes principaux remerciements vont naturellement aux deux personnes sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour :

- *Kathrin, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe et d'avoir eu assez confiance en moi pour me confier ce projet. Merci pour ton aide, tes conseils et explications (« On ne dit pas MES cellules… Je vais finir par te faire travailler sur… », citation mémorable qui me suivra encore pendant longtemps…).*
- *Carole, un immense merci pour ces 4 années passées ensemble. Pour ton encadrement, tes explications, ton soutien et surtout TA PATIENCE. Pour les coups de pied au derrière qui étaient nécessaires à ma remotivation.*

Merci à ceux qui ont partagé ma paillasse ou la pièce de culture de façon plus ou moins prolongée : Pascale, Manon, Chloé, Loïc, Hai-Jun… Edwige, Marie-Christine : malgré mon passage furtif dans le monde du nématode, merci d'avoir pris le temps de m'expliquer et de me former à cet organisme modèle.

Je tiens également à remercier les membres présents et passés de l'équipe « Biologie du muscle et pathogenèse » : Stéphanie, Nicole, Mathieu, Ludivine, Charlotte. (Avec un MERCI particulier à ma petite Chacha : l'entraide, c'est cool !).

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui m'ont aidée, d'une manière ou d'une autre, durant cette thèse : Bénédicte CHAZAUD, Vincent GACHE et Alexandre GUIRAUD…

Merci aux étudiants de L1, pour ces nombreuses heures de TP à loucher sur des drosophiles, à se tromper dans les pipettages, à percer les gels d'agarose… Et à s'extasier devant un chromatogramme (« WAOUUUUH c'est beau Madame ! »). Vous enseigner la génétique n'aura fait que renforcer mon amour pour l'enseignement, et m'aura rendue un peu plus patiente !

Mes derniers remerciements iront à ceux et celles qui ont TOUJOURS cru en moi et ne m'ont JAMAIS laissée tomber, malgré les nombreux moments de doute dont j'ai fait preuve durant ces 3 dernières années :

- *A mes amis les plus chers : Amélie (Princess Power !), Louise, Quentin, Fabio, Thomas, Romain, Claudia, Perrine, Bénédicte, Océane, Charlotte…*
- *A ma famille*

Malgré mes sautes d'humeur et mes nombreux caprices, vous m'avez toujours soutenue. Aucun mot n'est assez fort pour vous montrer ma reconnaissance, et vous montrer à quel point je vous aime.

TABLE DES MATIERES

Table des matières **6**
Table des illustrations **13**
Table des abréviations **17**
Résumé **21**
Introduction **25**

Chapitre 1 : Le Contrôle Qualité des Protéines (PQC) **27**

1. Conformation native et agrégation des protéines **27**
1.1 Traduction, repliement et conformation native 27
1.2 Principales causes du mauvais repliement protéique 27
1.2.1 Changements physiologiques 27
1.2.2 Mutations 28
1.2.3 Stress environnementaux 29
1.3 Conséquences d'une mauvaise conformation protéique 29
1.3.1 Agrégation protéique 29
1.3.1.1 Phase de nucléation 29
1.3.1.2 Formation de protofibrilles 29
1.3.1.3 Condensation 30
1.3.2 Agrégation protéique et pathologies : quelques exemples 30
1.3.2.1 αB-crystalline/HSPB5 30
1.3.2.2 Huntingtine 30

2. Contrôle Qualité des Protéines par reconformation : Les chaperons moléculaires, dont les protéines de choc thermique **32**
2.1 Chaperons dépendants de l'ATP permettant la reconformation : la famille des foldases 33
2.1.1 HSPA/HSP70 33
2.1.2 HSPC/HSP90 36
2.1.3 Chaperonines 37
2.1.4 Co-chaperons moléculaires 39
2.2 Chaperons indépendants de l'ATP servant de réservoirs pour protéines mal conformées : la famille des holdases 40
2.2.1 HSPB1/HSP27 42

2.2.2 HSPB5/αB-crystalline 43
2.2.3 HSPB8/HSP22 44

3. Contrôle Qualité des Protéines par dégradation : le système ubiquitine -protéasome (UPS) **44**
3.1 Processus d'ubiquitination 44
3.1.1 Activation de l'ubiquitine (enzymes E1) 45
3.1.2 Liaison de l'ubiquitine au substrat (enzymes E2/E3) 45
3.2 Ubiquitine et son code 46
3.2.1 Ubiquitine, une molécule d'adressage 46
3.2.2 Code ubiquitine 47
3.3 Dégradation par le protéasome 49
3.3.1 Protéasome 20S 49
3.3.2 Protéasome 26S 49
3.3.3 BAG1, une protéine d'adressage des protéines mal conformées à l'UPS 50
4. Contrôle qualité des protéines par dégradation : le processus autophagique **51**
4.1 Etapes du processus autophagique 52
4.1.1 Phase d'initiation 52
4.1.2 Nucléation du PAS (*Pre-Autophagosomal Structure*) 53
4.1.3 Elongation de la membrane 53
4.1.4 Clôture de la vésicule et recyclage de la machinerie autophagique 55
4.1.5 Transport des vésicules autophagiques 55
4.1.6 Fusion autophagosomes/lysosomes 56
4.2 Régulation du processus autophagique 57
4.2.1 mTOR 57
4.2.2 Bcl-2 58
4.3 Rôles physiologiques et pathologiques de l'autophagie 59
4.3.1 Quelques exemples des rôles physiologiques de l'autophagie 59
4.3.2 Autophagie et pathologies, quelques exemples 60

5. NFκB et contrôle qualité des protéines **62**
5.1 Voie canonique 62

5.2 Voie non canonique 64
5.3 Voies atypiques 64

Chapitre 2 : Les Dystrophies musculaires **65**

1. Muscle strié **65**
1.1 Structure du muscle strié squelettique 65
1.1.1 Généralités 65
1.1.2 Organisation subcellulaire 67
1.1.2.1 Sarcolemme 67
1.1.2.2 Réticulum sarcoplasmique 67
1.1.2.3 Système tubulaire T 67
1.1.2.4 Myofibrilles 67
1.1.2.5 Costamères 69
1.2 Contraction musculaire 69
1.3 Lésions musculaires et régénération 70
1.3.1 Cellules souches, cellules souches musculaires 70
1.3.2 Processus de régénération 70
2. Dystrophies musculaires **71**
2.1 Dystrophinopathies 72
2.1.1 Dystrophie de Duchenne 72
2.1.2 Dystrophie de Becker 73
2.2 Dystrophies myotoniques 73
2.3 Dystrophies congénitales 74
2.4 Dystrophies FascioScapuloHumérales 74
2.5 Dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss 80
2.6 Dystrophies OculoPharyngées 80
2.7 Dystrophies musculaires des ceintures 80
3. Dystrophie Musculaire de Duchenne **81**
3.1 Historique & étiologie 81
3.2 Défauts subcellulaires 83
3.2.1 Altérations du sarcolemme et de sa fonctionnalité 83
3.2.2 Perturbations de l'homéostasie calcique 83
3.2.3 Déficit en nNOS 84
3.2.4 Inflammation 84

3.2.5 Altération du processus régénératif 84
3.3 Modèles d'étude 84
3.3.1 Cultures primaires et lignées cellulaires 84
3.3.2 Modèles invertébrés 84
3.3.2.1 Caenorhabditis elegans 84
3.3.2.2 Drosophila melanogaster 85
3.3.3 Modèles vertébrés 85
3.3.3.1 Modèle murin 85
3.3.3.2 Poisson zèbre 85
3.3.3.3 Autres modèles 86
3.4 Stratégies thérapeutiques 86
3.4.1 Correction du défaut génétique primaire 87
3.4.1.1 Saut d'exon (exon skipping) 87
3.4.1.2 Translecture de codon STOP 87
3.4.1.3 Correction/Supplémentation génétique 88
3.4.1.4 Injection de cellules souches 88
3.4.2 Correction de défauts secondaires 89
3.4.2.1 Utilisation de glucocorticoïdes 89
3.4.2.2 Amélioration du métabolisme oxydatif 89
3.4.2.3 Autres méthodes 89

Chapitre 3 : Le Contrôle Qualité des Protéines et la dystrophie musculaire de Duchenne **91**

3.1 Etat de l'art 91
3.2 Objectifs de l'étude 92

Résultats **93**

Chapitre 1 : Caractérisation des lignées de myoblastes immortalisés **95**
1. Potentiel prolifératif 95
2. Capacité de différenciation 96
3. Expression de la dystrophine 98

Chapitre 2 : Analyse des mécanismes du Contrôle Qualité des Protéines (PQC) dans des lignées de myoblastes contrôles ou DMD **100**

1. Efficacité du contrôle qualité des protéines dans des myoblastes DMD 100
1.1 Taux de p62/multiubiquitine 100
1.2 Agrégation protéique 101
2. Mécanisme de reconformation et protéines de choc thermique (HSP) 103
2.1 Famille des foldases 103
2.1.1 Expression des foldases 103
2.1.2 Activité chaperon globale 104
2.2 Holdases 105
2.2.1 Expression des holdases 105
2.2.2 Holdases et agrégation protéique 106
2.2.3 HSPB5 et cytosquelette 107
3. Système ubiquitine-protéasome (UPS) 108
3.1 Activité du protéasome 109
3.2 Ubiquitines ligases 110
3.3 Adressage à l'UPS : le co-chaperon BAG1 110
3.4 Switch BAG1/BAG3 112
4. Processus autophagique 113
4.1 Nucléation de la structure pré-autophagosomale (PAS) 114
4.2 Elongation de la membrane, reconnaissance des clients, et clôture de l'autophagosome 115
4.3 Transport des autophagosomes et fusion avec les lysosomes 116
4.4 Augmentation du flux autophagique/Blocage de la fusion ? 118
5. Facteur de transcription NFκB 120

Conclusion générale **123**
Perspectives et discussion **127**
Publication **141**
Modulation of protein quality control and proteasome to autophagy switch in immortalized myoblasts from Duchenne Muscular Dystrophy patients (Wattin et al.)
Matériel & Méthodes **183**
Références bibliographiques **191**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Conformation protéique et état énergétique
Figure 2 : Conformation, agrégation protéique et Contrôle Qualité des Protéines (PQC)
Figure 3 : Reconformation protéique par les HSP70
Figure 4 : Reconformation protéique par les HSP90
Figure 5 : Reconformation protéique par les chaperonines
Figure 6 : Mécanisme d'action des petites HSP (HSPB)
Figure 7 : Le processus d'ubiquitination
Figure 8 : L'ubiquitine
Figure 9 : Les protéasomes
Figure 10 : BAG1 et adressage à l'UPS
Figure 11 : Les différentes formes d'autophagie
Figure 12 : Mécanisme de formation des autophagosomes
Figure 13 : Le transport des autophagosomes
Figure 14 : NFκB, voie canonique et non canonique
Figure 15 : Organisation générale des muscles striés squelettiques
Figure 16 : Organisation subcellulaire du muscle strié squelettique - Sarcomères et complexes d'ancrage
Figure 17 : Le muscle strié squelettique, de la cellule satellite à la fibre musculaire
Figure 18 : Les différents types de mutations impliqués dans les dystrophinopathies

Table 1 : La famille des HSP70
Table 2 : La famille des HSP90
Table 3 : La famille des chaperonines
Table 4 : La famille des petites HSP/sHSP/HSPB
Table 5 : Code ubiquitine et processus cellulaires associés
Table 6 : Les dystrophies musculaires et leur prévalence
Table 7 : Les dystrophies musculaires et leurs défauts génétiques primaires

RESULTATS

Figure 19 : Analyse du potentiel prolifératif des lignées de myoblastes immortalisés
Figure 20 : Capacité de différenciation des lignées de myoblastes immortalisés
Figure 21 : Analyse de l'expression de la dystrophine dans les lignées de myoblastes

immortalisés
Figure 22 : Analyse du taux de protéines multiubiquitinées et de p62 dans les lignées de myoblastes immortalisés
Figure 23 : Analyse de l'agrégation protéique
Figure 24 : Analyse de l'expression des foldases
Figure 25 : Activité chaperon des foldases
Figure 26 : Analyse de l'expression des holdases
Figure 27 : Holdases et agrégation protéique
Figure 28 : HSPB5 et cytosquelette
Figure 29 : Activité enzymatique du protéasome dans les myoblastes contrôle et DMD
Figure 30 : Expression des E3 ligases MuRF1 et MAFbx/Atrogin
Figure 31 : Analyse de l'expression de BAG1 (-L, -M, BAG1 et -S)
Figure 32 : Switch BAG1/BAG3
Figure 33 : Analyse de l'expression de PI3KIII, BECN1 et BCL-2
Figure 34 : Analyse des taux protéiques de différents acteurs de l'autophagie
Figure 35 : Transport et maturation des autophagosomes
Figure 36 : Augmentation du flux autophagique
Figure 37 : NFκB et contrôle qualité des protéines

TABLE DES ABREVIATIONS

ACD : *αCrystallin Domain*

ATG : *Autophagy gene*

BAG : *BCL-2-associated AthanoGene*

BCL-2 : *B-Cell Lymphoma 2*

BDNF : *Bone-Derived Neurotrophic Factor*

BECN1 : Becline 1

BMD : *Becker Muscular Dystrophy*

CASA : *Chaperone-Assisted Selective Autophagy*

CMA : *Chaperone-Mediated Autophagy*

CMD : *Congenital Muscular Dystrophy*

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DBD : *DNA Binding Domain*

DGC : *Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*

DM : Dystrophie Myotonique

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

EDMD : *Emery-Dreyfuss Muscular Dystrophy*

ESCRT : *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

FOXO3A : *FOrkhead boX O3A*

FSHMD : *FascioScapuloHumeral Muscular Dystrophy*

HDAC6 : *Histone DeACetylase 6*

HECT : *Homologous to the E6AP Carboxy Terminus*

HSF : *Heat Shock Factor*

HSP : *Heat Shock Protein*

IκB : *Inhibitors of κB*

IKK : *IκB Kinase*

LC3 : *microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3*

LGMD : *Limb-Girdle Muscular Dystrophy*

LIR : *LC3-Interacting Region*

LPS : *Lipopolysaccharide*

MD : *Mid Domain*

MHC : *Myosin Heavy Chain*

MTOC : Centre organisateur des microtubules

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

MVB : *MultiVesicular Bodies*

NBD : *Nucleotide Binding Domain*

NEF : *Nucleotide Exchange Factor*

NFκB : *Nuclear Factor κB*

NLS : *Nuclear Localization Sequence*

NMD : *Nonsense-mediates mRNA Decay*

nNOS : *neuronal Nitric Oxide Synthase*

OPMD : *OculoPharygeal Muscular Dystrophy*

PAS : Structure pré-autophagosomale

PE : PhosphatidylEthanolamines

PI3K : *PhosphatidylInositol-3-Kinase*

PQC : *Protein Quality Control*

Raptor : *Regulatory-Associated Protein of mTOR*

RBR : *RING-Between RING-RING*

RHD : *Rel Homology Domain*

Rictor : *Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*

SBD : *Susbtrate Binding Domain*

SNARE : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*

TNFα : *Tumor Necrosis Factor α*

TPPP : *Tubulin-Polymerization Promoting Protein*

UBD : *Ubiquitin-Binding Domain*

UBL : *Ubiquitin-Like domain*

UCMD : *Dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich*

ULK1 : *Unc-51 Like Kinase 1*

UPS : *Ubiquitin-Proteasome System*

VCP : *Valosin-Containing Protein*

RESUME

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance du contrôle qualité des protéines (PQC), c'est à dire des mécanismes de reconformation (chaperons moléculaires) et de dégradation (autophagie, proteasome) des protéines dans différentes pathologies musculaires telles que la dystrophie musculaire d'Ullrich (UCMD), de Duchenne (DMD) ou d'Emery-Dreifuss (EDMD) ; cependant, à l'heure actuelle, aucune n'a été menée sur l'ensemble de ces mécanismes dans un seul et même modèle et sur des cellules musculaires avant leur différenciation en muscles. Nous nous sommes donc intéressés à la fonctionnalité des mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines et à leurs interconnexions dans des myoblastes immortalisés de donneurs sains ou de patients atteints de DMD. Nous avons observé une augmentation de l'agrégation protéique dans les cellules DMD. Ce phénomène s'accompagne d'une dérégulation des mécanismes de séquestration par les chaperons moléculaires, conséquence d'une modulation de l'expression des protéines HSPB5 et HSPB8. Les mécanismes de dégradation sont également dérégulés; en effet, nous avons observé d'une part, une diminution de l'activité enzymatique du protéasome ainsi que des molécules d'adressage des protéines multiubiquitinées au protéasome et d'autre part, une augmentation de l'activité du facteur de transcription NFκB, de l'expression de protéines intervenant dans l'autophagie et des complexes BAG3/HspB8 conduisant à une augmentation du flux autophagique. L'ensemble de ces dérégulations reflète l'existence d'un stress d'agrégation protéique dans les myoblastes issus de patients DMD. Dans ce contexte, la modulation pharmacologique du PQC dans ces cellules pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Le Contrôle Qualité des Protéines (PQC)

1. Conformation native et agrégation des protéines

1.1 Traduction, repliement et conformation native

Pour être fonctionnelles, les protéines doivent atteindre une conformation particulière, déterminée par leur séquence en acides aminés et correspondant à la structure la plus thermodynamiquement stable : la conformation native. Cependant, la recherche du repliement idéal nécessite une forte consommation énergétique (**Figure 1**), celle-ci passant préalablement par de nombreux essais de conformation aléatoires. Ce processus implique donc la mise en place de liaisons faibles (liaisons covalentes ou ioniques, interactions hydrophobes, liaisons de Van Der Walls) ainsi que l'intervention de chaperons moléculaires pour assurer la stabilité de la protéine. En raison de l'environnement aqueux (cytosol, nucléoplasme…) dans lequel se produit le repliement protéique, l'obtention de cette conformation passe par l'internalisation des résidus non polaires, formant un cœur hydrophobe entouré d'une couche hydrophile d'acides aminés polaires. Dans certaines conditions, le processus de repliement peut être perturbé, ayant pour conséquence la formation d'agrégats protéiques et le développement de pathologies.

1.2 Principales causes du mauvais repliement protéique

1.2.1 Changements physiologiques

Le vieillissement est l'une des causes physiologiques principales de l'agrégation protéique. Après un certain nombre de divisions, les cellules deviennent sénescentes et les mécanismes de repliement et de contrôle qualité des protéines perdent de leur efficacité, permettant aux protéines mal conformées de s'agréger ou de s'associer à d'autres partenaires pour former des agrégats toxiques (**Groh et al., 2017**; **Taylor & Dillin, 2011**; **Walther et al., 2015**).

1.2.2 Mutations

Certaines mutations génétiques peuvent causer des changements d'acides aminés au sein de la chaîne polypeptidique (mutation faux-sens), entrainant la modification des propriétés physico-chimiques de celle-ci et un mauvais repliement protéique. Les protéines mal conformées peuvent alors s'agréger entre elles ou former des agrégats *via* des interactions inhabituelles avec d'autres partenaires protéiques. D'autres types de mutations, telles que les expansions nucléotidiques, peuvent donner naissance à de nouvelles structures intra-peptidiques, donnant lieu à des repliements inadéquats et/ou à des interactions inadaptées.

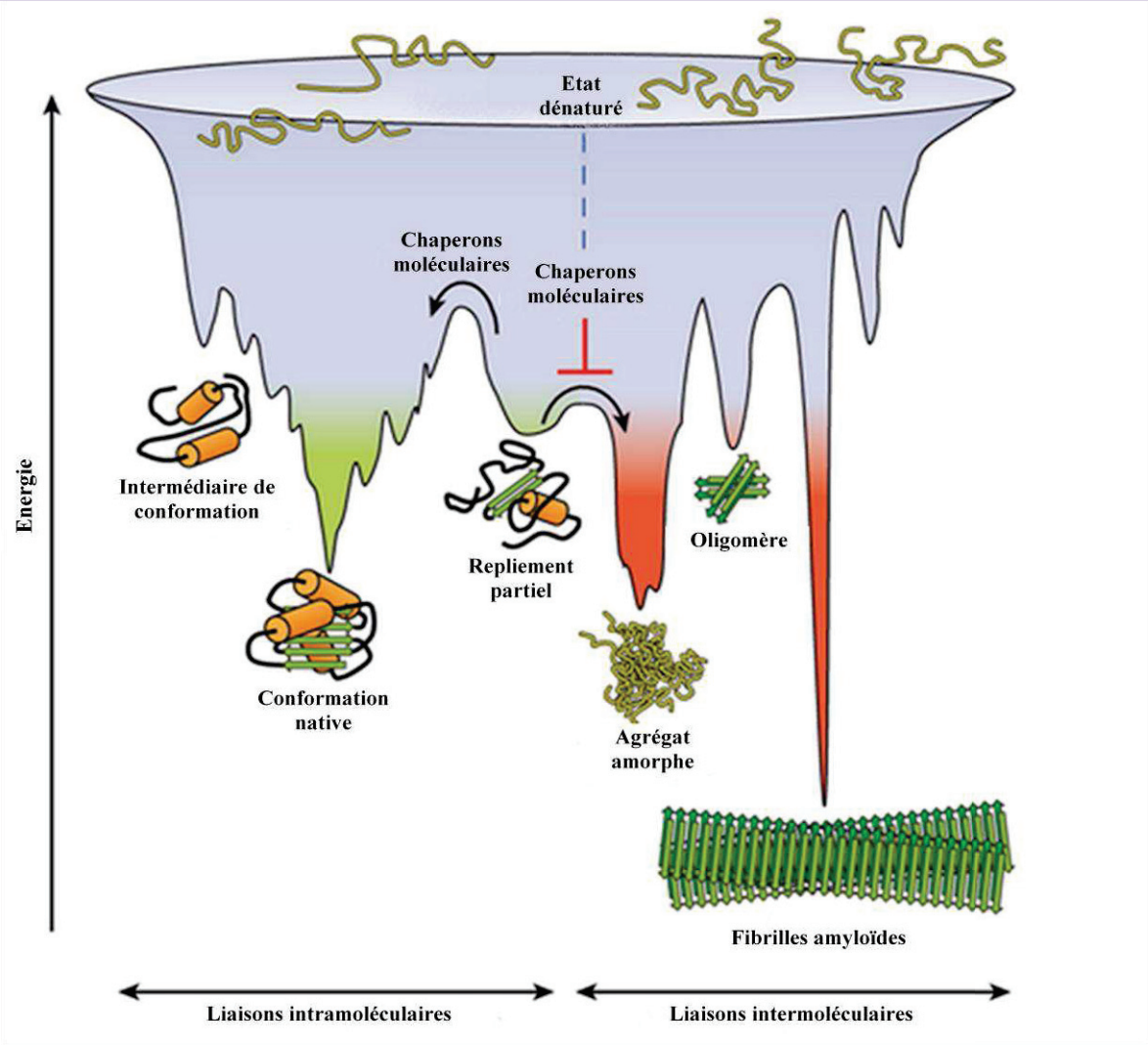


Figure 1 : Conformation protéique et état énergétique (Adapté de Hartl & al., 2011). Lors de leur traduction, les protéines doivent passer par différentes étapes de repliement, en vue d'atteindre la structure la plus thermodynamiquement stable : la conformation native. Cependant, en l'absence de chaperons moléculaires, les protéines ont tendance à s'engager dans les voies de repliement les moins consommatrices d'énergie et vont ainsi former des agrégats.

1.2.3 Stress environnementaux

Les variations de température (**Wallace et al., 2015**) ou de pH (**Balejčíková et al., 2017**) peuvent entrainer la déstabilisation des liaisons intraprotéiques et mener à la dénaturation des polypeptides. Une augmentation de la concentration protéique intracellulaire peut également mener à l'accumulation d'intermédiaires partiellement repliés (**Wang et al., 2010**). Le stress oxydatif ainsi que la concentration en sels du milieu (**Pasquier et al., 2017**) sont aussi des facteurs pouvant faciliter l'agrégation protéique.

1.3 Conséquences d'une mauvaise conformation protéique

1.3.1 Agrégation protéique

L'agrégation protéique est un processus nécessitant un apport énergétique moins important que celui fourni pour atteindre la conformation native d'un polypeptide. Ainsi, à l'état dénaturé et en l'absence de chaperons moléculaires pour les guider, les protéines ont tendance à s'engager spontanément dans la voie la moins consommatrice d'énergie (**Figure 1** ; **Hartl et al., 2011**).

1.3.1.1 *Phase de nucléation*

La formation d'agrégats est un processus multi-étapes (pour revue, voir **Roberts, 2007**), débutant par une phase de « nucléation ». Les protéines dénaturées exposent leurs résidus hydrophobes, générant des forces répulsives contre le cytosol. Pour remédier à cela, ces protéines vont s'associer entre elles par l'établissement de liaisons hydrogènes entre leurs régions non polaires, formant ainsi de manière irréversible un petit oligomère stable : le noyau. C'est à partir de cette structure que vont se développer les agrégats.

1.3.1.2 *Formation des protofibrilles*

L'étape suivante consiste en l'élongation en protofibrilles, filaments fins obtenus à partir de l'ajout de monomères dénaturés ou de l'assemblage de plusieurs noyaux entre eux. Ce processus reste réversible jusqu'à l'apparition de réarrangements structuraux, qui vont entrainer la « fixation » de la protofibrille. Ces filaments seront majoritairement linéaires, du fait de la formation de feuillets β lors des interactions protéine-protéine.

1.3.1.3 *Condensation*

La phase finale du processus d'agrégation est la condensation. Les protofibrilles vont s'assembler et former 3 catégories d'agrégats protéiques :

- Les agrégats amorphes, ne possédant pas d'organisation structurale particulière et formés de manière rapide (**Borgia et al., 2013**)
- Les fibrilles amyloïdes, résultant de l'association latérale de protofibrilles (**Dovidchenko et al., 2014**)
- Les gels (**Woodard et al., 2014**), issus de l'association de structures en feuillets β.

Une même protéine peut adopter plusieurs types de structures lors de son agrégation. On parle alors de polymorphisme d'agrégation (**Kodali & Wetzel, 2007**).

1.3.2 Agrégation protéique et pathologies, quelques exemples

La formation d'agrégats est impliquée dans le développement de diverses pathologies, appelées maladies d'agrégation protéique. Le caractère pathogène de cette agrégation peut se traduire de 2 façons, survenant parfois de manière combinée : d'une part en conférant aux protéines une foncion abérrante, souvent une toxicité pour les cellules, et d'autre part, en entrainant la perte de la fonction propre de la protéine agrégée (**Yang & Hu, 2016**).

1.3.2.1 *αB-crystalline/HSPB5*

L'αB-crystalline, aussi connue sous le nom d'HSPB5, est une petite protéine de choc thermique possédant une activité de chaperon moléculaire, localisée dans le cristallin de l'œil, mais aussi fortement exprimée dans les tissus musculaires (cf. **paragraphe 2.2.2 de ce chapitre**). Diverses études ont décrit l'implication de mutations de cette protéine dans le développement de cardiomyopathies, myopathies myofibrillaires et cataractes (**Safieh et al., 2009**; **Simon et al., 2007a**; **Vicart et al., 1998**).

La mutation R120G est la plus communément étudiée. Elle entraine des défauts structuraux de la protéine, conduisant à l'inhibition de son activité de chaperon moléculaire (**Simon et al., 2007b**) et à son agrégation avec la desmine, un type de filament intermédiaire avec lequel HSPB5 interagit.

1.3.2.2 *Huntingtine*

L'huntingtine est une protéine neuronale, impliquée dans le transport vésiculaire axonal d'un facteur neurotrophique, le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Cette molécule est

essentielle pour permettre la survie des cellules nerveuses (**Gauthier et al., 2004**). Le rôle protecteur de l'huntingtine lui est aussi conféré par sa capacité à inhiber la voie apoptotique intrinsèque en empêchant le clivage de la procaspase 9 (**Rigamonti et al., 2000 ; Rigamonti et al., 2001**).

La Chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative causée par l'expression d'une forme mutée de l'huntingtine, présentant une augmentation du nombre de répétitions du triplet CAG dans sa séquence nucléotidique, donnant lieu à une expansion polyglutamine dans la protéine (PolyQ). En temps normal, cette protéine possède entre 6 et 36 résidus glutamine, mais en cas de mutation, ce nombre varie entre 37 et 155 (**The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993**). Le caractère polaire de ces acides aminés entraine chez la protéine mutée des repliements non physiologiques conduisant à son agrégation. Ce problème de conformation provoque des anomalies de transmission du BDNF, ainsi que l'induction de la voie apoptotique intrinsèque, menant à la mort progressive des neurones des patients.

Ainsi, l'accumulation d'agrégats protéiques peut se révéler toxique pour l'organisme et faciliter, voire promouvoir, le développement de pathologies. Afin de lutter contre cet effet néfaste, les cellules possèdent des mécanismes efficaces de reconformation et de dégradation, regroupés sous l'appellation « Contrôle Qualité des Protéines » (**Figure 2**). Ces mécanismes sont étroitement connectés et agissent de façon synergique pour empêcher l'activation des voies de mort cellulaire.

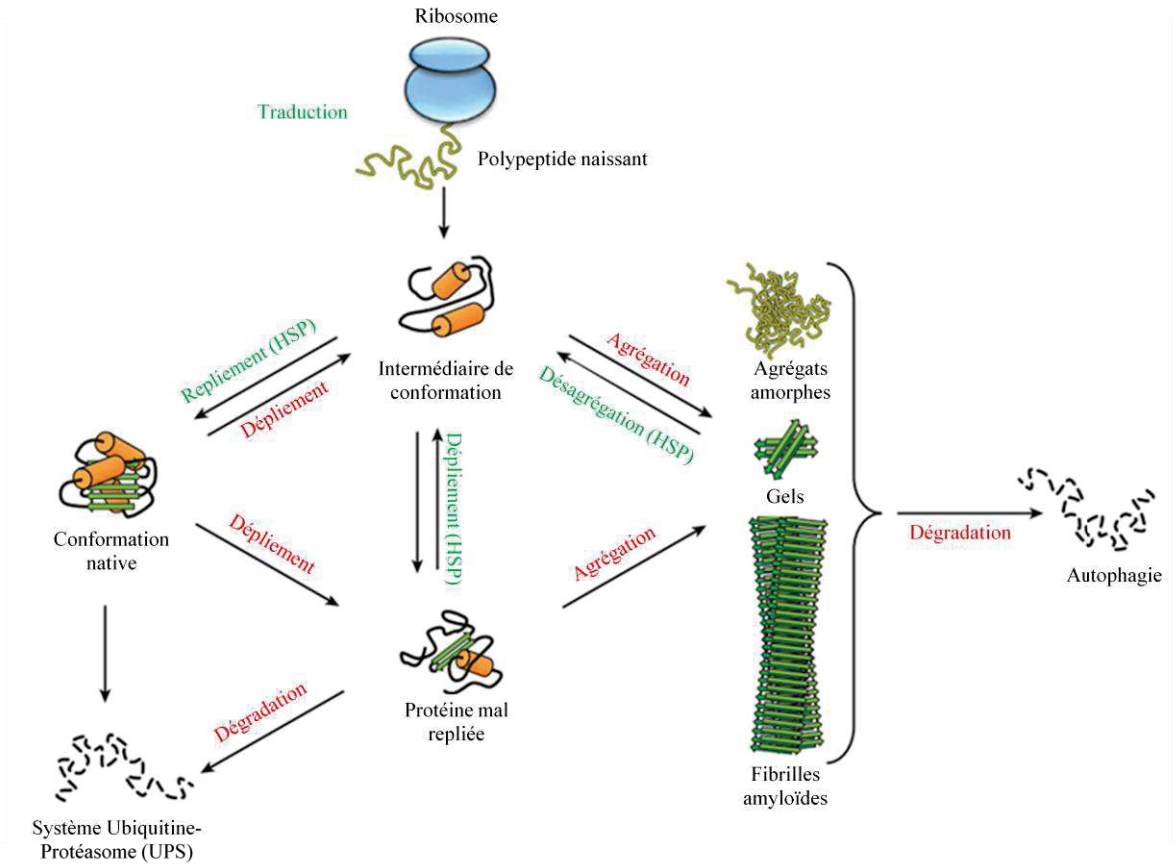


Figure 2 : Conformation, agrégation protéique et Contrôle Qualité des Protéines (PQC). Lors de leur traduction, les protéines doivent passer par des étapes successives de repliement, afin d'atteindre leur conformation native et être fonctionnelles. Cependant, le vieillissement, les mutations génétiques ou l'exposition à divers stress environnementaux peuvent perturber ce processus. Les polypeptides mal repliés sont alors soumis au Contrôle Qualité des Protéines, constitué de mécanismes de reconformation, de désagrégation et de dégradation, empêchant l'accumulation de ces protéines mal conformées, leur agrégation et *in fine*, la mort cellulaire (**Adapté de Hartl et al., 2011**).

2. Contrôle Qualité des Protéines par reconformation : Les chaperons moléculaires, dont les protéines de choc thermique (HSP pour *Heat Shock Proteins*)

Les chaperons moléculaires sont des protéines dont la fonction est d'assurer le bon repliement post-traductionnel de polypeptides, en les aidant à masquer ou à internaliser leurs résidus hydrophobes et en empêchant leur agrégation spontanée. Les protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins*, ou HSP) sont les premiers chaperons à avoir été mis en évidence dans les années 1960, dans les glandes salivaires de drosophiles ayant subi un stress thermique, et sont les plus abondamment décrits (**Ritossa, 1962**). Les protéines de cette famille sont impliquées dans de nombreux processus tels que :

- le repliement traductionnel et post-traductionnel de polypeptides nouvellement synthétisés et le transport de protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique ou des mitochondries (**Gambill et al., 1993**).
- la réponse à de nombreux stress physiques, chimiques ou métaboliques (reconnaissance de clients (set de protéines interagissant spécifiquement avec chaque chaperon moléculaire) mal conformés et/ou agrégés, reconformation protéique, dissociation des agrégats, adressage aux mécanismes de dégradation ; **Agarraberes & Dice, 2001**; **Patterson & Höhfeld, 2007**).
- l'activation des processus de mort cellulaire, lors d'un stress trop important ou lorsque la réponse au stress est insuffisante pour maintenir l'intégrité cellulaire (**Garrido et al., 2001**).

Les chaperons moléculaires peuvent également interagir avec des co-chaperons. La fonction biologique des HSP est alors déterminée par leur interaction spécifique avec ces partenaires protéiques (**Caplan, 2003**).

L'expression de ces *Heat Shock Proteins* dans la quasi-totalité des organismes vivants (**Feder & Hofmann, 1999**) démontre l'importance de leur activité dans le maintien de la protéostasie. La classification de ces protéines a été faite principalement en fonction de leur poids moléculaire et de leur fonction (**Kampinga et al., 2009**; **HUGO Gene Nomenclature Committee**, http://www.genenames.org/).

2.1 Chaperons dépendants de l'ATP permettant la reconformation : la famille des foldases

2.1.1 HSPA/Hsp70 (**Table 1**)

L'expression des protéines de la famille des HSP70 en réponse à divers stress (choc thermique, hypoxie, privation trophique…), a été initialement décrite chez la drosophile dans les années 1960 ; la conservation des HSPA dans les 3 principaux règnes du monde vivant (archées, eucaryotes et bactéries) a été démontrée quelques années plus tard (**Bardwell & Craig, 1984**).

Ubiquitaires, ces protéines peuvent se trouver sous forme libre ou complexées à divers éléments cellulaires, tels que des peptides antigéniques ou des exosomes. Chez l'humain, 13 protéines de 66 à 78 kDa sont codées par 17 gènes ; on peut également noter l'existence de 30 pseudogènes (**Brocchieri et al., 2008**). Malgré leurs poids moléculaires similaires, les membres de cette famille possèdent chacun des particularités (pour revue, voir **Daugaard et al., 2007**; **Vos et al., 2008**). On peut ainsi les classer en 2 groupes : les HSP70 exprimées de

façon constitutive (HSPA1L, HSPA2, HSPA8/HSC70, HSPA5) et celles induites par l'exposition à divers stress (HSPA1, HSPA6, HSPA7, HSPA13). Enfin, certains membres de cette famille ne sont encore que très peu étudiés (HSPA12A/B, HSPA14) et n'ont pas de fonction ou de localisation connue.

Nom	Localisation	Inductibilité	Fonction principale
HSPA1A/Hsp70-1	Cytosol, noyau, lysosomes	Oui	Réponse au stress, thermotolérance
HSPA1B/Hsp70-2			
HSPA1L	Cytosol, noyau	Non	Phase post-méiotique de la spermatogenèse (**Matsumoto & Fujimoto, 1990**)
HSPA2			Méiose de la spermatogenèse (**Zhu & al., 1997**)
HSPA5/BiP/Grp78	Réticulum endoplasmique		PQC du RE
HSPA6	Cytosol, noyau	Oui (uniquement)	Réponse au stress
HSPA7			
HSPA8/Hsc70	Cytosol, noyau	Non	Repliement post-traductionnel
HSPA9	Mitochondries (**Mizzen & al., 1989**)		PQC mitochondrial
HSPA12A	?		
HSPA12B			
HSPA13	Microsomes (**Otterson & al., 1994**)	Oui (par le calcium)	?
HSPA14	Cytosol, ribosomes	?	Repliement post-traductionnel (**Wan & al., 2004**)

Table 1 : La famille des HSP70. La famille des HSP70 est constituée de 13 membres, se distinguant à la fois par leur localisation, leur capacité à être activés sur le plan transcriptionnel ainsi que leur(s) fonction(s) subcellulaire(s).

Les protéines Hsp70 sont constituées de 2 domaines fonctionnels :

- Le domaine NBD (*Nucleotide Binding Domain*), situé dans la partie N-terminale, conservé chez tous les membres de cette famille, qui possède l'activité catalytique permettant l'hydrolyse de l'ATP.

- Le domaine SBD (*Substrate Binding Domain*), situé dans la partie C-terminale, permettant la reconnaissance et la liaison aux régions hydrophobes des protéines mal conformées.

La fixation de l'ATP sur le NBD permet au SBD d'adopter une conformation « ouverte », nécessaire pour lier les substrats mal conformés. Cette liaison, ainsi que l'intervention de partenaires protéiques tels que les chaperons moléculaires de la famille HSP40, stimulent

l'hydrolyse de l'ATP et la reconformation des clients. S'ensuit le relargage de l'ADP, grâce à l'intervention de facteurs d'échange nucléotidique (NEF, pour *Nucleotide Exchange Factor*), et la libération de la protéine correctement repliée (**Figure 3**).

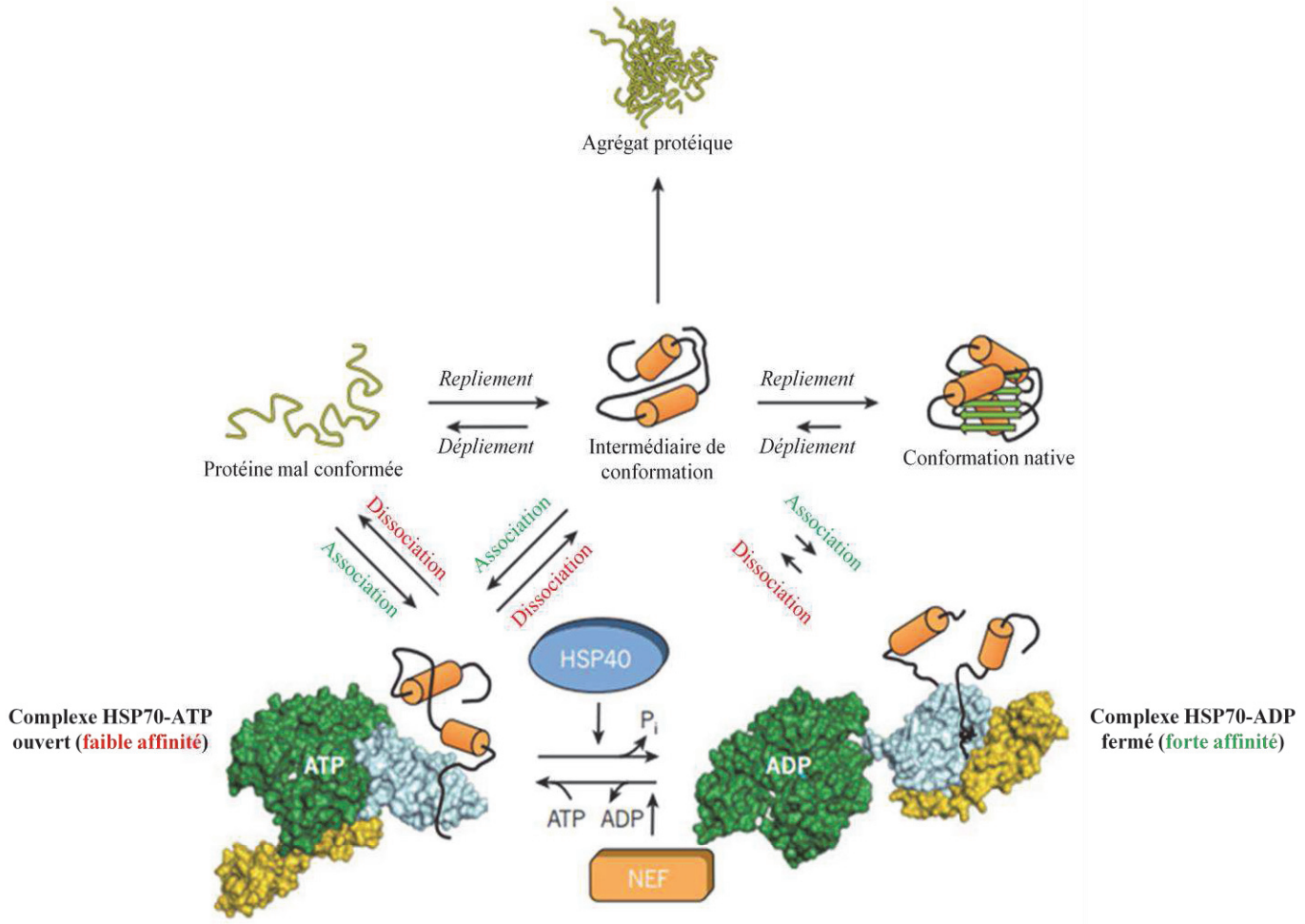


Figure 3 : La reconformation protéique par les HSP70 (Adapté de Hartl & al., 2011). Les protéines mal repliées, ainsi que les intermédiaires de conformation, sont reconnus par les complexes HSP70-ATP, dont la conformation est à l'état « ouvert ». Cette liaison, couplée à l'intervention de partenaires protéiques tels que les HSP40, entraine l'hydrolyse de l'ATP et la fermeture du complexe HSP70-ADP. Tant que ce complexe est sous cette forme, il lui est impossible de lier d'autres clients, jusqu'à reconformation et relargage du client en cours.

L'expression de ces chaperons moléculaires (pour revue, voir **Stephanou & Latchman, 2011**), dépend majoritairement de la famille des facteurs de transcription HSF (*Heat Shock Factor* ; **Akerfelt et al., 2010**; **Pirkkala et al., 2001**) et en particulier de HSF1. D'autres régulateurs ont été décrits pour activer la transcription des gènes Hsp70, notamment STAT1/STAT3, activés respectivement par l'interféron γ et l'IL-6, et la voie NF-IL6.

L'ensemble de ces régulateurs est exprimé suite à l'activation de diverses voies de signalisation, telles que les voies MAPK/ERK, JNK, ou NFκB.

2.1.2 HSPC/HSP90 (**Table 2**)

Les protéines de la famille Hsp90 possèdent un poids moléculaire d'environ 90kDa. L'un des rôles majeurs de cette classe de Hsp est de réguler la fonction des récepteurs aux stéroïdes, en modifiant leur conformation initiale (**Pratt, 1998**). Le génome humain possède 6 gènes codant pour 5 protéines distinctes, ainsi que 11 pseudogènes.

Nom	Localisation	Inductibilité	Fonction principale
HSPC1/HSP90α1	Cytosol	Oui	Réponse aux stress
HSPC2/HSP90α2			
HSPC3/HSP90β		Non	Repliement post-traductionnel
HSPC4/GP96	Réticulum endoplasmique	?	Repliement de protéines sécrétées (**Randow & Seed, 2001**)
HSPC5/TRAP1	Mitochondrie (**Felts & al., 2000**)	Oui (par le stress oxydatif ; **Pridgeon & al., 2007**)	PQC mitochondrial

Table 2 : La famille des HSP90. Chez l'humain, il existe 5 membres de la famille des HSP90 : HSPC1/HSP90α1 et HSPC2/HSP90α2, cytosoliques et inductibles par les stress environnementaux, HSPC3/HSP90β, exprimée de façon constitutive, HSPC4/GP96 spécifique du réticulum endoplasmique et HSPC5/TRAP1, forme mitochondriale.

Comme les Hsp70, les Hsp90 possèdent un domaine NBD dans leur partie N-terminale, permettant la liaison et l'hydrolyse des molécules d'ATP. Dans la région C-terminale se trouve un domaine responsable du recrutement de co-chaperons, grâce à la présence d'une séquence spécifique MEEVD, ainsi que de l'oligomérisation de HSP90 avec d'autres partenaires protéiques. En effet, la fonctionnalité de ces chaperons moléculaires dépend de leur capacité à former des homo/hétéro-oligomères. Enfin, un 3ème domaine MD (*Mid Domain*), situé dans la région intermédiaire des protéines, permet la liaison spécifique du substrat et potentialise l'activité ATPasique du domaine NBD. Les dimères de Hsp90 forment une pince, au creux de laquelle les clients mal conformés vont venir se fixer. Lorsque l'ATP se fixe sur les NBD, les parties N-terminales des deux sous unités se rejoignent, formant un « couvercle », rendant le système clos durant la reconformation protéique. L'hydrolyse de l'ATP permet ensuite le relargage du substrat correctement replié (**Pearl & Prodromou, 2006** ; **Figure 4**).

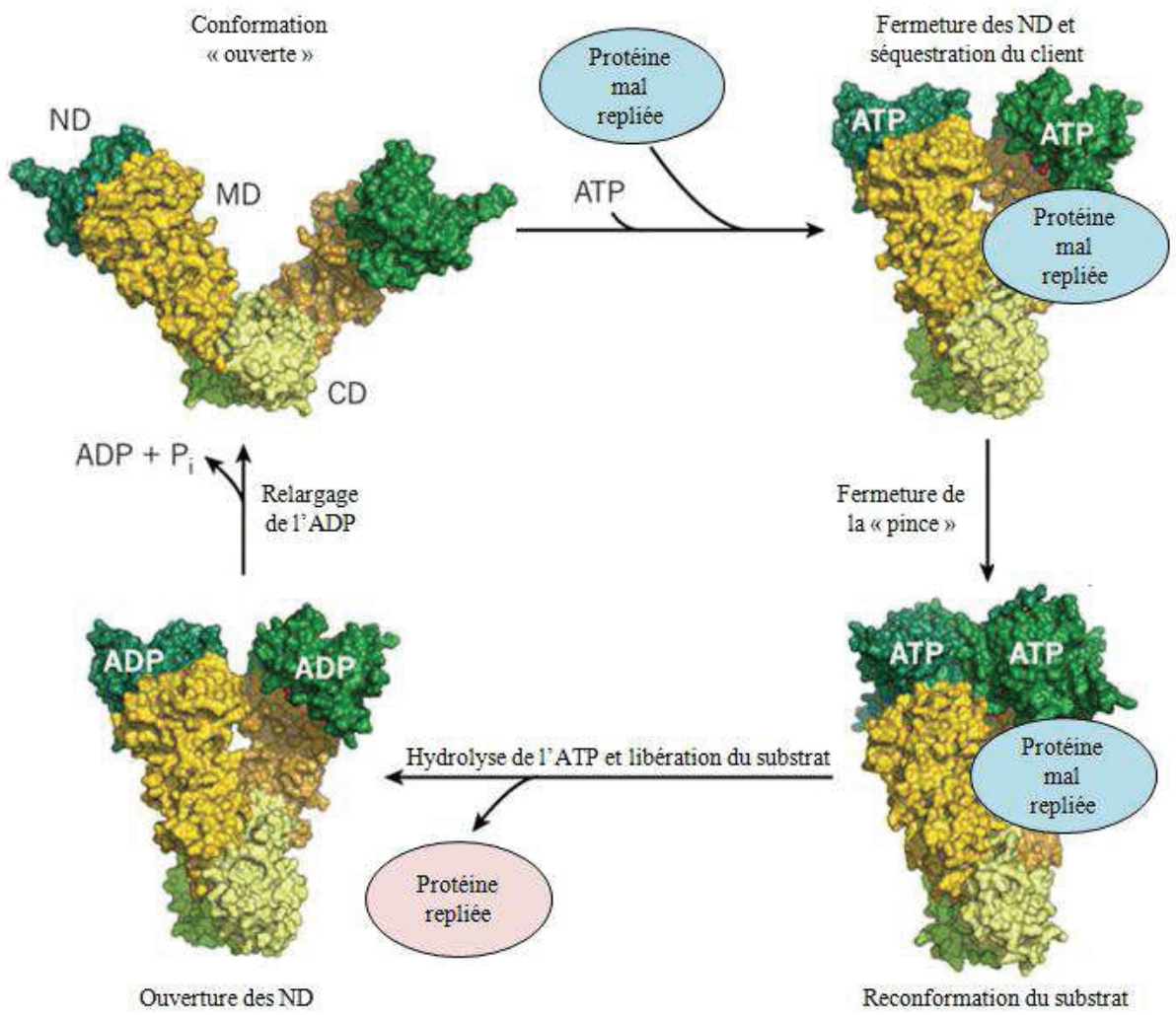


Figure 4 : La reconformation protéique par les HSP90 (Adapté de Hartl & al., 2011). La machinerie de reconformation médiée par HSP90 se compose d'un dimère de HSP90, interagissant grâce à leurs domaines CD respectifs. Les protéines mal conformées sont recrutées au niveau des domaines intermédiaires (MD) et la fixation d'ATP sur les extrémités N-term entraine la fermeture de la « pince ». L'hydrolyse de l'ATP provoque la reconformation du substrat, puis sa libération, tandis que la pince se rouvre. Le relargage d'ADP et du phosphate inorganique (Pi) est responsable du retour à l'état basal du dimère HSP90/HSP90.

La régulation de l'expression et de l'activité des Hsp90 passe par l'activation des facteurs de transcription HSF, ainsi que par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, acétylations, S-nitrosylation, oxydations ou ubiquitinations (**Mollapour & Neckers, 2012**).

2.1.3 Les chaperonines

La famille des chaperonines est subdivisée en 2 catégories (**Table 3**) :

- Le type I : Les chaperonines Hsp60/Hsp10, équivalents eucaryotes des protéines GroES/GroEL bactériennes, impliquées dans la translocation et le repliement de protéines mitochondriales.

- Le type II : Les protéines CCT formant le complexe cytosolique TRiC, interagissant avec environ 10% du protéome total des cellules (**Yam et al., 2008**). Ce complexe est notamment impliqué dans la biogenèse de la tubuline ainsi que dans la conformation de l'actine et de la tubuline (**Sternlicht et al., 1993**).

Nom	Localisation	Inductibilité	Fonction principale
CCT1/TCP1	Cytosol	Oui	Chaperon moléculaire de l'actine et la tubuline ; Rôle dans la ciliogenèse
CCT2			
CCT3			
CCT4			
CCT5			
CCT6A			
CCT6B			
CCT7			
CCT8			
HSPD1/HSP60	Mitochondrie		Chaperon moléculaire des protéines mitochondriales

Table 3 : La famille des chaperonines. La famille des chaperonines est composée de 2 types de protéines : Le type I, formé des protéines HSP60 et de leurs co-chaperons moléculaires HSP10, et le type II, constitué des protéines CCT, sous-unités à l'origine du complexe TRiC.

Ces chaperons moléculaires, organisés en complexes heptamériques (Hsp60) ou octamériques (TRiC), forment des « tonneaux », dans lesquels vont se lier les intermédiaires de conformation (**Figure 5**). La liaison d'une molécule d'ATP dans la cavité permet le recrutement de ces intermédiaires de conformation. L'hydrolyse de l'ATP permet la fermeture de la cavité (assistée du co-chaperon HSP10 dans le cas de HSP60, **figure 5A** ; autonome dans le cas de TRiC, **figure 5B**), ainsi que la reconformation du client. Le relargage du phosphate inorganique généré par cette hydrolyse (ADP + Pi) entraine la réouverture du complexe, et la libération du client reconformé.

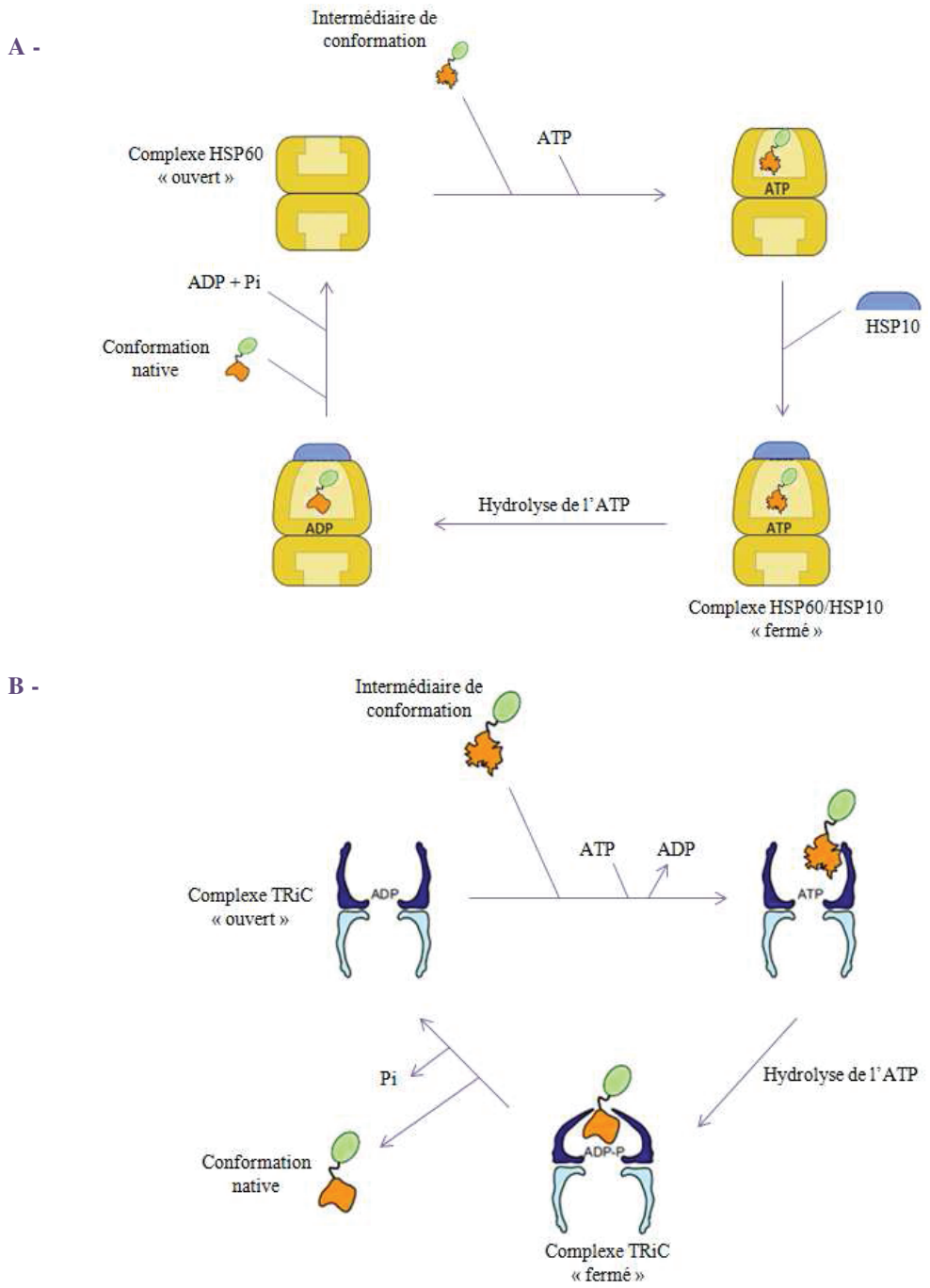


Figure 5 : La reconformation protéique par les chaperonines. Les chaperonines ont une structure en forme de « tonneau » dans laquelle vont se nicher les substrats mal repliés. L'hydrolyse de l'ATP provoque la fermeture de la cavité et la reconformation protéique. **A -** Reconformation par le complexe HSP60/HSP10 (adapté de **Hayer-Hartl & al., 2016**). **B -** Reconformation par le complexe TRiC (adapté de **Rüβmann & al., 2012**)

2.1.4 Les co-chaperons moléculaires

Les co-chaperons moléculaires (**Caplan, 2003**) sont des protéines assistant les foldases lors du processus de reconformation, en stimulant l'hydrolyse de l'ATP ou en assurant l'échange de nucléotide (on parle alors de NEF, pour *Nucleotide Exchange Factor*). Ces co-chaperons

déterminent également la spécificité des réactions catalysées en présentant spécifiquement HSP70 ou HSP90 aux clients mal conformés. Chez les mammifères, on dénombre plus de 100 co-chaperons, appartenant à 2 classes majoritaires :

- Les protéines à domaine J, dont font partie les protéines HSP40, interagissant uniquement avec les HSP70
- Les protéines à répétitions tétratricopeptides (TPR, pour *TetratricoPeptide Repeats*), capables d'interagir avec HSP70 ou HSP90

Parmi ces co-chaperons moléculaires, on trouve également les protéines de la famille BAG (*BCL-2-associated AthanoGene*), agissant comme des facteurs d'échange de nucléotide (NEF pour *Nucleotide Exchange Factor*) d'HSP70. Les protéines BAG1 et BAG3 ont également été décrites pour participer à l'adressage des clients d'HSP70 aux différents mécanismes de dégradation (protéasome ou autophagie ; voir **Introduction, Chapitre 1, 2.2.3** & **3.3.3**).

2.2 Chaperons indépendants de l'ATP servant de réservoir pour protéines mal conformées : les petites Hsp (HSPB) ou holdase

Les sHSP (small Heat Shock Proteins)/HSPB sont des petites protéines de choc thermique dont le poids moléculaire varie entre 12 et 43kDa. Le rôle majeur de ces HSP est d'empêcher l'agrégation de clients mal conformés, en interagissant avec leurs intermédiaires de conformation de façon ATP-indépendante (**Figure 6**), permettant ensuite leur adressage aux mécanismes de reconformation (foldases) ou de dégradation (protéasome ou autophagie).

Chez l'humain, cette famille comporte 11 membres, séparés en 2 classes :

- la classe I comprend HspB1/Hsp27, HspB5/αB-crystalline, HspB8/Hsp22 et HspB6/Hsp20 : ce sont des sHSP ubiquitaires dont l'expression est inductible par divers stress (thermique, oxydatif…) et impliquées dans la survie cellulaire.
- la classe II regroupe HspB2/MKBP, HspB3, HspB4/αA-crystalline, HspB7/cHSP, HspB9/CT51, HspB10/ODFP et HspB11/IFT25, protéines dont l'expression est le plus souvent tissu-dépendante mais non-inductible. Ces sHSP interviennent dans le développement, la différenciation (**Sugiyama & al., 2000**) ou d'autres processus tissu-spécifiques, tels que le maintien de la structure des spermatozoïdes (HSPB10), ou la transparence du cristallin (HSPB4).

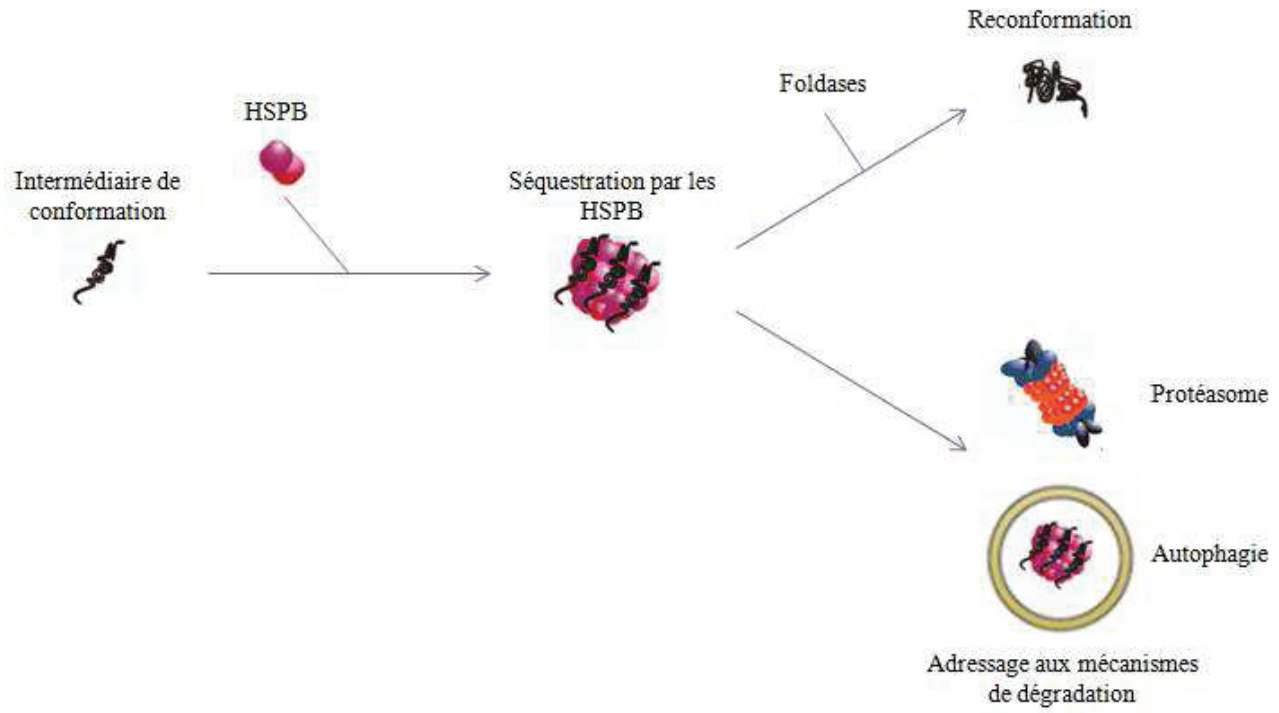


Figure 6 : Mécanisme d'action des petites HSP/HSPB (Inspiré de Vos & al., 2011). Les petites protéines de choc thermique possèdent une activité de holdase, consistant à lier les intermédiaires de conformation de façon ATP-indépendante, afin d'empêcher leur agrégation en attendant l'intervention des mécanismes de reconformation (foldases) ou de dégradation.

D'un point de vue structural, les sHSP partagent un domaine ACD (*α-Crystallin Domain*), entouré d'une région C-terminale et d'une région N-terminale dont la longueur et la composition sont variables. Ce domaine ACD permet l'interaction entre sous-unités et leur oligomérisation, menant à la formation d'homo- ou hétérocomplexes de haut poids moléculaire (**Arrigo, 2013**). Cette interaction est nécessaire au bon fonctionnement de ces chaperons moléculaires, mais aussi à leur stabilité.

La suite de ce chapitre traitera plus particulièrement des protéines HspB1/Hsp27, HspB5/Hsp25 et HspB8/Hsp22, membres les plus étudiés des sHSP.

Nom	Localisation	Inductibilité	Fonction principale
HSPB1/HSP27	Ubiquitaire	Oui	Anti-apoptotique ; Protection du cytosquelette et des structures sarcomériques ; Lutte contre le stress oxydatif
HSPB2		Non	Anti-apoptotique (**Oshita & al., 2010**) ; Régulation de la MDPK (**Sugiyama & al., 1998**)
HSPB3			Inhibition de la polymérisation du cytosquelette d'actine
HSPB4/αA-Cry	Noyau, cytosol		Transparence du cristallin (**Nagaraj & al., 2012**)
HSPB5/αB-Cry	Ubiquitaire	Oui	Chaperon moléculaire de l'actine, la tubuline, la desmine, la titine, la vimentine…
HSPB6	Noyau, cytosol, cytosquelette, mitochondries		Protection des muscles lisses et cardiaque (**Dreiza & al., 2010**)
HSPB7		Non	Protection contre l'agrégation polyQ (**Vos & al., 2010**)
HSPB8/HSP22	Ubiquitaire	Oui	Activation du processus autophagique
HSPB9	Noyau, cytosol	Non	Protection contre l'agrégation polyQ (**Vos & al., 2010**)
HSPB10	Noyau, cytosol, cytosquelette, mitochondries		Maintien des structures de la queue des spermatozoïdes (**Yang & al., 2012**)
HSPB11	Noyau, cytosol, cytosquelette		Transduction du signal dans les cils (**Keady & al., 2012**) ; transport intraflagellaire (**Liu & al., 2017**)

Table 4 : La famille des petites HSP/sHSP/HSPB. Chez l'humain, on dénombre 11 HSPB, impliquées dans des processus cellulaires très variés. Ces sHSP peuvent être divisées en 2 groupes : celles qui sont inductibles par les stress environnementaux (HSPB1, B5, B6 et B8), et celles qui ne le sont pas (HSPB2, B3, B4, B7, B9, B10 et B11).

2.2.1 HspB1/HSP27

L'expression de HspB1, aussi connue sous le nom d'Hsp27, a été mise en évidence pour la première fois dans les années 1980, suite au traitement de cellules HeLa par choc thermique (**Arrigo & Welch, 1987**). Cette protéine joue un rôle majeur dans la protection cellulaire, lors de l'exposition à divers stress environnementaux (UV, changements de température ; **Shi et al., 2008**), métaboliques (hypoxie, hypoglycémie ; **Zhang et al., 2017**) ou systémiques (infection, inflammation ; **Sur et al., 2008**). En cas de stress oxydatif, la liaison d'HspB1 aux protéines oxydées permet leur adressage aux mécanismes de dégradation (**Arrigo, 2001**). De plus, son interaction avec des substrats partiellement mal conformés permet d'éviter leur

agrégation et entraine la formation de « réservoirs » centralisant les agrégats toxiques avant leur élimination.

En tant que chaperon moléculaire, Hsp27 est impliquée dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine (**Lavoie et al., 1993**), des structures sarcomériques musculaires (**Yoshida et al., 1999**) et de structures tissulaires lors de leur différenciation (**Jonak et al., 2011**). De plus, elle intervient dans la réponse anti-apoptotique (**Mymrikov et al., 2011**) :
- intrinsèque, en inhibant le relargage de cytochrome C et la formation de l'apoptosome (**Bruey et al., 2000**; **Havasi et al., 2008**; **Pandey et al., 2000**; **Rane et al., 2003**)
- extrinsèque, en empêchant la translocation cytosolique de DAXX (**Charette & Landry, 2000**).
Cependant, si ce rôle cytoprotecteur peut se révéler bénéfique, il peut aussi avoir des effets néfastes (**Garrido et al., 2006**). En effet, HspB1 peut conférer aux cellules tumorales une résistance face aux traitements thermiques et/ou chimiques (**Chauhan et al., 2003**; **Garrido et al., 1998**; **Kanagasabai et al., 2010**; **Lin et al., 2012**).

2.2.2 HSPB5/αB-crystalline

Malgré sa découverte en 1894 dans le cristallin, HspB5, aussi appelée αB-crystalline, n'a été répertoriée comme petite protéine de choc thermique qu'à partir de 1982 (**Ingolia & Craig, 1982**) et son activité de chaperon moléculaire a été mise en évidence quelques années plus tard (**Horwitz, 1992**).

L'αB-crystalline intervient dans divers mécanismes physiologiques, tels que le maintien de la transparence de l'œil, la migration cellulaire (**Maddala & Rao, 2005**) ou encore la stabilisation du cytosquelette et des structures sarcomériques. En effet, HSPB5 exerce sa fonction de chaperon moléculaire en interagissant avec les microfilaments d'actine suite à un stress thermique (**Singh et al., 2007**), avec la titine (**Bullard et al., 2004**), mais aussi avec les filaments intermédiaires de vimentine (**Djabali & al., 1997**) et de desmine (**Wang et al., 2003**). De même, HSPB5 est impliquée dans la modulation de l'assemblage des microtubules, grâce à son interaction avec la tubuline (**Ghosh et al., 2007**; **Houck & Clark, 2010**). Enfin, une augmentation de l'expression d'HSPB5 a pu être observée en l'absence de dystrophine, dans les muscles squelettiques de souris *mdx* (**Carberry et al., 2013**).
Les mutations de HspB5 sont impliquées dans le développement de pathologies musculaires (**Goldfarb et al., 2008**; **Mitzelfelt et al., 2016**) ou neurologiques (pour revue, voir **Van Rijk**

& Bloemendal, 2000). De plus, l'expression de cette protéine est un marqueur de mauvais pronostique dans certains cancers car elle promeut la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse tumorale ainsi que la résistance aux traitements (**Dimberg et al., 2008**; **Moyano et al., 2006**).

2.2.3 HSPB8/HSP22

D'un poids moléculaire de 22kDa, HSPB8 est une petite protéine de choc thermique ubiquitaire, exprimée de façon abondante dans les tissus musculaires striés (squelettiques et cardiaque) et lisses. On la retrouve le plus souvent associée à d'autres HSP (HSPB1, HSPB2, HSPB3, HSPB5, HSPB6 ; **Arrigo, 2013**), ou complexée à la protéine co-chaperon BAG3, lors de l'adressage de cargos au processus autophagique (**Ulbricht et al., 2015**). Diverses études ont observé une augmentation de l'expression d'HSPB8 en conditions d'agrégation protéique et démontré son rôle dans l'élimination de ces agrégats (**Crippa et al., 2013**; **Nivon et al., 2016**). De plus, des mutations de cette protéine sont impliquées dans le développement de neuropathies distales ainsi que de myopathies myofibrillaires (**Fontaine et al., 2006**; **Ghaoui et al., 2016**).

En plus de son rôle de chaperon moléculaire, HSPB8 est impliquée dans la régulation du processus apoptotique. De par son rôle anti-apoptotique, HSPB8 est surexprimée dans divers cancers, favorisant la migration cellulaire et la prolifération des cellules tumorales (**Li et al., 2014**). En revanche, contrairement aux autres membres de cette famille, cette petite HSP n'est pas uniquement anti-apoptotique. En effet, Baiqan Li et son équipe ont pour la première fois mis en évidence un rôle pro-apoptotique d'une Hsp dans des cellules humaines (**Li et al., 2007**). Ainsi, lorsqu'elle est surexprimée, HSPB8 active la kinase TAK1 et entraine la voie de signalisation pro-apoptotique JNK.

3. Contrôle qualité des protéines par dégradation : le système Ubiquitine-Protéasome (*Ubiquitin-Proteasome System* ou UPS)

3.1 Processus d'ubiquitination (**Figure 7**)

Le mécanisme d'adressage et de dégradation peptidique par le système ubiquitine-protéasome (UPS, pour *Ubiquitin-Proteasome System*) est un processus cellulaire multi-étapes,

nécessitant l'intervention de différentes enzymes permettant l'activation et la conjugaison de l'ubiquitine au substrat protéique.

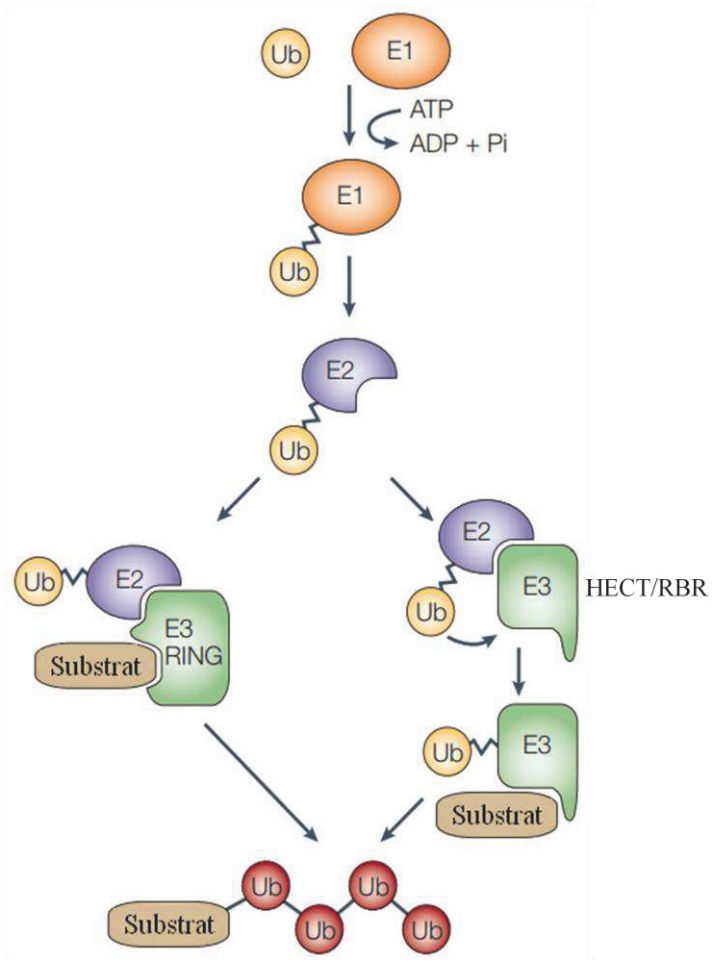


Figure 7 : Le processus d'ubiquitination (d'après Di Fiore & al., 2003). L'ubiquitination de substrats est un processus en 3 étapes : L'activation de la molécule d'ubiquitine par les enzymes E1, la conjugaison de cette ubiquitine active médiée par les enzymes E2, et la liaison substrat-ubiquitine assurée par les E3 ubiquitine-ligases (RING, HECT ou RBR).

3.1.1 Activation de l'ubiquitine (enzymes E1)

La première étape de ce mécanisme nécessite l'activation d'une molécule d'ubiquitine par des enzymes spécifiques, les enzymes E1. Chez l'humain, il n'existe que 9 gènes codant pour ces enzymes activatrices : UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA6, UBA7, ATG7, NAE1 et SAE1. Dans un premier temps, une enzyme E1 se lie à une molécule d'ubiquitine. Le processus d'activation permet ensuite la formation d'une liaison thio-ester entre un résidu cystéine de l'enzyme et la partie C-terminale de l'ubiquitine, de façon ATP-dépendante.

3.1.2 Liaison de l'ubiquitine au substrat (enzymes E2/E3)

Une fois activée, la molécule d'ubiquitine est prise en charge par l'enzyme E1 et va être adressée à une enzyme de conjugaison E2. Les enzymes E2 sont chargées de mettre en

relation les molécules d'ubiquitine avec les protéines cibles. Chez l'humain, environ 40 gènes codent pour ces différentes enzymes E2.

Enfin, la dernière étape de ce processus consiste à lier l'ubiquitine au substrat, et fait appel à des ubiquitine ligases E3. De par leur diversité (plus de 600 E3 différentes chez l'humain), ces enzymes sont classées en 3 grandes catégories, selon la spécificité de leurs clients (**Morreale & Walden, 2016**) :

- la famille RING est la plus abondante. Ces enzymes ont la capacité de transférer l'ubiquitine d'une E2 à un client en une seule étape. Dans cette famille, on trouve notamment l'APC/C, impliquée dans l'entrée en anaphase.
- les enzymes à domaine HECT (*Homologous to the E6AP Carboxy Terminus*), dont l'extrémité N-terminale permet la reconnaissance spécifique des substrats, et l'extrémité C-terminale possède le domaine catalytique, procèdent à l'ubiquitination de clients en 2 étapes : Tout d'abord, la molécule d'ubiquitine est transférée de l'E2 à un résidu cystéine de l'E3. Puis, la liaison entre l'ubiquitine conjuguée à l'E3 et le substrat est catalysée.
- les enzymes RBR (pour *RING-Between RING-RING*), fonctionnent de la même manière que les enzymes à domaine HECT. Elles sont constituées de 2 domaines RING : RING1, impliqué dans le recrutement du complexe E2-ubiquitine, et RING2, responsable de l'activité catalytique.

3.2 Ubiquitine et son code

3.2.1 Ubiquitine, une molécule d'adressage

Décrite initialement en 1975 pour son rôle dans la différentiation des lymphocytes B et T (Nommée UBIP ; **Goldstein et al., 1975**), l'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, fortement conservée entre les espèces. Son implication dans l'adressage de clients à un mécanisme de protéolyse ATP-dépendant, le protéasome, a été mise en évidence en 1978 par Ciechanover et son équipe (Nommée APF-1 ; **Ciehanover et al., 1978**). Depuis cette découverte, l'ubiquitine apparaît non seulement comme un élément essentiel dans la dégradation protéique, mais aussi dans de nombreux autres mécanismes cellulaires tels que la signalisation cellulaire, la régulation de la transcription de gènes cibles, le trafic membranaire ou la réponse aux dommages de l'ADN.

3.2.2 Code ubiquitine

L'ubiquitination des substrats se traduit par la fixation d'une molécule unique d'ubiquitine sur un client de manière covalente. La liaison s'effectue entre la partie C-terminale d'un résidu glycine de la molécule d'ubiquitine, et le groupement amine d'une lysine de la protéine cible. Les protéines peuvent être soumises à différents types d'ubiquitination selon leur destinée.

La monoubiquitination peut être simple et ne toucher qu'un seul résidu lysine du substrat, ou multiple : on parle alors de multi-monoubiquitination. Ce type de modification post-traductionnelle a été impliquée dans l'endocytose et la dégradation lysosomale de protéines transmembranaires (**Haglund et al., 2003**) ou de protéines impliquées dans le processus endocytique (**Van Delft et al., 1997**), la régulation des histones (**Pham & Sauer, 2000**; **Robzyk et al., 2000**), la réparation des dommages de l'ADN (**Hoege et al., 2002**; **Stelter & Ulrich, 2003**), mais aussi le bourgeonnement de vésicules virales (**Patnaik et al., 2000**; **Strack et al., 2000**). Cependant, plus récemment, une étude menée par Braten et son équipe a mis en évidence le rôle de la monoubiquitination dans la dégradation spécifique de certains clients par le protéasome 26S (**Braten et al., 2016**).

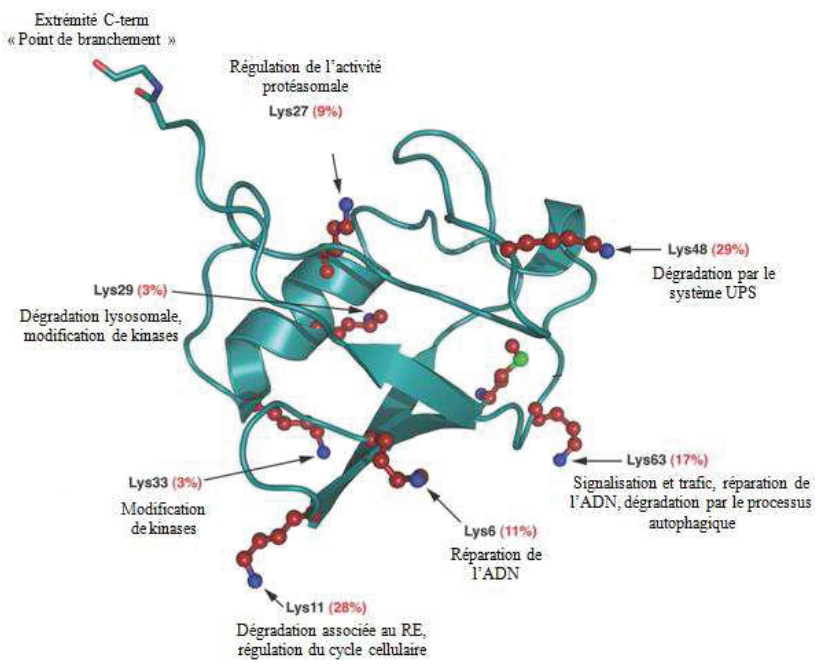


Figure 8 : L'ubiquitine (adapté de Komander, 2009). L'ubiquitine est une molécule de 76 acides aminés, impliquée dans le marquage de substrats et leur adressage spécifique à diverses voies de signalisation. La formation de chaines poly-ubiquitinées passe par le branchement de plusieurs molécules d'ubiquitine via l'extrémité C-terminale de la précédente, et un des 7 résidus lysine de la suivante.

Lorsque plusieurs cycles de conjugaison de l'ubiquitine sont réalisés à la suite, on obtient des chaînes de poly-ubiquitine (ou multiubiquitine). Les molécules d'ubiquitine portant 7 résidus lysines en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63, il est donc possible d'obtenir différents types de chaînes, linéaires ou ramifiées, impliquées dans des processus cellulaires variés (**Figure 8** ;

Table 5). Je ne détaillerai ici que les chaînes décrites comme permettant l'adressage aux systèmes de dégradation : protéasome 26S et autophagie.

Monoubiquitination	
Simple (Lys)	→ Endocytose → Régulation des histones → Réparation de l'ADN → Dégradation par le protéasome 26S → Bourgeonnement viral
Multiple (Lys Lys Lys)	
Polyubiquitination	
Lysine 6	→ Réparation de l'ADN → Mitophagie & xénophagie
Lysine 11	→ Endocytose → Dégradation par le protéasome 26S (cycle cellulaire) → Signalisation (TNFα, β-caténine)
Lysine 27	→ Régulation de l'autophagie/de la mitophagie → Sécrétion protéique → Réparation de l'ADN
Lysine 29	→ Régulation de l'activité du protéasome 26S → Régulation épigénétique de l'expression génique
Lysine 33	→ Trafic membranaire post-Golgi → Réponse immunitaire (signalisation TCR)
Lysine 48	→ Dégradation par le protéasome 26S
Lysine 63	→ Autophagie/Mitophagie/Xénophagie → Endocytose → Réparation de l'ADN → Bourgeonnement viral → Trafic intracellulaire

Table 5 : Code ubiquitine et processus cellulaires associés (Adapté d'Ikeda & Dikic, 2008). L'adressage spécifique de substrats à divers mécanismes cellulaires dépend de leur ubiquitination. Ainsi, les protéines ubiquitinées peuvent être dirigées vers des processus de dégradation, de réparation de l'ADN, d'endocytose, ou de régulation de voies de signalisation.

Ainsi, les chaines homotypiques polyubiquitinées en position K11 servent à adresser spécifiquement des acteurs du cycle cellulaire à la dégradation protéasomale (**Min et al., 2015**). La/les fonction(s) de la polyubiquitination en K27 sont à l'heure actuelle très peu étudiées. Cependant, ce type de chaines semble être impliqué dans le recrutement de protéines présentant des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBD, pour *Ubiquitin-Binding Domain*), telles que des acteurs de la régulation du flux autophagique (Geisler et al., 2010; Z. Liu et al., 2014). Dans une étude publiée en 2014, Besche et son équipe ont mis en évidence l'implication de la polyubiquitination en K29 de la sous-unité protéasomale Rpn13, servant de récepteur pour les clients destinés à la dégradation par l'UPS, dans la diminution de l'activité du protéasome 26S lors d'une accumulation trop importante de protéines ubiquitinées en réponse à un stress (**Besche et al., 2014**). La forme de polyubiquitination la plus connue et la plus étudiée reste la chaine K48. Bien que les avis divergent quant au type de chaine impliquée (tétraubiquitine, double diubiquitine… ; **Lu et al., 2015**), ce signal est majoritairement utilisé pour adresser des cargos à la dégradation protéasomale (**Thrower et al., 2000**). Enfin, le marquage de protéines par une polyubiquitination en K63 intervient

notamment dans l'adressage au processus autophagique (**Tan et al., 2008**), aux agrésomes (**Olzmann et al., 2007**) ou aux corps multivésiculaires (MVB, pour *MultiVesicular Bodies).*

3.3 Dégradation par le protéasome

3.3.1 Protéasome 20S

Le protéasome 20S est un complexe enzymatique cylindrique, permettant la catalyse de substrats polyubiquitinés. Il est formé d'un empilement de 4 anneaux, constitués de 7 sous-unités différentes :

- Les sous-unités de type α (α1 à α7), retrouvées dans les anneaux externes, ont pour fonction de garder les substrats sous forme linéaire pour leur permettre de passer dans le canal protéasomal.
- Les sous-unités β (β1 à β7), situées dans les anneaux internes, ont pour rôle de dégrader les protéines grâce à 3 sous-unités portant des activités enzymatiques différentes : une activité trypsine-like (coupure après un acide aminé basique tel que la lysine ou l'arginine) portée par la sous-unité β2, une activité chymotrypsine-like (coupure après des acides aminés hydrophobes, tels que le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine) conférée par la sous-unité β5 et une activité caspase-like (clivage après des résidus aspartates) portée par la sous-unité β1.

Sous cette forme, le protéasome 20S représente 40% de la fraction protéasomale totale d'une cellule de mammifère. Cependant, le protéasome s'associe à des sous unités régulatrices qui vont lui conférer des caractéristiques particulières.

3.3.2 Le protéasome 26S (**Figure 9**)

Le protéasome 26S résulte de l'association entre un complexe enzymatique 20S et 2 sous unités 19S de part et d'autre des anneaux α. Il est présent dans le noyau et le cytoplasme. Sa fonction principale est d'assurer la dégradation de protéines à courtes demi-vies polyubiquitinées (majoritairement en K48) d'origine nucléaire, cytoplasmique ou du RE et de permettre le recyclage des peptides de 6-7 acides aminés ainsi obtenus.

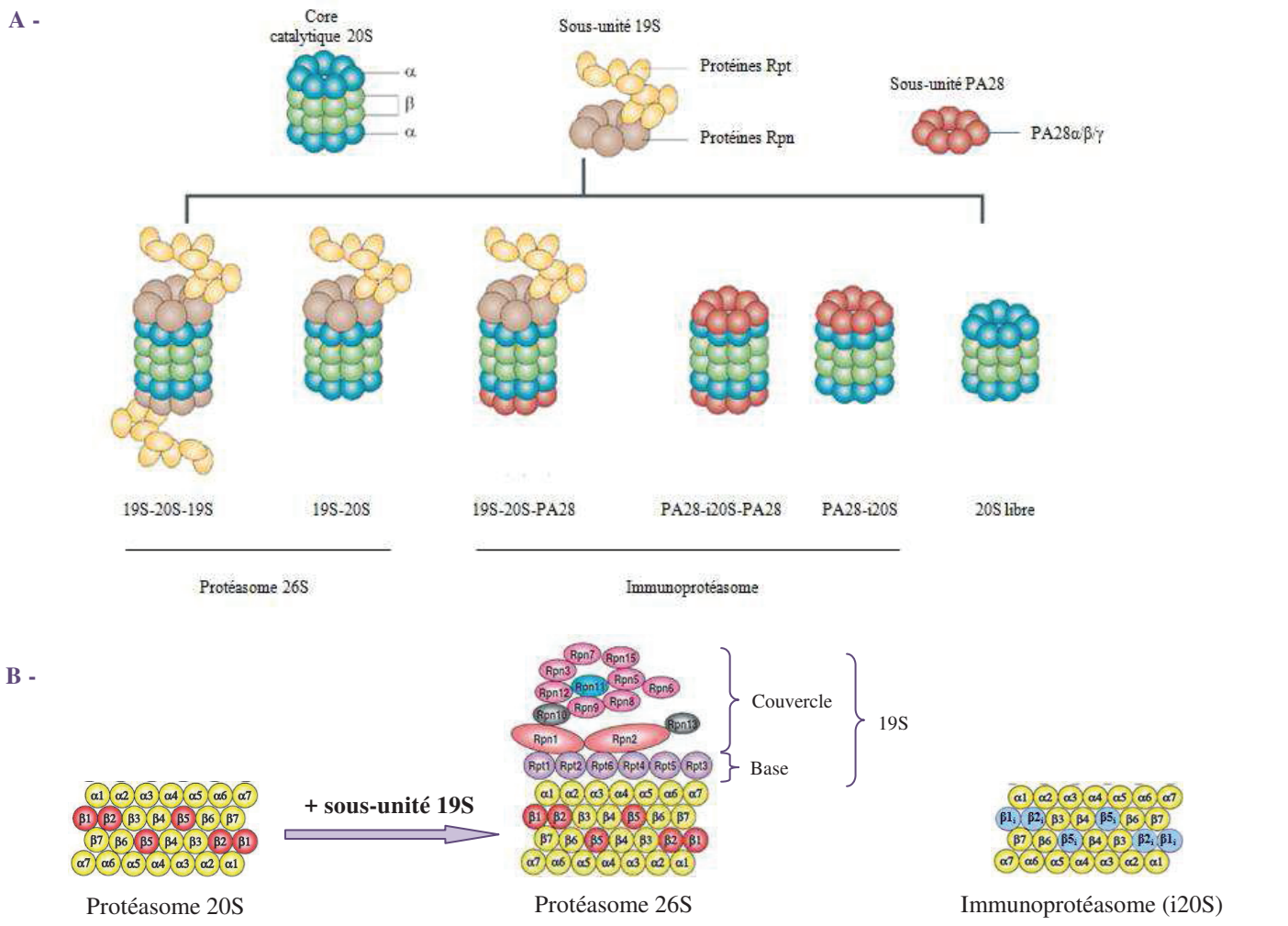


Figure 9 : Les protéasomes. A - Les protéasomes résultent de l'association entre un core catalytique 20S et d'une ou plusieurs sous-unités régulatrices (19S et PA28/11S) (**Adapté de Tai & Schuman, 2008**). **B -** Le protéasome 20S est formé de 4 anneaux empilés (2 anneaux externes de sous unités α et 2 anneaux externes de sous unités β). L'activité enzymatique de ce complexe réside dans les sous unités β1 (caspase-like), β2 (trypsine-like) et β5 (chymotrypsine-like). Une fois associé à 2 sous unités 19S, il forme le protéasome 26S, impliqué dans la dégradation de longs polypeptides ubiquitinés et de protéines à courte demi-vie. L'immunoprotéasome est un protéasome 20S dont les sous unités catalytiques ont été modifiées (β1, β2 et β5 → β1i, β2i et β5i). Ce type de protéasome ne possède pas d'activité caspase, et intervient dans la dégradation et la présentation de peptides antigéniques au CMH (**Adapté de Tanaka, 2009**).

3.3.3 BAG1, une protéine d'adressage des protéines mal conformées à l'UPS

La protéine BAG1 (*BCL-2-associated AthanoGene 1*) est composée de 4 sous-unités notées BAG1-L, -M, BAG1, et BAG1-S, dont les poids moléculaires (50kDa, 46kDa, 36kDa et 29kDa respectivement) diffèrent grâce à la présence en N-terminal de sites de traduction alternatifs. La forme la plus abondamment retrouvée est BAG1-S, cytosolique. BAG1-L possède une localisation nucléaire, due à la présence dans sa séquence d'un NLS (*Nuclear*

Localization Signal). En revanche, chez BAG1-M, cette séquence de localisation n'est que partielle : sa translocation nucléaire dépend donc de son interaction avec d'autres partenaires protéiques. Malgré des fonctions spécifiques à chaque sous-unité, le rôle commun des protéines BAG1 est d'adresser des protéines mal conformées au système ubiquitine-protéasome afin de permettre leur dégradation, via une interaction avec le chaperon moléculaire Hsp/Hsc70 d'une part, et une interaction avec le protéasome d'autre part, grâce à son domaine UBL (*UBiquitin-Like*) (**Figure 10** ; **Lüders et al., 2000**).

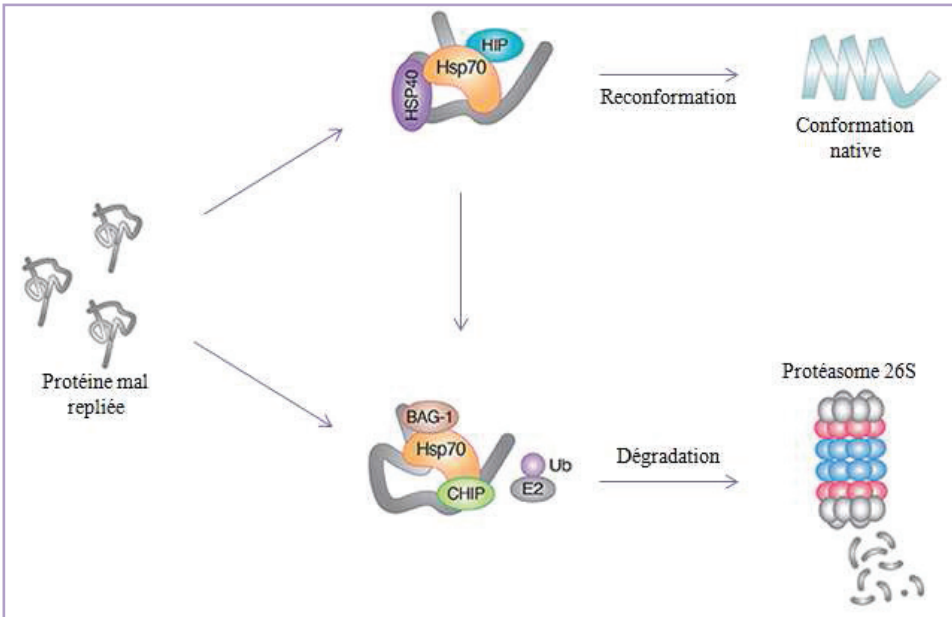


Figure 10 : BAG1 et adressage à l'UPS (d'après Ciechanover & Kwon, 2017). En cas de mauvais repliement, les protéines sont d'abord adressées aux mécanismes de reconformation, médiés par les chaperons moléculaires (ici HSP70/HSP40/HIP). En cas d'échec de repliement, la protéine HSP70 interagit avec CHIP, une E3 ubiquitine ligase entrainant l'ubiquitination du substrat, et BAG1, co-chaperon moléculaire permettant l'adressage du client à la dégradation protéasomale.

4. Contrôle qualité des protéines par dégradation : le processus autophagique

L'autophagie est un second système de dégradation, uniquement cytoplasmique. Du grec *auto* (soi-même) et *phágos* (dévorer), l'autophagie désigne le mécanisme permettant la dégradation de matériel intracellulaire par l'intermédiaire de la voie lysosomale.

L'autophagie fait appel à 3 mécanismes principaux (**Figure 11**) : la microautophagie, via l'invagination directe de la membrane lysosomale ; l'autophagie médiée par des chaperons moléculaires, ou CMA (*Chaperone-Mediated Autophagy*), *via* la reconnaissance d'un motif protéique KFERQ par la protéine Hsp70 et l'adressage au récepteur membranaire lysosomal LAMP2A ; La macroautophagie (couramment appelée autophagie), où l'adressage aux lysosomes passe par la formation de vésicules intermédiaires, les autophagosomes. Ce chapitre abordera uniquement ce dernier mécanisme.

L'autophagie est un processus multi-étapes, faisant intervenir de nombreuses voies de signalisation parallèles (**Figure 12**).

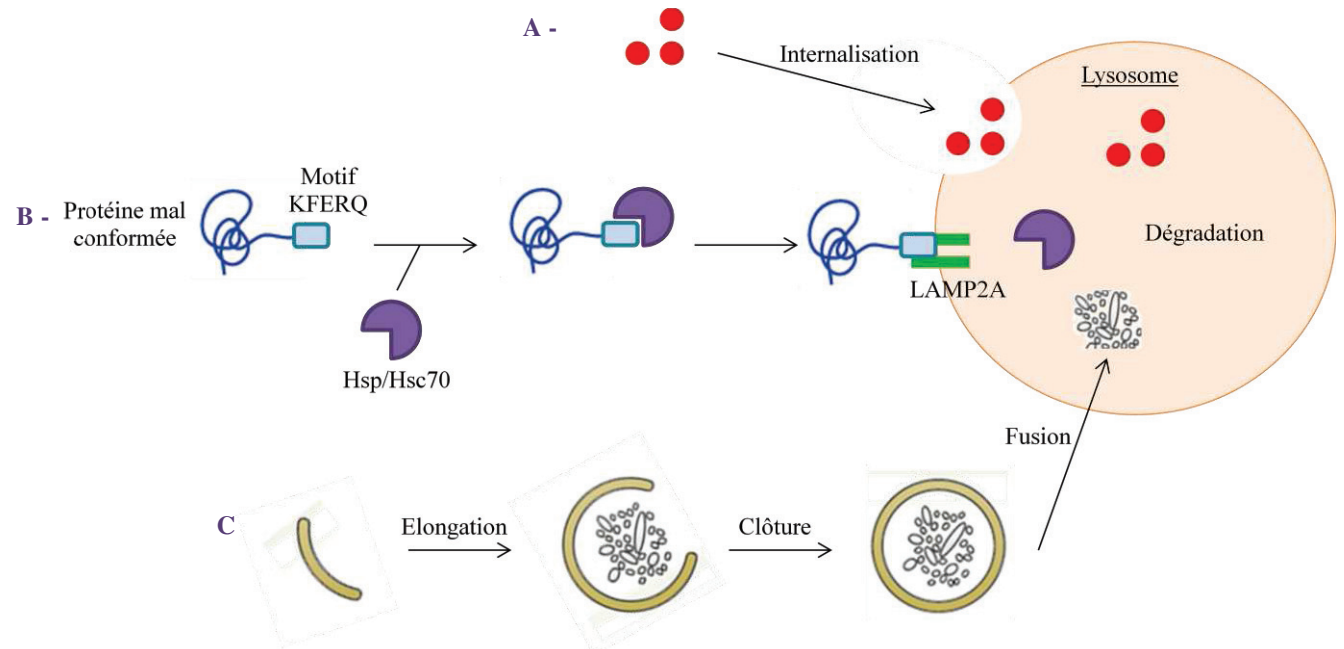


Figure 11 : Les différentes formes d'autophagie (adapté de Boya & al., 2013). **A –** La microautophagie permet d'éliminer de petites molécules intracytoplasmiques par l'intermédiaire direct de l'invagination de la membrane lysosomale. **B –** La CMA fait intervenir des chaperons moléculaires, capables de reconnaître spécifiquement des substrats possédant les motifs KFERQ. La translocation intramembranaire se fait grâce au complexe LAMP2A. **C –** La macroautophagie permet l'adressage de substrats aux lysosomes, grâce à leur internalisation au sein de vésicules, les autophagosomes.

4.1 Etapes du processus autophagique

4.1.1 Phase d'initiation

L'initiation de l'autophagie permet la formation de la structure membranaire à l'origine des autophagosomes : le PAS (*Pre-Autophagosomal Structure*). Cette étape passe par l'activation du complexe ULK1-FIP200-ATG13-ATG101. Ce complexe est formé de façon constitutive mais son activité est régulée par phosphorylation. Ainsi il est inhibé par la phosphorylation d'ULK1 et ATG13 *via* mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin 1*), un complexe protéique formé de la kinase mTOR et des protéines Raptor et GβL, sensible à la rapamycine (**Chan, 2009**). Le complexe ULK1-FIP200-ATG13-ATG101 est nécessaire au recrutement des protéines ATG (*AuTophagy-related Genes*) au niveau de l'omégasome, une plateforme membranaire connectée au réticulum endoplasmique (**Lamb et al., 2013**) servant de point de départ pour la nucléation et l'élongation des autophagosomes.

4.1.2 Nucléation du PAS (*Pre-Autophagosomal Structure*)

Le recrutement des protéines ATG au niveau de l'omégasome va permettre la nucléation de la structure pré-autophagosomale, ou phagophore. Cette phase nécessite l'activation du complexe cœur de la Becline1. En conditions physiologiques, la protéine Becline1 (BECN1) forme un complexe avec la PI3kinase de classe III, AMBRA1 et la protéine VPS15/P150. L'interaction avec d'autres partenaires protéiques permet de donner à ce complexe sa fonction physiologique finale :

- ATG14L, aussi appelée Barkor (*Beclin 1-associated Autophagy-Related Key regulatOR*) permet le recrutement du complexe au niveau d'une zone de contact entre la membrane du réticulum endoplasmique, où se situe l'omégasome, et la membrane externe mitochondriale. La PI3KIII génère alors du PtdIns3P (*phosphatidylinositol 3-phosphate*) permettant la nucléation du phagophore (**Hamasaki et al., 2013**).
- UVRAG (*UV irradiation Resistance-Associated Gene*) permet d'une part le recrutement de la PI3KIII au niveau des endosomes et la génération de PtdIns3P nécessaire à la nucléation, mais est aussi impliquée dans la courbure des membranes via son interaction avec la protéine BIF1 (**Itoh & De Camilli, 2006**; **Takahashi et al., 2007**).
- RUBICON (*RUn domain Becline-1 Interacting and cystein rich CONtaining protein*), au contraire, régule négativement le processus autophagique, en inhibant l'activité de la PI3KIII (**Zhong et al., 2009**).
- Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) en interagissant avec Becline1 provoque la dissociation du complexe cœur.

C'est au niveau du phagophore que va se dérouler la cascade de signalisation des protéines ATG, permettant l'élongation, puis la clôture de la vésicule autophagique (**Weidberg et al., 2011**).

4.1.3 Elongation de la membrane

L'élongation de la membrane autophagosomale passe par l'intervention de 2 systèmes de conjugaison faisant intervenir les protéines ATG :

- D'une part, un complexe ATG5-ATG12 est formé, grâce à l'action des protéines ATG7 et ATG10 (**Mizushima et al., 1998**). Ce complexe, en association avec ATG16L, fait office d'enzyme E3, et va permettre la conjugaison à la phosphatidyléthanolamine du système LC3 décrit ci-dessous.

- D'autre part, la protéine LC3/ATG8 est d'abord clivée/délipidée par ATG4, formant la protéine LC3-I où la glycine 120 est exposée. Cette protéine est ensuite conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) pour former la protéine LC3-II, protéine maîtresse de la membrane des autophagosomes. Ce phénomène nécessite l'intervention des protéines ATG7, ATG3 et du complexe ATG5-ATG12-ATG16L (**Ichimura et al., 2000**).

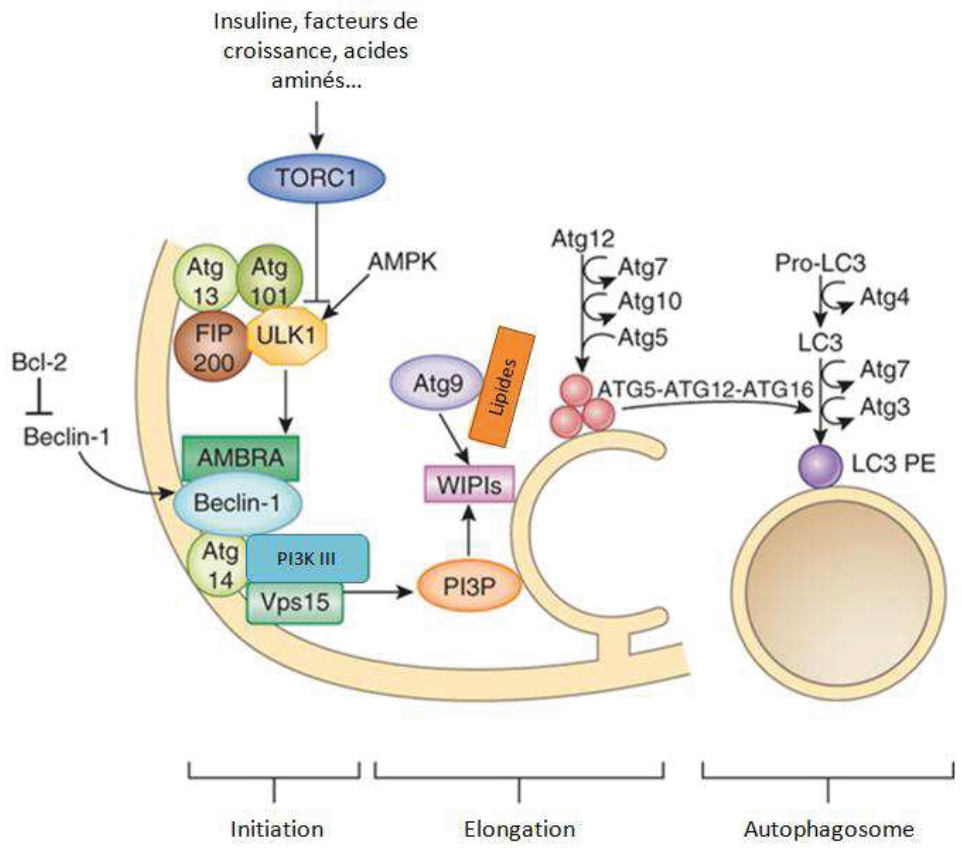


Figure 12 : Mécanisme de formation des autophagosomes (adapté de Sica & al., 2015). La formation des autophagosomes est un processus multi-étapes, faisant intervenir de nombreux acteurs protéiques. Le complexe ULK1/FIP200/ATG13/ATG101 permet l'initiation du processus ; le complexe cœur Beclin-1/Vps15/PI3KIII/ATG14 (ou UVRAG), associé aux systèmes de conjugaison ATG5-ATG12-ATG16L et LC3 permet la nucléation de la structure pré-autophagosomale (ou PAS) ; l'apport de matériel membranaire par la protéine ATG9 permet l'élongation de la membrane. Enfin, bien qu'encore mal connu, le processus de fermeture de l'autophagosome passe par la scission des membranes et semble faire appel, chez les mammifères, aux protéines GABARAP/GATE16.

L'apport de membrane permettant la formation de l'autophagosome est assuré par ATG9. Cette protéine, seul membre de la famille ATG à posséder des domaines transmembranaires, est retrouvée dans les membranes du réseau transgolgien, dans les endosomes tardifs et dans un « réservoir » vésiculaire situé à côté de l'appareil de Golgi (**Lamb et al., 2013**). Lors de l'activation du processus autophagique, ATG9 est activée par un mécanisme dépendant de ULK1 (**Young et al., 2006**). Les protéines WIPI (ATG18), recrutées au niveau du PAS via

leur interaction avec le PIP3, servent de complexe d'amarrage pour ATG9, couplée à des lipides membranaires. Une fois le matériel membranaire conjugué à l'autophagosome naissant, WIPI assure le relargage d'ATG9 et sa relocalisation (**Reggiori et al., 2004**).

4.1.4 Clôture de la vésicule et recyclage de la machinerie autophagique

Lorsque le processus d'élongation est terminé, la vésicule autophagique se ferme, par un phénomène de scission des membranes (**Knorr et al., 2015**). Ce processus semble être assuré, chez les mammifères, par les protéines GABARAP/GATE16 (**Weidberg et al., 2010**) bien que leur fonction exacte ne soit encore que peu connue.

Une fois l'autophagosome clos, la majorité des composants de la machinerie autophagique, à l'exception des protéines LC3 situées sur la membrane interne de la vésicule, vont être recyclés, afin de former de nouveaux autophagosomes (Z. Xie & Klionsky, 2007).

4.1.5 Le transport des vésicules autophagiques

Le transport des vésicules autophagiques dépend du réseau de microtubules et de sa stabilité, ainsi que des moteurs moléculaires associés (**Mackeh et al., 2013**). Des modifications post-traductionnelles de la tubuline α, et notamment une hyperacétylation du résidu Lysine 40, ont été décrites pour stabiliser le réseau de microtubules lors de carence nutritive et entrainer le recrutement de kinésines et de dynéines, favorisant ainsi l'initiation de l'autophagie et le transport des vésicules autophagiques (**Figure 13** ; **Geeraert et al., 2010**). Ainsi, les dynéines assurent le transport des autophagosomes vers le centre organisateur des microtubules (MTOC pour *MicroTubule Organizing Center*) situé à l'extrémité -, où se situent aussi les lysosomes. Les kinésines sont impliquées dans le transport des autophagosomes en conditions basales, ainsi que dans l'initiation de l'autophagie en cas de stress, mais l'implication de ces moteurs moléculaires dans le transport des vésicules autophagiques en conditions de stress n'a à l'heure actuelle pas encore été décrit. Cependant, une étude menée récemment a permis la mise en évidence de leur implication dans le recyclage des autolysosomes et la formation de nouvelles vésicules lysosomales (**Du et al., 2016**).

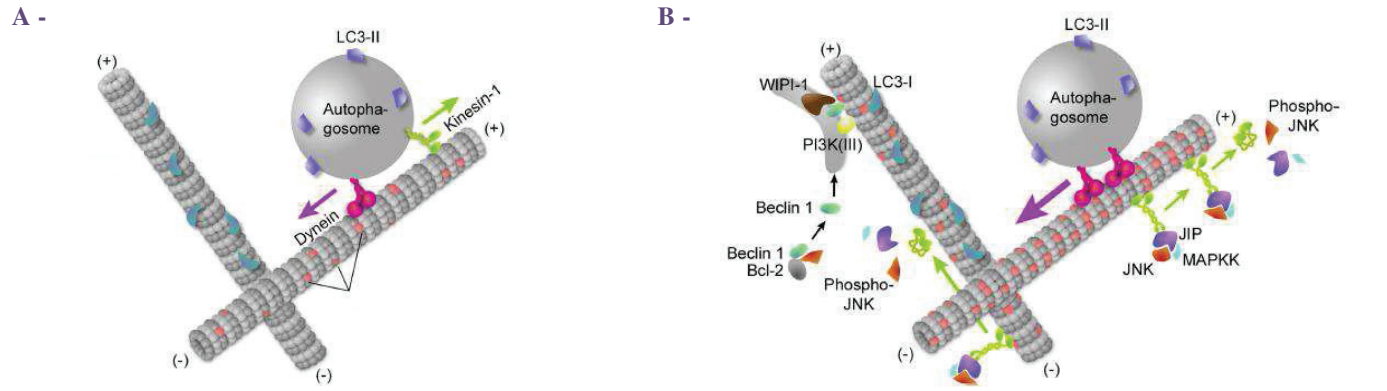


Figure 13 : Le transport des autophagosomes (d'après Geeraert et al., 2010). En conditions basales (A), le transport des autophagosomes le long des microtubules se fait de manière rétrograde ou antérograde. En cas de stress (B), l'hyperacétylation de la tubuline (en rouge) entraine le recrutement de moteurs moléculaires supplémentaires, afin d'initier la formation d'autophagosomes (Kinesin-1) et de médier leur transport jusqu'au MTOC où va se produire la fusion avec les lysosomes.

4.1.6 La fusion autophagosomes/lysosomes

Le processus de fusion requiert la présence d'un environnement acide à l'intérieur des lysosomes, afin de permettre le bon fonctionnement des enzymes de dégradation. Le maintien de ce pH acide est assuré par des pompes à protons, les v-ATPases (*vacuolar ATPases* ; (**Bagh et al., 2017**; **Nakamura et al., 1997**). Ainsi, un fonctionnement défaillant ou une inhibition par la bafilomycine A1 de la v-ATPase bloquent le processus autophagique (**Klionsky et al., 2008**).

Deux mécanismes de fusion ont été décrits (**Jahreiss et al., 2008**) :

- la fusion « complète » entre un autophagosome et un lysosome, donnant naissance à une nouvelle vésicule, l'auto(phago)lysosome
- le « kiss-and-run », impliquant un transfert de matériel entre autophagosome et lysosome par le biais d'une fusion partielle transitoire

Cette fusion nécessite l'intervention de différents complexes protéiques (**Nakamura & Yoshimori, 2017**) :

- La famille des SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* ; **Furuta & Amano, 2012**; **Wang et al., 2016**), comportant plus de 60 protéines chez les mammifères, subdivisée en 2 catégories : Les v-SNAREs, situées sur les membranes vésiculaires (*vesicle SNARE*), et les t-SNAREs, situées sur les membranes des compartiments cibles (*target SNARE*). L'interaction entre ces deux types de protéines permet l'amarrage des autophagosomes sur les lysosomes.
- La famille ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), divisée en 4 sous-familles principales (ESCRT-0, -I, -II, -III) et deux catégories de protéines accessoires (Vps4-

Vta1, Bro1), dont les mutations provoquent un défaut de fusion et une accumulation d'autophagosomes (**Lee et al., 2007**; **Rusten et al., 2007**).

- Les protéines LMP (*Lysosomal Membrane Proteins*) sont également impliquées dans la fusion autophagosome/lysosome. En effet, une déficience en LAMP-1 et LAMP-2 ne permet plus le recrutement de la protéine Rab7 au niveau des autophagosomes, et de ce fait inhibe la fusion (**Huynh et al., 2007**).

- D'autres protéines peuvent jouer un rôle dans le processus de fusion. C'est notamment le cas de HDAC6, une histone déacétylase impliquée dans le recrutement de la cortactine, lors de la fusion ; cette protéine permet la formation d'un réseau d'actine nécessaire à la fusion (**Lee et al., 2010**). La protéine p97/VCP (*Valosin-Containing Protein*) semble également intervenir dans ce processus, sa baisse d'expression entrainant une accumulation d'autophagosomes (**Ju et al., 2009**).

Une fois la fusion effectuée, les enzymes contenues dans l'autolysosome entrainent la dégradation du contenu vésiculaire. Des perméases permettent le recyclage de ce contenu, en assurant le transfert des molécules dans le cytosol.

4.2 Régulation du processus autophagique

4.2.1 mTOR

mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est une protéine de la famille des sérine/thréonine kinases, devant son nom à sa sensibilité à la rapamycine, un agent immunosuppresseur. Chez les mammifères, on la retrouve dans 2 complexes distincts :

- mTORC1, composé de mTOR, Raptor et GβL ; ce complexe, sensible à la rapamycine, intervient dans l'inhibition du processus autophagique via l'interaction de Raptor et ULK1, et la phosphorylation d'ULK1 et ATG13. L'insuline, les facteurs de croissance, ou un milieu riche en nutriments entrainent l'activation de ce complexe, tandis que la carence nutritive ou le stress sont responsables de son inhibition.

- mTORC2, composé de mTOR, Rictor, mSin1 et GβL ; dans le muscle strié squelettique, la transcription des gènes ATG dépend du facteur de transcription FOXO3A (**Mammucari et al., 2007**). Le complexe mTORC2, insensible à la rapamycine, participe à la régulation de FOXO3A, en modulant la phosphorylation de la kinase AKT (**Sarbassov et al., 2005**).

La régulation du complexe mTORC1 passe par différentes voies de signalisation (**Memmott & Dennis, 2010**).

Activation :

L'activation de la PI3K entraine la formation de PIP2 et de PIP3 à partir de lipides membranaires. Le PIP3 est capable de recruter la sérine/thréonine kinase AKT au niveau des membranes, permettant la phosphorylation de cette dernière (en T308, par PDK1 ; en S473, par divers acteurs tels que PDK1, ILK, ou mTORC2) et son activation. AKT phosphoryle ensuite le complexe TSC1/2, entrainant son inhibition, l'activation de Rheb et, *in fine*, de mTORC1 (**Inoki et al., 2002**).

La voie de signalisation des MAPK entraine l'activation de mTORC1 de deux manières. D'une part, via l'activation de la kinase ERK, permettant l'inhibition de TSC1/2 par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles (**Ma et al., 2005**). D'autre part, via l'activation de la voie WNT, menant à l'inhibition de GSK3β, un activateur du complexe TSC1/2 (**Buller et al., 2008**).

Inhibition :

La régulation du complexe mTORC1 est également sensible aux variations du ratio intracellulaire ATP/AMP. L'augmentation de la concentration en AMP entraine l'activation de LKB1, une kinase responsable de l'activation de l'AMPK (**Woods et al., 2003**). Cette dernière entraine l'activation du complexe TSC1/2 et l'inhibition de mTOR. Une seconde kinase est responsable de l'activation de l'AMPK : CaMKKβ (**Hawley et al., 2005**). Cette enzyme est activée en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire.

D'autres voies de signalisation moins communes permettent la régulation du complexe mTORC1 : Ainsi, l'hypoxie est à l'origine de l'activation de REDD1, de TSC2 et de l'inhibition de mTOR (**Brugarolas et al., 2004**).

4.2.2 Bcl-2

En conditions optimales, la protéine Becline 1, acteur majeur de la nucléation de la structure pré-autophagosomale, est séquestrée dans le cytosol par une interaction avec la fraction cytosolique de Bcl-2 (**Pattingre et al., 2005**). La dissociation de ce complexe est donc nécessaire à la relocalisation de Becline 1 dans le complexe cœur et à l'activation du processus autophagique. Cette dissociation peut subvenir suite à :

- des modifications post-traductionnelles ; l'absence de nutriments permet l'activation de la voie JNK1, une protéine kinase permettant la phosphorylation de Bcl-2 et la dissociation du complexe BECN1/Bcl-2 (**Wei et al., 2008**).
- la liaison par compétitions d'autres protéines à domaine BH3 à Becline 1, telles que BNIP3 (**Zhang et al., 2008**), Bad (**Maiuri et al., 2007**), Bik (**Rashmi et al., 2008**), Noxa, Puma et BimEL (**Abedin et al., 2006**).

4.3 Rôles physiologiques et pathologiques de l'autophagie

4.3.1 Quelques exemples des rôles physiologiques de l'autophagie

En conditions physiologiques, le processus autophagique contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il peut être non sélectif, notamment en cas de restriction alimentaire (**Shang et al., 2011**) ; la dégradation de matériel cellulaire survient alors de façon aléatoire, afin de fournir à la cellule les nutriments nécessaires à sa survie. Au contraire, l'autophagie peut se révéler sélective et faire intervenir des récepteurs reconnaissant des clients spécifiques (pour revue, voir **Sica et al., 2015**) : on peut alors parler de mitophagie (élimination de mitochondries ; **Ding & Yin, 2012**), de lipophagie (élimination de gouttelettes lipidiques), de xénophagie (élimination de bactéries intracellulaires) ou d'agréphagie (élimination d'agrégats protéiques)… Ainsi, initialement mise en évidence dans les muscles striés squelettiques chez la drosophile (**Arndt et al., 2010**), la CASA (*Chaperone-Assisted Selective Autophagy*) est un mécanisme d'élimination sélective de la Filamine C, protéine participant au lien du cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire, par le processus autophagique. Ce processus a également été observé dans les muscles striés squelettiques humains (**Ulbricht et al., 2015**) ; il implique les protéines de choc thermique HSPA8 (HSP70) et HSPB8, ainsi que le co-chaperon moléculaire BAG3. Ce mécanisme permet le maintien de l'homéostasie du muscle squelettique en réponse à une tension entrainant une mauvaise conformation de la Filamine C (**Ulbricht & Höhfeld, 2013**). L'autophagie participe également au maintien de l'homéostasie des muscles squelettiques et du cerveau. En effet, l'inactivation conditionnelle d'Atg5 ou Atg7 dans les muscles squelettiques entraine une accumulation toxique de protéines ubiquitinées, de mitochondries défectueuses (**Masiero et al., 2009**; **Raben et al., 2008**). De plus, le KO conditionnel d'Atg5 dans le cœur de souris entraine une hypertrophie du muscle cardiaque (**Nakai et al., 2007**). Enfin, l'autophagie permet l'élimination basale continue des protéines mal conformées ou agrégées ainsi que d'organites non fonctionnels

dans les cellules nerveuses, empêchant leur accumulation toxique et le développement de maladies neurodégénératives (**Mizushima & Levine, 2010**).

L'activation du processus autophagique est également impliquée dans le développement embryonnaire. En effet, la fécondation entraine une reprogrammation génétique, nécessitant l'élimination de protéines et ARN messagers maternels par autophagie, au profit de l'expression du nouveau génome zygotique (**Mizushima & Levine, 2010**). De même, lors de la naissance, le nouveau-né n'est plus alimenté par le placenta maternel : l'autophagie est donc fortement activée durant les premières heures de vie, afin de fournir aux cellules les éléments permettant leur survie (**Kuma et al., 2004**). L'autophagie intervient aussi dans la différenciation des érythrocytes et des adipocytes (**Mizushima & Levine, 2010**).

Enfin, l'autophagie joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire, via l'élimination de pathogènes intracellulaires, la présentation antigénique, le maintien de l'homéostasie lymphocytaire (**Bronietzki et al., 2015**), la sécrétion de médiateurs immunitaires ainsi que l'activation du processus inflammatoire (pour revue, voir **Deretic et al., 2013**; **Kuballa et al., 2012**).

4.3.2 Autophagie et pathologies, quelques exemples

L'autophagie est impliquée dans divers processus pathologiques. Le vieillissement est un processus physiopathologique caractérisé par une diminution de l'activité autophagique cellulaire, ayant pour conséquence l'accumulation de protéines mal conformées ou agrégées et d'organites endommagés. Des études portant sur la relation entre autophagie et vieillissement ont permis d'établir un lien entre stimulation de l'autophagie et augmentation de l'espérance de vie chez des souris (**Pyo et al., 2013**), faisant de ce processus une piste thérapeutique intéressante dans le cadre de pathologies telles que la progéria de Hutchinson-Gilford. Cependant, même si l'autophagie devient moins efficace au cours du vieillissement, ce mécanisme de contrôle qualité semble être utilisé prioritairement ; ainsi, un « switch » entre les différents processus de dégradation a été mis en évidence lors du vieillissement cellulaire : en effet, dans les cellules « jeunes », le contrôle qualité des protéines est majoritairement assuré par la dégradation protéasomale de substrats polyubiquitinés médiée par BAG1, et en particulier par les sous-unités BAG1-L, BAG1-M. Cependant, lors du vieillissement ou en réponse au stress, l'expression du co-chaperon BAG3 augmente, tandis que celle de BAG1-L ou -M diminue, permettant un adressage prioritaire des protéines associées à Hsp70 vers l'autophagie plutôt que vers le protéasome 26S (**Behl, 2011**).

Cette diminution de l'autophagie liée à l'âge est impliquée dans le développement de plusieurs maladies associées au vieillissement dont les maladies dégénératives. Ainsi, des anomalies du processus autophagique ont été mises en évidence dans la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Des défauts d'acidification des lysosomes ont notamment été détectés chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (**Wolfe et al., 2013**), menant à l'accumulation d'autophagosomes renfermant le précurseur de l'amyloïde-β (APP), ainsi que l'enzyme nécessaire à son clivage. Bien que la séquestration vésiculaire des molécules toxiques soit bénéfique pour la cellule, elle possède un contre-effet néfaste ; en effet, le processus autophagique augmente la sécrétion d'amyloïde-β dans l'espace extracellulaire, facilitant ainsi la formation de plaques et le développement de la pathologie (**Nilsson et al., 2013**).

L'implication de l'autophagie a également été démontrée dans le cas de myopathies et plus particulièrement dans le cas de dystrophies musculaires (**Sandri et al., 2013**). Un défaut d'activité du processus autophagique, accompagné d'une activation persistante de la voie AKT/mTOR, ont été décrits chez les souris *mdx*, modélisant la dystrophie musculaire de Duchenne (C De Palma et al., 2012) ; cependant une autre équipe n'observe ce défaut qu'en réponse à une carence nutritive, mais non en situation basale (**Spitali et al., 2013**). Des altérations de l'autophagie ont aussi pu être observées dans le cas de la dystrophie musculaire d'Ullrich et de la myopathie de Béthlem (**Grumati et al., 2010**), ainsi que dans certaines laminopathies telles que la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B et les dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss de types 2 et 3 (**Ramos et al., 2012**).

L'absence d'autophagie est retrouvée chez des patients obèses, présentant un diabète de type II (**Yang et al., 2010**). De la même manière, une dérégulation du processus autophagique semble conférer une prédisposition à la maladie de Crohn, pathologie inflammatoire intestinale causée par un défaut de réponse immunitaire face aux bactéries entériques (**Henderson & Stevens, 2012**).

Enfin, la fonction « pro-survie » de l'autophagie peut favoriser le développement de certains cancers, en préservant la stabilité génomique, en limitant le stress oxydatif et en diminuant l'inflammation intra-tumorale (**Morselli et al., 2009**). De plus, ce processus est impliqué dans la réponse aux traitements par chimiothérapies et entraine la résistance et la survie des cellules tumorales (**Tan et al., 2017**).

Le processus autophagique apparait donc comme un mécanisme à deux visages, impliqué à la fois dans la survie cellulaire et le développement de pathologies. Cette double facette fait de l'autophagie une cible idéale pour le développement de thérapies.

5. NFκB et contrôle qualité des protéines

Identifié en 1986 comme facteur de transcription du gène codant pour la chaine légère κ des immunoglobulines (**Sen & Baltimore, 1986**), NFκB appartient à la famille de facteurs de transcription Rel/NFκB, constituée de 5 membres : p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) et p52/p100 (NFκB2). Grâce à l'existence d'un domaine RHD (*Rel Homology Domain*) dans leur partie N-terminale, ces protéines peuvent former des homo- ou hétérodimères ; l'association la plus fréquemment rencontrée est le dimère p65(RelA)/p50. Le TAD (*TransActivation Domain*), un domaine présent uniquement chez RelA/p65, RelB et c-Rel, confère à ces dimères leur activité transcriptionnelle. Ces facteurs interviennent dans la transcription de nombreux gènes cibles, impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, l'apoptose, ainsi que la réponse immunitaire et la réponse au stress (**Pahl, 1999**).

Les dimères NFκB sont des facteurs de transcription inductibles. En conditions basales, ils sont couplés à des molécules inhibitrices, connues sous le nom d'Inhibiteurs de κB (IκB, pour *Inhibitors of Kappa B* ; IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, BCL3 et p100/p105). La plupart de ces membres possèdent 7 répétitions ankyrine dans leur partie C-terminale, permettant la liaison et l'inhibition du domaine de liaison à l'ADN (DBD, pour *DNA-Binding Domain*) des sous-unités NFκB, ainsi que le blocage de leur activité transcriptionnelle. L'activation de NFκB nécessite donc la dissociation des complexes NFκB/IκB. Cette dissociation peut se produire de différentes manières, selon les stimuli responsables de l'activation de NFκB.

5.1 La voie canonique (**Figure 14A**)

La plupart des inducteurs de NFκB, impliquant de nombreux types de stress, activent NFκB de façon classique, ou « canonique ». Cette voie de signalisation implique le dimère p65/p50 et est activée par des composés tels que le TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*), le LPS (*LipoPolySaccharide*, un composé de la paroi bactérienne) ou encore l'interleurkine 1 (IL1). Ces cytokines activent les kinases d'IκB (IKK, pour *IκB Kinase*) qui phosphorylent IκBα sur 2 résidus Sérine (Ser32 et Ser36), entrainant son ubiquitination et sa dégradation par le

système ubiquitine-protéasome. NFκB peut alors migrer dans le noyau et induire la transcription de ses gènes cibles. Cette voie aboutit à la transcription de gènes impliqués dans le développement, la croissance et la survie cellulaire, la réponse immunitaire et l'inflammation.

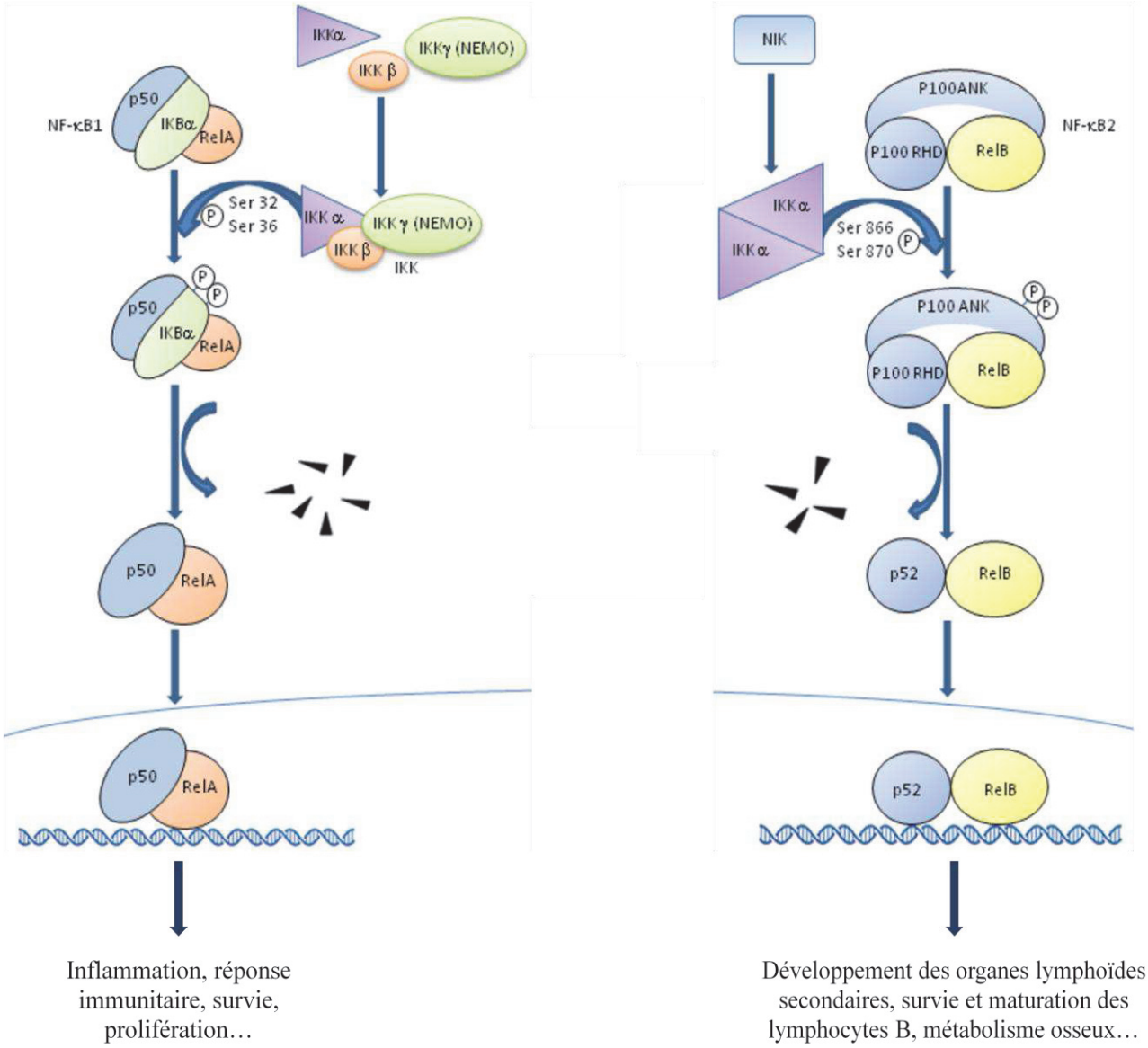


Figure 14 : NFκB, voie canonique et non canonique (adapté de Madonna & al., 2012). A - La voie canonique fait intervenir le dimère p65/p50, couplé à la molécule inhibitrice IκBα. En cas d'activation, le complexe IKK (IKKα, IKKβ & IKKγ/NEMO) phosphoryle IκBα sur les résidus Sérine 32 et 36. Cette modification post-traductionnelle entraine l'adressage d'IκBα au protéasome 26S, permettant la libération du facteur NFκB et sa translocation nucléaire. Cette voie de signalisation permet la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire, la survie et la prolifération cellulaires… B - La voie non canonique implique le dimère RelB/p100. Son activation entraine la phosphorylation de p100 par la kinase IKKα, son ubiquitination et son clivage par le protéasome. Le dimère RelB/p52 peut ainsi passer dans le noyau et activer la transcription de gènes impliqués dans le développement des organes lymphoïdes secondaires, la maturation des lymphcoytes B…

5.2 La voie non canonique (**Figure 14B**)

La voie non canonique de NFκB implique le dimère RelB/p100. L'activation de cette voie entraine la phosphorylation de la partie C-terminale de p100, son ubiquitination et son clivage par le protéasome 26S. Le complexe RelB/p52 est ensuite transloqué dans le noyau, et entraine la transcription de gènes impliqués dans le développement des organes lymphoïdes secondaires, la survie et la maturation des lymphocytes B, le métabolisme osseux ou l'activation des cellules dendritiques (**Sun, 2011**).

5.3 Les voies atypiques

Certaines conditions peuvent activer NFκB par l'intermédiaire de voies "atypiques". En effet, les UV ainsi que les analogues d'acides aminés ont été décrits pour activer la voie NFκB (p65/p50) par le biais de la dégradation d'IκBα, mais sans nécessiter sa phosphorylation préalable (**Kretz-Remy et al., 1998**; **Takada et al., 2003**). De plus, le péroxyde d'hydrogène active NFκB grâce à la phosphorylation de résidus Sérine de p65 ainsi que de résidus Tyrosine d'IκBα, sans passer par la dégradation de ce dernier (**Takada et al., 2003**).

Notre équipe a également mis en évidence une activation particulière de NFκB induite par un stress d'agrégation protéique, tel que le choc thermique, l'inhibition du protéasome ou la surexpression de protéines ayant tendance à s'agréger (**Kretz-Remy et al., 2001**; **Nivon et al., 2016**). En effet, l'activation de NFκB par ce type de stress ne requiert ni l'activation du complexe IKK, ni la phosphorylation et la dégradation d'IκBα, mais est corrélée à une dissociation du complexe NFκB/IκBα (**Kretz-Remy et al., 2001**). Les mécanismes moléculaires responsables de cette dissociation ne sont pas élucidés.

CHAPITRE 2 : Les dystrophies musculaires

1. Le muscle strié

Le corps humain comporte plus de 650 muscles, répartis en 3 catégories, selon leurs caractéristiques et fonctions :

- Les muscles striés squelettiques
- Le muscle strié cardiaque
- Les muscles lisses

Ce chapitre traitera uniquement des muscles striés squelettiques.

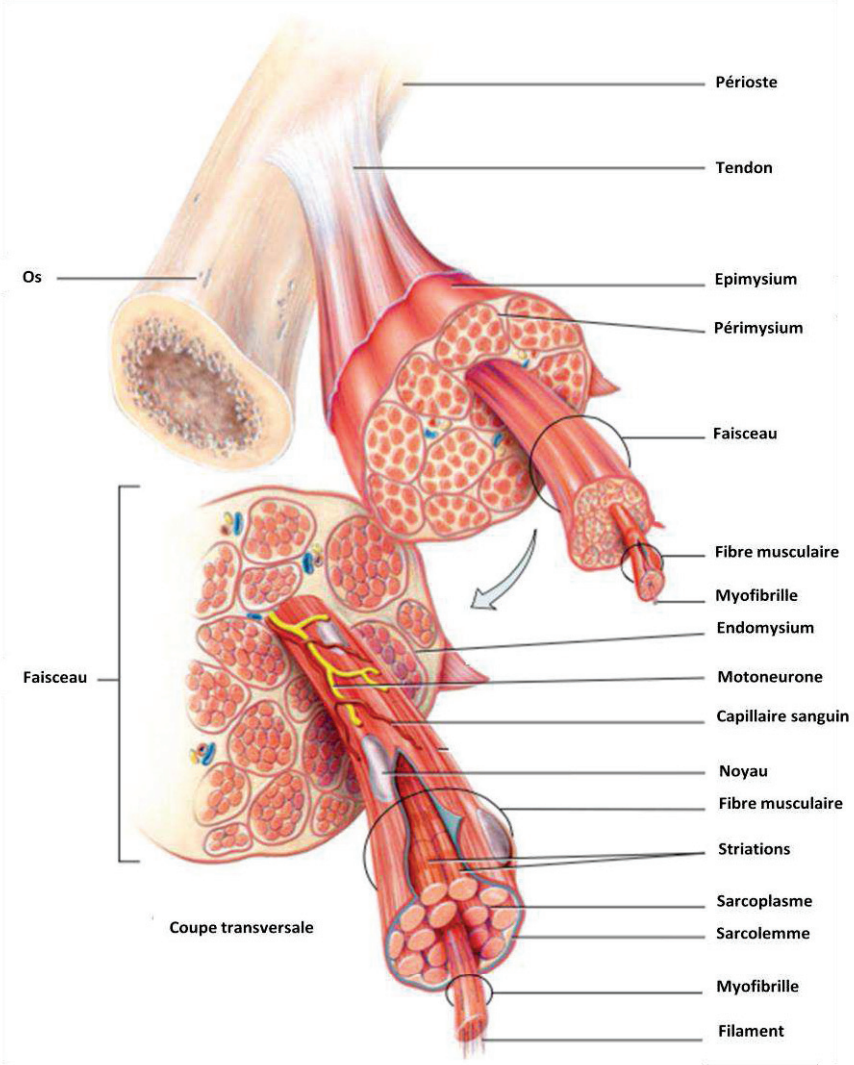
Sauf indication contraire, les informations citées dans cette partie sont tirées de l'ouvrage « Physiologie du muscle squelettique : De la structure au mouvement », de ***David Jones & Sesboüé, 2005***

1.1 Structure du muscle strié squelettique (**Figure 15**)

1.1.1 Généralités

Les muscles striés squelettiques constituent environ 40% de la masse corporelle d'un individu. Ces muscles à contraction volontaire sont impliqués dans le maintien de la posture ainsi que la mobilité (grâce aux tendons permettant leur liaison avec les os), la protection des articulations et la production de chaleur. Ils s'organisent en faisceaux, constitués de milliers de fibres musculaires plurinucléées, issues de la fusion de cellules précurseurs appelées myoblastes. Les muscles squelettiques sont aussi composés de tissu conjonctif, et sont irrigués par de nombreux vaisseaux sanguins. La présence de neurones et de cellules satellites est aussi indispensable, pour l'innervation nécessaire au mouvement et la réparation des lésions musculaires, respectivement.

Figure 15 : Organisation générale des muscles striés squelettiques. Les muscles striés squelettiques, dont la liaison avec les os est assurée par les tendons, s'organisent en faisceaux protégés par une enveloppe conjonctive, l'épimysium. Chacun de ces faisceaux regroupe de nombreuses fibres musculaires, composées de myofibrilles assurant la contraction musculaire. Ces fibres musculaires polynucléées sont irriguées par de nombreux capillaires sanguins, et innervées par des motoneurones. (Adapté de « Principes d'anatomie et de physiologie », de G. Tortora & B. Derrickson (De Boeck Supérieur))



Les muscles striés squelettiques se caractérisent par :

- leur excitabilité, par le biais de stimuli électriques, physiques ou chimiques
- leur contractilité, en réponse à ces stimuli
- leur élasticité/extensibilité, permettant une extension au delà de la position initiale lors d'un mouvement, et le retour à cette même position une fois le mouvement fini
- leur tonicité (ou tonus musculaire), légère contraction involontaire et permanente, permettant le maintien de la posture.
- leur plasticité, propriété permettant de modifier leur structure et de s'adapter au type d'effort fourni

1.1.2 Organisation subcellulaire

1.1.2.1 *Sarcolemme*

Le sarcolemme est la membrane plasmique délimitant les contours des fibres musculaires, et permettant leur liaison avec la matrice extracellulaire. Elle est constituée d'une double couche de phospholipides, et est traversée par des protéines membranaires et transmembranaires, intervenant dans l'ancrage du cytosquelette et sa cohésion avec la matrice extracellulaire, et dans le fonctionnement des fibres musculaires (transmission du signal). Le sarcolemme est le lieu de production du potentiel d'action, à l'origine de la contraction musculaire.

1.1.2.2 *Réticulum sarcoplasmique*

Le réticulum sarcoplasmique correspond au réticulum endoplasmique lisse des cellules non musculaires. Il enveloppe chaque myofibrille et sert de réservoir pour recapter ou relarguer le calcium grâce aux nombreux récepteurs à la Ryanodine (Ryanodine receptor ou Ryr) lors de cycles de contraction/relaxation.

1.1.2.3 *Système tubulaire T*

Le sarcolemme possède de nombreuses invaginations, courant de chaque côté des jonctions sarcomériques entre les bandes foncées (anisotropes, ou bandes A) et les bandes claires (isotropes, ou bandes I), appelées tubules T. Ces invaginations présentent des canaux calciques de type L : Les récepteurs à la DiHydroPyridine, ou DHPR (*DiHydroPyridine Receptor*).

Les tubules T, couplés de façon fonctionnelle au réticulum sarcoplasmique par le biais des citernes terminales, forment la triade, un complexe impliqué dans la transmission du potentiel d'action et le relargage de calcium, responsables de la contraction musculaire.

1.1.2.4 *Myofibrilles* (**Figure 16A**)

Les myofibrilles, de diamètre variable d'1 à 2µm, sont le support de la contraction musculaire. Constituées de 100 à 400 myofilaments, elles s'étendent sur toute la longueur des fibres musculaires, et possèdent un aspect strié, alternant régulièrement zones claires et zones sombres, que leur confère l'enchainement de sarcomères.

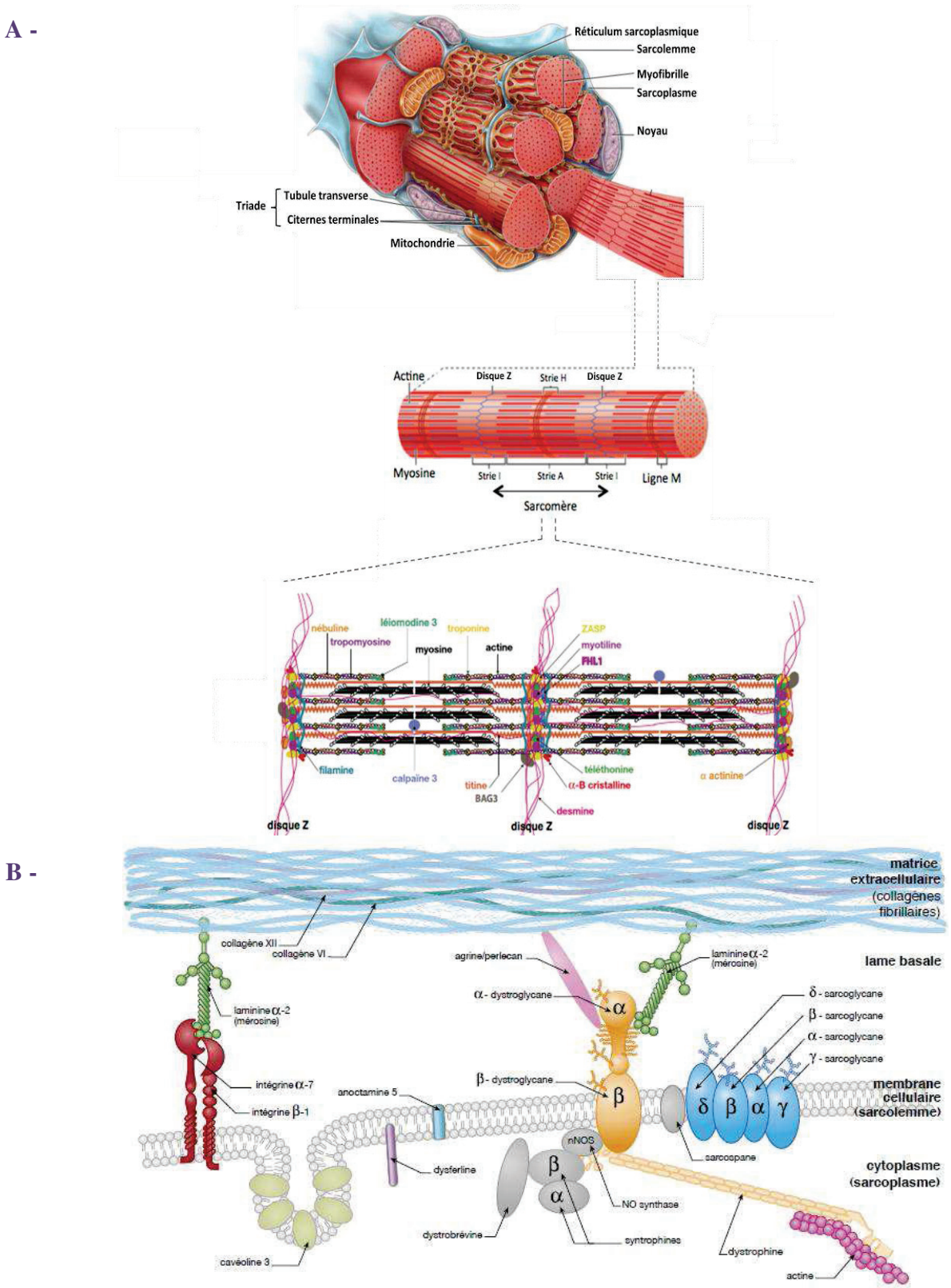


Figure 16 : Organisation subcellulaire du muscle strié squelettique : Sarcomères et complexes d'ancrage. Les fibres musculaires (**A** ; Adapté de **« Principes d'anatomie et de physiologie » de G. Tortora & B. Derrickson (De Boeck Supérieur)** et **« Principales maladies neuromusculaires - Fiche technique », AFM 2015**) se composent de myofibrilles, regroupant les sarcomères, unités contractiles des muscles striés. Ces sarcomères sont constitués de filaments d'actine (fins) et de myosine (épais), et de nombreuses protéines accessoires telles que la desmine, l'αB-crystalline ou la filamine. En réponse à un stimulus, le glissement des filaments fins sur les filaments épais entraine le raccourcissement des fibres musculaires et la contraction musculaire. Les costamères (**B**), structures d'ancrage des muscles striés, regroupent les complexes des intégrines (à gauche) et le DGC (*Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*)

Les sarcomères sont les unités structurales et fonctionnelles des muscles squelettiques. Ils se composent essentiellement de 2 types de myofilaments : les filaments primaires, ou épais, formés de myosine de type II, et les filaments secondaires, ou fins, regroupant l'α-actine, la tropomyosine et la troponine (TnI, TnC, TnT). C'est par un phénomène de glissement entre ces myofilaments que se produit la contraction musculaire, de façon ATP-dépendante. Des partenaires protéiques assurent le maintien de la disposition des filaments fins et épais lors des cycles de contraction/relaxation, ainsi que sa réorganisation en cas d'adaptation à un effort conséquent.

1.1.2.5 *Costamères*

Afin d'assurer la transmission de la force mécanique entre les fibres et la matrice extracellulaire lors de contractions musculaires, les cellules possèdent au niveau de leur membrane plasmique des complexes protéiques, ou adhésions focales, caractéristiques des muscles, appelés costamères.

On trouve 2 types de complexes protéiques, organisés de façon régulière le long des fibres musculaires (**Figure 16B**):

- Le complexe des intégrines
- Le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine, ou DGC (pour *Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*)

1.2 Contraction musculaire

En réponse à un stimulus, un potentiel d'action est généré, et va parcourir l'axone jusqu'à la zone synaptique. L'arrivée du message nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire va entrainer la libération d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, qui va se fixer sur des récepteurs de type nicotiniques (nAchRs, pour *nicotinic Acetylcholin Receptors*), disposés le long de la membrane plasmique. Ce potentiel d'action va ensuite se transmettre le long du sarcolemme jusqu'aux tubules T, et entrainer l'ouverture des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR), ainsi que des récepteurs à la ryanodine (RyR) présents sur les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Cette ouverture simultanée provoque la libération de calcium intra-sarcoplasmique, et sa fixation à la troponine C, une protéine sarcomérique inhibant la contraction musculaire via sa liaison à la tropomyosine. Cette fixation permet l'activation de cette dernière, et la libération des sites de liaison entre l'actine et la myosine, rendant possible le processus de contraction. Des canaux calciques ATP-dépendants ainsi que des pompes

Ca^{2+}/K^{+} permettent le retour à une concentration en calcium intracellulaire normale, en réabsorbant les ions Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique ou en l'expulsant dans le compartiment extra-cellulaire.

1.3 Lésions musculaires et régénération

1.3.1 Cellules satellites, cellules souches musculaires

Mises en évidence en 1961 par Alexander Mauro (**Mauro, 1961**) et Bernard Katz, les cellules satellites sont les cellules souches musculaires adultes. Localisées en périphérie des fibres musculaires striées squelettiques, ces cellules restent à l'état de quiescence (phase G0) en conditions basales. Cependant, en réponse à une lésion musculaire (physique ou chimique), elles sont capables d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et de se diviser, afin de donner naissance à des précurseurs myogéniques et à de nouvelles cellules satellites (**Dumont et al., 2015**).

1.3.2 Processus de régénération

La régénération musculaire est un processus multi-étapes, survenant en réponse à des lésions des muscles squelettiques (pour revue, voir **Laumonier & Menetrey, 2016**). Dans un premier temps, ces lésions entrainent la rupture et la nécrose des fibres musculaires, menant à la libération de cytokines et de chémokines responsables du recrutement de cellules musculaires (cellules satellites) et immunitaires (neutrophiles et macrophages ; **Tidball, 1995**). Dans un second temps, les cellules satellites, reçoivent des signaux permettant leur engagement dans la voie myogénique, et donnent naissance à des précurseurs myogéniques, les myoblastes. En parallèle, des macrophages de type pro-inflammatoires (M1) interviennent dans la phagocytose des débris cellulaires, et induisent la prolifération des myoblastes. Lors de la troisième phase du processus régénératif, les macrophages M1 subissent un « switch », durant lequel ils se transforment en macrophages de type anti-inflammatoire (M2 ; **Juban & Chazaud, 2017**). Ces nouveaux macrophages sont impliqués dans l'atténuation de la réponse inflammatoire, ainsi que dans la différenciation et la fusion des précurseurs myogéniques en myotubes, cellules allongées plurinucléées, et leur maturation finale en fibres musculaires. Enfin, des fibroblastes envahissent la zone en régénération, afin de produire des facteurs permettant le remodelage de la matrice extra-cellulaire constituée de collagène de type I et III, de laminine, et de fibronectine. La revascularisation du site lésé ainsi que l'innervation sont restaurées, rendant la fibre musculaire nouvellement créée fonctionnelle.

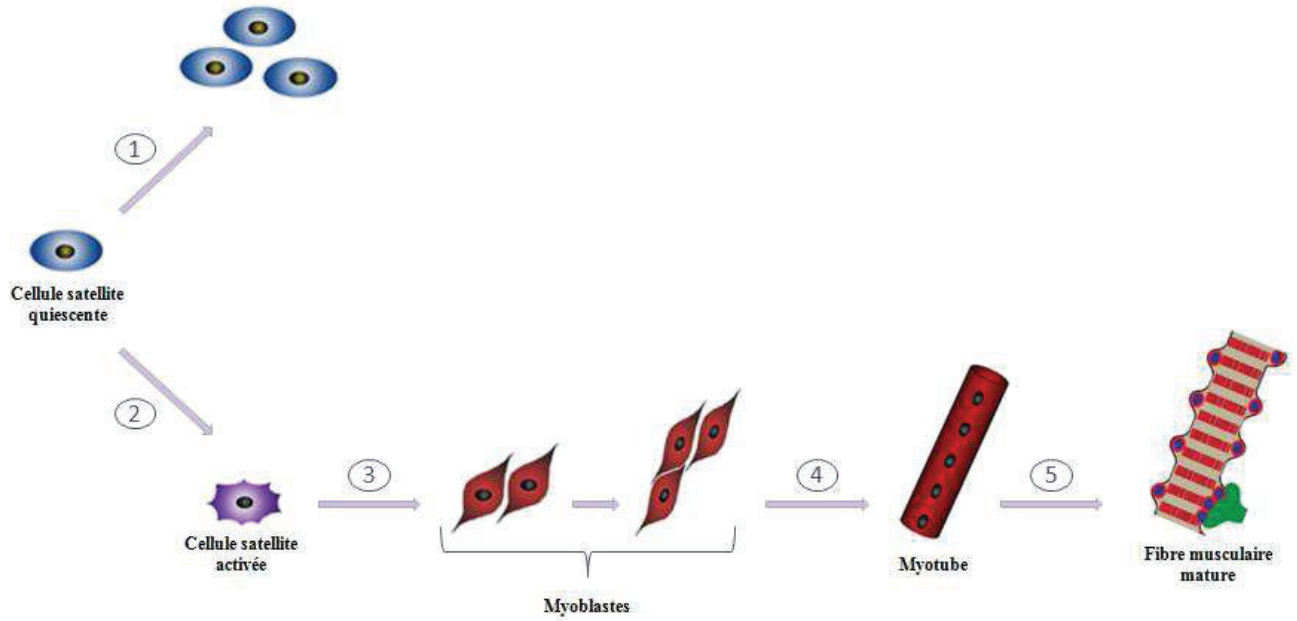


Figure 17 : Le muscle strié squelettique, de la cellule satellite à la fibre musculaire (inspiré de Zammit & al., 2006). A l'état physiologique, les cellules satellites, cellules souches musculaires, sont à l'état de quiescence. Ces dernières sont capables d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire, et de se diviser de façon asymétrique : D'une part, pour reformer le réservoir de cellules souches (1), et d'autre part, pour donner des cellules satellites activées (2), à l'origine de nouveaux précurseurs musculaires, les myoblastes (3). Ces précurseurs vont s'aligner, puis fusionner, afin de former des myotubes (4). Enfin, ces myotubes passent par une phase de maturation (5), durant laquelle se développent les structures sarcomériques, ainsi que les jonctions neuromusculaires.

2. Dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires sont des maladies musculaires rares d'origine génétique, caractérisées par une faiblesse et une dégénérescence progressive des muscles, entrainant leur atrophie et la perte de leur force. Les muscles touchés par ces pathologies sont souvent impliqués dans les mouvements volontaires (cuisses, jambes, bras, avant-bras), mais dans certains cas, les muscles respiratoires et cardiaques peuvent être atteints. Plus de 70 dystrophies musculaires sont à ce jour répertoriées, mais seuls une cinquantaine de gènes ont été identifiés comme causes primaires de celles-ci (**Table 6**). La classification des dystrophies musculaires est établie selon plusieurs critères :

- La composante héréditaire
- L'âge d'apparition des premiers symptômes
- Le profil de faiblesse musculaire
- La vitesse de progression de la maladie
- L'atteinte d'autres tissus que le muscle

Si de nombreuses stratégies thérapeutiques ont vu le jour, il n'existe cependant à l'heure actuelle aucun traitement curatif pour ces maladies.

Classe	Prévalence
Dystrophinopathies	5
Dystrophies myotoniques	5
Dystrophies musculaires des ceintures	0,8
Dystrophies musculaires Fascio-Scapulo-Humérales	5
Dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss	0,3
Dystrophies musculaires congénitales	5
Dystrophies musculaires Oculo-Pharyngées	1
Prévalence cumulée	**22,1**

Table 6 : Les dystrophies musculaires et leur prévalence. Les dystrophies musculaires sont classées en 7 catégories, dépendant de leur défaut génétique primaire. Si la prévalence individuelle de chacune de ces catégories reste relativement faible, la prévalence cumulée de ces pathologies révèle que les dystrophies musculaires impactent la santé humaine de façon importante.

Sauf indications contraires, les informations citées ci-après sont décrites dans « Principales maladies neuromusculaires - Fiche technique » AFM 2015.

2.1 Dystrophinopathies

Les dystrophinopathies sont des myopathies causées par des mutations dans le gène *DMD*, codant pour une protéine essentielle au bon maintien de l'architecture du muscle, la dystrophine. Cette protéine permet notamment au DGC (*Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*) de conserver sa structure intacte, suite aux cycles répétés de contraction/relaxation. Cette partie sera abordée plus en détail dans le chapitre III.

Avec une prévalence de 5/100 000, ce sont les dystrophies musculaires les plus fréquemment rencontrées. Ces pathologies à transmission récessive étant liées au chromosome X, seuls les hommes en sont atteints, les femmes n'étant dans la plupart des cas que porteuses saines.

Il existe deux formes de dystrophinopathies : La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et la dystrophie musculaire de Becker (BMD).

2.1.1 Dystrophie de Duchenne (DMD)

La dystrophie de Duchenne, communément appelée DMD (*Duchenne Muscular Dystrophy*), est la dystrophie musculaire la plus fréquente (avec une incidence de 1/3500 garçons nouveau-nés) ; elle est aussi la plus grave.

Les patients souffrant de DMD présentent une absence totale de dystrophine fonctionnelle au sein de leurs muscles. Cette absence est le plus souvent causée par des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture dans le gène *DMD*, avec une apparition de codons STOP prématurés, ne permettant pas la production de dystrophine. Cette dystrophie sera traitée plus en détail dans le paragraphe 3.

2.1.2 Dystrophie de Becker (BMD)

Contrairement aux patients souffrant de DMD, les patients atteints de BMD (*Becker Muscular Dystrophy*) expriment une dystrophine tronquée et partiellement fonctionnelle, rendant cette forme de dystrophinopathie moins sévère. L'apparition des premiers symptômes survient généralement aux alentours de 12 ans, et s'accompagne d'une évolution plus lente de la pathologie que chez des patients souffrant de DMD.

2.2 Dystrophies myotoniques (DM)

Les dystrophies myotoniques sont des pathologies multi-systémiques affectant à la fois les muscles squelettiques et cardiaque, les yeux, le cerveau, le système nerveux central et le tractus gastro-intestinal (**Yum et al., 2017**). Elles sont transmises de façon autosomique dominante, et provoquées par une expansion de microsatellites tri- ou quadrinucléotidiques dans des portions non-codantes de 2 gènes : des répétitions CTG dans la région 3' non traduite du gène DMPK (*Myotonic Dystrophy Protein Kinase*) dans le cas de la dystrophie myotonique de type 1 (ou dystrophie de Steinert), et des répétitions CCTG dans le premier intron du gène CNBP/ZNF9 dans le cas de la dystrophie myotonique de type 2. La transcription de ces gènes donne naissance à des ARN messagers présentant des expansions CUG ou CCUG, entrainant la formation de foci et la séquestration de protéines cytoplasmiques telles que des membres de la famille MBNL (*Muscleblind like*) ou CELF (*CUGBP, Elav-Like Family*), impliqués notamment dans la régulation de l'épissage alternatif de certains ARN messagers cibles (Jones et al., 2011).

De façon intéressante, certains transcrits ciblés par la protéine MBNL1 codent pour des protéines impliquées dans le couplage excitation/contraction (BIN1, *Bridging Integrator 1* (**Fugier et al., 2011**) ; ATP2A1/SERCA1, *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum* Ca_2^+-*ATPase* (**Kimura et al., 2005**) ; ClC-1, *Chloride Channel 1* (**Mankodi et al., 2002**) ; RyR, *Ryanodine Receptor* ; Cav1.1/CACNA1S, *Calcium Channel, voltage-dependent,, L-type, α1S subunit* (Tang et al., 2012)), la structure sarcomérique (ZASP/LDB3, *LIM domain binding 3*

(**Lin et al., 2006**) ; TNNT3, Troponine T3 (**Kanadia et al., 2003**)) et la signalisation (MTMR1, *Myotubularin-related protein 1* (**Buj-Bello et al., 2002**)).

2.3 Dystrophies musculaires congénitales (CMD)

Les dystrophies musculaires congénitales (CMD pour *Congenital Muscular Dystrophy*) sont un ensemble de maladies hétérogènes à transmission majoritairement autosomique récessive. Un diagnostic moléculaire permet de distinguer 3 groupes différents de dystrophies musculaires congénitales : les CMD impliquant des mutations de protéines de la matrice extracellulaire, de la lame basale et du sarcolemme ; les CMD impliquant des mutations dans des enzymes de glycosylation de l'α-dystroglycane et de la 0-glycosylation (**Muntoni et al., 2007**) ; les CMD impliquant des mutations dans d'autres gènes n'entrant pas dans les groupes précédents.

2.4 Dystrophies Facio-Scapulo-Humérales (FSHD)

Les dystrophies Facio-Scapulo-Humérales (FSHD pour *Facio-Scapulo-Humeral dystrophy*) ou dystrophies de Landouzy-Déjerine sont classées en 2 catégories : les FSHD de type 1, à transmission autosomique dominante, et les FSHD de type 2, à transmission autosomique récessive. Les premiers signes cliniques apparaissent généralement entre 10 et 20 ans, et se traduisent par des atteintes des muscles du visage, des épaules et des bras. Dans la majorité des cas, ces pathologies sont causées par des anomalies de répétition dans la région D4Z4, située sur le bras long du chromosome 4, entrainant un relâchement de la chromatine et une surexpression du facteur de transcription *DUX4* (*Double homeobox 4*) ou de gènes voisins. D'autres anomalies génétiques, telles que des mutations dans les gènes *SMCHD1* (*Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1*) et *DNMT3B* (*DNA (cytosine-5) MethylTransferase 3B*), peuvent entrainer une hypométhylation et un relâchement de la chromatine, menant aussi à la surexpression de *DUX4*. La surexpression de ce facteur de transcription au sein des muscles entraine l'activation de voies de signalisation menant à une atrophie musculaire, à une augmentation du stress oxydatif, ainsi qu'à des anomalies de différenciation (**Celegato et al., 2006**; **Vanderplanck et al., 2011**).

Gène	Protéine	Dystrophie(s) Musculaire(s) associée(s)	Références
Enzymes de glycosylation des dystroglycanes			
ALG13	UDP-N-acétylglusaminyl transférase	Dystrophie musculaire congénitale avec hypoglycosylation du dystroglycane	**Sparks & Krasnewich, 1993**
B3GALNT2	β-1,3-acétylgalactosaminyl transférase 2		**Stevens et al., 2013**
DPM1	Dolichol-Phosphate Mannosyl transférase (sous unité 1)		**Sparks & Krasnewich, 1993**
DPM2	Dolichol-Phosphate Mannosyl transférase (sous unité 2)		
DPM3	Dolichol-Phosphate Mannosyl transférase (sous unité 3)	Dystrophie musculaire congénitale avec défaut de glycosylation de type 1O	
B3GNT1	β-1,4-glucuronyl transférase	Syndrome de Walker-Warburg	**Buysse et al., 2013**
POMGNT2	*Protein O-linked mannose N-acétylglucosaminyl transferase 2*		**Manzini et al., 2012**
POMK	*Protein O-mannose kinase*		**Yoshida-Moriguchi et al., 2013**
FKRP	*Fukutin-related protein*	Dystrophie musculaire congénitale type 1C (MDC1C), syndrome Muscle-Œil-Cerveau, syndrome de Walker-Warburg, LGMD2I	**Brockington et al., 2001**
FKTN	*Fukutin*	Syndrome de Walker-Warburg, dystrophie musculaire congénitale de Fukuyama, LGMD2M	**Nigro & Savarese, 2014**
GMPPB	GDP-mannose phosphorylase B	LGMD2T, syndrome Muscle-œil-Cerveau, dystrophie musculaire congénitale avec hypoglycosylation du dystroglycane	
ISPD	Isoprénoïde synthétase	LGMD2U, syndrome de Walker-Warburg	
LARGE	*Like-glycosyltransferase*	Dystrophie musculaire congénitale avec hypoglycosylation du dystroglycane (MDC1D)	**Longman et al., 2003**

POMGNT1	*Protein O-linked mannose N-acétylglucosaminyl transferase 1*	LGMD2O, syndrome Muscle-Œil-Cerveau, syndrome de Walker-Warburg	**Nigro & Savarese, 2014**
POMT1	*Protein O-mannosyl transferase 1*	LGMD2K, syndrome de Walker-Warburg	
POMT2	*Protein O-mannosyl transferase 2*	LGMD2N, syndrome de Walker-Warburg, syndrome Muscle-Œil-Cerveau	
TMEM5	*Transmembrane Protein 5*	Dystrophie musculaire congénitale avec hypoglycosylation du dystroglycane	**Astrea et al., 2016**
Architecture et transport nucléaires			
EMD	Emerine	EDMD1	**Bonne, Leturcq, & Ben Yaou, 1993**
LMNA	Lamine A/C	EDMD2/3, laminopathie (L-CMD), LGLD1B	
SYNE1	*Spectrin-repeat containing, nuclear enveloppe 1 (nesprin 1)*	EDMD4	**Zhang et al., 2007**
SYNE2	*Spectrin-repeat containing, nuclear enveloppe 2 (nesprin 2)*	EDMD	
TMEM43/LUMA	*Transmembrane protein 43*	EDMD7	**Liang et al., 2011**
TNPO3	Transportine 3	LGMD1F	**Melià et al., 2013**
Protéines de la matrice extracellulaire, du sarcolemme et des sarcomères			
ACTA1	α-actine	Syndrome de la colonne vertébrale raide	**O'Grady et al., 2015**
DES	Desmine	LGMD2R, LGMD1E	**Nigro & Savarese, 2014**
PLEC1	Plectine	LGMD2Q	
SGCA	α-sarcoglycane	LGMD2D	
SGCB	β-sarcoglycane	LGMD2E	
SGCG	γ-sarcoglycane	LGMD2C	
SGCD	δ-sarcoglycane	LGMD2F	

Lien entre sarcolemme et matrice extracellulaire			
COL12A1	Collagène de type XII	Syndrome d'Ullrich, myopathie de Bethlem, dystrophie musculaire congénitale liée au collagène XII	**Zou et al., 2014**
COL6A1	Collagène de type VI, chaîne α1	Syndrome d'Ullrich, myopathie de Bethlem	**Lampe & Bushby, 2005**
COL6A2	Collagène de type VI, chaîne α2	Syndrome d'Ullrich, myopathie de Bethlem, myosclérose	
COL6A3	Collagène de type VI, chaîne α3	Syndrome d'Ullrich, myopathie de Bethlem	
DMD	Dystrophine	Dystrophie musculaire de Duchenne/Becker (DMD/BMD)	**Rumeur, 2015**
ITGA7	Intégrine α7	Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en intégrine α7	**Mayer et al., 1997**
LAMA2	Laminine α2/Mérosine	Dystrophie musculaire congénitale de type 1A (MDC1A), dystrophie musculaire congénitale de type 1B (MDC1B)	**Allamand & Guicheney, 2002**
TRAPPC11	*Trafficking Protein Particle Complex 11*	LGMD2S, Dystrophie musculaire congénitale à foie gras et caractère infantile	**Nigro & Savarese, 2014**
Développement et réparation du muscle			
ANO5	Anoctamine 5	LGMD2L	**Nigro & Savarese, 2014**
CAV3	Cavéoline 3	LGMD1C	
DAG1	α/β dystroglycanes	LGMD2P	
DYSF	Dysferline	LGMD2B	
FHL1	*Four and a half LIM domain*	EDMD6	**Bonne, Leturcq, & Ben Yaou, 1993**
MYOT	Myotiline	LGMD1A	**Nigro & Savarese, 2014**
TCAP	Téléthonine	LGMD2G, dystrophie musculaire congénitale avec défaut en téléthonine	
TTN	Titine	LGMD2J	
Autres			
CAPN3	Calpaïne 3	LGMD2A	**Nigro & Savarese, 2014**

CHKB	Choline kinase β	Dystrophie musculaire congénitale avec anomalies structurales mitochondriales	**Mitsuhashi et al., 2011**
DMPK	*Myotonic Dystrophy Protein Kinase*	Dystrophie myotonique de type 1 (Steinert)	**Cho & Tapscott, 2007**
DNAJB6	Hsp40/DNAJB6	LGMD1D	**Nigro & Savarese, 2014**
DNM2	Dynamine 2	Dystrophie musculaire congénitale avec défaut en DNM2	**Romero, 2010**
DNMT3B	DNA Methyltransferase 3 β	FSHD1B	**Van den Boogaard et al., 2016**
DUX4	*Double Homeobox 4*	FSHD1A	**Dixit et al., 2007**
GAA	α-glucosidase acide	LGMD2V	**Nigro & Savarese, 2014**
HNRPDL	*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D-like*	LGMD1G	
PABPN1	*Poly(A) binding protein nuclear 1*	Dystrophie musculaire OculoPharyngée	**Brais et al., 1998**
PINCH2/LIMS2	*LIM zinc finger domain containing 2*	LGMD2W	**Nigro & Savarese, 2014**
POPDC1/BVES	*Blood Vessel Epicardial Substance*	LGMD2X	**Schindler et al., 2016**
SEPN1	Sélénoprotéine, type N1	Syndrome de la colonne vertébrale raide (RSMD1)	**Moghadaszadeh et al., 2001**
SMCHD1	*Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1*	FSHD1B	**Lemmers et al., 2012**
TOR1AIP1	*Torsin A interacting protein 1*	LGMD2Y	**Ghaoui et al., 2016**
TRIM32	*Tripartite-containing motif 32*	LGMD2H	**Nigro & Savarese, 2014**
ZNF9/CNBP	Cellular Nucleic acid-Binding Protein	Dystrophie myotonique de type 2	**Cho & Tapscott, 2007**

Dystrophies musculaires congénitales
Dystrophies musculaires des ceintures (Limb-girdle)
Dystrophies musculaires OculoPharyngées
Dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss (EDMD)
Dystrophinopathies
Dystrophies musculaires myotoniques
Dystrophies musculaires FacioScapuloHumérales (FSHD)

Table 7 : Les dystrophies musculaires et leurs défauts génétiques primaires. Les dystrophies musculaires sont des maladies génétiques rares, caractérisées par l'apparition progressive d'une faiblesse musculaire et la dégénérescence des fibres musculaires. A ce jour, on dénombre plus de 70 pathologies différentes, et 63 gènes ont été identifiés comme défauts génétiques primaires de ces pathologies.

2.5 Dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss (EDMD)

Les dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss (EDMD pour *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy*) se caractérisent par une faiblesse musculaire progressive et une amyotrophie des bras, des épaules et des jambes. Les origines génétiques de ces pathologies se traduisent par un déficit en protéines liées à l'enveloppe du noyau, telles que l'émerine, les lamines A/C et les nesprines, entrainant un défaut de couplage avec le cytosquelette des fibres musculaires. (**Bonne et al., 1999**; **Nagano et al., 1996**; **Zhang et al., 2007**)

2.6 Dystrophies Oculo-Pharyngées (OPMD)

Pathologies à transmission autosomique dominante et à développement tardif (entre 40 et 60 ans), les dystrophies musculaires oculo-pharyngées (OPMD pour *Oculo-Pharyngeal Muscular Dystrophy*) sont causées par des expansions de triplets GCA dans le gène *PABPN1* (*Polyadenylate-binding nuclear protein 1*), codant pour la protéine PABP2 (*Polyadenylate-binding protein 2*). Les résidus poly-alanine générés entrainent la formation d'inclusions nucléaires de PABP2, capables d'interagir avec la queue polyA d'ARN messagers et de séquestrer ces derniers, empêchant ainsi leur traduction (**Calado et al., 2000**). Cette maladie touche principalement les muscles releveurs des paupières et les muscles de la déglutition, mais les ceintures scapulaire et pelvienne peuvent aussi être affectées, rendant certains mouvements (tels que la marche) difficiles.

2.7 Dystrophies musculaires des ceintures (LGMD)

Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb-Girdle Muscular Dystrophy) regroupent un grand nombre de pathologies touchant principalement les muscles des ceintures scapulaire et pelvienne. A ce jour, on dénombre 31 LGMD, répertoriées en 2 classes : les LGMD de type 1, à transmission autosomique dominante (LGMD1A à LGMD1H) et les LGMD de type 2, à transmission autosomique récessive (LGMD2A à LGMD2W ; les plus fréquentes). L'âge d'apparition des premiers symptômes, ainsi que leur rapidité d'évolution sont très variables, tout comme leur sévérité.

Les gènes impliqués dans ces pathologies codent majoritairement pour des protéines structurales du sarcolemme, des sarcomères, de l'enveloppe nucléaire ou du cytoplasme.

3. Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

*Sauf indications contraires, les informations citées ci-après sont issues majoritairement de : DMD mutations database, **Bladen et al., 2015; Blake et al., 2002; Leturcq & Tuffery-Giraud, 2015***

3.1 Historique & étiologie

La dystrophie musculaire de Duchenne, communément appelée DMD, a été initialement décrite en 1851 par Edward Meryon, puis en 1858 par Guillaume Duchenne de Boulogne qui a étudié la forme la plus sévère de la maladie, et lui a donné son nom.
Les premiers signes cliniques de la dystrophie musculaire de Duchenne se manifestent généralement vers l'âge de 2-3 ans et se traduisent par un retard dans l'apprentissage de la marche, l'acquisition d'une démarche dandinante et des difficultés à se remettre debout lors de chutes. D'un point de vue musculaire, une pseudo-hypertrophie des mollets peut déjà être observée à cet âge. S'en suivent pour les patients des difficultés à courir et à monter les escaliers, ainsi que la perte de la marche lors de l'adolescence, nécessitant l'utilisation d'un fauteuil roulant. Des scolioses plus ou moins prononcées apparaissent suite à l'immobilité prolongée, et peuvent nécessiter des interventions chirurgicales, en vue de soulager les patients. Des complications respiratoires et cardiaques sont généralement responsables du décès des malades, dont l'espérance de vie, qui ne dépassait pas 25 ans en 1970, approche désormais les 40 ans (**Kieny et al., 2013**).

L'origine génétique de cette pathologie est restée mystérieuse jusqu'à l'identification du gène de la dystrophine en 1986 (**Monaco et al., 1986**). Avec ses 2,6 millions de paires de bases, ce gène, localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21.2), possède plusieurs promoteurs permettant la synthèse de différentes isoformes tissus-spécifiques de la protéine :
- l'isoforme DP427M (musculaire), P (localisée dans les cellules de Purkinje), L (lymphoblastique) ou B (localisée dans les neurones adultes) composée de 79 exons.
- l'isoforme DP412e, embryonnaire (**Massouridès et al., 2015**)
- l'isoforme DP260, rétinienne (**Wersinger et al., 2011**)
- l'isoforme DP140, présente dans le cerveau, la rétine et les reins (**Lidov & Kunkel, 1997**; **Lidov et al., 1995**; **Wersinger et al., 2011**)
- l'isoforme DP116, localisée dans les nerfs périphériques de l'adulte
- l'isoforme DP71, spécifique du cerveau et des tissus non musculaires

- l'isoforme DP40, spécifiquement localisée dans le cerveau

Le gène de la dystrophine est soumis à un très grand nombre de mutations (Figure 18), pouvant entrainer des décalages de cadres de lecture ainsi que l'apparition de codons STOP prématurés, menant à la production de dystrophine peu fonctionnelle (dans le cas de la dystrophie musculaire de Becker), ou à l'absence totale de protéine (dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne). Environ 70 à 80% des mutations impliquées dans la dystrophie musculaire de Duchenne correspondent à des insertions/délétions, contre 20-30% de mutations ponctuelles. Ces modifications génétiques surviennent préférentiellement dans 2 régions du gène, caractérisées de « hot spot » : autour des exons 2 à 20, ou entre les exons 45 et 55 (**Leturcq & Tuffery-Giraud, 2015**).

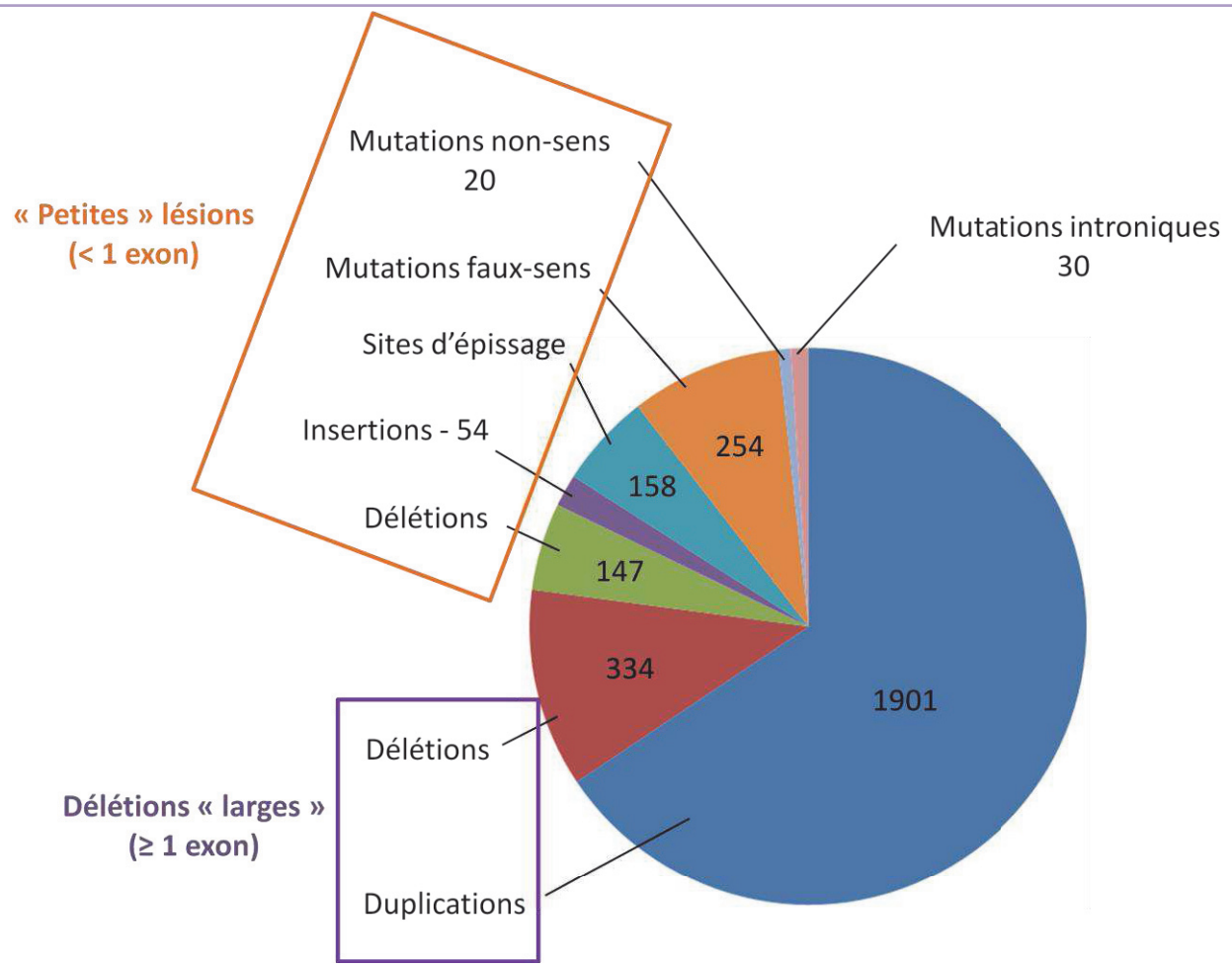


Figure 18 : Les différents types de mutations impliqués dans les dystrophinopathies (Source : DMD mutations database). Le gène de la dystrophine est le plus long gène retrouvé chez l'Homme. Sa taille de β,4 millions de paires de bases (β,4εb) et ses 79 exons rendent propices l'apparition de diverses mutations : des lésions dites « larges » d'au moins un exon, de petites lésion (< un exon) ou des mutations introniques (favorisant l'apparition d'exons cryptiques). Au total, β898 mutations différentes impliquées dans le développement des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker sont référencées sur le site DMD

3.2 Défauts subcellulaires

A l'état embryonnaire, les muscles des patients atteints de DMD ne présentent, d'un point de vue histologique, aucune différence avec des muscles sains. Les premiers défauts sont observables dès la naissance, avant même l'apparition de faiblesse musculaire.

3.2.1 Altérations du sarcolemme et de sa fonctionnalité

L'absence de dystrophine entraîne une fragilisation de la membrane plasmique des fibres musculaires, due à la déstabilisation du DGC et à la rupture du lien existant entre compartiment intracellulaire et matrice extracellulaire. La transmission de la force mécanique lors des cycles de contractions musculaires est donc altérée, entrainant la rupture du sarcolemme.

3.2.2 Perturbations de l'homéostasie calcique

Dans les muscles des patients atteints de DMD, l'homéostasie calcique est perturbée par une entrée massive d'ions Ca_2^+ dans les fibres musculaires, *via* des canaux calciques et des points de rupture présents dans le sarcolemme. Le calcium est impliqué dans la régulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, intervenant notamment dans le processus de contraction musculaire et dans l'activation de protéases telles que les calpaïnes. L'activation de ces enzymes entraine *in fine* l'activation de voies de mort cellulaire, telle que l'apoptose (**Allard, 2006**).

3.2.3 Déficit en nNOS

Le monoxyde d'azote, ou NO, est un composé vasodilatateur, augmentant l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires au bon fonctionnement des muscles. Dans le DGC, se trouve une enzyme, la nNOS (*neuronal Nitric Oxyde Synthase*), chargée de synthétiser ce monoxyde d'azote. Cette enzyme est ancrée à la membrane sarcoplasmique par le biais d'une interaction avec la dystrophine (**Molza et al., 2015**). Cependant, dans les muscles de patients atteints de DMD, l'absence de dystrophine déstabilise le DGC, entrainant la relocalisation subcellulaire cytosolique de cette enzyme et sa dysfonction. De plus, on observe chez ces patients une diminution de l'expression de la nNOS, reflétée par une baisse de la transcription et de la traduction (**Chang et al., 1996**). Ces anomalies pourraient participer à la diminution de l'irrigation musculaire et donc à la fatigue musculaire (**Sander et al., 2000**; **Sato et al., 2008**).

3.2.4 Inflammation

La dégénérescence progressive des fibres musculaires retrouvée chez les patients DMD entraine un recrutement de cellules du système immunitaire. La fuite de cytokines à travers le sarcolemme endommagé, ainsi que l'infiltration de neutrophiles et de macrophages, permettent le développement d'une réaction inflammatoire, contribuant ainsi à l'évolution de la maladie (**Spencer & Tidball, 2001**).

3.2.5 Altération du processus régénératif

Un nouveau rôle de la dystrophine a récemment été mis en évidence par l'équipe de Mickael Rudnicki, dans la division asymmétrique des cellules satellites lors de la régénération musculaire. Dans les cellules satellites de patients DMD, dépourvues de dystrophine, la division des cellules satellites est altérée et ne permet plus la génération de précurseurs myogéniques, entrainant l'accumulation de cellules satellites dans les muscles, et un défaut de régénération musculaire (**Chang et al., 2016**; **Dumont et al., 2015**).

3.3 Modèles d'étude

3.3.1 Cultures primaires et lignées cellulaires

Les biopsies musculaires effectuées sur les quadriceps et/ou deltoïdes de jeunes patients atteints de DMD peuvent être utilisées dans le cadre d'un diagnostic, mais aussi dans le cadre de la recherche médicale. Cependant, même si ces cultures primaires, extraites directement de leur milieu physiologique, sont un bon moyen d'étudier la pathologie, leur fragilité et leur rareté en font un modèle très difficile à utiliser. Pour pallier à ce manque de matériel, il est désormais possible de cultiver des lignées de myoblastes immortalisés ; ces lignées sont capables d'exprimer des marqueurs myogéniques et de lancer une programme de différenciation *in vitro* (**Mamchaoui et al., 2011**).

3.3.2 Modèles invertébrés

3.3.2.1 *Caenorhabditis elegans*

Depuis le séquençage de son génome en 1998, le nématode est devenu un modèle de choix dans la création de souches mimant un grand nombre de maladies humaines. En effet, plus de 65 % des gènes impliqués dans des pathologies chez l'humain possèdent un gène orthologue chez *C. elegans*. Ainsi, en 2000, une souche mimant la dystrophie musculaire de Duchenne a été développée par l'équipe de Laurent Ségalat et est toujours utilisée dans notre équipe

(**Gieseler et al., 2000**; **Megeney et al., 1996**). Cette souche résume à la fois le processus de dégénérescence musculaire observable chez les patients DMD, mais aussi les mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie (**Brouilly et al., 2015**).

3.3.2.2 *Drosophila melanogaster*

Tout comme le nématode, la drosophile, ou mouche du fruit, est un organisme modèle très utilisé dans l'étude des pathologies humaines. Cependant, contrairement à *Caenorhabditis elegans*, les cellules musculaires de la drosophile sont fusionnées, comme chez les mammifères. Son court cycle de vie et de développement, son génome entièrement séquencé et la présence de nombreux gènes orthologues aux gènes humains ont permis le développement de souches mimant des maladies retrouvées chez l'humain, telles que les dystrophies musculaires (LGMD, DMD, CMD… ; **Plantié et al., 2015**; **Shcherbata et al., 2007**).

3.3.3 Modèles vertébrés

3.3.3.1 *Modèle murin*

La souris est l'un des organismes modèles vertébrés les plus couramment utilisés en génétique, grâce à la forte homologie entre son génome et le génome humain (> 90%). Ainsi, en mutant le gène de la dystrophine, des équipes ont réussi à développer une lignée murine capable de mimer la dystrophie musculaire de Duchenne la souris *mdx* (**Bulfield et al., 1984**; **Sicinski et al., 1989**). Cependant, la souris possédant un fort taux de régénération musculaire dû en partie à l'expression d'utrophine, la dégénérescence musculaire observée dans ce modèle n'est pas aussi important que celle observée chez les patients humains. Une nouvelle lignée murine a par la suite été créée, inactivant à la fois le gène de la dystrophine et le gène de l'utrophine (**Isaac et al., 2013**). Les animaux double KO possèdent un phénotype plus sévère que les souris *mdx*, reflétant de façon plus réaliste les symptômes de la dystrophie musculaire de Duchenne.

3.3.3.2 *Poisson zèbre*

84 % des gènes humains impliqués dans des pathologies possèdent un orthologue chez le poisson zèbre (*Zebrafish*). Sa facilité d'entretien, le grand nombre de descendants générés et surtout sa transparence, permettant des observations microscopiques *in vivo,* en font un modèle d'étude très utilisé, notamment dans l'analyse des mécanismes d'embryogenèse et de formation des organes, de la migration cellulaire, du comportement et du sommeil (**Bassett**

& Currie, 2004; **Steffen et al., 2007**). L'identification d'un gène orthologue de la dystrophine humaine, le gène *sapje*, a permis le développement d'un modèle DMD chez le poisson zèbre, présentant des défauts sarcomériques ainsi que des problèmes de contraction (**Li et al., 2014**) similaires à ceux retrouvés chez les patients.

3.3.3.3 *Autres modèles*

D'autres organismes modèles sont utilisés pour étudier la dystrophie musculaire de Duchenne. La DMD a été modélisée chez de nombreuses races de chien, dont la plus connue et étudiée reste le Golden Retriever (GRMD, pour *Golden Retriever Muscular Dystrophy*) ; les défauts phénotypiques observés sont similaires à ceux retrouvés chez l'humain (pour revue, voir **Duan, 2015**). Des races de chats (**Gaschen & Burgunder, 2001**) ont également été génétiquement modifiées afin de mimer cette pathologie et présentent, en plus de l'absence d'expression de la dystrophine, une diminution du nombre de fibres intermédiaires (type 2A). De même, le modèle porcin de la DMD récapitule bon nombre de caractéristiques phénotypiques retrouvées chez les patients : élévation du taux de Créatine Kinase, apparition de lésions nécrotiques, développement de cardiomyopathies (**Klymiuk et al., 2013**; **Selsby et al., 2015**)… Enfin, chez les rats DMD (**Larcher et al., 2014**), les muscles des individus dystrophiques présentent de sévères fibroses, ainsi qu'une infiltration de tissu adipeux. De plus, une baisse globale de la force musculaire, ainsi que l'apparition de cardiomyopathies ont pu être observées.

3.4 Stratégies thérapeutiques

Bien qu'à l'heure actuelle, aucun traitement curatif ne soit disponible pour la dystrophie musculaire de Duchenne, de nombreux essais cliniques sont en cours (**https://clinicaltrials.gov**). 2 types de stratégies thérapeutiques sont développées : la première, à but curatif, vise principalement à corriger le défaut génétique primaire, et à permettre la réexpression de la dystrophine ou à complémenter cette expression par l'expression d'utrophine ; la seconde, à but palliatif, vise à traiter les défauts secondaires associés à la DMD, et à améliorer la qualité de vie des patients, en retardant ou en limitant l'apparition des symptômes de la maladie.

3.4.1 Correction du défaut génétique primaire

3.4.1.1 *Saut d'exon*

Le saut d'exon, ou *exon skipping*, est une stratégie visant à restaurer un cadre de lecture correct en retirant artificiellement un ou plusieurs exons du gène de la dystrophine, pour permettre la transcription et l'épissage d'un ARN messager dont la traduction permettra l'expression d'une protéine tronquée, mais fonctionnelle. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AON, pour *Antisens OligoNucleotide*) spécifiques de séquences cibles du gène et reste la stratégie la plus prometteuse dans le traitement de la DMD (**Arechavala-Gomeza et al., 2012**; **Koo & Wood, 2013**). Plusieurs molécules ont fait l'objet d'essais cliniques ces dernières années. Ainsi, le Drisapersen, un oligonucléotide dirigé contre l'exon 51, a atteint la phase III. Cependant la trop faible amélioration du score 6MWT (*6 Minutes Walk Test*, ou test de marche sur 6 minutes) chez les 186 patients testés n'a pas convaincu la FDA (*Food & Drug Administration*), qui a par conséquent refusé de délivrer une autorisation de mise sur le marché pour ce composé (**Lu et al., 2014**). En parallèle, un second laboratoire a mis au point un autre AON, l'Eteplirsen, lui aussi dirigé contre l'exon 51 de la dystrophine. L'augmentation de l'expression de la protéine chez les patients DMD observée dans les phases II et III, le ralentissement de la perte de la marche ainsi que de la fonction respiratoire et la bonne tolérance des patients ont mené, en Septembre 2016, à la mise sur le marché de cette molécule (**Lim et al, 2017**).

3.4.1.2 *Translecture de codon STOP*

Les mutations non-sens représentent 10 % des mutations impliquées dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Elles consistent en l'apparition de codons STOP prématurés dans la séquence du gène de la dystrophine, menant à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle, ou à la dégradation des ARN messagers par le système NMD (*Nonsense-mediated mRNA Decay*). L'utilisation de composés chimiques, tels que l'Ataluren (**Bushby et al., 2014**) ou la Gentamicine, permet de forcer la machinerie traductionnelle à passer outre ce codon stop et à poursuivre la traduction, et la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Cependant, bien qu'un traitement par le PTC124 (Ataluren) ait permis de restaurer une expression partielle de dystrophine dans les muscles de patients DMD (**Finkel et al., 2013**) et de retarder leur déclin ambulatoire (**Bushby et al., 2014**), la Gentamicine n'a montré que très peu d'effets bénéfiques (**Malik et al., 2010**).

3.4.1.3 *Correction/Supplémentation génétique*

Une autre stratégie consiste à complémenter les cellules musculaires DMD en dystrophine (**Lostal et al., 2014**) ou en utrophine (un homologue fonctionnel de la dystrophine), via la transduction adéno-virale (**Athanasopoulos et al, 2004**) de mini/micro-versions de ces gènes (**Blankinship et al, 2006**; **Odom et al, 2008**). Cependant, un des facteurs limitant de cette technique reste le développement par les patients traités d'une éventuelle réponse immunitaire, dirigée contre la capside virale et/ou le transgène (**Okada & Takeda, 2013**). Un traitement immunosuppresseur pourrait donc accompagner ce type de thérapie, afin de maitriser cette réponse immunitaire. La restauration de l'expression de dystrophine/utrophine fait actuellement l'objet d'essais cliniques visant à tester le caractère immunogène de cette technique. En 2010, la phase I d'un premier essai (NCT00428935) a ainsi démontré l'absence de réponse immunitaire à l'égard d'un AAV exprimant la minidystrophine.

Enfin, il est désormais possible de procéder directement à des modifications du génome, grâce à l'utilisation d'enzymes telles que des méganucléases (**Popplewell et al., 2013**). L'édition génétique peut se révéler très utile dans le cas de délétions d'exons : les enzymes provoquent des cassures double brin de l'ADN et, grâce à un phénomène de recombinaison homologue à partir d'un ADN matrice issu d'un donneur sain, peuvent permettre la restauration du gène et de l'expression de la dystrophine. Ainsi, l'édition génétique du gène de la dystrophine dans des muscles de souris mdx (**Xu et al., 2016**) a permis la restauration de l'expression, de la localisation ainsi que de la fonction de la protéine. Enfin, la méthode du CRISPR/Cas9 a été employée avec succès dans des myoblastes issus de patients DMD présentant une duplication de l'exon 2, entrainant une réexpression de la dystrophine, à l'échelle de l'ARN messager et de la protéine (**Lattanzi et al., 2017**).

3.4.1.4 *Injection de cellules souches*

Il est aussi envisageable de transplanter directement des cellules souches (cellules satellites ou iPSCs) provenant de donneurs sains ou corrigées génétiquement à partir de cellules de malades, dans les muscles de patients DMD, afin de permettre leur régénération. Cette méthode, bien qu'applicable à tous les types de mutations, reste toutefois limitée par le faible nombre de cellules satellites, et les méthodes d'injection intramusculaire encore imprécises (**Tabebordbar et al., 2013**). L'utilisation de cellules souches reprogrammées (iPSCs) dans la régénération musculaire a été testée avec succès dans les modèles canin (**Nitahara-Kasahara et al., 2012**) et murin (**Zhang et al., 2015**).

3.4.2 Traitement des défauts secondaires

3.4.2.1 *Utilisation de glucocorticoïdes*

Les glucocorticoïdes, tels que le Deflazacort ou la Prednisone, sont les médicaments les plus fréquemment utilisés dans le traitement des symptômes de la dystrophie de Duchenne. Bien que leur(s) mécanisme(s) d'action soi(en)t encore mal compris, leur utilisation quasi systématique a montré une nette amélioration de la motricité des patients, avec un retard de la perte de la marche (10 ans chez les patients non traités, contre 14,5 ans chez les patients traités quotidiennement ; **Ricotti et al., 2013**), un développement de cardiomyopathies différé (13,1 ans contre 15,2 ans ; **Barber et al., 2013**), une diminution du développement de scolioses (**Lebel et al., 2013**), une amélioration de la fonction respiratoire (**Buyse et al., 2013**) et une diminution du taux de mortalité (**Schram et al., 2013**). Cependant, malgré des effets positifs évidents, les traitements aux glucocorticoïdes possèdent de nombreux effets indésirables, tels qu'une prise de poids excessive, la diminution de la densité des os, l'hypertension artérielle, l'apparition d'une cataracte, et des troubles de l'humeur (**Beytía et al., 2012**).

3.4.2.2 *Amélioration du métabolisme oxydatif*

Une conséquence indirecte de l'absence de dystrophine dans les muscles de patients DMD est la dérégulation du métabolisme oxydatif. L'administration d'un traitement à base d'Idebenone, un analogue du coenzyme Q10, permettrait d'améliorer ce processus chez des patients non traités aux corticoïdes, ce type de médicaments ayant montré un effet neutralisant sur le composé. Après des essais concluants sur le modèle murin *mdx* (**Buyse et al., 2009**), des essais cliniques ont mis en évidence les effets bénéfiques du Iedebenone sur les fonctions cardiaque et respiratoire (**Buyse et al., 2015**) chez les patients DMD.

3.4.2.3 *Autres méthodes*

Le maintien de la masse musculaire est une stratégie thérapeutique secondaire très importante pour les patients DMD, dont l'un des principaux symptômes est la fonte excessive des muscles. Des résultats prometteurs ont notamment été obtenus suite à l'utilisation de stéroïdes anabolisants tels que l'Oxandrolone (**Orr & Singh, 2004**), ainsi que d'agonistes des récepteurs aux androgènes (**Ponnusamy et al., 2017**). Les effets de la diminution des mécanismes de protéolyse (cathepsine S, calpaïnes et protéasome) ont aussi été analysés et ont montré une diminution du phénotype dystrophique chez les souris *mdx* (**Briguet et al., 2008** ; **Tjondrokoesoemo et al., 2016**).

Par ailleurs, le développement d'une réaction inflammatoire fait partie des autres symptômes rencontrés chez les patients DMD. La mise en évidence récente dans le modèle murin de l'implication du récepteur P2RX7, acteur de la réponse immunitaire, dans le phénotype dystrophique a permis de démontrer que la modulation de l'inflammation était une piste thérapeutique prometteuse dans le traitement de la DMD (**Sinadinos et al., 2015**).

Enfin, des études ont été menées sur les effets de l'inhibition de la myostatine, une protéine capable d'inhiber la prolifération des cellules satellites. Si le traitement de souris *mdx* par des anticorps masquant les récepteurs à la myostatine a permis d'augmenter la masse musculaire de ces animaux, de graves effets secondaires se sont développés, tels que des myopathies mitochondriales sévères (**Relizani et al., 2014**). Un essai clinique débuté en 2010 sur des patients DMD a ainsi du être stoppé prématurément, les patients présentant des symptômes inquiétants. L'analyse de cette voie de signalisation est cependant toujours en cours, afin de trouver de nouveaux traitements.

CHAPITRE 3 : Contrôle Qualité des Protéines et Dystrophie Musculaire de Duchenne

1. Etat de l'art

Différentes études réalisées sur des modèles variés de dystrophies dont la DMD rapportent des modifications de certains acteurs du contrôle qualité des protéines.

Ainsi, certains types de mutations du gène de la dystrophine touchant le domaine de liaison à l'actine (ABD, pour *Actin Binding Domain*) entrainent une déstabilisation de la structure protéique, provoquant la formation d'agrégats de dystrophine et rendant la protéine non fonctionnelle (**Singh et al., 2010**).

Des analyses protéomiques réalisées chez des souris *mdx* ont mis en évidence une augmentation de l'expression de différentes isoformes de Hsp70 (**Carberry et al., 2014**), ainsi que de HspB5/αB-crystalline (**Carberry et al., 2013**). Une augmentation de l'expression de certains chaperons moléculaires (Hsp70, Hsp90α et Hsp90β) a aussi pu être observée chez des patients souffrant de DMD (**Paepe et al., 2012**). De plus, l'analyse du processus de dégradation non lysosomale dans des biopsies de patients DMD a montré une augmentation de l'activité du protéasome (**Kumamoto et al., 2000**). L'utilisation du MG132, un inhibiteur de l'activité du protéasome, sur des souris *mdx* (**Bonuccelli et al., 2003**) ou des poissons zèbre *sapje* (**Winder et al., 2011**) a permis une diminution du phénotype dystrophique, caractérisée par une diminution des dommages musculaires et une augmentation de l'expression de protéines sarcolemmales. Enfin, des études menées dans le modèle murin *mdx* ont permis de mettre en évidence une dérégulation de l'autophagie, traduite par une augmentation de l'activation d'AKT, ainsi qu'une diminution de la lipidation de LC3, et une accumulation d'organites défectueux et du récepteur autophagique p62 (**De Palma et al., 2014**). L'utilisation du lysotracker, un marqueur des vésicules acides, dans le modèle DMD du nématode, a aussi montré une accumulation de ces vésicules (lysosomes et autophagolysosomes) dans les vers DMD (**Pierson & al., en préparation**).

Ainsi, le contrôle qualité des protéines semble modulé dans différents modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces défauts secondaires pourraient donc constituer de nouvelles cibles pour le développement de traitements palliatifs.

2. Objectifs de l'étude

Malgré la constante augmentation des études menées depuis 30 ans, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif pour la dystrophie musculaire de Duchenne. De plus, en raison de la diversité des mutations impliquées dans cette pathologie, les différentes pistes thérapeutiques explorées nécessiteraient la mise en place de processus de médecine personnalisée. Malheureusement, ce type de thérapie « patient-dépendant » est difficilement envisageable à l'heure actuelle, à cause de la durée nécessaire à sa mise au point, mais aussi de son coût très élevé. Une solution alternative serait de développer des traitements palliatifs, ciblant les défauts secondaires inhérents à cette dystrophie, tels que les anomalies du contrôle qualité des protéines. Ces traitements permettraient d'atténuer le phénotype dystrophique et d'améliorer les fonctions musculaires et respiratoires chez le plus grand nombre de patients DMD.

Bien que les mécanismes de PQC aient été étudiés séparément dans différents organismes modèles, aucune analyse globale des mécanismes du contrôle qualité des protéines et de leurs interconnexions n'a encore été réalisée au sein d'un même modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne. De plus, jusqu'à aujourd'hui, l'étude de ces mécanismes a été menée uniquement dans des muscles différenciés.

Durant ma thèse, je me suis donc appliquée à caractériser l'état du contrôle qualité des protéines ainsi que des différents mécanismes régulateurs de l'homéostasie protéique au sein de cellules musculaires non différenciées provenant de patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne ; l'objectif étant de déterminer si des défauts du PQC pourraient déjà être détectés avant différenciation des myoblastes en myotubes.

A court terme, ce projet vise à acquérir une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette étude pourra ensuite être étendue à d'autres pathologies musculaires, et permettra l'identification d'acteurs communs de la dégénérescence musculaire, et le développement de thérapies palliatives communes au plus grand nombre de ces maladies.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : Caractérisation des lignées de myoblastes immortalisés

Les cultures primaires de cellules musculaires constituent un matériel précieux pour les laboratoires. Cependant, le peu de cellules disponibles, ainsi que leur prolifération limitée par leur entrée en sénescence rendent difficiles l'utilisation de ce type de matériel. Les premières lignées de myoblastes immortalisées par transduction virale de plasmides permettant la surexpression de la télomérase et de CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) ont été développées par l'équipe de Vincent Mouly et leur potentiel prolifératif ainsi que leur capacité de différenciation ont été étudiés (**Mamchaoui et al., 2011**). Ainsi, ce nouveau modèle permet d'étudier le développement et la physiologie des muscles squelettiques, du stade précoce myoblastique au stade différencié, tout en s'affranchissant des contraintes évoquées précédemment.

Les lignées utilisées dans cette étude proviennent initialement de cultures primaires issues de biopsies musculaires de donneurs sains ou de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (cf. **Matériel & Méthodes**), immortalisées par l'équipe de Bénédicte Chazaud (UMR5310/INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène) d'après le protocole de V. Mouly. Lorsque nous avons obtenu ces lignées, elles n'avaient pas encore été entièrement caractérisées. J'ai donc commencé par la caractérisation de ces lignées, en termes de prolifération et de différenciation.

1. Potentiel prolifératif

Les myoblastes ont été ensemencés à une densité donnée, dans des milieux de compositions différentes (cf. **Matériel & Méthodes**), afin de déterminer les conditions optimales de culture. Un comptage quotidien a ensuite été effectué sur une période de 5 jours.

L'utilisation du Milieu 1 a permis de mettre en évidence une première différence entre les lignées immortalisées de myoblastes provenant de donneurs sains et ceux provenant de patients DMD. En effet, si les lignées saines (Wild type, ou WT ; W1 & W4) ont besoin de 48

à 72h pour doubler leur population, il faut en moyenne 4 à 5 jours aux lignées issues de biopsies de patients atteints de la myopathie de Duchenne (DMD ; D1, D2, D3 & D4) pour arriver à ce même résultat (**Figure 19**). Ce milieu a été utilisé par notre équipe durant les 2/3 de ma thèse, ne bénéficiant pas de meilleure alternative.

Depuis un an, nous utilisons un mélange (Milieu 2) composé du Milieu 1 et d'un milieu de prolifération complet spécifiquement mis au point pour la culture de cellules musculaires squelettiques et commercialisé par la société Promocell (ratio 1:1). L'utilisation de ce nouveau milieu sur les différentes lignées a montré une nette amélioration de leur prolifération, démontrée par la diminution du temps nécessaire au doublement de la population des myoblastes Wild Type (24h à partir de J2) et DMD (2 jours au lieu de 4). Cependant, malgré l'importante augmentation de prolifération des cellules DMD dans ce second milieu, leur vitesse de prolifération reste inférieure à celle des cellules saines ($4{,}5 \times 10^5$ à 5×10^5 cellules DMD, contre $7{,}3 \times 10^5$ à $7{,}5 \times 10^5$ cellules Wild Type après 5 jours de croissance en Milieu 2 ; ***$p < 0{,}001$). Cependant, les cellules n'ayant jamais été ensemencées plus de 48h avant la réalisation de nos expériences, cette différence de croissance ne s'est pas révélée problématique.

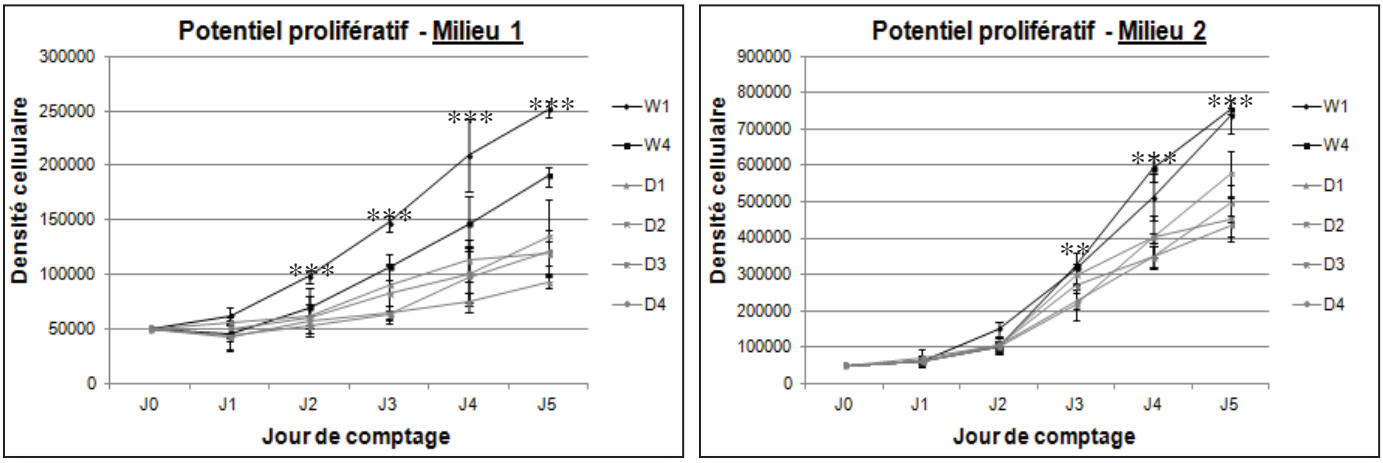


Figure 19 : Analyse du potentiel prolifératif des lignées de myoblastes immortalisés. La croissance des lignées de myoblastes immortalisés (Wild type : W1 & W4 ; DMD : D1, D2, D3 & D4) dans différents milieux de culture (Milieu 1, Milieu 2 ; cf. Matériel & Méthodes) a été analysée. Si la croissance des myoblastes DMD semble ralentie par rapport aux myoblastes WT dans le Milieu 1, le Milieu 2 améliore considérablement leur temps de doublement (2 jours au lieu de 3-4 jours dans le Milieu 1). (**$p < 0{,}01$ & *** $p < 0{,}001$)

2. Capacité de différenciation

Lors de leur différenciation, les myoblastes changent de morphologie, adoptant une conformation fusiforme et orientée. Ces cellules allongées vont ensuite fusionner avec leurs voisines, afin de donner naissance à des myotubes polynucléés. Le programme génétique des cellules musculaires engagées dans ce processus leur permet l'expression de protéines spécifiques telles que la chaîne lourde de la myosine (MHC, pour *Myosin Heavy Chain*) ou la desmine.

La capacité des lignées de myoblastes immortalisés à se différencier a été analysée. Pour ce faire, les cellules ont été différenciées durant 8 jours et un immunomarquage de la MHC a été réalisé. Comme attendu, la MHC est totalement absente dans les myoblastes non différenciés ($J0_{Diff}$). Après 8 jours de différenciation ($J8_{Diff}$), un fort marquage de la MHC est observable dans les lignées immortalisées WT1, WT4, DMD3 et DMD4. Cependant, un nombre moins important de cellules MHC-positives est observable dans le cas des lignées DMD1 et DMD2. De plus, il est possible d'observer pour toutes les lignées des myoblastes fusionnés, (présence d'au moins 2 noyaux par cellule musculaire ; **Figure 20A**).

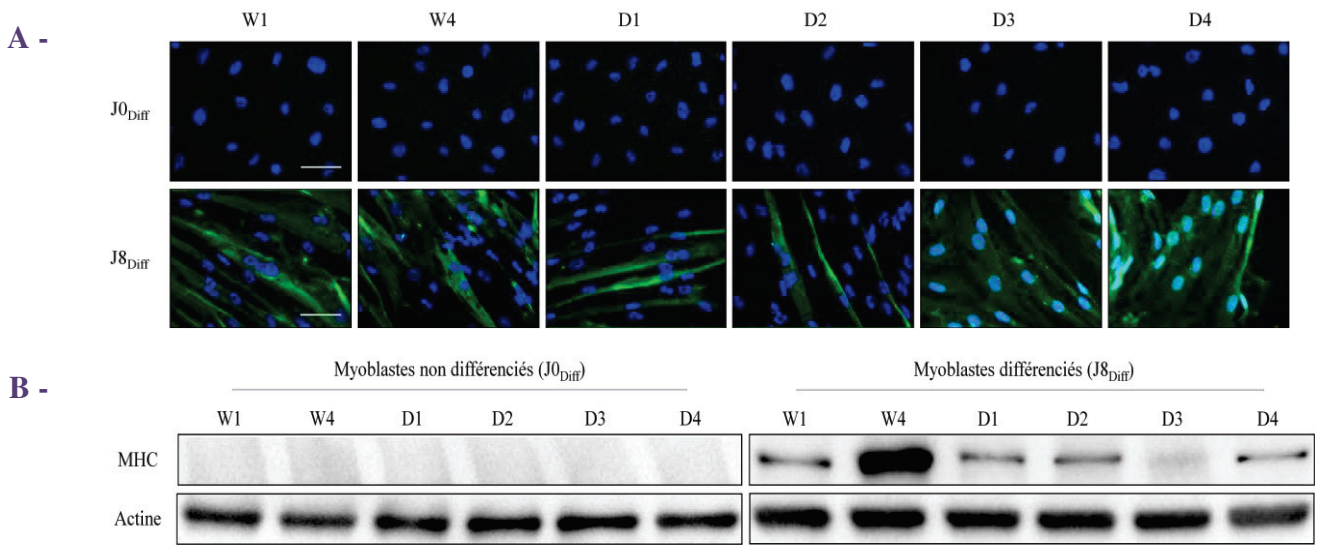


Figure 20 : Capacité de différenciation des lignées de myoblastes immortalisés. A - Des myoblastes Wild type (W1 et W4) et DMD (D1 à D4) ont été ensemencés dans du milieu de prolifération ($J0_{Diff}$). Le jour suivant, le milieu de prolifération a été remplacé par du milieu de différenciation. Les cellules ont été différenciées durant 8 jours ($J8_{Diff}$) et un immunomarquage de la chaine lourde de la myosine (MHC, en vert) a été réalisé. Un marquage nucléaire au Hoechst (en bleu) a aussi été réalisé. Les observations ont été réalisées au grossissement x40, sur le microscope Z1 Axio Imager. Echelle : 50µm. **B -** Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir de myoblastes non différenciés ou différenciés durant 8 jours, puis séparés par SDS-PAGE ; l'expression de la MHC a été analysée par immunoblot grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. L'actine est utilisée comme témoin de charge.

L'expression de MHC après 8 jours de différenciation a également été confirmée par immunoblot (**Figure 20B**). En effet, si la protéine est totalement absente dans les myoblastes, une bande d'intensité variable a pu être révélée dans les cellules différenciées. Ces résultats reflètent donc la capacité de ces myoblastes à s'engager dans le processus de différenciation. Cependant, les cellules présentes sur les lames n'expriment pas toutes la MHC suggérant qu'elles n'entrent pas toutes dans un processus de différenciation et ceci de façon plus importante dans les lignées DMD que dans les lignées WT.

3. Expression de la dystrophine

Si certaines études ont montré une expression de la dystrophine limitée aux cellules musculaires différenciées (**Miranda et al., 1988**), d'autres ont cependant réussi à mettre en évidence sa présence dans des myoblastes humains (**Trimarchi et al., 2006**), ainsi que dans les cellules satellites de souris (**Dumont et al., 2015**). Il nous a donc semblé nécessaire d'analyser l'expression de la dystrophine dans les lignées de myoblastes immortalisés de cette étude. Pour ce faire, un immunoblot a été réalisé sur des extraits protéiques des différentes lignées non différenciées et un anticorps spécifique de la région C-terminale de la protéine (MANDRA1) a été utilisé pour révéler la dystrophine. Des extraits protéiques préparés à partir de cellules différenciées durant 8 jours ont été utilisés comme témoin positif. Une bande de haut poids moléculaire correspondant à la dystrophine est observable dans les myoblastes Wild type (W1 et W4), mais est totalement absente des lignées DMD. Ces résultats suggèrent que la dystrophine est bien exprimée à l'état de myoblastes, mais que les mutations portées par les myoblastes DMD ne permettent pas l'expression de cette protéine. Cependant, cette expression reste relativement faible par rapport aux cellules différenciées (W4 $J8_{Diff}$). En effet, la quantification du taux de dystrophine dans les myoblastes Wild type a montré une expression 13 fois plus faible que dans les cellules différenciées (**Figure 21**).

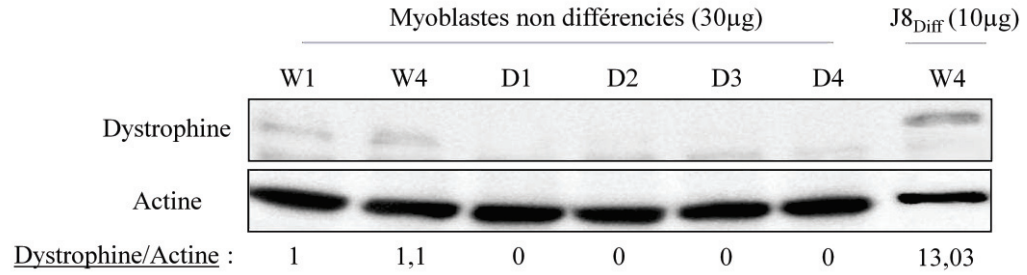


Figure 21 : Analyse de l'expression de la dystrophine dans les lignées de myoblastes immortalisés. Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir de myoblastes non différenciés ou différenciés durant 8 jours et 10 ou 30µg ont été séparés par SDS-PAGE ; l'expression de la dystrophine a été analysée par immunoblot grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (MANDRA1). Le ratio dystrophine/actine indique la quantité relative de dystrophine exprimée dans les différentes lignées.

La bonne prolifération des lignées de myoblastes immortalisées ainsi que leur capacité à s'engager dans le processus de différenciation en font donc un bon modèle pour l'étude des mécanismes physiologiques et du développement musculaire. Durant la suite de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines (PQC) au sein des cellules musculaires non différenciées présentant une déficience en dystrophine. Cette analyse a permis de déterminer les conséquences de la différence d'expression de cette protéine entre les lignées Wild Type et DMD sur la fonctionnalité des mécanismes du PQC.

CHAPITRE 2 : Analyse des mécanismes du Contrôle Qualité des Protéines (PQC) dans des lignées de myoblastes contrôle ou DMD

1. Efficacité du Contrôle Qualité des Protéines dans des myoblastes DMD

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est très important au sein des muscles. Les mouvements quotidiens ainsi que l'activité physique entrainent une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, ainsi qu'un important besoin en ATP. De plus, certaines protéines musculaires telles que la filamine, sont très endommagées lors des cycles de contraction/relaxation et ont tendance à s'agréger. Le Contrôle Qualité des Protéines (PQC) joue donc un rôle important dans le maintien de la qualité du protéome des cellules musculaires en jouant un rôle dans l'élimination des organites endommagés ou des agrégats protéiques mais aussi dans le recyclage des composés pour fournir de l'énergie.
Des défauts du PQC ont déjà été décrits dans certaines myopathies, et en particulier dans le cas de dystrophies. Cependant, aucune étude de ces mécanismes n'a été réalisée dans un seul modèle d'étude et à un stade précoce, avant la différenciation musculaire. Mon projet de thèse a donc visé à caractériser l'état du Contrôle Qualité des Protéines dans des lignées de myoblastes immortalisée issues de donneurs sains ou de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'efficacité du PQC au sein de ces lignées.

1.1 Taux de p62/multiubiquitine

J'ai tout d'abord analysé l'expression de deux marqueurs reflétant l'efficacité du PQC : p62 et les chaines multiubiquitinées. En effet, p62 est un récepteur de la macroautophagie, spécialisé dans la reconnaissance des agrégats protéiques et leur adressage à la dégradation. Grâce à son domaine UBD (*Ubiquitin-Binding Domain*), p62 est capable de lier des cargos multiubiquitinés, préférentiellement via une chaîne K63. La présence d'un domaine LIR (*LC3-Interacting Region*) lui permet également d'interagir avec la protéine LC3, faisant le lien entre agrégats protéiques et machinerie autophagique (**Pankiv & al., 2007**). Les chaines multiubiquitinées permettent l'adressage aux principaux systèmes de dégradation cellulaire :

le système ubiquitine-protéasome (chaine de multiubiquitine K48) et l'autophagie (chaine de multiubiquitine K63 ; voir **Introduction, 3.2.2**).

Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir des lignées de myoblastes immortalisés, puis séparés par SDS-PAGE. Une immunorévélation a permis de détecter les protéines d'intérêt, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (**Figure 22A**). Une forte augmentation du taux de protéines multiubiquitinées a pu être observée dans les lignées DMD en comparaison aux lignées contrôle ; cependant, l'expression de la protéine p62 s'est révélée très variable d'une lignée à l'autre. La quantification des blots issus de trois expériences indépendantes (**Figure 22B**) a permis d'une part de confirmer l'augmentation significative (***p < 0,001) de la présence de chaines multiubiquitinées dans les lignées DMD et d'autre part, l'absence de variation du taux de p62 entre les lignées contrôle et DMD.

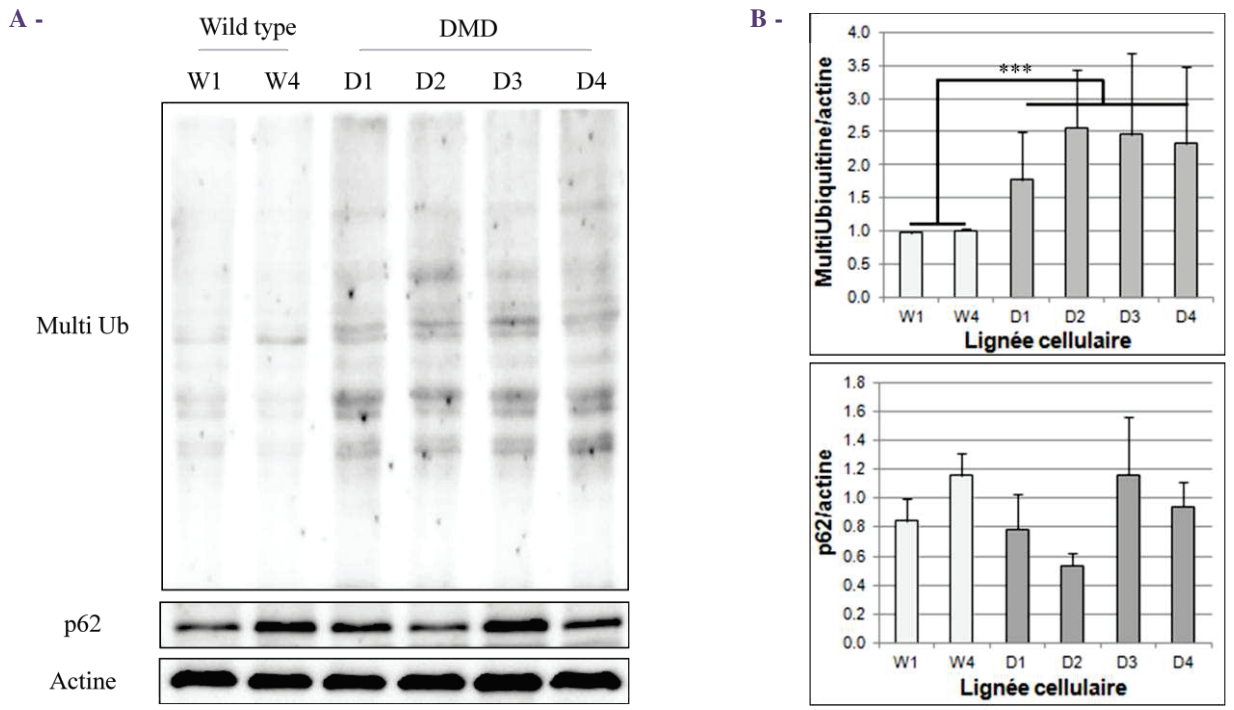


Figure 22 : Analyse du taux de protéines multiubiquitinées et de p62 dans les lignées de myoblastes immortalisées. A - Des extraits protéiques totaux ont été séparés par SDS-PAGE et analysés par immunoblotting grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre les chaines multiubiquitinées et p62. **B -** Les blots issus de trois expériences indépendantes ont été quantifiés (n = 3). Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD (*** ; p < 0,001)

1.2 Agrégation protéique

L'accumulation de protéines multiubiquitinées et/ou mal repliées dans le cytosol des cellules peut entrainer la formation d'agrégats protéiques toxiques. J'ai donc procédé à l'analyse du recrutement des protéines multiubiquitinées ainsi que de la protéine p62 dans des agrégats

protéiques. Pour ce faire, des expériences de Filter Trap ont été réalisées sur les différentes lignées (**Figure 23A** ; **Nivon et al., 2009**). Une augmentation du taux d'agrégats protéiques associés à p62 ou multiubiquitinés a ainsi pu être constatée dans les quatre lignées DMD en comparaison aux cellules contrôle.

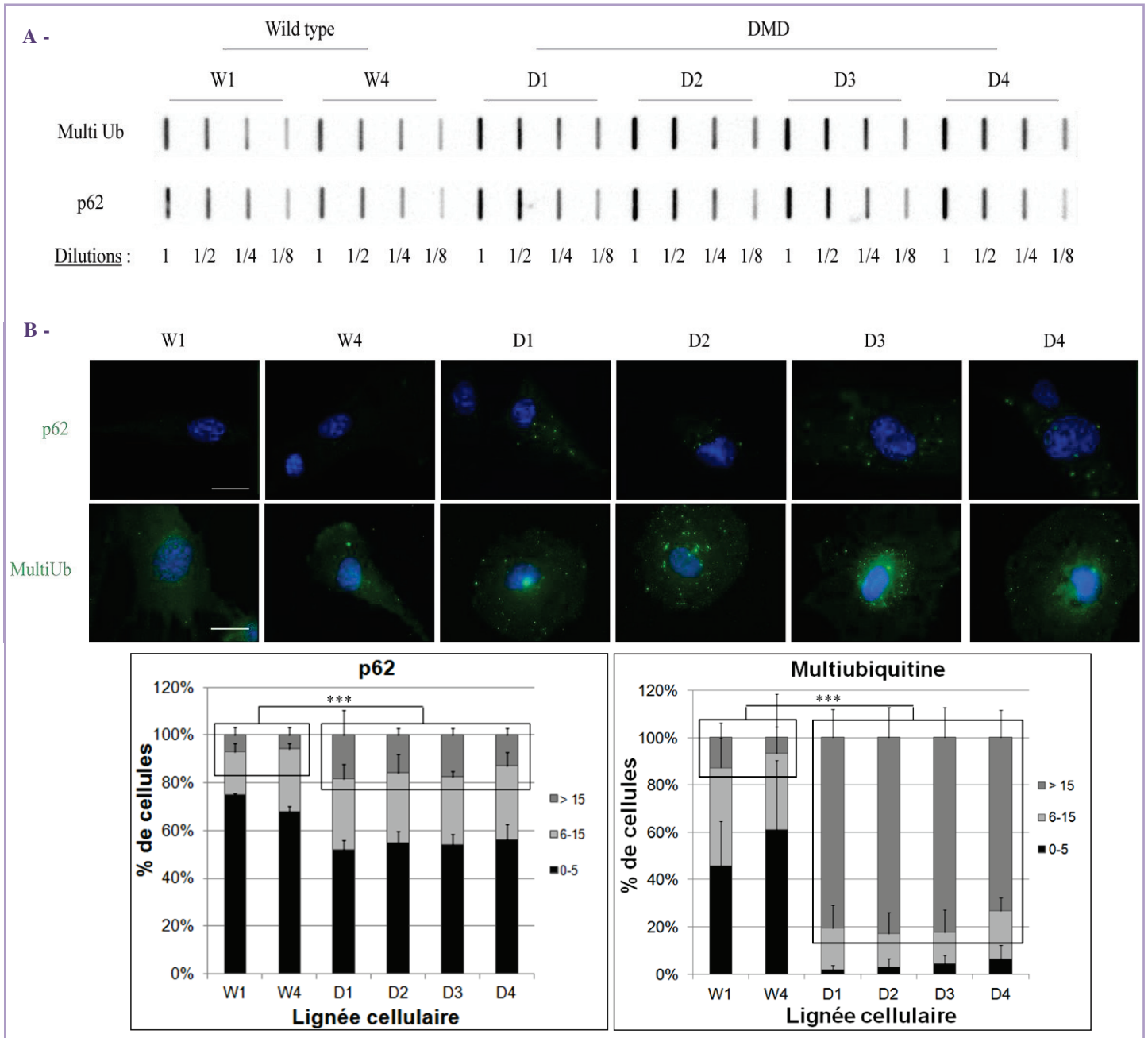


Figure 23 : Analyse de l'agrégation protéique. A - Des extraits protéiques totaux ont été analysés par Filter Trap (voir Matériel & Méthodes). Les blots montrent une augmentation des agrégats protéiques contenant la protéine p62 ou des protéines multiubiquitinées dans les lignées de myoblastes DMD en comparaison aux lignées WT. **B -** Un immunomarquage des protéines p62 et des chaines multiubiquitinées a été réalisé dans les différentes lignées. Le nombre d'agrégats protéiques par cellule a ensuite été compté dans 100 à 200 cellules par lignée. Les graphiques résultent du comptage de trois expériences indépendantes (n = 3). Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD (*** ; $p < 0,001$)

Un immunomarquage de ces protéines a également été réalisé afin d'appuyer ces observations (**Figure 23B**). Le nombre d'agrégats protéiques positifs pour p62 ou la multiubiquitine- a ensuite été compté dans 100 à 200 cellules de chacune des lignées de myoblastes. Ainsi, le nombre de cellules présentant plus de 15 agrégats p62-positifs augmente de façon significative dans les lignées DMD (***$p < 0,001$). Le nombre de myoblastes contenant plus de 15 agrégats multiubiquitine-positifs est également plus important dans les lignées DMD (***$p < 0,001$).

Ainsi, les lignées de myoblastes issus de patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne présentent une accumulation de protéines multiubiquitinées et d'agrégats protéiques dans leur cytosol. Cette agrégation pourrait être le reflet de défaillances du PQC et notamment des mécanismes de reconformation des protéines mal conformées (*Heat Shock Proteins*) et/ou de dégradation des protéines agrégées (système ubiquitine-protéasome et autophagie). La suite de ce projet a donc été d'analyser ces différents mécanismes.

2. Mécanisme de reconformation et protéines de choc thermique (HSP)

Les chaperons moléculaires sont les premiers senseurs de la mauvaise conformation protéique. Ces protéines chaperons sont majoritairement des protéines de choc thermique (HSP pour *Heat Shock Proteins*) capables de reconnaitre les résidus hydrophobes externalisés des protéines mal repliées. Une première hypothèse de travail quant à l'accumulation de protéines multiubiquitinées et d'agrégats protéiques dans les myoblastes immortalisés DMD pouvait être celle d'un mécanisme de reconformation peu efficace. Je me suis donc intéressée aux deux catégories de HSP:

- Les foldases, dont l'activité enzymatique permet la reconformation de substrats de façon ATP-dépendante
- Les holdases, séquestrant les protéines mal conformées en attente de reconformation/dégradation

2.1 Foldases

2.1.1 Expression des foldases

Dans un premier temps, j'ai analysé l'expression des protéines HSP40, HSP70 et HSP90. Des extraits protéiques issus des différentes lignées contrôle et DMD ont été analysés par

immunoblot, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêt (**Figure 24**).

La quantification de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique des résultats obtenus n'ont permis de montrer aucune différence significative entre les lignées de myoblastes WT et DMD, pour les taux de HSP40, HSP70 et HSP90.

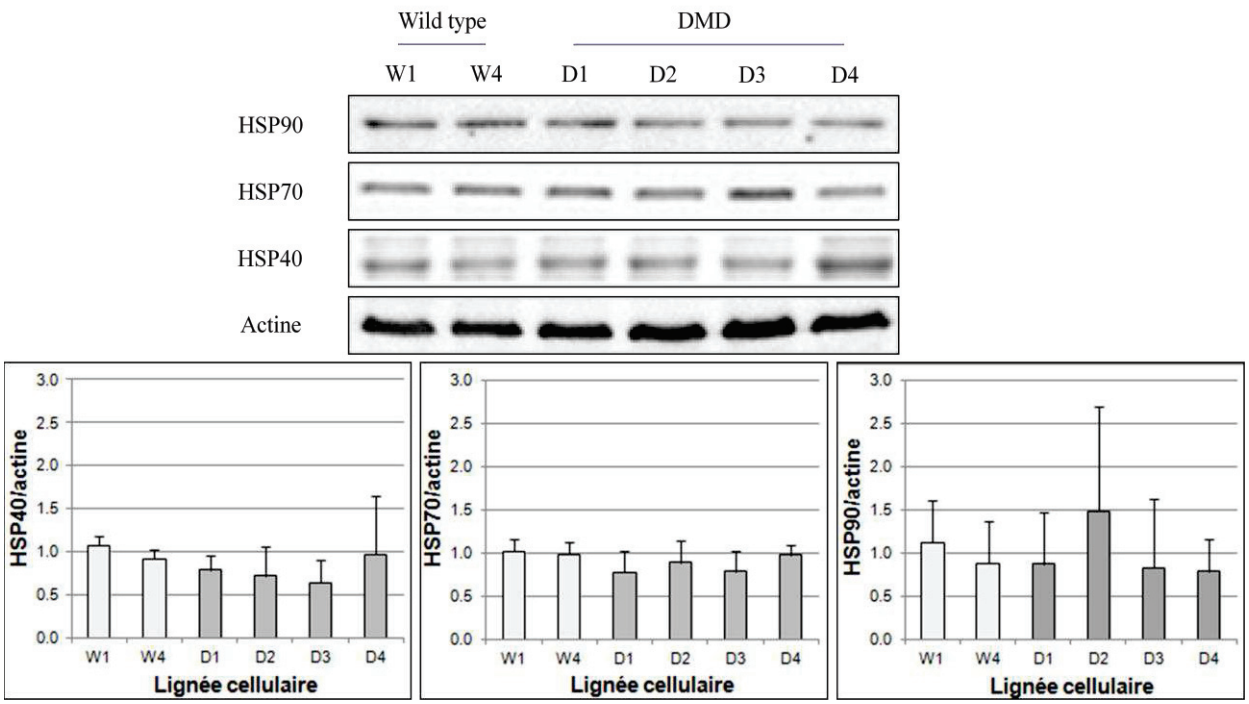


Figure 24 : Analyse de l'expression des foldases. Des extraits protéiques issus des lignées Wild Type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) n'ont pas montré de différence significative entre les lignées de myoblastes WT et DMD pour les taux des HSP.

2.1.2 Activité chaperon globale

L'absence de variation d'expression des protéines analysées dans la partie 2.1.1 n'exclut cependant pas une modification de leur activité chaperon. Cette activité a donc été étudiée par la réalisation d'un test luciférase de reconformation (**Figure 25**) ; brièvement, les lignées de myoblastes immortalisés ont été transfectées transitoirement avec un plasmide permettant l'expression de la luciférase. 24 heures après transfection, les cellules ont été soumises à un choc thermique qui entraine le mauvais repliement/la dénaturation de la luciférase et donc sa perte d'activité enzymatique. Les cellules sont alors replacées à 37°C pendant différents temps de récupération, ce qui permet aux foldases d'éventuellement reconformer la luciférase qui retrouvera alors son activité enzymatique. La détection de luminescence nous renseigne

donc sur la récupération d'activité enzymatique de la luciférase et ainsi sur l'efficacité de l'activité chaperon dans les cellules.

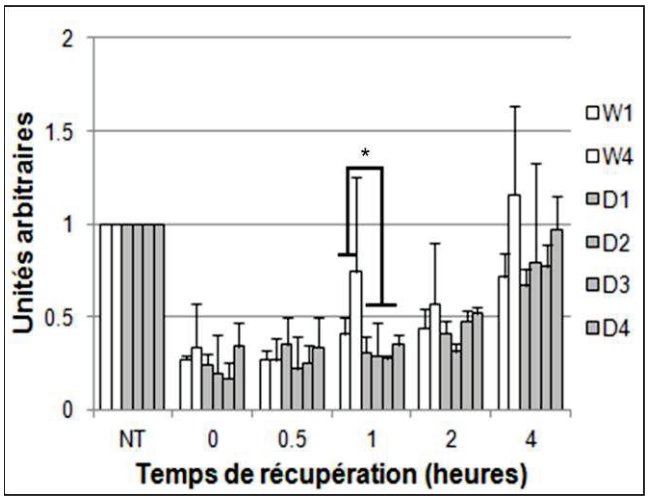


Figure 25 : Activité chaperon. L'activité globale des chaperons a été mesurée dans les différentes lignées (WT : W1, W4 ; DMD : D1, D2, D3, D4) en conditions basales (Non Traitées, NT) ou en réponse à un choc thermique (1h30 à 43°C) suivi d'une phase de récupération (0,5 à 4 heures à 37°C), grâce à un test de reconformation de luciférase. Le graphique présenté est le résultat de trois expériences indépendantes, après normalisation par rapport à la condition non traitée. Une analyse statistique (ANOVA) a été réalisée (*$p < 0.05$).

On peut observer une cinétique de récupération de l'activité luciférase très semblable entre les différentes lignées ; ainsi après 4 heures de récupération à 37°C, la luciférase a récupéré entre 67% et 110% de son activité pour toutes les lignées cellulaires. L'analyse statistique des résultats confirme une absence de différence significative entre les lignées de myoblastes immortalisées WT et DMD, excepté après une heure de récupération à 37°C (R1 ; *$p < 0.05$) : l'origine de cette variation résidant dans une grande variabilité existant entre les lignées WT.

Ainsi, il n'existe pas de différence dans le taux des foldases ni dans leur activité chaperon entre les myoblastes contrôle ou DMD. Je me suis donc intéressée par la suite à la seconde catégorie de HSP: les holdases.

2.2 Holdases

2.2.1 Expression des holdases

J'ai procédé à l'analyse de l'expression de trois holdases, en raison de leurs rôles associés aux muscles striés squelettiques (voir **Introduction, 2.2** ; **Figure 26**) : HSPB1/HSP27, HSPB5/αB-crystalline et HSPB8/HSP22. Ces holdases sont notamment impliquées dans le maintien des structures sarcomériques (**Arndt et al., 2010** ; **Yoshida et al., 1999**). De plus, dans le muscle HSPB8 intervient dans l'élimination de protéines musculaires mal conformées ou agrégées telles que la filamine C par le processus de CASA (*Chaperone-Assisted Selective Autophagy* ; **Ulbricht et al., 2015**).

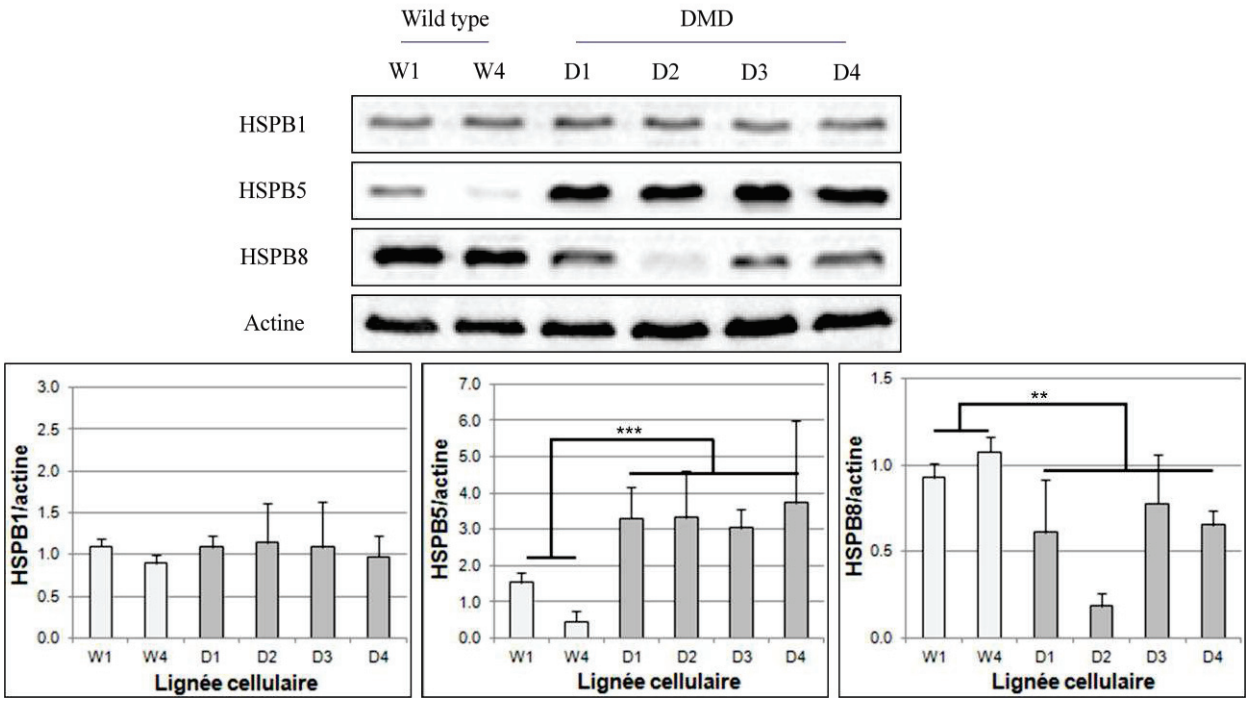


Figure 26 : Analyse de l'expression des holdases. Des extraits protéiques issus des lignées Wild type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées WT et DMD (**p < 0,01 ; ***p < 0,001).

Le taux d'expression de HSPB1 ne présente pas de variation significative entre les différentes lignées. Cependant, l'expression de HSPB5 montre une augmentation significative (***p < 0,001) d'environ 300% dans les lignées de myoblastes DMD. Pour ces mêmes cellules, on observe à l'inverse une diminution significative (**p < 0,01) de l'expression de HSPB8, allant de 22 (D3) à 82% (D2).

2.2.2 Holdases et agrégation protéique

La modulation de l'expression de HSPB5 et HSPB8 pourrait être corrélée à un potentiel recrutement de ces acteurs lors du processus d'agrégation. En effet, cette famille de chaperons moléculaires participe à la séquestration de protéines mal conformées grâce à la formation de réservoirs. J'ai donc étudié le recrutement de ces protéines au sein d'agrégats protéiques grâce à la technique de Filter Trap (**Figure 27**).

La dilution en cascade des échantillons permet de quantifier les blots obtenus. Les protéines HSPB5 et HSPB8 semblent être présentes de façon plus importante au niveau des agrégats protéiques dans les lignées immortalisées de myoblastes DMD et ce, en dépit de leur niveau d'expression. Ainsi, malgré une sous-expression protéique d'HSPB8 observée dans les

myoblastes DMD, son recrutement au niveau des agrégats semble deux à trois fois plus important dans ces cellules que dans les cellules contrôle. Dans le cas d'HSPB5, l'augmentation d'expression de cette protéine est associée à une augmentation de son recrutement dans les agrégats : en effet, les lignées de myoblastes DMD présentent deux (D2, D3, D4) à cinq (D1) fois plus d'agrégats contenant HspB5

Cette augmentation du recrutement d'HSPB5 et d'HSPB8 au niveau d'agrégats pourrait refléter des modulations du cytosquelette (HSPB5) (v. ci-dessous) et/ou du processus autophagique (CASA ; HSPB8) dans ces cellules (v. **Chapitre 4** de la partie **Résultats**).

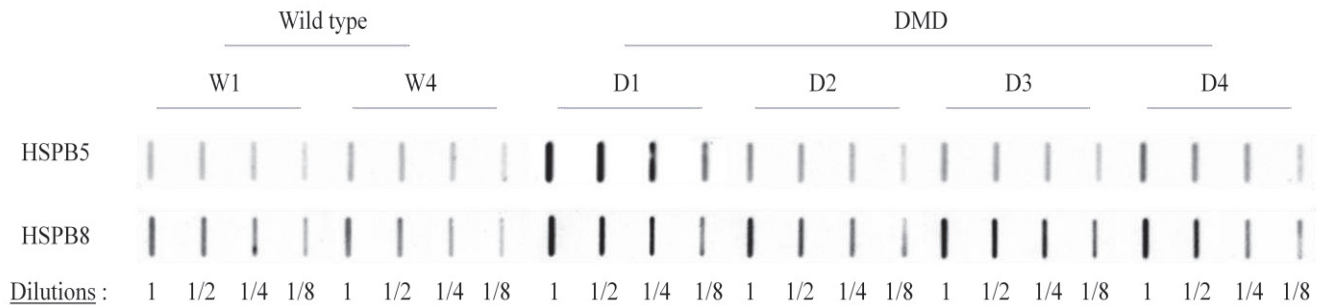


Figure 27 : Holdases et agrégation protéique. Des extraits protéiques totaux ont été analysés par Filter Trap (voir Matériel & Méthodes). Les blots montrent une augmentation des taux d'HSPB5 et HSPB8 dans les agrégats protéiques présents dans les lignées de myoblastes DMD (n = 3).

2.2.3 HSPB5 et cytosquelette

HSPB5 est impliquée dans le maintien des structures sarcomériques, en interagissant avec les composants du cytosquelette (microfilaments, microtubules, filaments intermédiaires) afin d'empêcher leur agrégation lors des cycles de contraction/relaxation des muscles striés squelettiques ou lors de stress. Ainsi, la présence de potentiels défauts architecturaux touchant les différentes catégories de filaments pourrait entrainer leur agrégation, et expliquer l'augmentation du recrutement d'HSPB5 observée précédemment dans les agrégats protéiques.

J'ai donc analysé la structure du cytosquelette par immunomarquage de protéines constitutives des différents types de filaments : les microfilaments d'actine, la tubuline α des microtubules et les filaments intermédiaires de vimentine (**Figure 28**).

L'immunomarquage de l'actine (en rouge) montre un réseau de microfilaments identique entre les lignées Wild Type et DMD. De la même manière, le marquage de la tubuline ainsi que de la vimentine (en vert) n'a montré aucune différence d'organisation entre les différentes lignées. Le cytosquelette des myoblastes DMD ne semble donc présenter aucune anomalie

d'ordre structural. L'augmentation de l'expression d'HSPB5 ainsi que sa localisation dans les agrégats protéiques mises en évidence dans les lignées immortalisées de myoblastes DMD ne semblent donc pas corrélées à la présence de défauts d'architecture du cytosquelette.

Ainsi, si le mécanisme de reconformation assuré par les foldases ne parait pas modifié, le recrutement des holdases au niveau d'agrégats protéiques semble être affecté dans les lignées de myoblastes immortalisés issus de patients DMD ; en ce qui concerne HSPB5, celui-ci ne semble cependant pas être associé à un remaniement du cytosquelette.

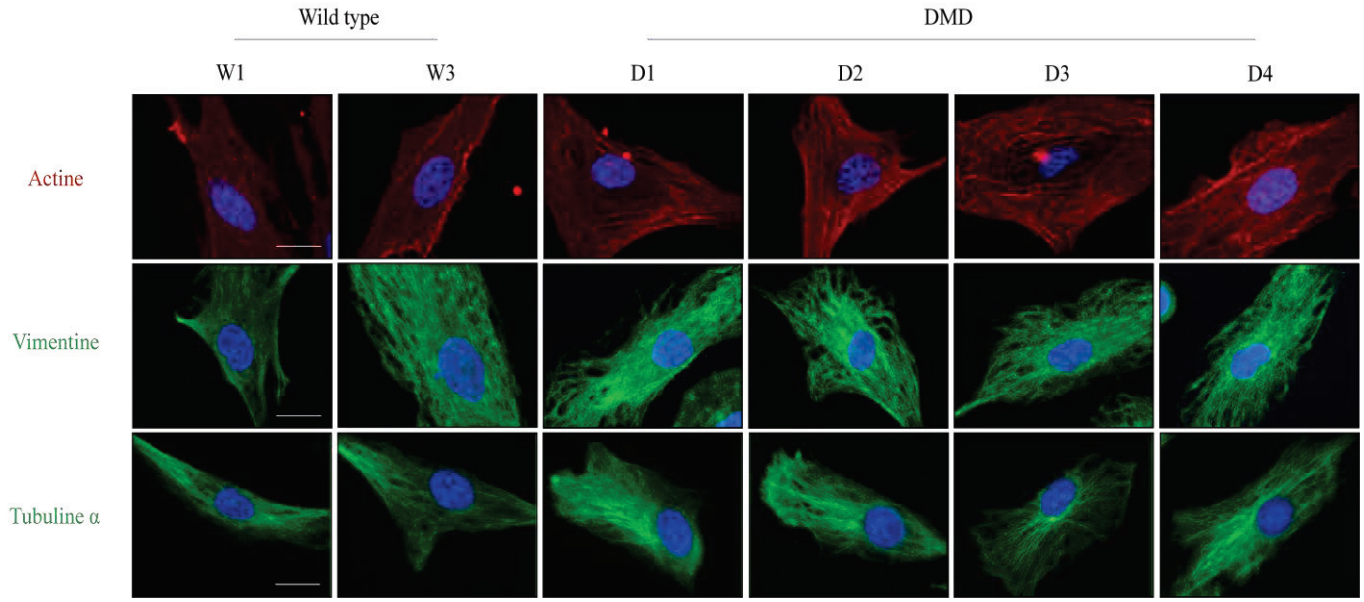


Figure 28 : HSPB5 et cytosquelette. Des myoblastes Wild Type (W1 et W4) et DMD (D1 à D4) ont été ensemencés dans du milieu de prolifération. Le jour suivant, les cellules ont été fixées et un immunomarquage de l'actine, de la vimentine et de la tubuline a été réalisé. Un marquage nucléaire (en bleu) a aussi été réalisé. Les observations ont été faites au grossissement x100, sur le microscope Z1 Axio Imager. Echelle : 50µm.

Après avoir analysé la fonctionnalité des chaperons moléculaires, je me suis ensuite intéressée aux différents mécanismes du PQC responsables de la dégradation des protéines mal conformées et/ou agrégées : le système ubiquitine-protéasome (ou UPS) et le processus autophagique.

3. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

L'accumulation de protéines multiubiquitinées et d'agrégats protéiques dans le cytosol des myoblastes immortalisés issus de patients DMD pourrait être la conséquence du mauvais fonctionnement des mécanismes de dégradation cellulaires (autophagie et système ubiquitine-

protéasome). En ce qui concerne le protéasome, cette accumulation d'agrégats pourrait provenir d'une augmentation de l'ubiquitination des substrats, d'un défaut de leur adressage au protéasome 26S ou d'une baisse de l'activité de ce dernier. Ces trois hypothèses ont donc été testées.

3.1 Activité du protéasome

Le protéasome 26S est constitué d'un empilement de deux anneaux externes de sous-unités α et deux anneaux internes de sous-unité β ; trois de ces dernières portent des activités enzymatiques permettant la dégradation des substrats protéiques en petits peptides : une activité de type trypsine portée par la sous-unité β2, une activité de type chymotrypsine assurée par la sous-unité β5, et enfin une activité de type caspase assurée par la sous-unité β1 (voir **Introduction, 3.3.1**).

Ces différentes activités enzymatiques ont été analysées grâce à l'utilisation de substrats luminogènes spécifiques de chacune d'elles : Suc-LLVY-aminoluciférine pour l'activité chymotrypsine-like, Z-LRR-aminoluciférine pour l'activité trypsine-like et Z-nLPnLD-aminoluciférine pour l'activité caspase-like (**Figure 29**). Le clivage de ces substrats entraine la libération de luciférine ; l'addition de luciférase permet alors la production de luminescence corrélée à l'activité enzymatique.

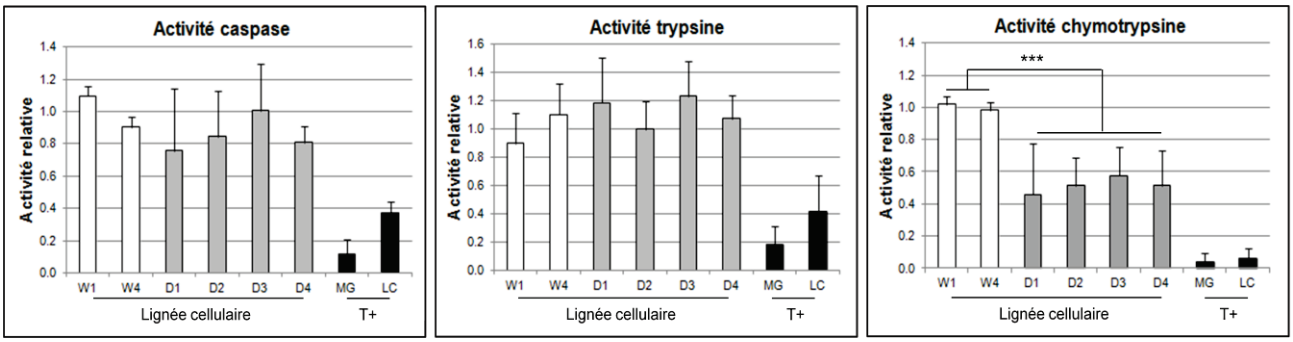


Figure 29 : Activité enzymatique du protéasome dans les myoblastes contrôle et DMD. L'activité du protéasome a été analysée grâce à l'utilisation de substrats luminogènes spécifiques de chaque activité enzymatique de type trypsine, chymotrypsine ou caspase. Les cellules Wild Type servant de référence dans cette étude, les différentes activités enzymatiques ont été normalisées d'après les résultats obtenus dans ces lignées. Les graphiques présentés sont le résultat de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une diminution significative (***$p < 0,001$) de l'activité de type chymotrypsine dans les myoblastes DMD.

Les 3 activités du protéasome ont donc été quantifiées pour chacune des lignées cellulaires contrôles et DMD. Après quantification des résultats issus de trois expériences indépendantes, nous avons pu constater une diminution significative de l'activité chymotrypsine dans les

lignées de myoblastes DMD (de 43% dans les cellules D3 à 54% dans les cellules D1) en comparaison à celle des lignées contrôle, tandis que les activités de type trypsine et caspase ne semblent pas modifiées. La diminution de l'activité de type chymotrypsine du protéasome 26S dans les myoblastes DMD pourrait donc entrainer une diminution générale de l'efficacité de ce mécanisme de dégradation et ainsi altérer le processus de contrôle qualité des protéines dans ces cellules.

3.2 Ubiquitination des substrats

Le processus d'ubiquitination des substrats fait intervenir différents types d'enzymes : les E1, qui activent la molécule d'ubiquitine, les E2 permettant son acheminement jusqu'au client et les E3 qui catalysent la liaison entre les deux. Dans les muscles striés squelettiques humains, on retrouve majoritairement deux enzymes de type E3 : MuRF1, et MAFbx/Atrogin.

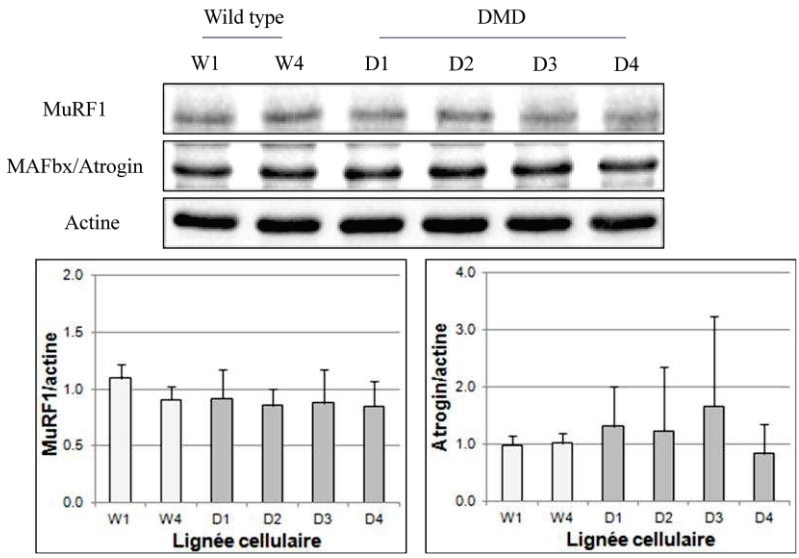


Figure 30 : Expression des E3 ligases MuRF1 et MAFbx/Atrogin. Des extraits protéiques issus des lignées Wild Type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot révélés par des anticorps dirigés contre MuRF1 et MAFbx/Atrogin. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) n'ont pas montré de différence significative entre les myoblastes WT et les myoblastes DMD.

Une modification du taux de ces enzymes pourrait affecter le taux d'ubiquitination de leurs protéines cibles. Leur expression a donc été quantifiée par immunoblot dans les différentes lignées de myoblastes immortalisés (**Figure 30**). Aucune différence significative n'a pu être observée entre les lignées WT et DMD. L'accumulation de protéines multiubiquitinées dans les myoblastes DMD ne provient donc pas d'une augmentation du taux des E3 ligases musculaires.

3.3 Adressage à l'UPS : le co-chaperon BAG1

Lorsque les chaperons moléculaires échouent à replier correctement les protéines, ces dernières peuvent être ubiquitinées, puis adressées aux mécanismes de dégradation

cellulaires : l'UPS ou l'autophagie. L'intervention de co-chaperons permet l'adressage spécifique de clients ubiquitinés à l'un ou l'autre de ces mécanismes. La protéine BAG1 (*BCL-2-associated AthanoGene*) est une protéine servant de lien entre HSP70/HSC70 et le système ubiquitine-protéasome (voir **Introduction, 3.3.3**). Elle est synthétisée sous 4 isoformes, chacune des ces isoformes portant un site UBL (ubiquitin-like) leur permettant de se lier au protéasome.

Une de nos hypothèses quant à l'accumulation des protéines ubiquitinées était un défaut d'adressage de celles-ci au système de dégradation protéasomal. Afin de la vérifier, l'expression des différentes formes de BAG1 a été analysée par immunoblot puis quantifiée (**Figure 31**). Parmi les sous-unités analysées (BAG1-S, -M, BAG1 et BAG1-L), seule une diminution significative (***p < 0,001) du taux de BAG1-M (de 39 à 49%) a pu être observée dans les lignées de myoblastes DMD.

Ainsi, un défaut d'adressage des substrats ubiquitinés au protéasome ainsi qu'une diminution de l'activité enzymatique du protéasome 26S pourraient participer à l'accumulation de protéines multiubiquitinées et/ou agrégées observées dans le cytosol des myoblastes DMD.

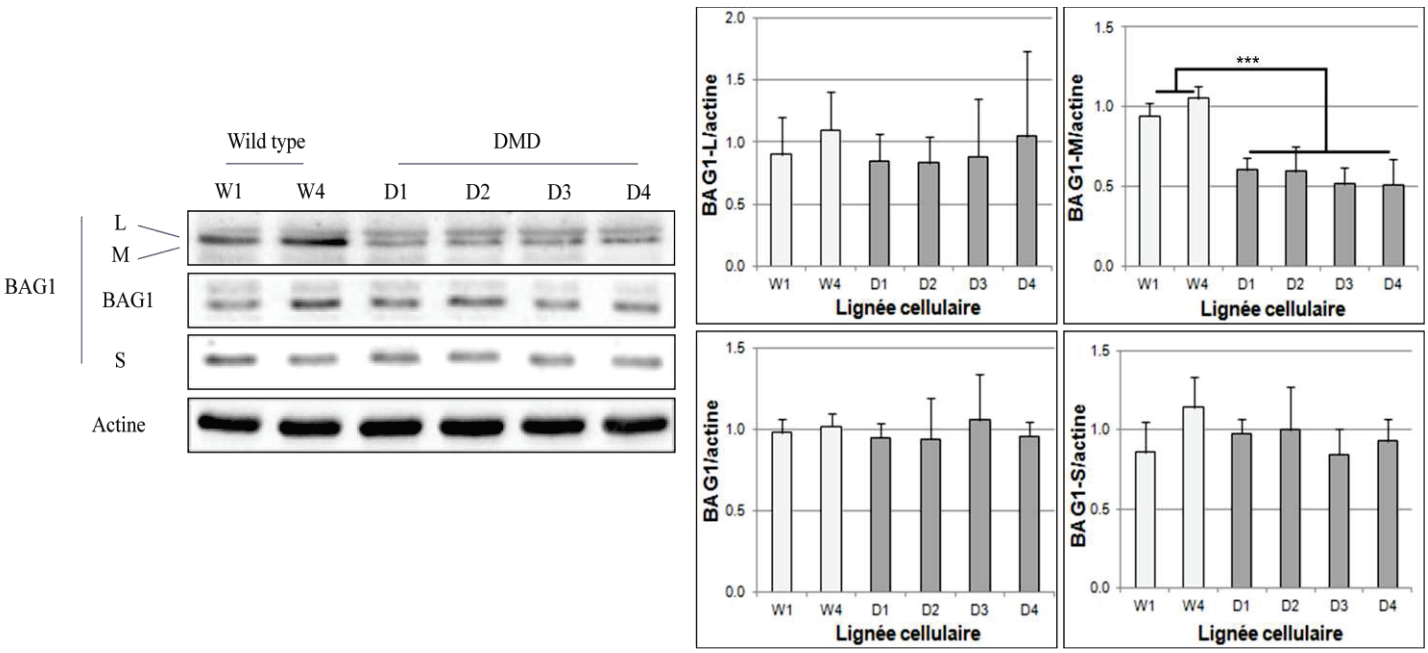


Figure 31 : Analyse de l'expression BAG1 (-L, -M, BAG1 et -S). Des extraits protéiques issus des lignées Wild type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot en utilisant un anticorps dirigé contre les différentes formes, BAG1-L, -M, BAG1 et BAG1-S de BAG1. La révélation de l'actine sert de témoin de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une diminution significative de l'expression de la sous-unité BAG1-M (***p < 0,001) dans les lignées de myoblastes DMD.

3.4 Switch BAG1/BAG3

Dans les cellules jeunes, le contrôle qualité des protéines est assuré principalement par la dégradation protéasomale de clients multiubiquitinés médiée par la protéine BAG1. En effet, chacune des sous-unités de BAG1 (-L, -M, BAG1 et -S) possède un domaine de liaison aux chaines multiubiquitinées, permettant la reconnaissance et l'adressage de clients au protéasome. Cependant, lors du vieillissement ou en réponse à un stress aigu, les protéines mal repliées et agrégées s'accumulent dans le cytosol, activant un mécanisme de « switch » : tandis que le niveau d'expression de BAG1 diminue, l'expression d'une autre protéine de la famille BAG, BAG3, augmente, permettant un adressage majoritaire au processus autophagique (**Minoia et al., 2014**). Ainsi, la diminution d'expression de la sous-unité BAG1-M observée précédemment pourrait refléter une activation de ce switch dans les lignées de myoblastes DMD. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai analysé l'expression de la protéine BAG3 par immunoblot (**Figure 32A**). De façon intéressante, le taux de BAG3 est augmenté de 40 à 50% dans les myoblastes DMD, comparé aux cellules contrôle.

BAG3 intervient dans un type particulier d'autophagie, appelée CASA (*Chaperone-Assisted Selective Autophagy*), en association avec le chaperon moléculaire HSPB8. La modulation de l'expression de ces protéines observée dans les lignées immortalisées de myoblastes DMD pourrait donc être corrélée à une modulation des taux de complexes BAG3/HSPB8. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de Proximity Ligation Assay ont été réalisées et le nombre de complexes a été quantifié dans chacune des lignées de myoblastes immortalisés (**Figure 32B**). On observe une augmentation significative (***$p < 0,001$) d'environ 270 (D1) à 375% (D3) de la quantité de complexes BAG3/HSPB8 formés dans les lignées de myoblastes DMD en comparaison aux lignées contrôle. Ainsi, la modulation de l'expression de BAG3 et HSPB8 dans les myoblastes DMD semble associée à une augmentation de la formation des complexes.

Le switch BAG1/BAG3 semble donc être activé dans les lignées de myoblastes immortalisés issues de patients DMD, ce qui peut suggérer une augmentation de l'autophagie dans ces cellules. Je me suis donc intéressée au processus autophagique dans les différentes lignées.

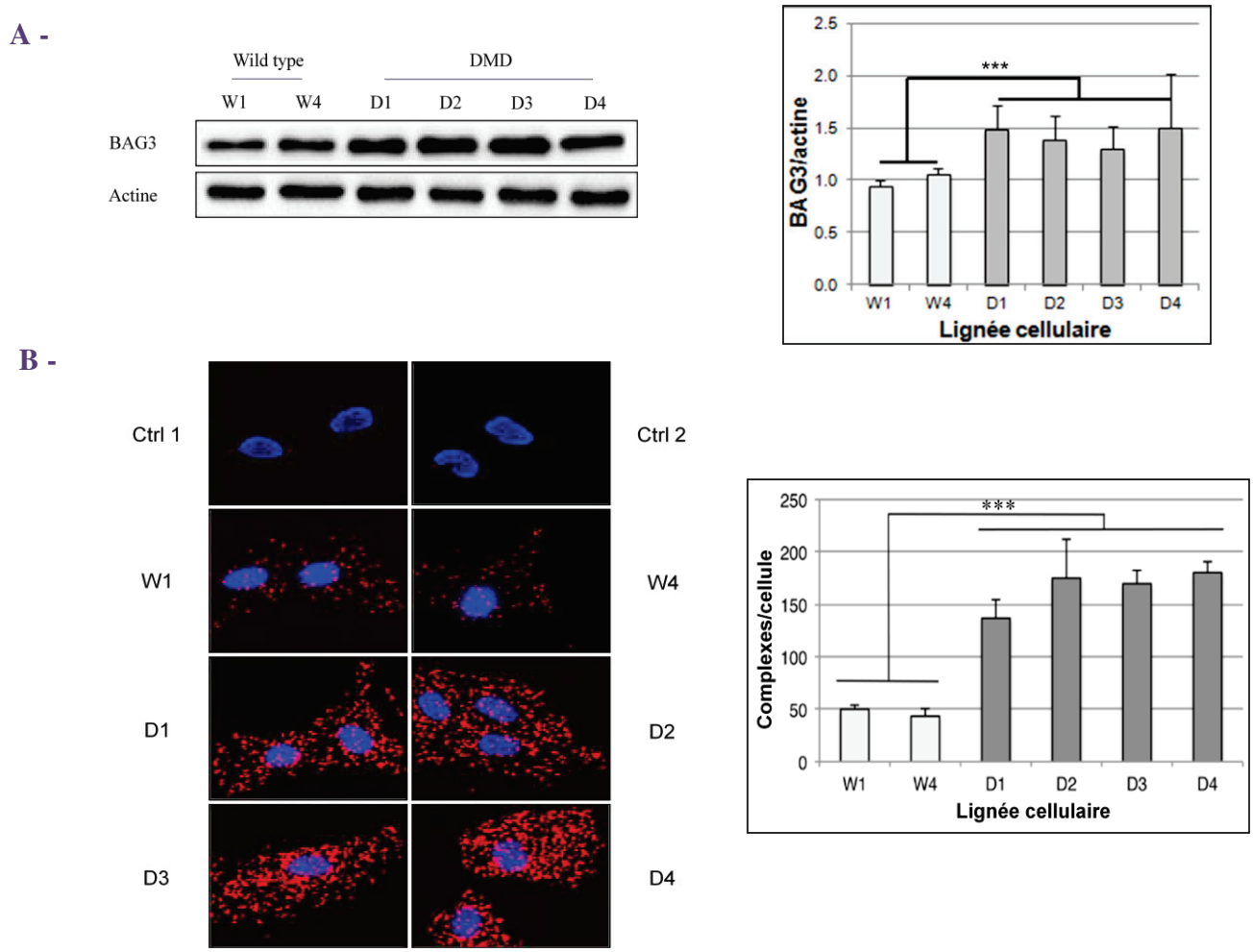


Figure 32 : Switch BAG1/BAG3. A - Des extraits protéiques issus des lignées Wild type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés BAG3. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD (***p < 0,001). **B -** La formation des complexes BAG3/HSPB8 a été analysée par Proximity Ligation Assay. Les conditions contrôle (Ctrl1 & Ctrl2) correspondent à des hybridations avec un seul des anticorps (Ctrl1) ou avec des anticorps anti-BAG3 et anti-PML (2 protéines qui n'interagissent pas l'une avec l'autre). Le nombre de ponctuations a été compté dans environ 50 cellules de chaque lignée. Le graphique présenté résulte du comptage de 3 expériences indépendantes (n = 3). Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs (ANOVA ; ***p < 0,001).

4. Processus autophagique

L'autophagie est un processus cellulaire permettant l'élimination de protéines à longue demi-vie, d'agrégats protéiques, ainsi que de pathogènes intracellulaires. L'importance de ce mécanisme dans le contrôle qualité des protéines, en particulier dans le maintien de l'homéostasie musculaire, a été largement décrite et des anomalies de ce processus sont à l'origine ou accompagnent le développement de nombreuses pathologies.

L'autophagie implique l'intervention de nombreux acteurs à chacune des étapes : la nucléation de la structure préautophagosomale (PAS), l'élongation de la membrane vésiculaire, les récepteurs/adaptateurs autophagiques, la clôture de la vésicule autophagique, le transport de l'autophagosome et sa fusion avec les lysosomes. L'augmentation des complexes BAG3/HspB8 dans les lignées de myoblastes immortalisées issus de patients DMD pourrait être associée à une modulation de l'activité autophagique. J'ai donc étudié le processus autophagique dans les lignées contrôles et DMD.

4.1 Nucléation de la structure préautophagosomale (PAS)

La nucléation de la structure préautophagosomale, ou PAS, est régulée par le complexe cœur constitué de Becline1, AMBRA1, Vps15 et de la PI3K de classe III (voir **Introduction, chapitre 2, partie 4.1**). La protéine BCL-2 est décrite comme un inhibiteur de la formation de ce complexe.

J'ai donc analysé l'expression de différents acteurs impliqués dans cette phase de nucléation : Becline1 (BECN1), BCL-2 et la PI3KIII (**Figure 33**). L'expression de BCL-2 ainsi que de Becline1 ne semble pas varier entre les lignées contrôle et les lignées DMD. Cependant, on observe une augmentation significative (***p < 0,001) du taux de PI3KIII, de 50% pour les myoblastes D1 à 100% pour les myoblastes D4 en comparaison aux cellules contrôles.

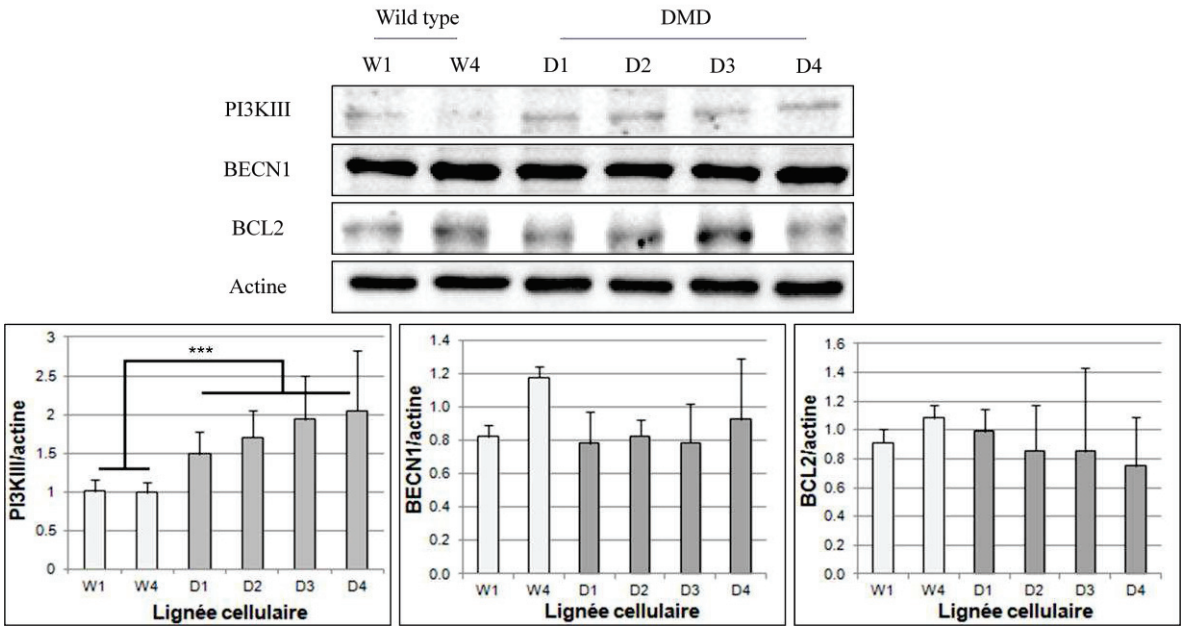


Figure 33 : Analyse de l'expression de PI3KIII, BECN1 et BCL-2. Des extraits protéiques issus des lignées Wild Type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre PI3KIII, BECN1 et BCL-2. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD pour le taux de la PI3KIII (***p < 0,001).

4.2 Elongation de la membrane, reconnaissance des clients, et clôture de l'autophagosome

L'élongation et la clôture de la vésicule autophagique dépendent de l'intervention des protéines ATG : le complexe ATG5/ATG12/ATG16, les protéines ATG8/LC3, ATG7 et ATG3 (**voir Introduction, chapitre 2, partie 4.1.3**)… Dans les muscles striés squelettiques, le facteur de transcription FOXO3A régule l'expression de ces acteurs.

L'expression de ces différentes protéines a été quantifiée par immunoblot dans les différentes lignées de myoblastes immortalisés (**Figure 34**). Aucune différence significative n'a pu être observée pour les protéines FOXO3A, ATG7, ATG16 et ATG5/12. Cependant, une augmentation significative (***$p < 0,001$) de l'expression d'ATG3 a pu être observée dans les lignées de myoblastes DMD. Cette augmentation se traduit par une multiplication par 2,2 à 3,45 du taux d'ATG3 par rapport aux cellules contrôle. De la même manière, les lignées DMD présentent une augmentation significative (**$p < 0,01$) de la forme conjuguée aux phosphatidyl-éthanolamine de LC3 (LC3-II) (de 40% pour les cellules D3 à 140% pour les cellules D4).

C'est également lors de la phase d'élongation qu'interviennent les récepteurs et adaptateurs autophagiques, tels que p62, BAG3 ou NBR1. Ces récepteurs/adaptateurs sont chargés de lier les chaines multiubiquitinées et de les adresser aux autophagosomes pour permettre leur dégradation. L'expression de p62, mesurée dans le **Chapitre 1.2**, n'a pas montré de différence significative entre les lignées Wild type et DMD. L'expression de BAG3 en revanche, augmente de façon significative dans les lignées DMD (voir **Résultats, Chapitre 3.4**). Enfin, le taux de NBR1 ne semble pas varier de façon significative entre les différentes lignées.

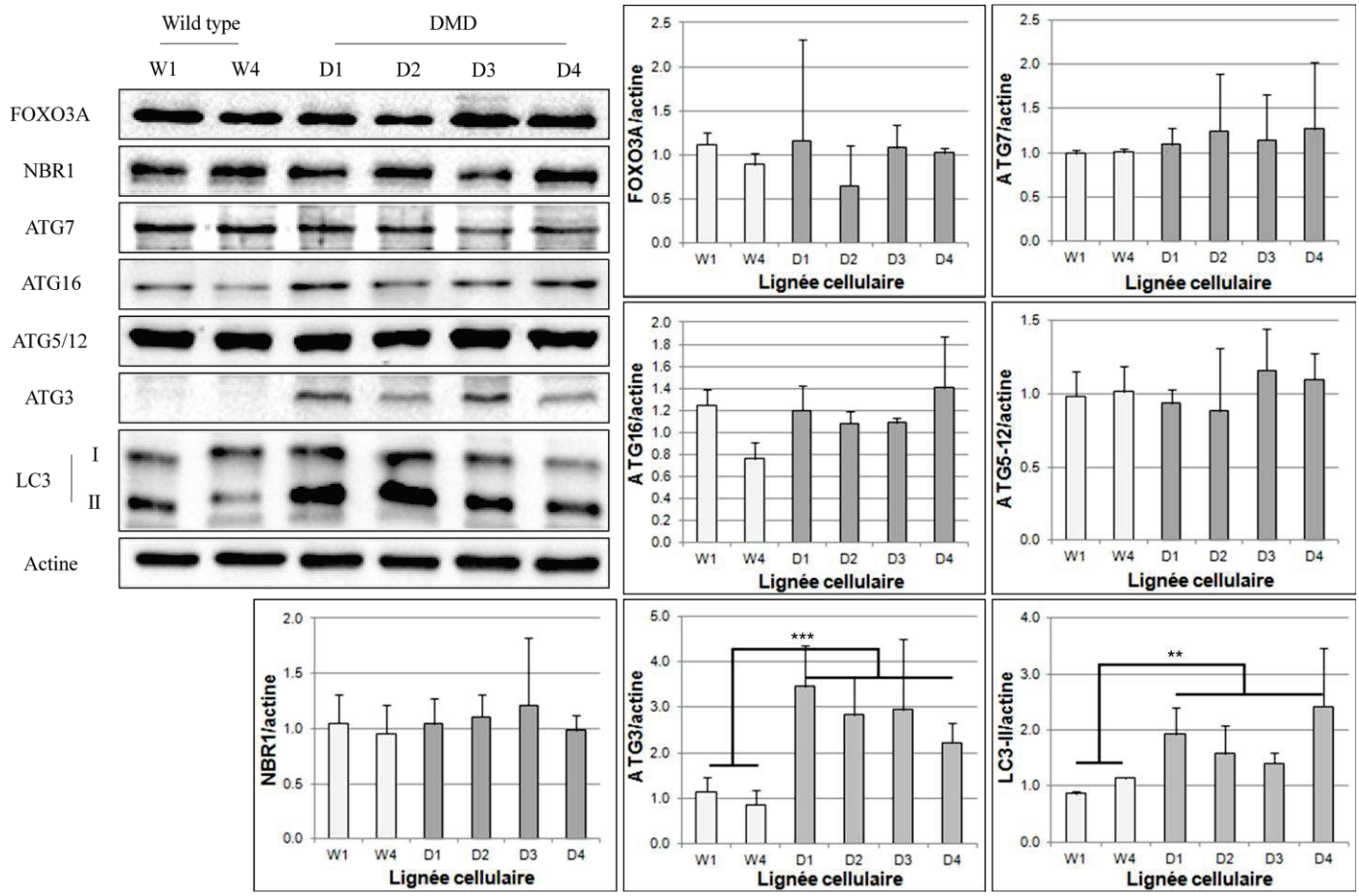


Figure 34 : Analyse des taux protéiques de différents acteurs de l'autophagie. Des extraits protéiques issus des lignées Wild type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre FOXO3A, NBR1, ATG7, ATG16, ATG5/12, ATG3 et ATG8/LC3. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD pour les protéines ATG3 et LC3-II (**$p < 0,01$ & ***$p < 0,001$).

4.3 Transport des autophagosomes et fusion avec les lysosomes

Une fois les clients reconnus et les autophagosomes formés, la dégradation du contenu vésiculaire nécessite le transport de ceux-ci jusqu'aux lysosomes en vue de leur fusion. Ce transport est dépendant du réseau de microtubules et des modifications post-traductionnelles de la tubuline. Dans un premier temps, j'ai procédé à l'analyse de l'acétylation de la tubuline α. Cette modification post-traductionnelle est décrite pour stabiliser le réseau de microtubules et ainsi faciliter le transport des autophagosomes et leur fusion avec les lysosomes (**Xie et al., 2010**). Cependant, après quantification de trois expériences indépendantes, ni l'expression de la tubuline α ni son acétylation n'ont montré de variation significative entre les différentes lignées (**Figure 35A**).

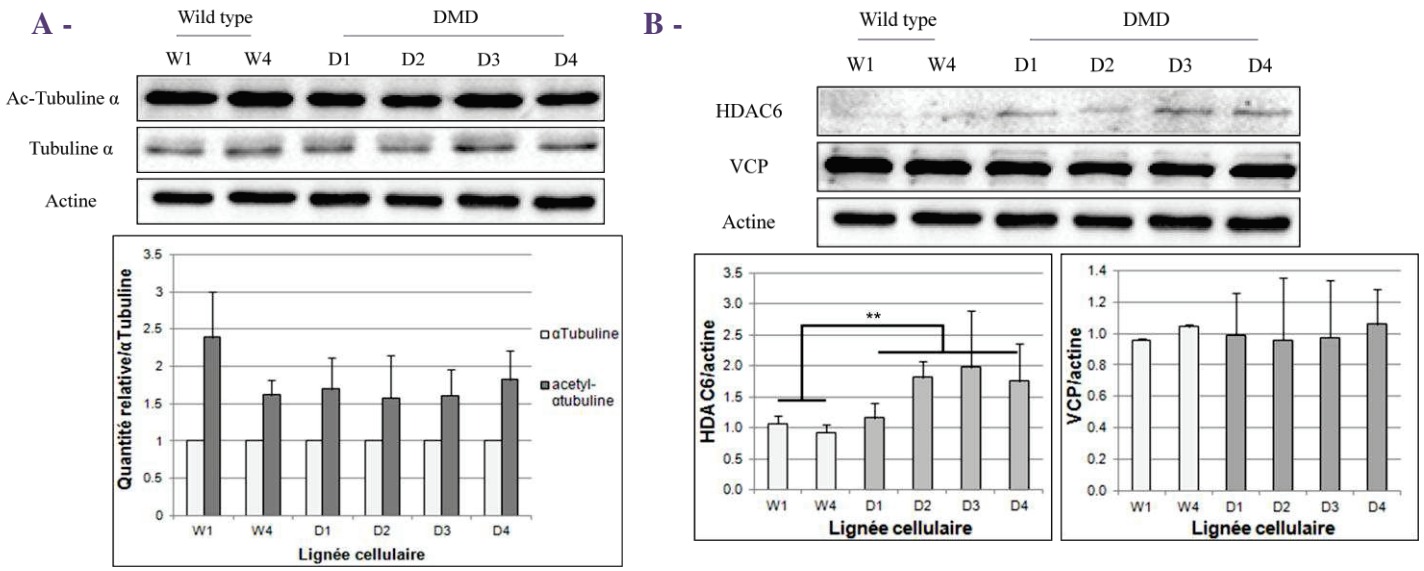


Figure 35 : Transport et maturation des autophagosomes. Des extraits protéiques issus des lignées Wild type (W1, W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été analysés par immunoblot en utilisant **(A)** des anticorps spécifiques dirigés contre la tubuline α ainsi que sa forme acétylée, **(B)** des anticorps dirigés contre VCP et HDAC6. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les graphiques présentés correspondent à la quantification de trois expériences indépendantes, après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative du taux d'HDAC6 $p < 0,01$ (**).

Je me suis également intéressée à deux protéines impliquées dans la fusion autophagosome-lysosome : VCP (*Valosin-Containing Protein*) et HDAC6 (*Histone DeACetylase 6*). Bien que la fonction exacte de VCP dans le processus de fusion soit encore inconnue, des études ont montré que son inhibition provoque une accumulation d'autophagosomes liée à un défaut de maturation (**Ju et al., 2009**). HDAC6, en plus de son rôle dans la formation d'agrésomes (**Kawaguchi et al., 2003**) et dans la déacétylation de la tubuline, est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à la fusion (**Lee et al., 2010**). L'analyse de l'expression de ces protéines a été réalisée par immunoblot puis quantifiée (**Figure 35B**). Si le taux de VCP ne présente aucune variation significative entre les lignées, l'expression de HDAC6 augmente de façon significative (**$p < 0,01$) dans les myoblastes DMD. En effet, ces derniers présentent un taux de HDAC6 de 1,2 (D1) à 2 fois supérieur au taux observé dans les cellules contrôles. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes pourrait donc être modulée dans les lignées de myoblastes DMD.

Ainsi, nous avons pu observer des variations de certains acteurs des différentes étapes du processus autophagique dans les lignées de myoblastes immortalisés issues de patients DMD, en comparaison aux lignées contrôle. Cette modulation, reflétée par une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la formation d'autophagosomes (PI3KIII, ATG3,

LC3-II) ainsi que dans le processus de fusion (HDAC6) qui semble se traduire par une augmentation du nombre de vésicules autophagiques.

4.4 Augmentation du flux autophagique/Blocage de la fusion ?

Les observations précédentes semblent indiquer une modulation du processus autophagique dans les myoblastes immortalisés issus de patients DMD. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette modulation : soit l'augmentation du flux autophagique, soit un blocage de la fusion autophagosome-lysosome et donc de la dégradation lysosomale qui aboutit lui aussi à une augmentation du nombre d'autophagosomes.

Afin de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses alternatives, les cellules ont été traitées par un cocktail d'inhibiteurs d'enzymes lysosomales : l'E64D, inhibiteur spécifique des protéases à cystéine et la Pepstatine A, inhibiteur spécifique des protéases acides. Ce traitement sur des cellules saines entraine un blocage de la dégradation lysosomale associée à une accumulation d'autophagosomes et donc une augmentation de la quantité de LC3-II, forme lipidée de la protéine LC3 associée aux autophagosomes. La quantité de LC3-II a été analysée par immunoblot dans les différentes lignées de myoblastes avant et après traitement (**Figure 36A**). Dans les cellules Wild Type, l'inhibition des enzymes lysosomales provoque une augmentation du taux de LC3-II (4,3 pour les W1 et 3,2 pour les W3), reflétant l'accumulation d'autophagosomes. De même, les lignées DMD présentent une augmentation du taux de cette protéine, de 1,2 pour les cellules D1 et D4 à 3 pour les cellules D2. Cette expérience permet donc d'écarter l'hypothèse concernant un éventuel blocage de la fusion autophagosome-lysosome au profit de celle d'une augmentation du flux autophagique dans les myoblastes DMD.

Afin de confirmer ces observations, les différentes lignées ont été transfectées de façon transitoire avec un plasmide permettant l'expression d'EGFP-LC3. Le nombre d'autophagosomes a ensuite été compté dans 100 cellules par lignée (**Figure 36B**). Après quantification de trois expériences indépendantes, nous avons pu constater une augmentation significative du nombre d'autophagosomes dans les lignées DMD comparé aux lignées contrôle. En effet, si le pourcentage moyen de cellules présentant plus de 50 autophagosomes est d'environ 30 à 40% pour les lignées Wild Type, ce pourcentage varie de 60 (D1, D2, D3) à 80% (D4) pour les cellules DMD.

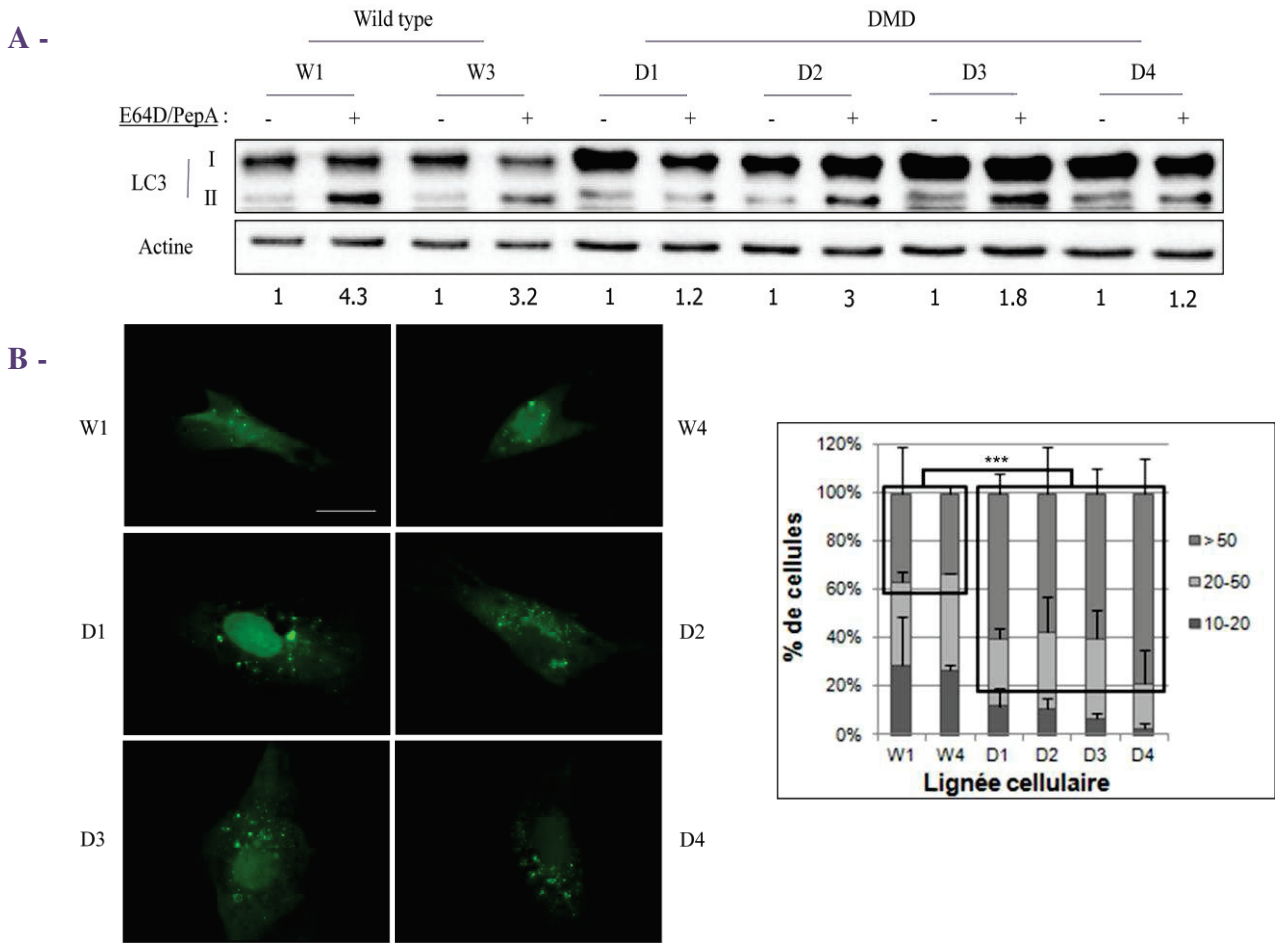


Figure 36 : Augmentation du flux autophagique A - Des myoblastes Wild Type (W1 & W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été traités par un cocktail d'inhibiteurs de protéases lysosomales (E64D + Pepstatine A) durant 19 heures. Des extraits protéiques ont ensuite été analysés par immunoblot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre LC3. La révélation de l'actine constitue un contrôle de charge. Les chiffres indiqués sous le blot correspondent à la quantification du taux de LC3-II/Actine après normalisation par la condition Non Traitée (NT). **B -** Des myoblastes Wild Type (W1 & W4) et DMD (D1, D2, D3, D4) ont été transfectés de façon transitoire avec un plasmide EGFP-LC3. Le nombre d'autophagosomes a été compté dans 100 cellules par lignée et regroupés en 3 catégories : 10-20, 20-50 >50 vésicules/cellules. Le graphique présenté correspond à la quantification de 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative du nombre de vésicules autophagiques entre cellules contrôles et cellules DMD $p < 0,001$ (***).

En conclusion, le flux autophagique semble plus important dans les lignées de myoblastes immortalisés issus de patients DMD que dans les lignées contrôle. Cette augmentation de l'autophagie pourrait être une conséquence de la baisse d'activité du protéasome observée précédemment, afin de pallier aux défauts d'élimination des protéines multiubiquitinées. Cependant, cette suractivation du processus autophagique semble ne pas être suffisante pour éliminer les nombreux agrégats présents dans les lignées DMD.

5. NFκB et contrôle qualité des protéines

Divers types de stress pouvant mener à l'inhibition ou à la surcharge du système ubiquitine-protéasome, à une augmentation de la formation des complexes BAG3/HSPB8 et de l'activité autophagique sont décrits pour être associés à une activation de la voie NFκB (**Minoia et al., 2014** ; **Nivon et al., 2012** ; **Nivon et al., 2016**).

Nous nous sommes demandé si les défauts du Contrôle Qualité des Protéines observés dans les lignées de myoblastes immortalisés issus de patients atteints de DMD pouvaient être associés à une modulation de l'activité de NFκB. Dans un premier temps, j'ai analysé par immunoblot l'expression de p65/RelA, la sous-unité de NFκB possédant un domaine d'activation de la transcription (**Figure 37A**). La quantification de trois expériences indépendantes a révélé une augmentation significative du taux de p65 dans les lignées DMD, variant de 1,8X (D1) à 2,6X (D2) comparé aux cellules contrôle.

J'ai ensuite analysé l'activité de NFκB en conditions basales ou en réponse à un choc thermique dans les différentes lignées (**Figure 37B**). Pour ce faire, les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec un plasmide permettant l'expression de la luciferase sous contrôle d'un promoteur contenant des sites de fixation pour le facteur de transcription. Ainsi, la quantification de luminescence après ajout de luciférine nous renseigne sur l'activité de NFκB, résultant de la cascade de signalisation, de sa fixation à l'ADN ainsi que de son activité transcriptionnelle. En conditions basales, nous avons pu observer une forte augmentation de l'activité NFκB dans les myoblastes DMD. En effet, la luminescence quantifiée est 3 à 4 fois plus importante dans ces lignées que dans les cellules contrôle. Après traitement par choc thermique (1h30 à 43°C), les cellules Wild Type présentent une activité NFκB environ quatre (W1) à 5 (W4) fois plus importante qu'en conditions basales. Cette augmentation significative (**$p < 0,01$) est cohérente avec l'activation de la voie atypique décrite précédemment. Cependant, cette activité ne varie pas entre les conditions Non Traitées (NT) ou après choc thermique (*Heat Shock (HS)*) dans les lignées DMD.

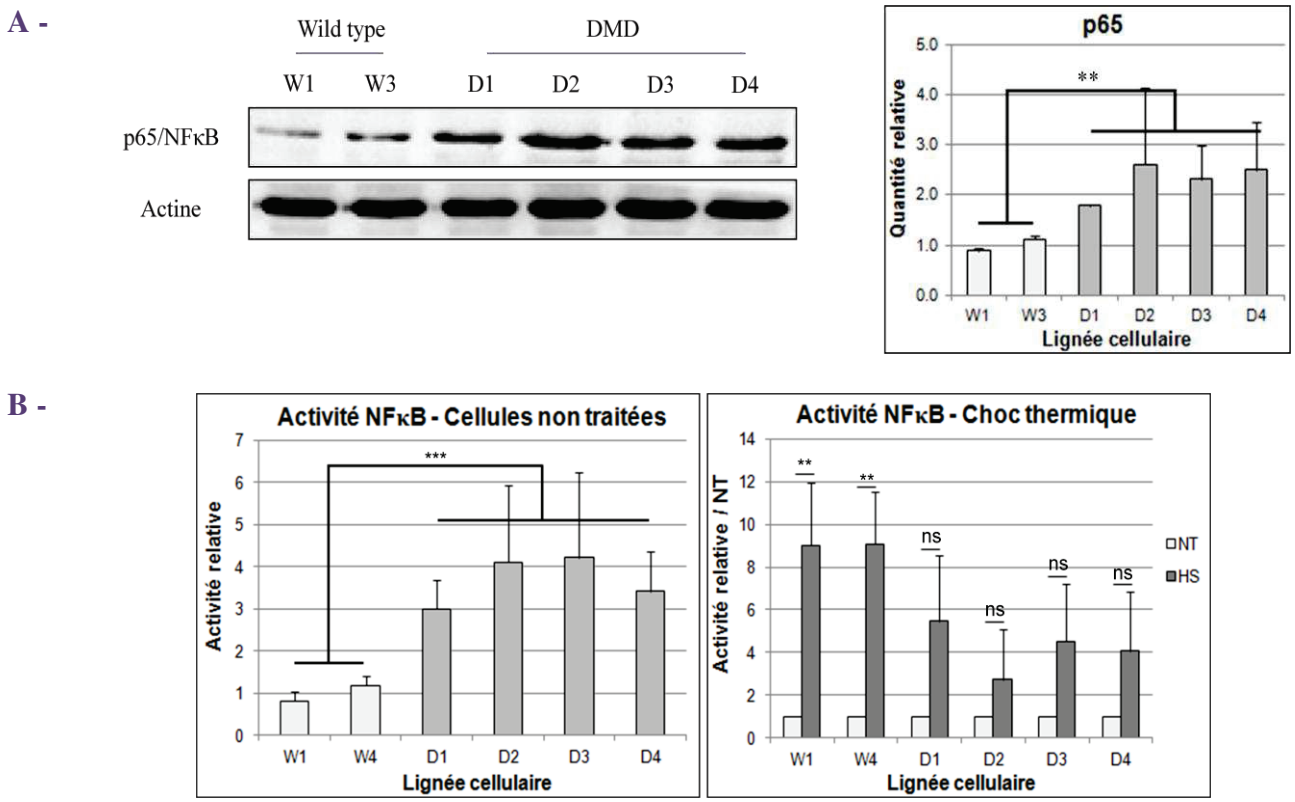


Figure 37 : NFκB et contrôle qualité des protéines. A - Des extraits protéiques totaux ont été séparés par SDS-PAGE et analysés par immunoblot grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifiquement dirigés contre p65. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Le graphique présenté représente la quantification de trois expériences indépendantes après normalisation. Les analyses statistiques (ANOVA) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD (**p < 0,01). **B -** L'activité NFκB a été mesurée par test luciférase, en conditions basales (graphique de gauche) ou en réponse à un choc thermique (1h30 à 43°C ; graphique de droite). En conditions basales, l'activité relative correspond aux résultats normalisés par rapport aux lignées Wild Type. Après choc thermique, l'activité relative correspond aux résultats normalisés par rapport à la condition Non Traitée (NT). Les analyses statistiques (ANOVA et STUDENT) montrent une différence significative entre les lignées Wild Type et DMD en conditions basales (***p < 0,001), ainsi qu'entre les conditions Non Traitées (NT) et *Heat Shock* (HS) pour les lignées WT1 & WT4 (**p < 0,01). ns = non significatif.

Ainsi, l'augmentation de l'expression de p65 dans les lignées de myoblastes DMD est corrélée à une augmentation de l'activité NFκB en conditions basales. Cependant, l'application d'un stress d'agrégation protéique (choc thermique) sur ces cellules, ne provoque aucun effet additif sur cette activation basale. Les lignées DMD semblent donc présenter un état de stress en conditions basales, corrélé à l'apparition d'anomalies des mécanismes de Contrôle Qualité des Protéines.

CONCLUSION GENERALE

Le Contrôle Qualité des Protéines est un processus particulièrement important au sein des cellules car il permet le bon fonctionnement de leur protéome. Ceci est d'autant plus important dans les cellules musculaires; en effet, les cycles de contraction/relaxation endommagent de nombreuses protéines qui ont ainsi tendance à s'agréger et à s'accumuler de façon toxique dans les cellules. Des défauts des mécanismes de reconformation (chaperons moléculaires) ou de dégradation (protéasome et autophagie) ont déjà été décrits dans le cadre de maladies musculaires, telles que des dystrophies (dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss, de Duchenne ou d'Ullrich). Cependant, à ce jour, aucune analyse de la fonctionnalité de ces mécanismes et de leurs interconnexions n'a été réalisée sur un même modèle de pathologie musculaire et avant la formation de muscles différenciés.

Durant ma thèse, j'ai travaillé sur des lignées de myoblastes immortalisés obtenus à partir de donneurs sains ou de patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne provoquée par une mutation sur le gène de la dystrophine. Ces lignées apparaissent comme un bon modèle d'étude des mécanismes impliqués dans le développement précoce de la Dystrophie de Duchenne, les myoblastes de patients n'exprimant pas la dystrophine au contraire des myoblastes de donneurs sains.
L'analyse de l'état global du Contrôle Qualité des Protéines dans les myoblastes m'a permis d'observer une augmentation de l'agrégation protéique dans les myoblastes DMD en comparaison aux myoblastes contrôles. Ce phénomène s'accompagne d'une dérégulation des mécanismes du PQC, reflétée par une modulation de l'expression des chaperons moléculaires HSPB5 et HSPB8, une augmentation de l'activation de la voie NFκB, une diminution de l'activité du protéasome ainsi qu'un switch du ratio BAG1/BAG3 conduisant à une augmentation du flux autophagique.

Les résultats obtenus lors de ma thèse apportent ainsi de nouveaux indices concernant les altérations précoces de la cellule musculaire au cours de la dystrophie musculaire de Duchenne. L'identification de nouveaux acteurs impliqués dans cette maladie permettra à long terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourront peut-être être applicables aux différentes pathologies musculaires où une dérégulation du contrôle qualité des protéines a été détectée.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Les lignées de myoblastes immortalisées, nouvel outil d'étude du développement et de la physiologie musculaires

Les premières lignées de myoblastes immortalisés ont été développées par l'équipe de Vincent Mouly, grâce à la transfection conjointe de plasmides permettant la surexpression de la télomérase (hTERT, pour *human Telomerase Reverse Transcriptase*) et de CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*). Durant ma thèse, j'ai procédé à la caractérisation de 6 lignées de myoblastes immortalisés selon ce même protocole par l'équipe de Bénédicte Chazaud (UMR 5310/INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène) : 2 lignées provenant de donneurs sains, notées W1 et W4 (pour *Wild Type*) et 4 lignées issues de patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne, notées D1 à D4. Suite aux tests réalisés dans le Milieu 1, l'analyse du potentiel proliératif de ces différentes lignées a révélé un temps de doublement plus long pour les lignées DMD comparé aux cellules contrôle. Cette différence a pu être en partie réduite grâce a l'utilisation d'un nouveau milieu de culture (Milieu 2) composé pour moitié d'un milieu commercial (Promocell). Il nous est donc désormais possible de maitriser la prolifération de ces lignées. De plus, ce protocole d'immortalisation par surexpression de la télomérase permet de s'affranchir du phénomène physiologique de sénescence (**Bernadotte et al., 2016**) survenant après un certain nombre de divisions cellulaires, en raison de l'érosion progressive des télomères, régions agéniques protectrices des chromosomes. Ce nouveau modèle d'étude permet donc l'obtention d'un grand nombre de cellules en un minimum de temps. De plus, l'utilisation de lignées immortalisées nous a permis de nous familiariser avec la culture de cellules musculaires humaines.

Nous avons également procédé à l'analyse de la capacité de différenciation de ces lignées de myoblastes immortalisés. Pour ce faire, nous avons utilisé le protocole standard employé dans l'équipe de Vingent Gache (UMR 5310/INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène), consistant à remplacer le milieu de prolifération par un milieu de différenciation pauvre en sérum, lorsque la densité cellulaire avoisine les 70 à 80% de confluence, et ce pendant 8 jours. Par un marquage de la chaine lourde de la myosine (MHC pour *Myosin Heavy Chain*), une protéine exprimée spécifiquement dans les cellules musculaires engagées dans le processus de différenciation, nous avons montré que les différentes lignées pouvaient se différencier et fusionner partiellement, formant des myotubes plurinucléés. Cependant, toutes les cellules présentes sur nos lames n'exprimaient pas la MHC et n'étaient pas capables de fusionner. Ce protocole de différenciation ne semble donc pas optimal et nécessitera des ajustements. Un

protocole spécifiquement mis au point par Promocell est actuellement en phase de test dans notre laboratoire, et consiste à laisser les cellules en contact avec le milieu de différenciation durant 5 jours, avant de le remplacer à nouveau par du milieu de prolifération. L'utilisation de cette méthode permettrait d'obtenir de nombreux myotubes, pouvant présenter pour certains une contraction spontanée.

2. La dystrophine : rôle et expression

Décrite initialement comme une protéine architecturale assurant le lien entre matrice extracellulaire et machinerie contractile des fibres musculaires, la dystrophine fait désormais l'objet d'études plus approfondies concernant un rôle potentiel avant la différenciation musculaire. Ainsi, en 2011, l'équipe de Michael Rudnicki a mis en évidence chez la souris une expression de la dystrophine dans les cellules satellites, cellules souches des muscles squelettiques, et un rôle fondamental dans la division asymétrique de celles-ci (**Dumont et al., 2015**). En effet en cas de lésion musculaire, les cellules satellites sont sollicitées pour créer de nouveaux précurseurs myogéniques afin de pallier à la destruction des fibres musculaires. Cette action nécessite une division asymétrique des cellules souches, afin de donner naissance d'une part à un précurseur myogénique qui va migrer jusqu'au site endommagé et d'autre part, à une nouvelle cellule souche pour maintenir une réserve de cellules satellites constamment disponible. Ainsi, chez les patients souffrant de Dystrophie Musculaire de Duchenne, l'absence de dystrophine provoque des anomalies de polarisation des cellules satellites, réduisant de façon drastique leur capacité de division asymétrique et par extension, la régénération musculaire. La dystrophine apparait donc comme une protéine multifonctions impliquée dans divers processus cellulaires, aussi bien dans des muscles striés matures que dans les cellules souches musculaires.

Les avis concernant l'expression de la dystrophine à l'état myoblastique s'avèrent partagés. En effet, si certaines études affirment que cette protéine est absente dans ces cellules musculaires non différenciées (**Miranda et al., 1988**), d'autres ont mis en évidence son expression dans les myoblastes (**Trimarchi et al., 2006**). Nous nous sommes donc légitimement demandé si les lignées immortalisées de myoblastes que nous utilisons exprimaient de la dystrophine. Un protocole nécessitant l'utilisation de gels Tris-acétate en gradient a permis de révéler l'expression de cette protéine dans les lignées de myoblastes issus de donneurs sains, de façon beaucoup moins importante cependant que le taux

observable dans des cellules différenciées. Ces résultats nous permettent ainsi d'affirmer que (1) la dystrophine est exprimée dans les myoblastes Wild Type et (2) que les mutations affectant le gène de la dystrophine dans les lignées DMD ne permettent pas l'expression de la protéine. Les lignées DMD présentent soit une mutation ponctuelle causant l'apparition d'un codon STOP dans l'exon 41 du gène de la dystrophine (D1, D2, D3), soit une délétion totale de l'exon 44 provoquant un décalage du cadre de lecture (D4). Les anticorps utilisés pour les analyses d'expression protéique (Western Blot) reconnaissent spécifiquement la partie C-terminale de la protéine (MANDRA1, Santacruz ; acides aminés 3558-3684). Plusieurs hypothèses peuvent se poser concernant cette absence de dystrophine dans les myoblastes DMD : (1) la protéine n'est pas exprimée dans ces cellules, ou (2) la protéine est traduite sous une forme tronquée instable aussitôt dégradée (**Aartsma-Rus et al., 2016**).

3. Dystrophie Musculaire de Duchenne, agrégation protéique et Contrôle Qualité des Protéines (PQC)

Parmi les nombreuses dystrophies musculaires connues à ce jour, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, pour *Duchenne Muscular Dystrophy*) apparait comme l'une des plus fréquentes (avec une prévalence d'1/3500 parmi les garçons nouveau-nés). L'apparition précoce des premiers symptômes aux alentours de 2 ans ainsi que son évolution rapide (les patients perdent leur capacité ambulatoire dès l'adolescence) en font également l'une des pathologies musculaires les plus sévères. A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif pour cette maladie, et les thérapies palliatives ne suffisent pas à soulager les patients sur le long terme.

De nombreux défauts physiologiques ont été mis en évidence depuis de nombreuses années chez les patients DMD ou dans les animaux modèles : dégénérescence progressive des fibres musculaires liée aux cycles répétés de contraction/relaxation, phénomène inflammatoire persistant avec infiltration de cellules immunitaires dans le tissu musculaire, problèmes de régénération et remplacement des muscles par du tissu adipeux… L'étude des mécanismes cellulaires sous-jacents a également montré des anomalies du contrôle qualité des protéines (PQC). Si ces mécanismes cellulaires ont été analysés dans différents modèles de muscles striés différenciés (nématode, souris, chien…) ou sur des biopsies de patients, aucune étude n'avait jusqu'à maintenant été réalisée dans un seul et même modèle, à un stade précoce du développement musculaire. Les lignées de myoblastes immortalisés caractérisées

précédemment nous ont donc permis d'étudier, dans un contexte d'absence de dystrophine, la fonctionnalité des mécanismes du PQC ainsi que leur interconnexion avant la différenciation musculaire. Ce projet vise à identifier des acteurs précoces pouvant favoriser la dégénérescence musculaire, dans la perspective de nouvelles thérapies.

3.1 Etat global du PQC

La première étape a été d'analyser l'état global du Contrôle Qualité des Protéines dans ces lignées. Pour ce faire, nous avons procédé a une quantification de l'agrégation protéique grâce au marquage de deux protéines spécifiques : (1) p62, un récepteur de l'autophagie capable de lier des substrats ubiquitinés grâce à son domaine UBD et (2) les protéines multiubiquitinées adressées aux différentes machineries de dégradation (le système Ubiquitine-Proteasome pour une polyubiquitination via le résidu Lysine 48 de la molécule d'ubiquitine ; le processus autophagique pour les chaînes polyubiquitinées via le résidu Lysine 63 de la molécule d'ubiquitine). Les lignées de myoblastes DMD ont montré un recrutement plus important de la protéine p62 au niveau des agrégats (Filter Trap), confirmé par la présence d'un plus grand nombre d'agrégats p62-positifs dans ces cellules (immunofluorescence). Une augmentation du taux de protéines multiubiquitinées (immunoblot) associée à une augmentation de leur agrégation (Filter Trap et immunofluorescence), ont également pu être observées dans les myoblastes DMD. L'augmentation de la présence de protéines multiubiquitinées révèle une augmentation du taux de protéines à adresser aux systèmes de dégradation cellulaires : le système ubiquitine-protéasome (chaines K48) ou le processus autophagique (chaines K63). L'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces types deux types différents de polyubiquitination permettra de distinguer les protéines adressées à l'un ou l'autre de ces mécanismes.

Ainsi, ce travail montre pour la première fois un taux d'agrégation plus important dans des cellules DMD que dans des lignées contrôle et ce dès le stade myoblaste.
Pour se prémunir contre l'accumulation toxique d'agrégats protéiques dans leur cytosol, les cellules possèdent différents mécanismes de défense. Parmi eux, on trouve notamment le phénomène de division asymétrique, durant lequel la cellule mère centralise ses « déchets » (agrégats protéiques, protéines mal conformées, organites défectueux…) dans une seule des cellules filles lors de la mitose, afin d'épargner la seconde (**Fuentealba et al., 2008**). Dans le modèle murin de la dystrophie de Duchenne (mdx), l'absence de dystrophine cause une

défaillance de la division asymétrique des cellules satellites, provoquée par une mauvaise répartition de Pard3 (*Partitioning defective 3 homolog*) régulateur de la famille des protéines PAR (**Dumont et al., 2015**). Cependant, le rôle de ces protéines dans la division asymétrique impliquée dans la gestion des déchets n'est, à l'heure actuelle, pas connu. En revanche, des études menées sur ce phénomène chez la levure (**Zhou et al., 2014**) ont mis en évidence l'importance de l'attachement des agrégats protéiques à la membrane externe des mitochondries, et l'implication de la protéine FIS1 (*mitochondrial FISsion protein 1*) intervenant dans le processus de fusion/fission. En effet, l'inhibition de l'expression de cette protéine par mutation génétique entraine une diminution du taux d'agrégats protéiques associés aux mitochondries. Il serait intéressant d'étudier la capacité de liaison des agrégats protéiques aux mitochondries grâce à un double marquage immunofluorescent (agrégats/mitochondries), et ce lors de la division des cellules WT ou DMD, pour déterminer si la répartition des agrégats protéiques pourrait s'avérer hétérogène.

3.2 Les chaperons moléculaires : séquestration et reconformation

Les chaperons moléculaires, et en particulier les protéines de choc thermiques (HSP pour *Heat Shock Proteins*) sont les premiers senseurs du mauvais repliement protéique. Ces protéines peuvent lier les domaines hydrophobes exposés de clients mal conformés, afin de les séquestrer (holdases) et/ou de les reconformer (foldases). L'analyse de l'expression d'HSP70 et HSP90, ainsi que du co-chaperon HSP40 n'a pas montré de différence significative entre les lignées contrôle et les lignées DMD. De même, l'activité enzymatique de ces foldases n'a pas révélé d'anomalies dans ces cellules. Les mécanismes de reconformation ne semblent donc pas affectés dans les myoblastes DMD. Des études protéomiques menées chez des patients DMD ont cependant mis en évidence une augmentation de l'expression d'HSP70 et HSP90α/β (**Paepe et al., 2012**). Ces observations ont été confirmées dans le modèle murin de la DMD (*mdx*), où une augmentation du taux d'HSP70 a pu être constaté (**Carberry et al., 2014**). Cette différence d'expression pourrait s'expliquer par une augmentation progressive de la quantité de protéines mal conformées dans les cellules musculaires des patients DMD, nécessitant une mobilisation plus importante des mécanismes de reconformation.

L'analyse de l'expression d'HSPB1, HSPB5 et HSPB8, trois holdases impliquées dans le maintien de l'intégrité des structures sarcomériques en réponse au stress, a mis en évidence d'une part une augmentation du taux de HSPB5 et d'autre part une diminution du taux de

HSPB8 dans les cellules DMD. Une augmentation du recrutement de ces deux acteurs au niveau des agrégats protéiques a également été constatée dans ces lignées. Les mécanismes de séquestration semblent donc mobilisés de façon plus importante dans les lignées de myoblastes immortalisés DMD. La séquestration de protéines mal conformées permet d'empêcher leur agrégation toxique, en attendant l'intervention des mécanismes de reconformation ou l'adressage aux mécanismes de dégradation.

Ainsi la protéine HSPB8 interagit avec le co-chaperon moléculaire BAG3 dans un type particulier d'autophagie, nommé CASA (*Chaperone-assisted Selective Autophagy*). Ce processus, initialement mis en évidence dans les muscles de la drosophile (**Arndt et al., 2010**), intervient dans l'élimination de protéines mal conformées telles que la Filamine C (FLNC). Cette protéine, exprimée spécifiquement dans les muscles, subit les cycles de contraction/relaxation et a tendance à s'agréger. Des études ont mis en évidence une augmentation de la localisation de FLNC au niveau du sarcolemme dans les muscles de patients DMD, suggérant un potentiel rôle compensatoire pour pallier aux dommages membranaires (**Thompson et al., 2000**). L'augmentation de la formation des complexes BAG3/HSPB8 dans les myoblastes DMD, que nous observons dans cette étude, pourrait donc être liée à une augmentation de l'agrégation de cette protéine. L'expression de filamine C, ainsi que son recrutement au niveau des agrégats protéiques, nécessiteront d'être analysés par des méthodes d'immunoblot, de Filter Trap et d'immunofluorescence. La FLNC intervient également dans le processus de fusion lors de la différenciation musculaire et son absence cause le développement de maladies musculaires sévères, les filaminopathies (**Dalkilic et al., 2006**). Une modulation de l'expression de la filamine C ainsi que son agrégation pourraient participer à la mauvaise régénération des muscles chez les patients DMD, via des défauts de fusion lors de la différenciation des précurseurs myogéniques.

HSPB5, aussi connue sous le nom d'alphaB-crystalline, intervient notamment dans le maintien des structures cytosquelettiques en réponse à des stress pouvant provoquer leur agrégation (**Bullard et al., 2004** ; **Djabali et al., 1997** ; **Ghosh et al. 2007** ; **Singh, et al., 2007** ; **Wang et al., 2003**). Cependant, l'analyse de l'intégrité des différentes catégories de filaments (actine, tubuline, vimentine) n'a révélé aucune anomalie architecturale pouvant expliquer l'augmentation d'expression d'HSPB5 observée dans les myoblastes DMD.
L'augmentation de l'expression d'HSPB5 a été préalablement mise en évidence dans les muscles de souris *mdx* (**Carberry et al., 2013**), ainsi que dans les muscles vieillissants

(**Doran et al., 2007**), révélant l'importance de ce chaperon moléculaire au sein de ces organes. HSPB5 possède trois sites de phosphorylation (Sérine 19, sérine 45 et sérine 59). La modulation de la phosphorylation de ces sites permet la détermination des fonctions cellulaires assurées par la protéine (**Ahmad et al., 2008** ; **Ecroyd et al., 2007**) ainsi que sa localisation subcellulaire (**Den Engelsman et al., 2005**). Ainsi, des études menées dans des muscles squelettiques humains lors du processus de vieillissement ont montré une augmentation de la phosphorylation d'HSPB5 ainsi que du recrutement de cette forme phosphorylée au niveau des fractions insolubles (agrégats protéiques ; **Yamaguchi et al., 2007**). Le recrutement d'HSPB5 au niveau des agrégats protéiques étant plus important dans les myoblastes immortalisés DMD, l'état de phosphorylation de cette sHSP pourrait être modifié dans ces cellules. Il serait donc intéressant d'analyser le taux de phosphorylation de chacun des résidus Sérine (S19, S45 et S59) dans les différentes lignées, afin de comparer les profils de phosphorylation.

3.3 Le système Ubiquitine-Protéasome

Le système Ubiquitine-Protéasome (UPS) est un mécanisme de dégradation spécialisé dans l'élimination des protéines à courte demi-vie et des protéines mal conformées multiubiquitinées. L'accumulation de protéines multiubiquitinées dans les lignées de myoblastes immortalisées DMD nous a poussés à analyser l'activité catalytique du protéasome 26S. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une diminution de l'activité chymotrypsine dans ces mêmes cellules, sans modification des activités caspase et trypsine. Des études menées sur l'importance de l'activité de type chymotrypsine ont mis en évidence le rôle primordial des sous-unités β5, porteuses de cette activité. En effet, leur inhibition chimique par un traitement au Z-IE(OtBu)AL-CHO, un aldéhyde peptidique inhibant de façon spécifique l'activité chymotrypsine du protéasome, entraine l'accumulation de protéines ubiquitinées dans des cellules neuronales de souris (**Figueiredo-Pereira et al., 1994**). Cependant, des analyses effectuées chez des patients DMD ont montré une augmentation significative de l'activité enzymatique globale du protéasome (**Kumamoto et al., 2000**). Cette différence d'observations pourrait être liée à la différence de matériel analysé (muscle différencié *vs* myoblastes).

La baisse d'activité catalytique du protéasome observée dans les myoblastes DMD s'accompagne d'une baisse de l'expression de la protéine BAG1-M. Chacune des sous-unités

de BAG1 (BAG1-L, -M, BAG1, -S) possède un domaine de liaison à l'ubiquitine, permettant la reconnaissance des protéines multiubiquitinées. De plus, Lüders et son équipe ont démontré l'implication de BAG1 dans l'adressage de clients vers la dégradation protéasomale, grâce à une interaction avec le protéasome 26S (**Lüders et al., 2000**). Enfin, différentes études indiquent que BAG1 participe à l'adressage de substrats spécifiques tels que la protéine BCR-ABL (**Tsukahara & Maru, 2010**), l'huntingtine (**Sroka et al., 2009**) ou la protéine Tau (**Elliott et al., 2007**) à la dégradation protéasomale. Ainsi, la baisse d'expression de la sous-unité BAG1-M dans les myoblastes DMD pourrait causer une diminution de l'adressage de certaines protéines au système ubiquitine-protéasome.

De façon intéressante, la baisse du taux de BAG1 est corrélée à une augmentation de l'expression de la protéine BAG3, indiquant l'existence d'un switch BAG1/BAG3 dans les lignées de myoblastes DMD. Ce phénomène est observable en conditions physiologiques, lors du vieillissement cellulaire (**Gamerdinger et al., 2009**), ainsi qu'en cas de surcharge ou d'inhibition du système ubiquitine-protéasome (**Rapino et al., 2014**). L'augmentation du taux de BAG3 dans les myoblastes DMD est associée à une augmentation du nombre de complexes BAG3/HSPB8. Ce phénomène a déjà été écrit en réponse à une augmentation de l'agrégation protéique, favorisant ainsi l'adressage des agrégats et leur élimination par le processus autophagique (**Minoia et al., 2014** ; **Nivon et al., 2012**). Nos résultats suggèrent donc que ce switch entraine une activation préférentielle du processus autophagique au détriment de la dégradation protéasomale dans les lignées de myoblastes DMD.

3.4 Le processus autophagique

Nous avons pu mettre en évidence une modulation de l'expression d'acteurs intervenant à différentes étapes du processus autophagique dans les lignées de myoblastes DMD.

Parmi les protéines concernées par cette modulation, on trouve la PI3 Kinase de classe III, une enzyme responsable de la formation de PIP3 (Phosphatidyl-Inositol 3 phosphate) et de la nucléation de la structure pré-autophagosomale (PAS pour Pre-Autophagosomal Structure). L'augmentation de l'expression de cette protéine dans les lignées de myoblastes DMD n'étant pas nécessairement corrélée à une augmentation de son activité enzymatique, cette dernière pourra être analysée par une méthode immunoenzymatique (test ELISA, pour *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) après purification de l'enzyme et quantification de la formation de PIP3 (**Hassett et al., 2017**).

L'augmentation du taux d'ATG3 et de LC3-II, forme lipidée de la protéine LC3, ainsi que l'augmentation du nombre d'autophagosomes présents dans les lignées DMD semble indiquer une augmentation du flux autophagique dans ces cellules. Ces résultats concordent avec l'augmentation de la machinerie autophagique observée dans les muscles de souris *mdx* (**Spaulding et al., 2017**). Cependant, si cette augmentation dans les lignées de myoblastes DMD correspond à une augmentation du flux autophagique, l'augmentation observée dans les muscles *mdx* est associée à une diminution du flux, lié à la diminution du nombre de lysosomes disponibles pour assurer la dégradation. Ces observations pourraient s'expliquer par une perte d'efficacité du processus autophagique au fur et à mesure de l'avancée de la pathologie, causée par une diminution de la réserve de lysosomes disponibles.

Une augmentation de l'expression de HDAC6 (*Histone DeACetylase 6*) a également été constatée dans les myoblastes DMD. Cette enzyme est impliquée dans différents processus cellulaires : elle entraine notamment la déstabilisation du réseau de microtubules en déacétylant la tubuline (**Matsuyama et al., 2002**), permet la formation des agrésomes en transportant les agrégats protéiques jusqu'au centre organisateur des microtubules (MTOC, pour *MicroTubule Organizing Center* ; **Kawaguchi et al., 2003**) et intervient dans le processus de fusion autophagosome-lysosome par déacétylation de la cortactine (**J.-Y. Lee et al., 2010**). Cependant, malgré l'augmentation du taux de HDAC6 observée dans les cellules DMD, l'acétylation de la tubuline α ne présente aucune variation significative par rapport aux lignées contrôle. La surexpression de cette protéine pourrait agir comme un mécanisme compensatoire en cas de diminution de son activité enzymatique. L'analyse de cette activité dans les différentes lignées grâce à l'utilisation d'un kit fluorogénique (BML-AK516-0001, Enzo Life Sciences ; **Pai et al., 2015**) permettrait de tester cette hypothèse. Des études menées chez la souris *mdx* (**Minetti et al., 2006**) et chez le poisson zèbre *sapje* (**Johnson et al., 2013**) ont montré que l'inhibition chimique de l'activité déacétylase de HDAC6 réduisait le phénotype dystrophique, reflétant un rôle central de l'activité déacétylase dans cette pathologie. HDAC6 pourrait également être inhibée via son interaction avec d'autres partenaires protéiques. En effet, l'interaction avec la protéine TPPP (*Tubulin Polymerization Promoting Protein*) a été décrite pour inhiber l'activité déacétylase de HDAC6 (**Tőkési et al., 2010**). Ainsi, la quantification du taux de TPPP dans les lignées de myoblastes DMD pourrait nous renseigner sur l'activité enzymatique de HDAC6. Une absence de modulation de l'activité enzymatique d'HDAC6 laisserait à penser que l'augmentation de son expression observée dans les myoblastes DMD pourrait ne pas être liée à son intervention dans

l'acétylation de la tubuline. Dans ce cas, l'élévation du taux de HDAC6 pourrait alors s'expliquer par l'augmentation de l'agrégation protéique constatée dans ces cellules, et par la nécessiter de transporter ces agrégats dans la zone du centre organisateur des microtubules (MTOC, pour *MicroTubule Organizing Center*) où se produit la fusion autophagosome/lysosome. L'analyse de la localisation subcellulaire de HDAC6 ainsi que des différents moteurs moléculaires (kinésine, dynéine) par immunofluorescence, ainsi que des expériences de Time-Lapse pour visualiser le transport des agrégats protéiques dans les différentes lignées de myoblastes permettraient de vérifier cette hypothèse.

3.5 Activation de NFκB

L'accumulation de protéines mal conformées et/ou agrégées peut mener à la surcharge ou la diminution de l'efficacité du système ubiquitine-protéasome, ainsi qu'à une augmentation de la formation des complexes BAG3/HSPB8 et de l'activité autophagique. Ces phénomènes sont également décrits pour être associés à une activation de la voie NFκB (**Nivon & al., 2012** ; **Nivon & al., 2016** ; **Minoia & al., 2014**). L'analyse de l'expression de p65, sous-unité intervenant dans la voie canonique et une des voies atypiques décrites par notre équipe, a mis en évidence une augmentation de son expression dans les lignées de myoblastes DMD. Nous avons également constaté une augmentation de l'activité NFκB à l'état basal dans les myoblastes DMD. L'application d'un stress d'agrégation protéique (choc thermique) n'a pas entrainé d'activation supplémentaire dans ces cellules, suggérant ainsi une activité maximale de NFκB à l'état basal.

L'inflammation chronique est une des caractéristiques principales de la dystrophie musculaire de Duchenne. Celle-ci entraine la production de molécules activant la voie NFκB, telles que le TNFα ou l'interleukine-1, permettant la transcription de gènes spécifiques de la réponse inflammatoire (**Messina et al., 2011**). L'une des prochaines étapes de ce projet consistera donc à déterminer quel type de voie (classique ou atypique) est activé, ainsi que les gènes cibles transcrits en réponse à l'hyperactivation de la voie NFκB dans les myoblastes DMD.

3.6 Réexpression de la dystrophine

L'accumulation d'agrégats protéiques toxiques ainsi que les nombreux défauts du Contrôle Qualité des Protéines observés dans les myoblastes DMD où l'expression de la dystrophine est abolie, semblent impliquer cette protéine dans la modulation du PQC. Afin de valider ces

résultats, notre équipe va procéder à la réexpression de la protéine et vérifier la restauration d'un PQC similaire à celui analysé dans les cellules contrôles. L'édition génomique à visée thérapeutique a déjà été utilisée auparavant dans des myoblastes de patients DMD, avec succès, grâce à la méthode CRISPR/Cas9 (**Lattanzi et al., 2017**). Cette méthode est utilisée par notre équipe pour procéder à la réexpression de la dystrophine dans la lignée D4, présentant un codon STOP prématuré causé par un décalage du cadre de lecture consécutif à la délétion de l'exon 44.

PUBLICATION

Modulation of protein quality control and proteasome to autophagy switch in immortalized myoblasts from Duchenne Muscular Dystrophy patients

Marion Wattin, Loïc Gaweda, Pascale Muller, Mathieu Baritaud, Charlotte Scholtes, Chloé Lozano, Bénédicte Chazaud, Kathrin Gieseler and Carole Kretz-Remy

Université de Lyon, F-69622, Lyon, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne ; CNRS, UMR5310 INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène.

Corresponding author: Carole Kretz-Remy, INMG, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de médicine Lyon Est, 8 Avenue Rockefeller, F-69373 LYON Cedex 08. Mailing address: carole.kretz@univ-lyon1.fr; Phone number: +33 472 44 79 57; Fax number: +33 472 43 26 85.

ABSTRACT

The maintenance of proteome integrity is of primary importance in post-mitotic tissues such as muscle cells; thus, protein quality control mechanisms must be carefully regulated to ensure their optimal efficiency, a failure of these processes being associated to various muscular disorders. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is one of the most common and severe form of muscular dystrophies and is caused by mutations in the dystrophin gene. Protein quality control modulations have been diversely observed in degenerating muscles of patients suffering from Duchenne Muscular Dystrophy or in animal models of the disease. In this study, we investigated whether modulations of protein quality control mechanisms already pre-exist in undifferentiated myoblast cells originating from DMD patients. We report for the first time that the absence of Dystrophin in human myoblasts is associated with protein aggregation stress characterized by an increase of protein aggregates. This stress is combined with BAG1 to BAG3 switch, NFκB activation and up-regulation of BAG3/HSPB8 complexes that ensure preferential routing of misfolded/aggregated proteins to stimulated autophagy rather than to 26S proteasome. In this context, restoration of pre-existing alterations of protein quality control processes might represent a valuable strategy for Duchenne Muscular Dystrophy therapies.

INTRODUCTION

The maintenance of the proteome integrity is of great importance for cell viability. Indeed, proteins must fold into specific three-dimensional structures to acquire their functional native states, which is energetically favored but in precarious equilibrium. Actually, proteins often misfold as a result of stochastic fluctuations, mutations or environmental stresses such as elevated temperatures, exposure to chemicals, production of reactive oxygen species or physiological aging (Herczenik and Gebbink, 2008; Haigis and Yankner, 2010; Chen *et al.*, 2011). Because of their altered spatial arrangement, misfolded proteins expose hydrophobic domains usually located internally; these hydrophobic motifs drive protein aggregation and can sequester other functional cellular components leading to cell cytotoxicity. Accumulation of toxic misfolded/aggregated proteins is considered as a major mechanism of human disease highlighted by the growing list of “protein conformational diseases” resulting from accumulation of toxic inclusions (Herczenik and Gebbink, 2008). Consequently, cells possess protein quality control (PQC) machinery that monitors and preserve the health of its proteome by three main strategies: refolding, sequestering or degrading misfolded proteins. Refolding is achieved by molecular chaperones that bind to hydrophobic motifs of non-native proteins (Vabulas *et al.*, 2010). Chaperones can be classified according to their mode of action: i) the foldases such as HSPA (Hsp70) family that assist protein refolding in an ATP-dependent way and ii) the ATP-independent holdases, such as HspB1, HspB5 or HspB8, which prevent protein aggregation by binding partially unfolded client proteins, holding them in a folding-prone state and thus protecting them from aggregation (Suss and Reichmann, 2015). Chaperones form a dynamic network of chaperones and co-chaperones whose composition change and adapt to the environment; as for example, when refolding is not possible the association of BAG1 or BAG3 co-chaperones to HspA1/A8 and other partners can redirect misfolded/aggregated proteins to degradation mechanisms: the proteasome for the former and the autophagy for the latter (Kettern *et al.*, 2010). The ubiquitin-proteasome system (UPS) is responsible for the degradation of proteins residing in the cytosol, the endoplasmic reticulum and the nucleus (Arrigo *et al.*, 1988). The 26S proteasome is a barrel-like structure in which the two inner ß-ring structures of the core particle bear caspase-like, trypsine-like and chymotrypsin-like proteolytic activities (Livneh *et al.*, 2016). Substrate proteins are targeted to the proteasome through multi-ubiquitination accomplished by E1, E2 and E3 (Dick *et al.*, 1998) and are de-ubiquitinated and degraded into small peptides of 7-8 amino acids long (Verma *et al.*, 2002). The other major degradation pathway is the autophagic process. Macroautophagy (herein referred as autophagy) is a self-eating process starting with *de novo* formation of double-membrane autophagosomes that engulf parts of the cytoplasm and fuse with acidic lysosomes to form autolysosomes (Wirth *et al.*, 2013 ;

Wilson *et al.*, 2014); the autophagosome content is then degraded by lysosomal hydrolases. The autophagic process is regulated by ATG proteins and requires the ULK1 kinase complex, the interaction of beclin1 with class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), the ATG9 cycling system, the WIPIs, and the Atg12-Atg5 and the LC3-phosphatidylethanolamine (LC3-II) conjugation systems, which are under the control of various signal transduction pathways (Kamada *et al.*, 2000 ; Kraft and Martens, 2012; Bakula *et al.*, 2017). Autophagy has long been described as a bulk degradation process which recycles cellular building blocks for energy salvage, after starvation for example (Kuma *et al.*, 2004). However, it is now abundantly described that autophagy can selectively degrade damaged mitochondria, aggregated proteins etc. by targeting cargos to the autophagosomal membrane protein LC3-II, *via* the use of autophagic receptors and adaptors (such as p62 or BAG3) (Nivon *et al.*, 2016 ; Zaffagnini and Martens, 2016). When PQC mechanisms are inefficient or overwhelmed, protein aggregates are formed and accumulate, leading to cell toxicity and eventually protein conformational diseases such as neurodegenerations or muscular disorders of which muscular dystrophies characterized by progressive wasting of skeletal muscles (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007; Sandri *et al.*, 2013).

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is one of the most common form of muscular dystrophies (1 out of 3500 new-born males) (Hoffman *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1987). DMD is characterized by progressive muscle degeneration starting in early childhood and affecting skeletal and cardiac muscle as well as the diaphragm (Davies *et al.*, 1988). This X-linked recessive disorder is caused by duplications, deletions or point mutations of the human dystrophin gene (Magri *et al.*, 2011). The Dystrophin protein is essential for maintenance of the muscle cell membrane; it recruits other structural and signaling proteins to the sarcolemma, allowing the formation of the Dystrophin-associated Glycoprotein Complex. This complex plays a key role during muscle contraction by mechanically stabilizing the sarcolemma but is also involved in the scaffolding of intracellular signaling proteins (De Palma *et al.*, 2014). In addition to its role in differentiated muscles, it was recently reported that Dystrophin is necessary for maintaining the asymmetric division and the regenerating potential of mouse satellite cells that will differentiate in myoblasts and myotubes (Dumont *et al.*, 2015). To date no cure for DMD is available, but several pre-clinical and clinical settings are currently investigated (Shimizu-Motohashi *et al.*, 2016). Interestingly, some connections between PQC perturbation and altered muscles in DMD patients or diverse animal models have been performed. For instance, an increase of the levels of HspB5 and HSPA1 molecular chaperones was observed in the muscles of *mdx* mouse model (Carberry *et al.*, 2013; Carberry *et al.*, 2014); modulation of autophagy was also reported in *mdx* mice muscles and in muscle biopsies of DMD patients (De Palma *et al.*, 2012; De Palma *et al.*,

2014). Moreover, our group also observed an increased number of autophagosomes in the nematode (*C. elegans*) DMD model and could identify various genetic suppressors of muscle degeneration that were connected to protein degradation pathways (Brouilly *et al.*, 2015). However, whether and how PQC contributes to Dystrophin-dependent muscle degeneration is still unknown. In addition, all PQC studies on DMD models have been carried out on mature, degenerating muscles; it is thus still unknown whether PQC modulations pre-exist in DMD myoblasts, the myofibres precursors. Therefore, we performed an exhaustive study of PQC actors in a unique DMD model consisting of immortalized human myoblast cell lines originating from dystrophic muscle biopsies of DMD patients.

In this study, we observed an accumulation of intracellular protein aggregates in DMD myoblasts, in comparison to controls from healthy donors. Moreover, we detected modulations of molecular chaperones levels, notably HspB5 and HspB8, a decreased activity of the 26S proteasome and a BAG1 to BAG3 molecular switch. These modulation of PQC processes were associated with an up-regulation of NFκB activity, increased levels of autophagy actors (ATG3, LC3-II, HDAC6) and stimulation of the autophagic flux along with down-regulation of proteasome activity. These results demonstrate that PQC alterations pre-exist in DMD myoblasts and could represent interesting targets in palliative treatment strategies for DMD.

RESULTS

Characterization of immortalized myoblasts derived from healthy donors or Duchenne Muscular Dystrophy patients.

DMD is the most common childhood muscular dystrophy, but there is still no cure for this disease; thus, standardized tools that could allow the study of the molecular and cellular mechanisms involved in this disease are still needed. In this context, human primary myoblasts derived from muscle biopsies of dystrophic patients have been used to assess molecular and cellular mechanisms of DMD. However, these *in vitro* cultures of primary human cells suffer from phenotype variations and cellular senescence occurring during prolonged cell division. The use of stable immortalized cell lines deriving from human myoblasts isolated from muscular biopsies of DMD patients can overcome these drawbacks and thus help to assess the pathological mechanisms of DMD (Mamchaoui *et al.*, 2011). In this study, we used six immortalized myoblasts cell lines expressing human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and cyclin-dependent kinase-4 (CDK4), to study the involvement of protein quality control in DMD pathology. W1 and W4 cell lines were obtained

from biopsies of healthy patients whereas D1 to D4 cell lines were derived from muscle biopsies of DMD patients (see Materials and Methods).

We first checked the myogenic signature and differentiation ability of the cells by detecting myosin heavy chains (MyHC) in control or DMD cell lines, during proliferation or differentiation conditions (Figure 1A and 1B). As seen by immunofluorescence analysis, after 8 days of differentiation all cell lines expressed MyHC, whereas undifferentiated cells did not (Fig.1A); moreover, at D8 we could distinguish fused myoblasts containing more than 2 nuclei in each cell line. These results were confirmed by western blot analysis of MyHC levels; indeed, MyHC was expressed in each cell line, albeit to a higher degree in W4 and to a lower degree in D3 cell line (Fig.1B). We then tested for Dystrophin expression, by western blot analysis using mandra1 antibody that recognizes the end of the C-terminal domain of Dystrophin. We could detect low levels of Dystrophin in control proliferating/undifferentiated control cells (W1 and W4) but no expression in DMD cell lines (Fig.1C). In addition, as expected, we detected high levels of Dystrophin in differentiated control cells but not in differentiated DMD cell lines. To confirm Dystrophin expression in proliferating control myoblast cell lines, a western blot analysis of total protein extracts of control and DMD undifferentiated myoblasts was performed with a 30 μg of total protein extracts and compared with the analysis 10 μg of total protein extracts from W4 differentiated control cell lines (supplementary figure S1). Quantification of the Dystrophin bands revealed a 13-fold higher level of Dystrophin in differentiated myotubes compared to non-differentiated myoblasts; in contrast, no Dystrophin band was detectable in protein extracts from DMD myoblasts or myotubes. Thus, our results demonstrate that Dystrophin protein is expressed at myoblasts stage and consequently that DMD immortalized myoblastic cell lines constitute a robust *ex vivo* model to assess the consequences of Dystrophin absence on PQC mechanisms.

Protein aggregation is increased in DMD myoblasts.

To evaluate the involvement of protein quality control in Duchenne Muscular Dystrophy, we first analyzed the protein aggregation status of control (W1 and W4) and DMD (D1 to D4) immortalized myoblasts. To this end, we focused on multi-ubiquitinated proteins or p62 protein that are often associated to protein aggregates and are involved in proteasome or autophagy addressing, respectively (Thrower *et al.*, 2000; Lamark *et al.*, 2009). As shown in Figure 2A, in DMD cell lines the level of multi-ubiquitinated proteins was increased by 1.7 (D1) to 2.4-fold (D2) in comparison to control ones. However, no significant modulation of p62 level was detected. We next determined the protein aggregation status of multi-ubiquitinated proteins or p62-associated aggregates by filter trap analysis; in DMD cell lines, we observed a 4 to 6-fold increased level of protein aggregates conjugated to multi-ubiquitin

and a 2 to 4-fold increase of p62-containing aggregates as compared to control cells (Fig. 2B). These results were confirmed by immunofluorescence analysis, in which more aggregates labeled by multi-ubiquitin or p62 antibodies were detected in DMD cell lines than in controls (Fig. 2C). Quantification of aggregates revealed that the percentage of cells containing more than fifteen p62-containing aggregates is increased by 2.5-fold and of cells containing multi-ubiquitinated aggregates by 13-fold in DMD cell lines with respect to controls. Taken together, our results indicated an increased protein aggregation level in DMD immortalized myoblasts in comparison to their control counterparts, which suggests that protein quality control might be less efficient in myoblasts derived from muscle biopsies of DMD patients than from healthy donors.

HspB5 and HspB8 levels are modulated in DMD myoblasts.

Heat shock proteins (HSP) are sensors of protein misfolding and aggregation and can act as molecular chaperones that help the proteins to recover their native conformation. Since we observed an increased level of multi-ubiquitinated and aggregated proteins in DMD immortalized myoblasts, we asked whether HSP were efficient in these cells.

We first focused on foldases and determined the level of the major members of the three main foldases families that are HSPC2/C3 (Hsp90α and ß), HSPA1/A8 (Hsp70/Hsc70) and DNAJB1 (Hsp40). As shown in Figure 3A, no modulation of the major foldases levels could be detected by western blot analysis in control or DMD myoblasts; this observation was confirmed by statistical analysis of quantifications (supplementary figure S2A). We then determined the global folding activity in each of the control and DMD cell lines by performing a refolding luciferase assay (Figure 3B). This assay allows determining the cell-folding capacity by quantifying cell extracts ability to restore the enzymatic activity of constitutively expressed luciferase that has been inhibited by heat shock-induced denaturation. We observed that the kinetics of luciferase activity recovery after the heat shock was similar in all cell lines, indicating that the folding capacity of DMD myoblastic cell lines is not altered.

We next analyzed by western blot the levels of the major muscle holdases: HspB1 (Hsp27), HspB5 (αB-crystallin) and HspB8 (Hsp22). No modulation of HspB1 level was observed between control and DMD cell lines (Figure 3C and S2B). By contrast, a two- to sevenfold increase of HspB5 level and a 20% to 78% decrease of HspB8 level were observed in DMD cell lines in comparison to control cells (Figure 3C). We therefore asked whether HspB5 and HspB8 could be recruited to protein aggregates. Filter trap data indicated a fourfold to eightfold increase of HspB8 recruitment to protein aggregates in DMD cell lines (Figure 3D) whereas its global expression is decreased in these cell lines when compared to control. Thus, these results suggest that HspB8 is specifically redirected to protein aggregates in DMD myoblasts. As for HspB5, we observed a two- to eightfold increase of HspB5-

containing aggregates in DMD cell lines compared to control cell lines (Figure 3D) indicating that the overexpression of HspB5 goes along with its recruitment to protein aggregates.

Since a major function of HSPB5 is the chaperoning of cytoskeleton filaments (Nicholl and Quinlan, 1994; Fujita *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007), we analyzed by immunofluorescence actin microfilaments, microtubules, or vimentin intermediate filaments in control and DMD myoblasts. However, we did not detect any modification of actin bundles, vimentin or microtubule networks in DMD cell lines compared to control ones (supplementary figure S3).

In conclusion, our results indicate that the refolding capacity of DMD cell lines is not altered; however, the expression of HspB5 and HspB8 holdases is modulated, these proteins being preferentially redirected to protein aggregates; this observation might suggest that the chaperone network in DMD myoblasts is harnessed but overwhelmed.

Proteasome activity is decreased in DMD myoblasts

The accumulation of multi-ubiquitinated protein, and the increased recruitment of holdases to protein aggregates in DMD cells, despite efficient chaperone activity, suggest that the degradation mechanisms of PQC (ubiquitin-proteasome system (UPS) and/or autophagy) might be roped in. As for UPS, the increase of multi-ubiquitinated and/or aggregated protein levels could be the consequence of a modulation of the ubiquitination process, of the misfolded proteins addressing to UPS or of the proteasome enzymatic activity. We first quantified enzymatic activity of 26S proteasome by incubating WT and DMD myoblasts with luminogenic substrates specific for chymotrypsin-, tryspin- and caspase-like activities. Trypsin- and caspase-like activities were not modified between control and DMD cell lines (Figure 4A); in contrast, we observed a 50% decrease of chymotrypsin-like activity, which is the prevailing activity for 26S proteasome function (Kisselev *et al.*, 2012). We then checked the expression of the major muscle-ubiquitin E3 ligases that are MuRF1 (Muscle really interesting novel gene (RING) finger-1) and MAFbx/Atrogin-1 (Muscle atrophy F-box) by western blot analysis. MuRF1 and MAFbx/Atrogin-1 levels were identical in control and DMD myoblasts suggesting that ubiquitination efficiency is similar in these cell lines (Figure 4B and supplementary figure S4). At last, we quantified the BAG1 co-chaperone level. Indeed, this HspA1/A8 interactor is described to route misfolded/aggregated proteins to the 26S proteasome due to the ability of its 4 isoforms to bind to the proteasome. We observed a 45% decrease of the medium isoform of BAG1 (BAG1-M) in DMD myoblasts in comparison to controls; by contrast, BAG1L, BAG1 and BAG1S levels were similar (Figure 4B).

Taken together, our results indicate that the addressing of multi-ubiquitinated proteins to the proteasome mediated by BAG1 might be less efficient in DMD cells; as in addition, in these cells, the chymotryspsin-like activity of the 26S proteasome activity is decreased, we propose

that misfolded/aggregated proteins degradation by the proteasome is impaired in DMD myoblasts.

BAG1 to BAG3 switch, increased level of BAG3/HspB8 complexes and autophagy up-regulation in DMD myoblasts

Since we observed a decreased level of BAG1 proteins in DMD immortalized cell lines, we further investigated BAG3 co-chaperone levels. Indeed, in an aggregation-prone environment such as aging or proteasome inhibition (Gamerdinger *et al.*, 2009; Minoia *et al.*, 2014) a reciprocal change in the expression of BAG1 and BAG3 co-chaperone was described; this BAG1 to BAG3 switch enhances the autophagy-lysosome degradation pathways of multi-ubiquitinated proteins at the expense of their clearance by the proteasome. We thus quantified BAG3 levels by western blot in control and DMD cell lines and observed a 1.3 (D3) to 1.5-fold (D1 and D4) up-regulation of BAG3 levels in DMD cell lines in comparison to controls (Figure 5A). Moreover, filter trap analysis revealed a two- to fourfold increase of BAG3-containing aggregates in comparison to control cells, indicating that BAG3 up-regulation is accompanied by its recruitment to protein aggregates. Of interest, we and others demonstrated that BAG3 in complex with HSPB8 could be involved in the selective clearance of protein aggregates by autophagy (Carra *et al.*, 2008; Nivon *et al.*, 2012; Ulbricht *et al.*, 2015; Nivon *et al.*, 2016). Because our observations revealed a higher recruitment of BAG3 and HSPB8 to protein aggregates in DMD myoblasts; we quantified BAG3/HspB8 complexes in control and DMD cell lines by proximity ligation assay (PLA, Figure 5C). PLA detection of endogenous BAG3/HspB8 complexes generated a more abundant signal in DMD cell lines than in control cells; the average number of dots per cell was increased by 2.7 (D1) to 4.5-fold (D4) in DMD myoblasts compared to controls (Figure 5C, graph). In addition, the signal was absent in experiments performed with only one antibody (anti-BAG3, Cont1) or with antibodies for BAG3 and PML (located in cytoplasm and nucleus respectively) (Cont2). Our results thus indicate that there is a switch between BAG1 and BAG3 levels in DMD cell lines associated to an up-regulation of the level of BAG3/HspB8 complexes suggesting that selective autophagic process could be stimulated in order to degrade protein aggregates.

To assess autophagic activity in DMD cell lines we first quantified the levels of various proteins involved in the autophagic nucleation phase that allows the formation of the pre-autophagosome (PAS) structure. We detected a 1.5 to 2-fold increase of class III PI3K level in DMD cell lines compared to control cells, whereas beclin1 and bcl2 levels remained unchanged (Figure 7A and supplementary figure S5). As for proteins involved in the elongation phase (FOXO3a, ATG3, ATG9L1, ATG5-12 and ATG7), the closure of autophagosomes and their fusion to lysosomes (HDAC6), we observed a significant increase

of ATG3 (2.2 (D4) to 3.4-fold (D1)) and of HDAC6 levels (between 1.8 and 2-fold in DMD2, 3 and 4 cell lines), which would be in favor of an enhancement of autophagosome formation (Figure 6B). We thus quantified LC3 levels and observed a 1.4 to 2.4 increase of the lipidated form of LC3 (LC3-II) in DMD cell lines compared to controls (Figure 6C). These results were confirmed with immunofluorescence analysis of control and DMD cell lines transiently expressing EGFP-LC3 (Figure 6D). Indeed, whereas 35 % of control cell lines contained more than 50 autophagosomes per cell, this percentage raised up to 57% (D2) or 78% (D4) in DMD cell lines, indicating an increased number of autophagosomes in DMD cell lines. This increase could be the consequence of either increased autophagic flux or inhibition of the maturation/degradation step of autophagy. We thus performed LC3-II quantification in each cell line, in presence or absence of E64D and pepstatin A, two inhibitors of lysosomal cathepsins that are known to block autophagosome maturation into autolysosomes (Figure 6E). Addition of these inhibitors further increased the already elevated level of LC3-II in DMD cell lines, indicating that the autophagic flux is up-regulated in DMD cell lines compared to controls. Our results thus describe an increase of BAG3/HspB8 complexes associated with a stimulation of the autophagic flux in DMD myoblasts, as compared to control cells.

NFκB activity is stimulated in DMD myoblasts

Various stress conditions leading to proteasome inhibition or overload, to increased BAG3/HspB8 complexes and increased autophagic activity have been described to be associated with enhanced NFκB activity (Nivon *et al.*, 2012; Minoia *et al.*, 2014; Nivon *et al.*, 2016). We thus checked whether this was the case in DMD cell lines. By western blot, we first quantified RelA/p65 level, which is the transcriptional subunit of NFκB (figure 7A) and observed a 1.8 (D1) to 2.6 (D3) increase of p65 subunit in DMD cell lines compared to control cells. Control and DMD cell lines were thus transiently transfected with pNFκBluc reporter vector to quantify NFκB activity (Figure 7B). The luminescence produced was up-regulated by 3 (D1) to 4.2 (D3) fold in DMD cell lines in comparison to control cells, indicating that NFκB basal activity is increased in DMD myoblasts.

Taken together, our results demonstrate that DMD myoblasts are under protein aggregation stress as evidenced by the accumulation of protein aggregates, the modulation of expression of HSPB chaperones, the stimulation of NFκB activity, the altered proteasome activity associated to a BAG1 to BAG3 expression switch. This ensures up-regulation of BAG3/HspB8 complexes and stimulation of the autophagic process.

DISCUSSION

In muscle cells, protein quality control (PQC) must be carefully regulated, in order to ensure optimal efficiency, as evidenced by various studies highlighting the importance of PQC actors in different types of muscular disorders. For instance, mutations in some co-chaperones such as DNAJB6 (HSP40) are associated with Limb-girdle muscular dystrophy type 1D and 2I (LGMD1D, LGMD2I) (Couthouis *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2014); increases of molecular chaperone levels were detected in some muscles of *mdx* mice (Carberry *et al.*, 2013), in idiopathic inflammatory myopathies (IIM) (Paepe *et al.*, 2012) or in oculopharyngeal muscular dystrophies (Abu-Baker *et al.*, 2003). As for the proteasome, an increase of its expression (biopsies of DMD patients), of ubiquitin conjugation to muscle proteins, of transcripts encoding ubiquitin, of ub-conjugating enzymes (E2) and Ub ligases (MURF1 and MAFBx/Atrogin-1) are reported to be associated to muscular dystrophies or muscle atrophy (Kumamoto *et al.*, 2000; Bernardi and Bonaldo, 2013), while deletion of the proteasome component Rpt3 was described to contribute to myofiber degeneration (Kitajima *et al.*, 2014). At last, autophagy defects in autophagosome biogenesis/maturation, mitophagy, lysosome biogenesis or autolysosome exocytosis are described in DMD, Ullrich congenital muscular dystrophies (UCMD) and Emery-Dreifuss muscular dystrophies (EDMD) (De Palma *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2013), while autophagy hyperactivation was observed in Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (Carmignac *et al.*, 2011). It is thus clear that PQC efficiency is modified in muscular disorders including DMD. However, it is still unknown whether and how PQC contributes to dystrophin-dependent muscle degeneration. Moreover, PQC mechanisms are intimately interconnected and therefore it seems necessary to have an overview of global PQC modulation the same model. Although numerous animal models for DMD have been developed (*C. elegans*, *drosophila*, zebrafish, mouse, rats, cats, dogs and pigs) (Gieseler *et al.*, 2000; Nakamura and Takeda, 2011; McGreevy *et al.*, 2015) to investigate the physiopathology of DMD. However, all these studies have been carried out on mature, degenerating muscles; therefore, it is still unknown whether alterations in particular of PQC mechanisms could pre-exist myoblast stage. We thus decided to perform an exhaustive study of PQC actors in a unique DMD model consisting of immortalized human DMD myoblasts.

We first have taken advantage of immortalized myoblasts to address the controverted question of Dystrophin expression in non-differentiated muscles, which was either reported to be positive (Trimarchi *et al.*, 2006) or negative (Miranda *et al.*, 1988). Western blot analysis of Dystrophin with mandra1 antibody recognizing the C-terminal part of the protein did not detect any signal in DMD myoblastic cell lines, which is in agreement with the dystrophin gene mutations present in DMD cell lines. Indeed, D1 to D3 cell lines contain a premature

stop codon in exon 41, which leads to premature protein translation termination; D4 cell lines contains a large out of frame deletion of the entire exon 44 leading to inclusion of aberrant amino acids, which generally leads to premature truncation of translation. The resulting Dystrophins are thus non-functional and generally degraded (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). However, we were able to detect Dystrophin expression in undifferentiated control myoblasts. This expression is lower than in differentiated myotubes, but clearly confirms that Dystrophin is expressed at the myoblast stage, which validates immortalized DMD myoblasts as powerful tool to study the involvement of PQC in the physiopathology of DMD.

In this study, we describe for the first time the existence of a protein aggregation stress in Dystrophin-deficient myoblasts, as evidenced by the observation of increased multi-ubiquitinated protein levels and of multi-ubiquitinated proteins- or p62-containing aggregates. Indeed, a protein aggregation of specific mutated Dystrophin with missense mutations in actin binding domain 1 was reported (Henderson *et al.*, 2010), however a global increase of protein aggregation level was, to our knowledge, never reported. Our results thus suggest that a PQC deficiency could be responsible for this accumulation of protein aggregates. HSP are the first line actors of PQC, since they can refold misfolded/aggregated proteins. In contrast with the observation of increased levels of HspA and HspC proteins in muscle biopsies from DMD patients (Paepe *et al.*, 2012; Brinkmeier and Ohlendieck, 2014) or *mdx* hind limb muscle (Carberry *et al.*, 2014), we could not detect any modulation of these HSP in human immortalized DMD myoblasts; however, in these previous studies, HSPA and HSPC increases were mostly detected in regenerating muscle fibers (Paepe *et al.*, 2012), which is a different stage from undifferentiated muscle cells. Small HSP (HSPB family) are of special interest in muscles since they play a protective role in the maintenance of cytoskeletal network and contractile elements (Fujita *et al.*, 2004; Golenhofen *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2013). In addition, abnormalities of some HSPB members are involved in muscle disorders: HSPB5 mutations are associated to myofibrillar myopathies (Vicart *et al.*, 1998) and HSPB1 or HSPB8 to distal myopathy and Charcot-Mary-Tooth disease type 2 (Capponi *et al.*, 2011; Nakhro *et al.*, 2013). In this study, we observed a drastic increase of HspB5 in DMD cell lines, which is consistent with the observation of increased levels of HspB5 in soleus and interosseous muscles of *mdx* mouse (Carberry *et al.*, 2013). In addition, we detected an accumulation of HspB5-containg aggregates in DMD myoblasts. Since we did not detect any disturbance of actin, tubulin or vimentin networks in DMD myoblasts, our results suggest that HspB5 chaperone activity might nevertheless be important for stabilizing cytoskeletal network in a weakened dystrophic muscle and for the providing of reservoirs of misfolded/aggregated muscle proteins that can prevent their probable aggregation. Of interest, we also report for the first time a diminution of HSPB8 levels in DMD myoblasts that

is however associated with an increase of HSPB8-containing aggregates suggesting that HSPB8 is specifically and efficiently redirected to protein aggregates, like HspB5. This increased recruitment of HSPB5 and HSPB8 to the aggregates associated with an accumulation of protein aggregates in DMD myoblastic cell lines suggest that the refolding capacities of the chaperone network might be overwhelmed and that protein degradation mechanisms could thus also be modulated.

The Ubiquitin Proteasome System (UPS) has been shown to play an important role in muscle protein catabolism by participating in disassembly or degradation of myofibrillar proteins or regulation of myogenesis (Bilodeau *et al.*, 2016). In this study, we observed a 50% decrease of the chymotrypsin-like activity of the 26S proteasome in DMD myoblasts compared to control cells. Interestingly, site-directed mutagenesis in yeast allowed to identify the ß5 (chymotrypsin-like) sites of the proteasome to be the most important sites for the protein breakdown (Kisselev *et al.*, 2012). Our results thus suggest that down-regulation of the chymotrypsin-like activity could lead to decreased degradation rates of proteasome substrates in DMD myoblasts. This is quite surprising since increased levels of proteasome were detected in skeletal necrotic fibers of DMD patients (Kumamoto *et al.*, 2000) and the use of proteasome inhibitors in *mdx* mice was found to improve the histo-pathological signs of the disease even if it did not rescue every explants of muscle biopsies of DMD patients (Bonuccelli *et al.*, 2007; Sandri *et al.*, 2013; Assereto *et al.*, 2016). Moreover, increased proteasome levels (Kumamoto *et al.*, 2000) and increased proteasome activity (Assereto *et al.*, 2016) were observed in muscles biopsies from DMD patients. This discrepancy could be linked to the differentiation state of the samples analyzed, myoblasts *vs* degenerating myotubes, or to the type of proteasome and activities measured; indeed, immunoproteasome content was described to be increased in dystrophic muscles of *mdx* mice whereas the total content of proteasome was unchanged (Chen *et al.*, 2014). The absence of modulation of the MuRF1 and MAFbx/atrogin-1 levels, two major muscle E3 UB ligases observed in DMD myoblasts was in accordance with the quantifications performed in muscles biopsies of DMD patients (Assereto *et al.*, 2016). At last, we analyzed the levels of BAG1, a co-chaperone that interacts with HSPA1/A8/CHIP and their substrates and further sorts multi-ubiquitinated proteins to the proteasome (Alberti *et al.*, 2002). BAG1 exists as multiple isoforms, BAG1-L, -M, BAG1 and BAG1-S, generated by alternative translation initiation, the L isoform being predominantly nuclear and the others mostly cytoplasmic (Luders *et al.*, 2000). In this study, we detected a decrease of BAG1-M level in DMD myoblasts in comparison to control ones. Interestingly, BAG1-M isoform was reported to bind to HSPA1/A8, to the proteasome and to the CHIP Ubiquitin ligase (Demand *et al.*, 2001; Alberti *et al.*, 2003), which suggest that a down-regulation of its level could decrease the efficiency of addressing of multi-ubiquitinated

misfolded proteins to the proteasome. Moreover, BAG1 was described to be in balance with BAG3, another member of the BAG family. BAG3 is highly expressed in skeletal muscle cells and is co-localized with sarcomere-associated Z-disk, its mutation being associated to severe myofibrillar myopathy (Selcen *et al.*, 2009). Moreover, BAG1 and BAG3 were found to be reciprocally regulated in aggregation-prone environments such as cellular aging or proteasome inhibition, with a switch from high levels of BAG1 and low levels of BAG3 associated to BAG1-mediated proteasomal degradation of substrates to low levels of BAG1 and high levels of BAG3, associated to BAG3-mediated autophagy (Gamerdinger *et al.*, 2009; Minoia *et al.*, 2014). In addition, BAG3, in complex with HSPB8 protein, was described to activate selective autophagic removal of aggregated proteins such as Htt43Q, SOD1G85A or filamin C in human skeletal muscles submitted to resistance exercise (Carra *et al.*, 2008; Ulbricht *et al.*, 2015; Nivon *et al.*, 2016). Our observation of increased BAG3 levels in DMD myoblasts associated with a detection of more numerous BAG3/HspB8 complexes in DMD cells indicate that even if decreased in DMD myoblasts, HSPB8 level is not limiting for its preferential association with BAG3 in DMD cell lines. Moreover, our results report for the first time the existence of a BAG1 to BAG3 switch between control and DMD myoblastic cell lines, which suggest a shift to autophagy as a preferential protein degradation pathway. This was confirmed by autophagic activity measurements, since we observed increased levels of nucleation (class III PI3K), elongation (ATG3, LC3-II) or closure/fusion and transport (HDAC6) actors of autophagy/aggrephagy in DMD myoblastic cell lines. Moreover, we determined that the increased number of autophagosomes formed was due to an up-regulated autophagic flux. We thus describe here for the first time a BAG1 to BAG3 switch associated with stimulated autophagic activity and impaired degradation by the proteasome in DMD myoblasts. Such a mechanism was also recently described in a knock-in mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), where changes in the expression ratios of BAG1 to BAG3 were associated with a shift from proteasome to autophagy degradation pathways (Rusmini *et al.*, 2015). However, inhibition of autophagy was reported in *mdx* mice, with persistent activation of the AKT, mTOR axis, increase of p62 levels and decreased LC3 conjugation to phosphatidylethanolamine (De Palma *et al.*, 2012; Bibee *et al.*, 2014). These results were nevertheless not discordant with another study in the same mouse model reporting no differences in phosphorylated AKT and mTOR or LC3 levels between wild type and *mdx* mice, but an impairment of autophagy induction by starvation (Spitali *et al.*, 2013). As for DMD patients, increased levels of phospho-AKT and p62 were observed in muscle biopsies of 5 patients (De Palma *et al.*, 2012). Of interest, a recent study described increased autophagic actors (beclin1, ATG5-ATG12, class III PI3K) in dystrophic muscles of *mdx* mice but decreased lysosomal content during disease progression. We thus could hypothesize that the up-regulation of autophagic flux could turn into autophagy down-

regulation because of lysosomal content exhaustion during disease progression (Spaulding *et al.*, 2017).

Since various stress conditions leading to proteasome inhibition or overload are described to be associated with enhanced NFκB transcription factor activity and since NFκB can stimulate HSPB8 and BAG3 expression, we checked NFκB activity in control and DMD myoblasts and observed an increased level of the RelA/p65 subunit of NFκB and an increased NFκB basal activity in DMD myoblasts. These results are in accordance with studies reporting increased levels of p65 and NFκB activity, associated with stimulation of inflammatory pathways, in the muscles of infants soon after birth, prior to the onset of clinical manifestations (Monici *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005); interestingly, NFκB was also reported to be activated in dystrophic muscles of *mdx* mice. However, its stimulation was not associated to any phosphorylation or degradation of its inhibitory subunit IκBα, suggesting that the classical signaling pathway triggered by inflammatory cytokines is not responsible for this activation (Acharyya *et al.*, 2007). Whether NFκB activation associated with protein aggregation stress is thus responsible for induction of inflammatory cytokines in DMD myoblasts will merit further investigations.

In conclusion, in this study we report for the first time that the absence of Dystrophin in immortalized DMD myoblast is accompanied by increased levels of multi-ubiquitinated proteins- and p62-containing aggregates. Furthermore, this protein aggregation stress is associated with increased basal activity of NFκB transcription factor, BAG1 to BAG3 switch and up-regulation of BAG3/HspB8 complexes that ensure preferential routing of misfolded/aggregated proteins to stimulated autophagy rather than to 26S proteasome. Thus our results highlight that PQC modulation already pre-exists in non-differentiated DMD muscle cells, prior to the onset of clinical manifestations. Consequently, modulation/restoring of this altered PQC could improve myoblasts and thus myotubes physiology and might represent a valuable strategy for DMD therapies.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and cell lines

The cell lines used were derived from satellite cells that were isolated from muscle biopsies of healthy donors or Duchenne Muscular Dystrophy patients and differentiated into myoblasts. These myoblasts were immortalized with viral transduction of CDK4 (cyclin-dependent kinase-4) and hTERT (human telomerase reverse transcriptase) that are required to overcome cellular senescence (Mamchaoui *et al.*, 2011). Various clones were isolated and

amplified; the cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere in Skeletal Muscle Cell Growth medium (PromoCell), complemented with 20% FCS (Invitrogen), 0.2% dexamethasone (D4902, Sigma) and 1ug/mL puromycin (selection marker; p8833, Sigma). Six distinct cell lines have been used in this study: (W1) and (W4) that are two cell lines derived from biopsies of healthy donors of 95 months and 121 months, respectively ; 4 cell lines derived from the biopsies of 147 (D1, D2 and D3) and 142 (D4) months old patients: D1, D2 and D3 in which the dystrophin gene is interrupted by a STOP codon in exon 41 (c5758 C>T); D4 cell line, in which the exon 44 of the dystrophin gene is deleted (c.44 del from intron 43 (position 27742) to intron 44 (position 116255)).

Reagents and plasmids

E64D (#E3132), Triton-X100 and Hoechst 33258 were from Sigma. PepstatinA was from Merck-Millipore. Bovine Serum Albumin was from Euromedex. Rabbit polyclonal antibody against ATG9L1 was from Abgent (AP1814a). Rabbit polyclonal antibodies against Bag3 (#ABC277) and p65 (#06-418) and mouse monoclonal antibody against actin (#MAB1501) were from Millipore. Mouse monoclonal anti-HspB8 (#H00026353) was from Abnova. Mouse monoclonal antibodies against DNAJB1 (#SPA-450), HSPA1/A8 (#ADI-SPA-822F) and HspB5/alphaB-crystallin (#ADI-SPA-222F), rabbit polyclonal antibody against HspB5/alphaB-crystallin (#SPA-223) and rat monoclonal antibody against HSPC2/C3 (#ADI-SPA-835F) were from Enzo Life Sciences. Rabbit polyclonal anti-LC3B (#L7543) and mouse monoclonal anti-acetylated α-tubulin (#MABT868) were from Sigma. Rabbit polyclonal antibodies against Beclin1 (#ab51031), HDAC6 (#ab133493) and Pericentrin (#ab4448) and mouse monoclonal antibody against Atg3 (#ab56409) and VCP (#ab11433) were from Abcam. Mouse monoclonal anti-multi-ubiquitin (clone FK1; #D071-3) was from MBL. Goat polyclonal antibody against HspB1/Hsp27 (#sc-1190) and mouse monoclonal anti-dystrophin (MANDRA1; #SC-73592) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-NBR1 is a rabbit polyclonal antibody from PTGLab (#16004-1-AP). Anti-Atg5 (#2630), anti-PI3K III (#3811) and anti-αtubulin (#2144) rabbit polyclonal antibodies were from Cell Signaling. Mouse monoclonal antibody against vimentin was from DAKO (#M0725). Mouse monoclonal antibody against p62 was from BD Sciences (#610832). Anti-MHC monoclonal antibody (#MAB4470) was from R&D Systems. Goat anti-mouse (#170-6516) and goat anti-rabbit (#170-6515) secondary antibodies were from Bio-Rad. Donkey anti-goat (#sc-2020) secondary antibody was from Santacruz. Rabbit anti-rat secondary antibody (#A5795) was from Sigma. Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (#A11001) or 568 (#A11031), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (#A11034) or 568 (#A11011) secondary antibodies were from Thermofischer. pNFκB-LUC was from Clontech. pGL3 promotor vector was from Promega. pEGFP-LC3 was a kind gift from T. Yoshimori (Research Institute for Microbial Diseases, Tokyo, japan).

Transfection

24 hours before transfection, immortalized myoblasts were seeded at a density of 10^6 cells/100mm dishes or $5.8x10^5$ cells/60mm dishes. Cells were then transiently transfected with the desired plasmid (pNFκBluc vector or pGL3-promotor vector) by using the Jetprime® transfection reagent (Polyplus), according to the supplier's protocol.

Gel electrophoresis and western-blot

Briefly, 10 µg of total protein extracts were separated by SDS-PAGE on acrylamide /bisacrylamide (Euromedex) or 3-15% gradient Tris-Acetate gels (Cubillos-Rojas *et al.*, 2012), in Tris-Glycin 1X 0,1% SDS buffer or in Tris-Acetate SDS Running Buffer (Cubillos-Rojas *et al.*, 2012). After electrophoresis, proteins were transferred onto Protran BA85 nitrocellulose (Perkin Elmer) or immobilon-P (Millipore) membranes and blots were incubated with primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Revelation was performed with ECL detection reagents (Clarity Western ECL substrate from Bio-Rad or ECL blotting detection reagent from Amersham). Western blot imaging was performed with Chemidoc MP (Bio-Rad) based on charge-coupled device detection technology. Image capture and analysis of Western-blot were processed by ImageLab 4.0 software and quantification by Image J software (NIH).

Proteasome assay

The control and DMD myoblasts cell lines were plated in 96 well culture plates at a density of 10^4 cells/well. The day after transfection, proteasome activities (caspase-, trypsin- and chymotrypsin-like activities) were measured using cell-based Proteasome-Glo™ assay (Promega) as previously described (Nivon *et al.*, 2012). The proteasome inhibitors MG132 and lactacystin (10 µM, 2 h) were used as negative controls. Luminescence was measured using a Victor^3 Luminometer (Perkin Elmer). The relative light units produced were reported to 50 µg of total proteins.

Luciferase assay

Myoblasts, transiently transfected with pNFκBluc vector the day before, were either non-treated or submitted to a 90 min heat shock at 43°C. 24 h after the transfection, the cells were resuspended into PBS and luciferase activity was quantified using the steady-glo® luciferase assay (Promega) as previously described (Nivon *et al.*, 2016). Luminescence was measured as described above and related light units produced were reported to 1 µg of total cellular proteins.

Luciferase refolding assay

This technic was previously described (Nivon *et al.*, 2009). Briefly, myoblast cell lines transiently transfected with pGL3-promotor vector were submitted to a 30 min heat shock at 43°C to inactivate luciferase. Then cells were incubated at 37°C to allow luciferase refolding and cell samples were taken at various time points (0.5 to 4 hours) for luciferase activity measurements. Luminescence was reported to 1 µg of total cellular proteins.

Filter trap assay

SDS-insoluble aggregates were analyzed by filter trap analysis as previously described (Nivon *et al.*, 2016). Briefly, cells were scraped in 2% SDS-FTA buffer (FTA: 150 mM NaCl, 50 mM DTT, 10 mM Tris-HCl, pH 8). Next, samples were homogenized by passages through 25G needle. 2.5 µg of protein extracts were diluted by a factor of 2 to 8 and applied into a slot blot apparatus onto a protran BA83 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell) pre-washed with 0.1% SDS-FTA buffer. Then the membrane was washed with 0.1%SDS-FTA buffer and 0.1%Tween-TBS buffer (TBS: 20 mM Tris-HCl, pH7.6, 137 mM NaCl) and processed for immunoblotting.

Fluorescence microscopy analysis

Cells were grown on glass coverslips or on polymer µ-slide IbiTreat (Ibidi). Thereafter, cells were fixed during 10 minutes with methanol, permeabilized and saturated with PBS-0.2%Triton -2% BSA and hybridized with various primary antibodies (p62, vimentin, desmin, actin, HspB5, MyHC) and Alexa Fluor secondary antibodies. Hoechst 33258 reagent was used to stain nuclei (5 min, 1 ng/ml). Observations were performed on Zeiss Axio Imager Z1 photomicroscope (Zeiss Inc.). Images were digitized with a camera (Coolsnap HQ2; Roper scientific) and acquired with Metavue Imaging system. Digitalization was done with Metavue software; images adjustments were performed on ImageJ.

Proximity ligation assay (PLA)

10^5 cells were seeded on glass coverslips in 35 mm cell culture dishes and were fixed and permeabilized as described above. Mouse monoclonal anti-HspB8 and rabbit polyclonal anti-BAG3 were used for detecting BAG/HspB8 complexes with Duolink® In Situ Orange kit mouse/rabbit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer instructions. Images of immunostaining were captured on a Zeiss confocal laser-scanning microscope LSM800 (63 x objective). Digitalization was performed with Zen software. Automated counting of dots in 50 cells of each cell line was performed with Fiji's particle analysis after running through the watershed program.

Statistics

ANOVA parametric test was applied to compare the data obtained between Wild Type and DMD conditions. *p<0.05; **p<0.01 ; ***p<0.001.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Vincent Gache (INMG, Lyon) for his help in human myoblasts differentiation protocol.

CONTRIBUTIONS FROM OTHERS

Marion Wattin, Loïc Gaweda, Pascale Muller and Carole Kretz-Remy performed most of the experiments. Bénédicte Chazaud generated immortalized control or DMD human myoblasts. Mathieu Baritaud and Chloé Lozano contributed to preliminary results. Charlotte Scholtes supervised confocal experiments. Carole Kretz-Remy supervised the studies, helped to design and interpret experiments and wrote the paper. All the authors discussed the results and performed critical reading of the manuscript.

FUNDING SOURCES

This work was supported by the Ligue contre le cancer- comité de Savoie to CK, the CNRS and the INSERM to KG and CK and the Association Française contre les myopathies (AFM)/Telethon to KG. MW was supported by a doctoral fellowship from the AFM/Telethon.

REFERENCES

Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I.B., and Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet 53, 145-151.

Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganiere, J., Gaspar, C., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2003). Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. Hum Mol Genet 12, 2609-2623.

Acharyya, S., Villalta, S.A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P.M., Carathers, M., Li, Z.W., Beg, A.A., Ghosh, S., Sahenk, Z., Weinstein, M., Gardner, K.L., Rafael-Fortney, J.A., Karin, M., Tidball, J.G., Baldwin, A.S., and Guttridge, D.C. (2007). Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. J Clin Invest 117, 889-901.

Alberti, S., Demand, J., Esser, C., Emmerich, N., Schild, H., and Hohfeld, J. (2002). Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. J Biol Chem 277, 45920-45927.

Alberti, S., Esser, C., and Hohfeld, J. (2003). BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. Cell Stress Chaperones 8, 225-231.

Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., and Welch, W.J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). Nature 331, 192-194.

Assereto, S., Piccirillo, R., Baratto, S., Scudieri, P., Fiorillo, C., Massacesi, M., Traverso, M., Galietta, L.J., Bruno, C., Minetti, C., Zara, F., and Gazzerro, E. (2016). The ubiquitin ligase tripartite-motif-protein 32 is induced in Duchenne muscular dystrophy. Lab Invest 96, 862-871.

Bakula, D., Muller, A.J., Zuleger, T., Takacs, Z., Franz-Wachtel, M., Thost, A.K., Brigger, D., Tschan, M.P., Frickey, T., Robenek, H., Macek, B., and Proikas-Cezanne, T. (2017). WIPI3 and WIPI4 beta-propellers are scaffolds for LKB1-AMPK-TSC signalling circuits in the control of autophagy. Nat Commun 8, 15637.

Bernardi, P., and Bonaldo, P. (2013). Mitochondrial dysfunction and defective autophagy in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. Cold Spring Harb Perspect Biol 5, a011387.

Bibee, K.P., Cheng, Y.J., Ching, J.K., Marsh, J.N., Li, A.J., Keeling, R.M., Connolly, A.M., Golumbek, P.T., Myerson, J.W., Hu, G., Chen, J., Shannon, W.D., Lanza, G.M., Weihl, C.C., and Wickline, S.A. (2014). Rapamycin nanoparticles target defective autophagy in muscular dystrophy to enhance both strength and cardiac function. FASEB J 28, 2047-2061.

Bilodeau, P.A., Coyne, E.S., and Wing, S.S. (2016). The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. Am J Physiol Cell Physiol 311, C392-403.

Bonuccelli, G., Sotgia, F., Capozza, F., Gazzerro, E., Minetti, C., and Lisanti, M.P. (2007). Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. Cell Cycle 6, 1242-1248.

Brinkmeier, H., and Ohlendieck, K. (2014). Chaperoning heat shock proteins: proteomic analysis and relevance for normal and dystrophin-deficient muscle. Proteomics Clin Appl 8, 875-895.

Brouilly, N., Lecroisey, C., Martin, E., Pierson, L., Mariol, M.C., Qadota, H., Labouesse, M., Streichenberger, N., Mounier, N., and Gieseler, K. (2015). Ultra-structural time-course study in the C. elegans model for Duchenne muscular dystrophy highlights a crucial role for sarcomere-anchoring structures and sarcolemma integrity in the earliest steps of the muscle degeneration process. Hum Mol Genet 24, 6428-6445.

Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., Schenone, A., Mandich, P., and Bellone, E. (2011). HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. J Peripher Nerv Syst 16, 287-294.

Carberry, S., Brinkmeier, H., Zhang, Y., Winkler, C.K., and Ohlendieck, K. (2013). Comparative proteomic profiling of soleus, extensor digitorum longus, flexor digitorum brevis and interosseus muscles from the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Int J Mol Med 32, 544-556.

Carberry, S., Zweyer, M., Swandulla, D., and Ohlendieck, K. (2014). Comparative proteomic analysis of the contractile-protein-depleted fraction from normal versus dystrophic skeletal muscle. Anal Biochem 446, 108-115.

Carmignac, V., Svensson, M., Korner, Z., Elowsson, L., Matsumura, C., Gawlik, K.I., Allamand, V., and Durbeej, M. (2011). Autophagy is increased in laminin alpha2 chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A. Hum Mol Genet 20, 4891-4902.

Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., and Landry, J. (2008). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. J Biol Chem 283, 1437-1444.

Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., and Frydman, J. (2011). Cellular strategies of protein quality control. Cold Spring Harb Perspect Biol 3, a004374.

Chen, C.N., Graber, T.G., Bratten, W.M., Ferrington, D.A., and Thompson, L.V. (2014). Immunoproteasome in animal models of Duchenne muscular dystrophy. J Muscle Res Cell Motil 35, 191-201.

Chen, Y.W., Nagaraju, K., Bakay, M., McIntyre, O., Rawat, R., Shi, R., and Hoffman, E.P. (2005). Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 65, 826-834.

Couthouis, J., Raphael, A.R., Siskind, C., Findlay, A.R., Buenrostro, J.D., Greenleaf, W.J., Vogel, H., Day, J.W., Flanigan, K.M., and Gitler, A.D. (2014). Exome sequencing identifies a

DNAJB6 mutation in a family with dominantly-inherited limb-girdle muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 24, 431-435.
Cubillos-Rojas, M., Amair-Pinedo, F., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., and Rosa, J.L. (2012). Tris-acetate polyacrylamide gradient gels for the simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass. Methods Mol Biol 869, 205-213.
Davies, K.E., Smith, T.J., Bundey, S., Read, A.P., Flint, T., Bell, M., and Speer, A. (1988). Mild and severe muscular dystrophy associated with deletions in Xp21 of the human X chromosome. J Med Genet 25, 9-13.
De Palma, C., Morisi, F., Cheli, S., Pambianco, S., Cappello, V., Vezzoli, M., Rovere-Querini, P., Moggio, M., Ripolone, M., Francolini, M., Sandri, M., and Clementi, E. (2012). Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. Cell Death Dis 3, e418.
De Palma, C., Perrotta, C., Pellegrino, P., Clementi, E., and Cervia, D. (2014). Skeletal muscle homeostasis in duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. Front Aging Neurosci 6, 188.
Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., and Hohfeld, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. Curr Biol 11, 1569-1577.
Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., and Schild, H. (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. J Biol Chem 273, 25637-25646.
Dumont, N.A., Wang, Y.X., von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C.F., Brun, C.E., and Rudnicki, M.A. (2015). Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. Nat Med 21, 1455-1463.
Elliott, J.L., Der Perng, M., Prescott, A.R., Jansen, K.A., Koenderink, G.H., and Quinlan, R.A. (2013). The specificity of the interaction between alphaB-crystallin and desmin filaments and its impact on filament aggregation and cell viability. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 368, 20120375.
Fujita, Y., Ohto, E., Katayama, E., and Atomi, Y. (2004). alphaB-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. J Cell Sci 117, 1719-1726.
Gamerdinger, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. The EMBO journal 28, 889-901.
Gieseler, K., Grisoni, K., and Segalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in Caenorhabditis elegans. Curr Biol 10, 1092-1097.
Golenhofen, N., Perng, M.D., Quinlan, R.A., and Drenckhahn, D. (2004). Comparison of the small heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle. Histochem Cell Biol 122, 415-425.
Haigis, M.C., and Yankner, B.A. (2010). The aging stress response. Mol Cell 40, 333-344.
Henderson, D.M., Lee, A., and Ervasti, J.M. (2010). Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 9632-9637.
Herczenik, E., and Gebbink, M.F. (2008). Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. FASEB J 22, 2115-2133.
Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51, 919-928.
Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. J Cell Biol 150, 1507-1513.
Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., and Hohfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. Biol Chem 391, 481-489.
Kisselev, A.F., van der Linden, W.A., and Overkleeft, H.S. (2012). Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. Chem Biol 19, 99-115.

Kitajima, Y., Tashiro, Y., Suzuki, N., Warita, H., Kato, M., Tateyama, M., Ando, R., Izumi, R., Yamazaki, M., Abe, M., Sakimura, K., Ito, H., Urushitani, M., Nagatomi, R., Takahashi, R., and Aoki, M. (2014). Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. J Cell Sci 127, 5204-5217.
Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50, 509-517.
Kraft, C., and Martens, S. (2012). Mechanisms and regulation of autophagosome formation. Curr Opin Cell Biol 24, 496-501.
Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature 432, 1032-1036.
Kumamoto, T., Fujimoto, S., Ito, T., Horinouchi, H., Ueyama, H., and Tsuda, T. (2000). Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. Acta Neuropathol 100, 595-602.
Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., and Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. Cell Cycle 8, 1986-1990.
Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., and Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. Cell Res 26, 869-885.
Luders, J., Demand, J., Papp, O., and Hohfeld, J. (2000). Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. J Biol Chem 275, 14817-14823.
Magri, F., Govoni, A., D'Angelo, M.G., Del Bo, R., Ghezzi, S., Sandra, G., Turconi, A.C., Sciacco, M., Ciscato, P., Bordoni, A., Tedeschi, S., Fortunato, F., Lucchini, V., Bonato, S., Lamperti, C., Coviello, D., Torrente, Y., Corti, S., Moggio, M., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. J Neurol 258, 1610-1623.
Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., Muntoni, F., Kim, J., Philippi, S., Spuler, S., Levy, N., Blumen, S.C., Voit, T., Wright, W.E., Aamiri, A., Butler-Browne, G., and Mouly, V. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. Skelet Muscle 1, 34.
Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A.M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. Lancet Neurol 6, 352-361.
McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. Dis Model Mech 8, 195-213.
Minoia, M., Boncoraglio, A., Vinet, J., Morelli, F.F., Brunsting, J.F., Poletti, A., Krom, S., Reits, E., Kampinga, H.H., and Carra, S. (2014). BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. Autophagy 10, 1603-1621.
Miranda, A.F., Bonilla, E., Martucci, G., Moraes, C.T., Hays, A.P., and Dimauro, S. (1988). Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. Am J Pathol 132, 410-416.
Monici, M.C., Aguennouz, M., Mazzeo, A., Messina, C., and Vita, G. (2003). Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. Neurology 60, 993-997.
Nakamura, A., and Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. J Biomed Biotechnol 2011, 184393.
Nakhro, K., Park, J.M., Kim, Y.J., Yoon, B.R., Yoo, J.H., Koo, H., Choi, B.O., and Chung, K.W. (2013). A novel Lys141Thr mutation in small heat shock protein 22 (HSPB8) gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. Neuromuscul Disord 23, 656-663.
Nicholl, I.D., and Quinlan, R.A. (1994). Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. The EMBO journal 13, 945-953.

Nivon, M., Abou-Samra, M., Richet, E., Guyot, B., Arrigo, A.P., and Kretz-Remy, C. (2012). NF-kappaB regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex. J Cell Sci 125, 1141-1151.
Nivon, M., Fort, L., Muller, P., Richet, E., Simon, S., Guey, B., Fournier, M., Arrigo, A.P., Hetz, C., Atkin, J.D., and Kretz-Remy, C. (2016). NFkappaB is a central regulator of protein quality control in response to protein aggregation stresses via autophagy modulation. Mol Biol Cell 27, 1712-1727.
Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.P., and Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. Autophagy 5, 766-783.
Paepe, B.D., Creus, K.K., Weis, J., and Bleecker, J.L. (2012). Heat shock protein families 70 and 90 in Duchenne muscular dystrophy and inflammatory myopathy: balancing muscle protection and destruction. Neuromuscul Disord 22, 26-33.
Rusmini, P., Polanco, M.J., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Meroni, M., Galbiati, M., Piccolella, M., Messi, E., Giorgetti, E., Lieberman, A.P., Milioto, C., Rocchi, A., Aggarwal, T., Pennuto, M., Crippa, V., and Poletti, A. (2015). Aberrant Autophagic Response in The Muscle of A Knock-in Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Sci Rep 5, 15174.
Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P., and Bonaldo, P. (2013). Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. J Cell Sci 126, 5325-5333.
Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B.K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A.V., and Engel, A.G. (2009). Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. Ann Neurol 65, 83-89.
Shimizu-Motohashi, Y., Miyatake, S., Komaki, H., Takeda, S., and Aoki, Y. (2016). Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: from discovery to clinical trials. Am J Transl Res 8, 2471-2489.
Singh, B.N., Rao, K.S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N., and Rao Ch, M. (2007). Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. J Mol Biol 366, 756-767.
Spaulding, H.R., Kelly, E.M., Quindry, J.C., Sheffield, J.B., Hudson, M.B., and Selsby, J.T. (2017). Autophagic dysfunction and autophagosome escape in the mdx mus musculus model of Duchenne muscular dystrophy. Acta Physiol (Oxf).
Spitali, P., Grumati, P., Hiller, M., Chrisam, M., Aartsma-Rus, A., and Bonaldo, P. (2013). Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice. PLoS Curr 5.
Stein, K.C., Bengoechea, R., Harms, M.B., Weihl, C.C., and True, H.L. (2014). Myopathy-causing mutations in an HSP40 chaperone disrupt processing of specific client conformers. J Biol Chem 289, 21120-21130.
Suss, O., and Reichmann, D. (2015). Protein plasticity underlines activation and function of ATP-independent chaperones. Front Mol Biosci 2, 43.
Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. The EMBO journal 19, 94-102.
Trimarchi, F., Favaloro, A., Fulle, S., Magaudda, L., Puglielli, C., and Di Mauro, D. (2006). Culture of human skeletal muscle myoblasts: timing appearance and localization of dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin complex. Cells Tissues Organs 183, 87-98.
Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., and Hohfeld, J. (2015). Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. Autophagy 11, 538-546.
Vabulas, R.M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a004390.
Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Science 298, 611-615.
Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D., and Fardeau, M. (1998). A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. Nat Genet 20, 92-95.

Wilson, M.I., Dooley, H.C., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2b and Atg16L1: setting the stage for autophagosome formation. Biochem Soc Trans 42, 1327-1334.
Wirth, M., Joachim, J., and Tooze, S.A. (2013). Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. Semin Cancer Biol 23, 301-309.
Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. J Mol Biol 428, 1714-1724.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of human immortalized myoblasts. (A) Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1, D2, D3 & D4) cell lines were seeded on Matrigel-coated 35mm dishes in proliferative medium. The day after, proliferative medium was replaced or not (Undiff) by differentiation medium. Cells were differentiated during 8 days (D8), then myosin heavy chain (MyHC) immunostaining and Hoechst nucleus staining were performed (scale bar: 50 µm). (B) and (C) Total proteins of Wild type and DMD cell lines were extracted and 10 µg were separated by SDS-PAGE. Analysis of MyHC (B) and Dystrophin (C) expression was performed by immunoblotting thanks to the use of specific antibodies. Actin is used as a loading control. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2: Protein aggregation is increased in human immortalized DMD myoblasts. (A) 10 µg of total protein extracts of Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1, D2, D3 & D4) cell lines were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting, using specific antibodies directed against multi-ubiquitin, p62 or Actin (as a loading control). The histograms show MultiUb/Actin and p62/Actin ratios (n=3). (B) 2.5 µg of total protein extracts from WT and DMD cell lines were slot-blotted at four different dilutions (1, 1/2, 1/4 & 1/8) on a cellulose acetate membrane and probed with multi-ubiquitin and p62 antibodies. Result is representative of three independent experiments. (C) Immunostaining of multi-ubiquitin and p62 and Hoechst staining of nuclei were performed in Wild Type and DMD myoblasts (scale bar: 50 µm). Graph: p62-containing aggregates and multi-ubiquitinated aggregates (green dots) were counted in 3 independent experiments.

Figure 3. HspB5 and HspB8 levels are modulated in human immortalized DMD myoblasts. (A) 10 µg of total protein extracts of Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were separated by SDS-PAGE. Heat Shock proteins expression was analyzed by immunoblotting, using anti-HSPC2/C3, -HSPA1/A8, -DNAJB1 and -Actin (as a loading control). (B) Control and DMD cell lines were transiently transfected with pGL3-promotor vector. The day after, they were submitted or not (NT) to a 30 min heat-shock treatment at 43°C followed by 0 to 4 hours of recovery at 37°C before quantification of luciferase activity (see Material & Methods). NT conditions of each cell line were set at 1. (C) – As in A) but western-blots were hybridized with HSPB1, B5 and B8 antibodies. Actin was used as a loading control. The histograms indicate HSPB5/Actin and HSPB8/Actin ratios. (D) Total proteins of Wild Type and DMD cell lines were extracted and 2.5 µg of proteins were submitted to filter trap analysis as described in figure 2. Membranes were hybridized with anti-HSPB5 and anti-HSPB8 antibodies. Results are representative of three independent experiments.

Figure 4: UPS efficiency is altered in human immortalized DMD myoblasts. (A) Trypsine-, chymotrypsin- and caspase-like activities of the 26S proteasome were quantified by using specific fluorogenic substrates, in control (W1 & W4)) and DMD (D1 to D4) cell lines. As a negative control, two proteasome inhibitors, MG132 and lactacystin (Lacta) were added to the cell culture medium (2 hours, 10 µM). Data were normalized to the mean of the Wild Type results. Statistical analyses (ANOVA test, n=4) show a significant decrease of chymotrypsin-like activity in DMD cell lines. (B) 10 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell lines were separated by SDS-PAGE. Analysis of MuRF1, MAFbx/Atrogin and BAG1 isoforms expression was performed using specific antibodies. Actin is revealed as a loading control. The histogram shows the BAG1M/Actin ratio (n=3).

Figure 5: BAG3 level and BAG3/HspB8 complexes are up-regulated in DMD myoblasts. (A) 10µg of total protein extracts of Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblots probed with BAG3 and Actin antibodies. The histogram shows BAG3/Actin ratio (n=3). (B) 2.5 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell line were submitted to filter trap analysis as described in figure 2. Membranes were hybridized with anti-BAG3 antibody. Results are representative of four independent experiments. (C) Control and DMD cell lines were fixed, permeabilized and submitted to proximity ligation assay for BAG3 and HSPB8 (red dots) along with DAPI staining of nuclei (blue). The graph shows quantification of PLA dots /cell (n=3).

Figure 6: The autophagic flux is increased in DMD myoblast cell lines. (A to C) 10 µg of total protein extracts from control (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblots probed with antibodies directed against (A) proteins involved in the initiation phase of the autophagic process: PI3K class III, BECN1 and BCL2; (B) proteins involved in autophagosome nucleation/elongation or transport/fusion: FOXO3a, ATG3, ATG9L1, ATG7, ATG5/12, HDAC6; (C) LC3-I and its lipidated form LC3-II. Actin is used as a loading control. The histograms show the PI3KIII/Actin, ATG3/Actin, HDAC6/Actin and LC3-II/Actin ratios (n=3). (D) Control and DMD cell lines were transiently transfected with pEGFP-LC3. 24h after transfection cells were fixed and analyzed with a fluorescence microscope (scale bar: 50 µm). The histogram shows quantification of the number of autophagic vesicles and indicates a statistically significant increase of cells containing more than 50 vesicles (n=3). (E) Wild Type and DMD cell lines were treated (+) or not (-) with a cocktail of lysosomal protease inhibitors (E64D and Pepstatin A) during 19 hours. 10 µg of total protein extracts of each cell lines were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using a specific antibody against LC3. The LC3-II/Actin ratios were set at 1.0 for non-treated conditions (-) in each cell line (n=3).

Figure 7: NFκB activity is stimulated in DMD myoblasts. (A) 10µg of total protein extracts of Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1, D2, D3 & D4) cell lines were separated by SDS-PAGE and submitted to an immunoblot hybridized with p65/RelA antibody. Actin is revealed as a loading control. The histogram shows p65/Actin ratio with a statistically significant increase of p65 level in DMD cell lines (n=3). (B) Cells were transiently transfected with pNFκBluc vector. The day after, the luciferase activity was measured. Results were normalized with control cells (ratio of luciferase activity in each cell line versus mean luciferase activity of control cells (n=4).

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS:

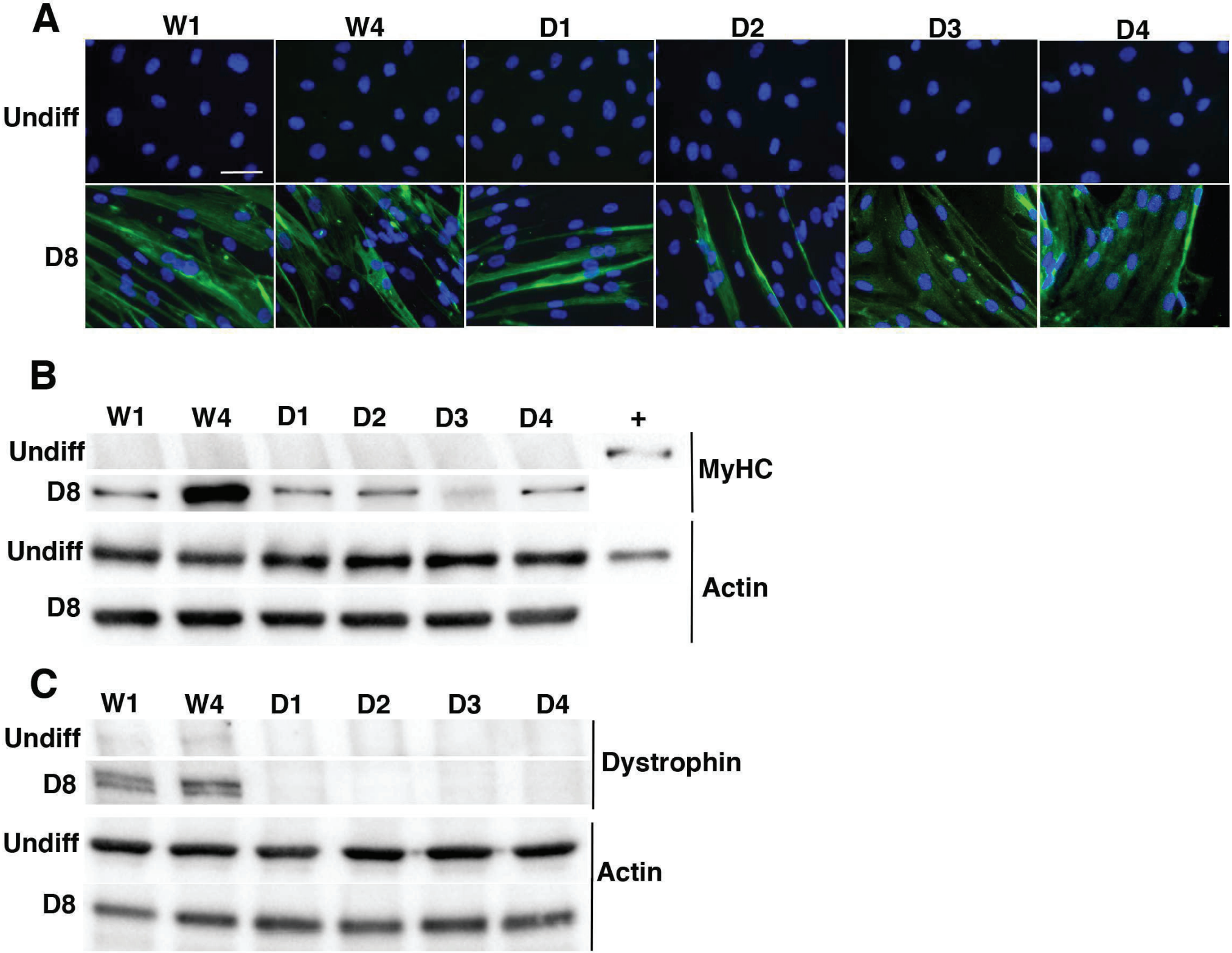
Figure S1: Characterization of dystrophin expression in human immortalized myoblasts. 30 µg of total protein extracts from undifferentiated Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell line were separated by SDS-PAGE. Analysis of Dystrophin expression was performed by immunoblotting thanks to the use of Mandra1 antibody. Actin is used as a loading control. As a positive control, 10 µg of total protein extracts of 8 days differentiated W4 cell line (D8, W4) were submitted to the same protocol (n=2).

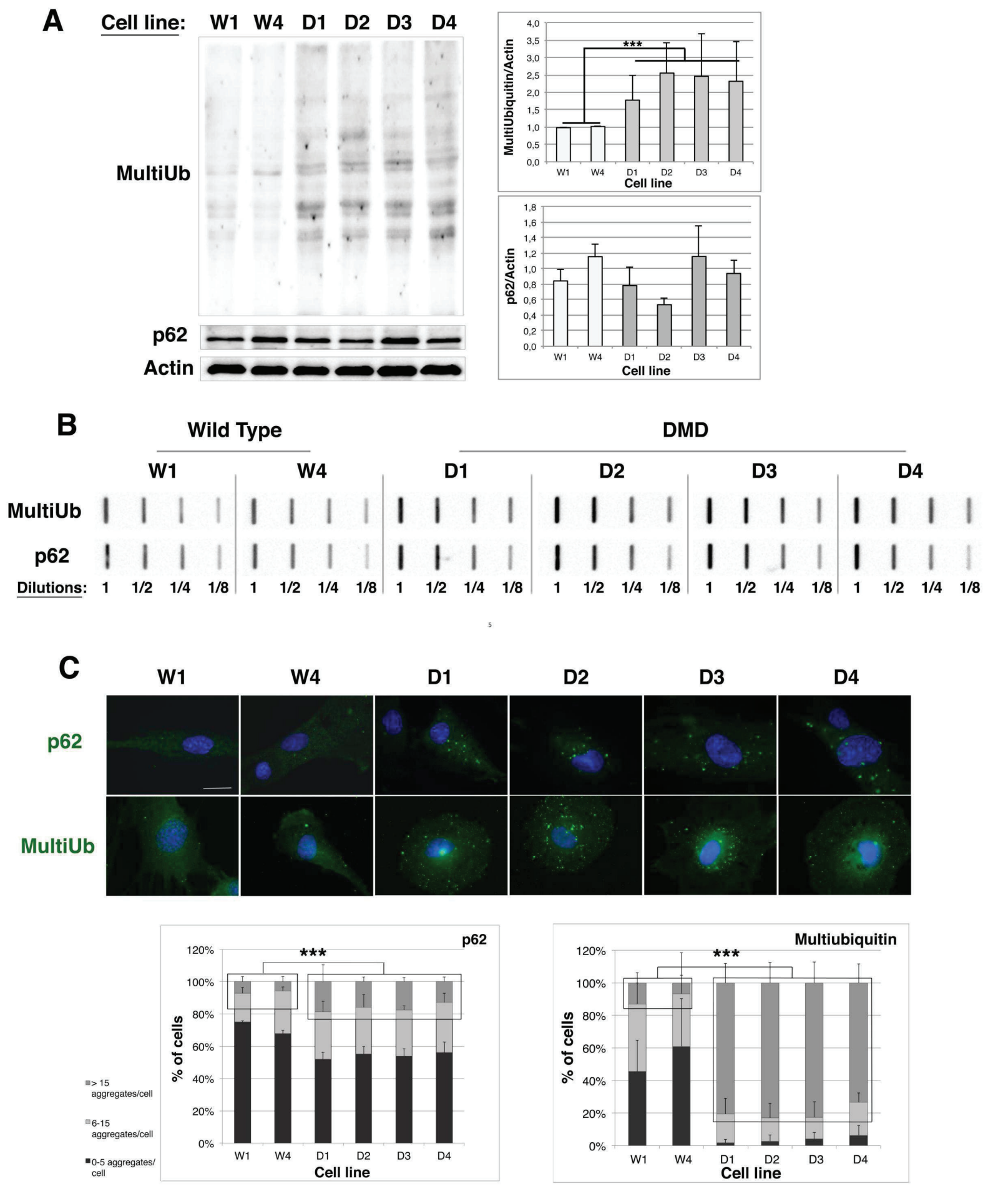
Figure S2: Foldases and HSPB1 holdase expression are not modulated in human immortalized DMD myoblasts. (A and B) 10 µg of total protein extracts from Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were separated by SDS-PAGE. Heat Shock proteins expression was analyzed by immunoblotting using (A) anti-HSPC2/C3, -HSPA1/A8, -DNAJB1 and -Actin antibodies; (B) anti-HspB1 and -Actin. Histograms indicate HSPC2/C3/Actin, HSPA1/A8/Actin, DNAJB1/Actin and HSPB1/Actin ratios. No statistically significant differences were observed between control and DMD cell lines (ANOVA, n=3)

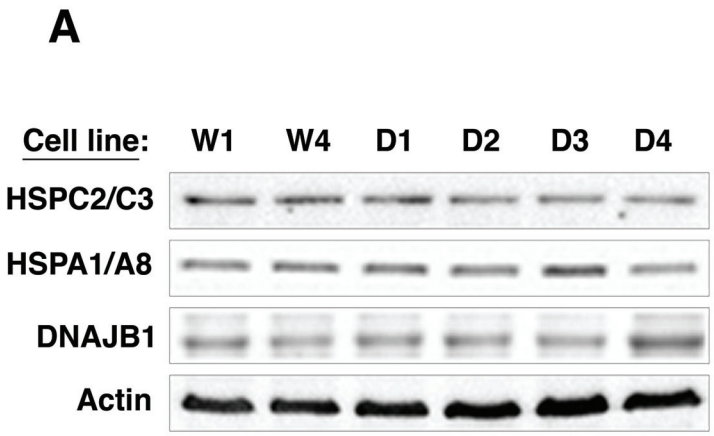
Figure S3: Cytoskeleton filaments are not altered in DMD myoblasts. Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were fixed, permeabilized and stained with antibodies against, actin (red), α-tubulin (green) or vimentin (green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Cells were analyzed with a fluorescence microscope (scale bar: 50 µm) (n=3).

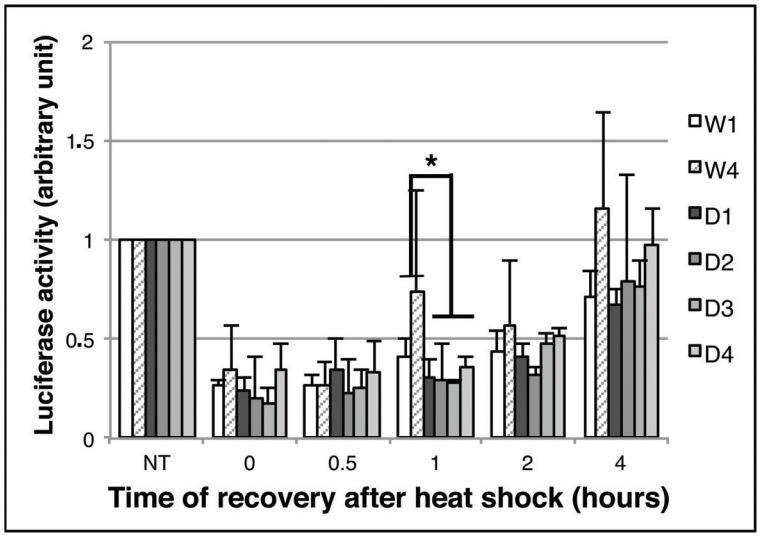
Figure S4: E3 Ub ligases, BAG1, BAG1-L and BAG1 expression is not modulated in DMD myoblasts. 10 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell lines were separated by SDS-PAGE. Analysis of the expression of the E3 Ub ligases MuRF1 and MAFbx/Atrogin and of BAG1 isoforms expression was performed using specific antibodies. Actin is revealed as a loading control. Histograms show the ratios of the various proteins *vs* Actin. No statistically significant differences could be observed (ANOVA test, n=3).

Figure S5: FOXO3A, ATG9L, ATG7, ATG5/12, BECN1 and BCL2 levels are not modulated in DMD myoblasts. 10 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell lines were separated by SDS-PAGE. Analysis of the expression of FOXO3a, ATG9L1, ATG7, ATG5/12 BECN1, BCL2 and Actin was performed using specific antibodies. Actin is revealed as a loading control. Histograms show the ratios of the various proteins *vs* Actin. No statistically significant differences could be observed (ANOVA test, n=3).

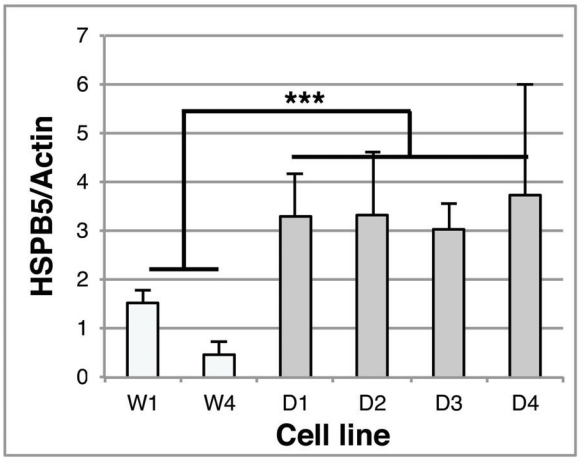

A
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Undiff
D8
B
W1
W4
D1
D2
D3
D4
+
Undiff
D8
MyHC
Undiff
D8
Actin
C
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Undiff
D8
Dystrophin
Undiff
D8
Actin

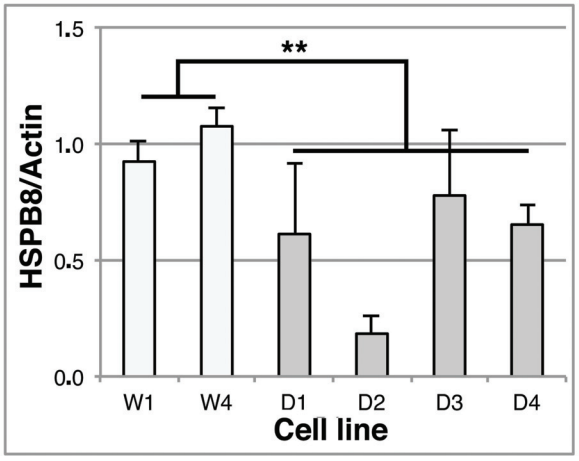

A
Cell line: W1 W4 D1 D2 D3 D4
MultiUb
p62
Actin
MultiUbiquitin/Actin
***
Cell line
p62/Actin
B
Wild Type
DMD
W1 W4 D1 D2 D3 D4
MultiUb
p62
Dilutions: 1 1/2 1/4 1/8
C
W1 W4 D1 D2 D3 D4
p62
MultiUb
p62
Multiubiquitin
% of cells
Cell line
> 15 aggregates/cell
6-15 aggregates/cell
0-5 aggregates/ cell

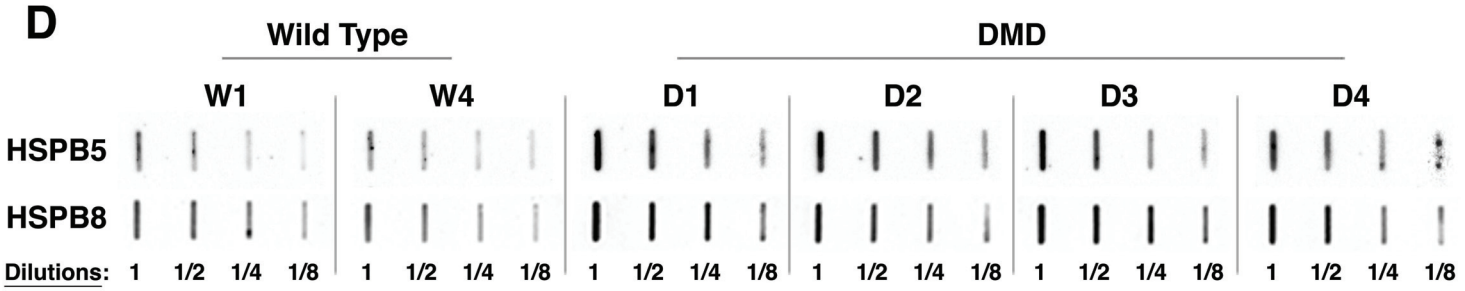

A
Cell line:
W1
W4
D1
D2
D3
D4
HSPC2/C3
HSPA1/A8
DNAJB1
Actin


B
Luciferase activity (arbitrary unit)
2
1.5
1
0.5
0
*
NT
0
0.5
1
2
4
Time of recovery after heat shock (hours)
W1
W4
D1
D2
D3
D4

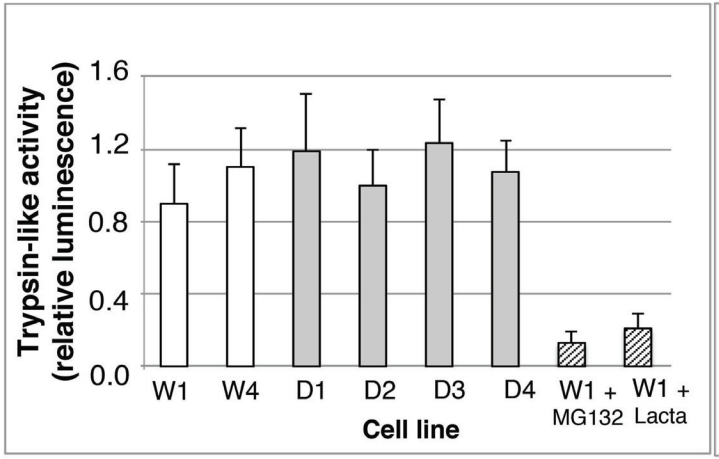
C
Cell line:
W1
W4
D1
D2
D3
D4
HSPB1
HSPB5
HSPB8
Actin

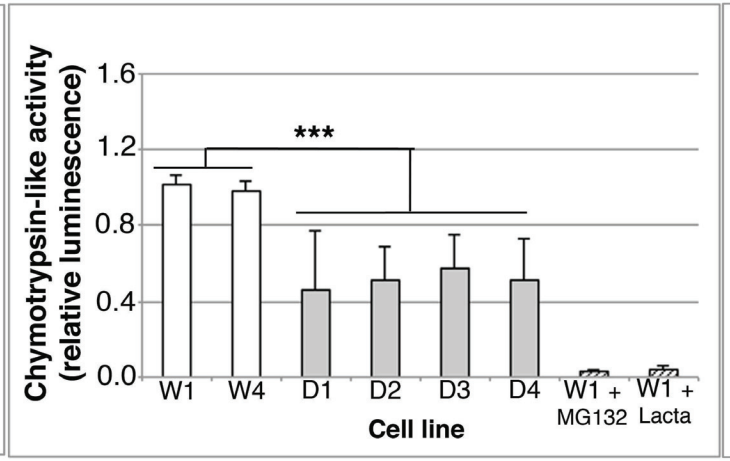

HSPB5/Actin
7
6
5
4
3
2
1
0
***
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Cell line

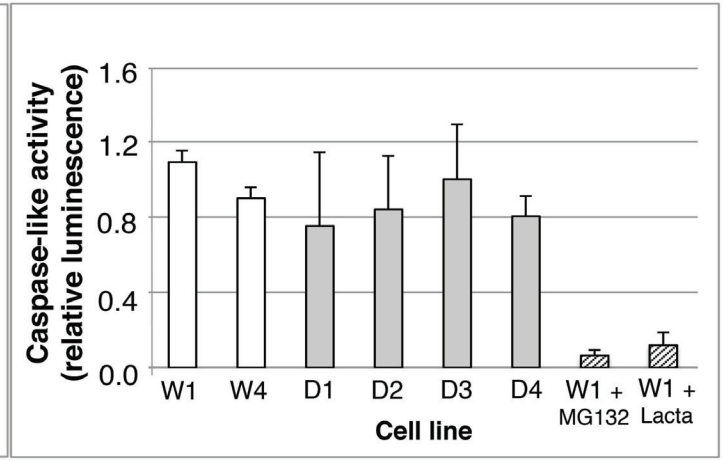

HSPB8/Actin
1.5
1.0
0.5
0.0
**
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Cell line


D
Wild Type
DMD
W1
W4
D1
D2
D3
D4
HSPB5
HSPB8
Dilutions:
1
1/2
1/4
1/8

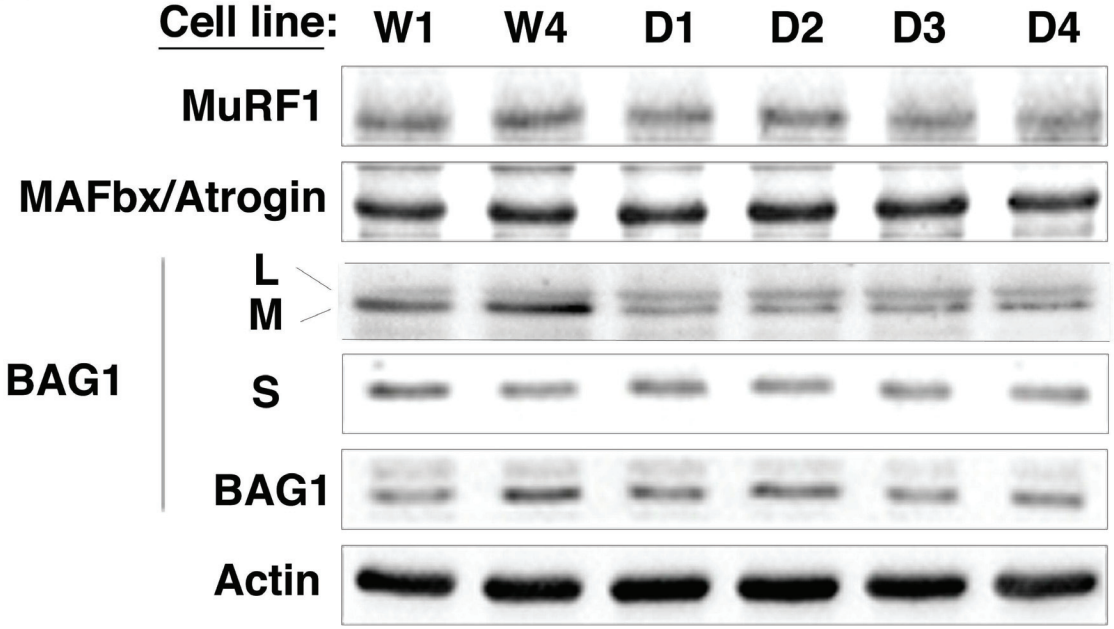
A

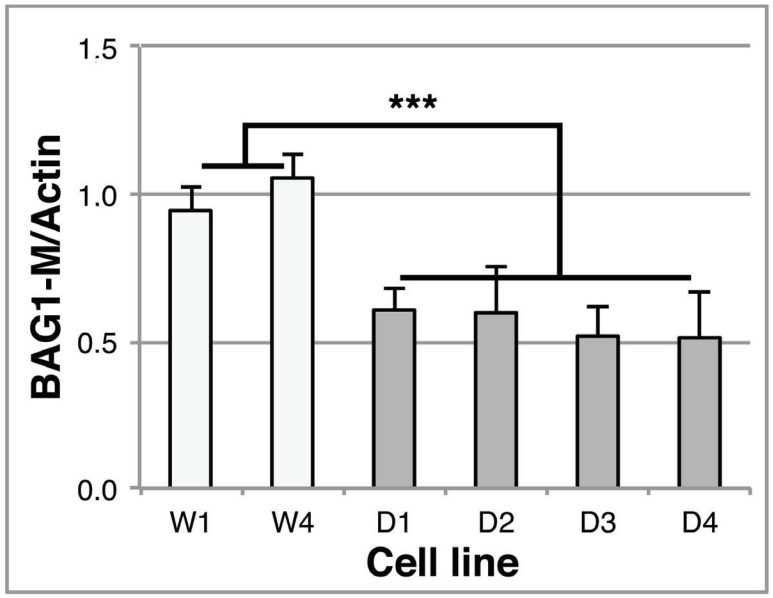

Trypsin-like activity
(relative luminescence)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
W1
W4
D1
D2
D3
D4
W1 + MG132
W1 + Lacta
Cell line

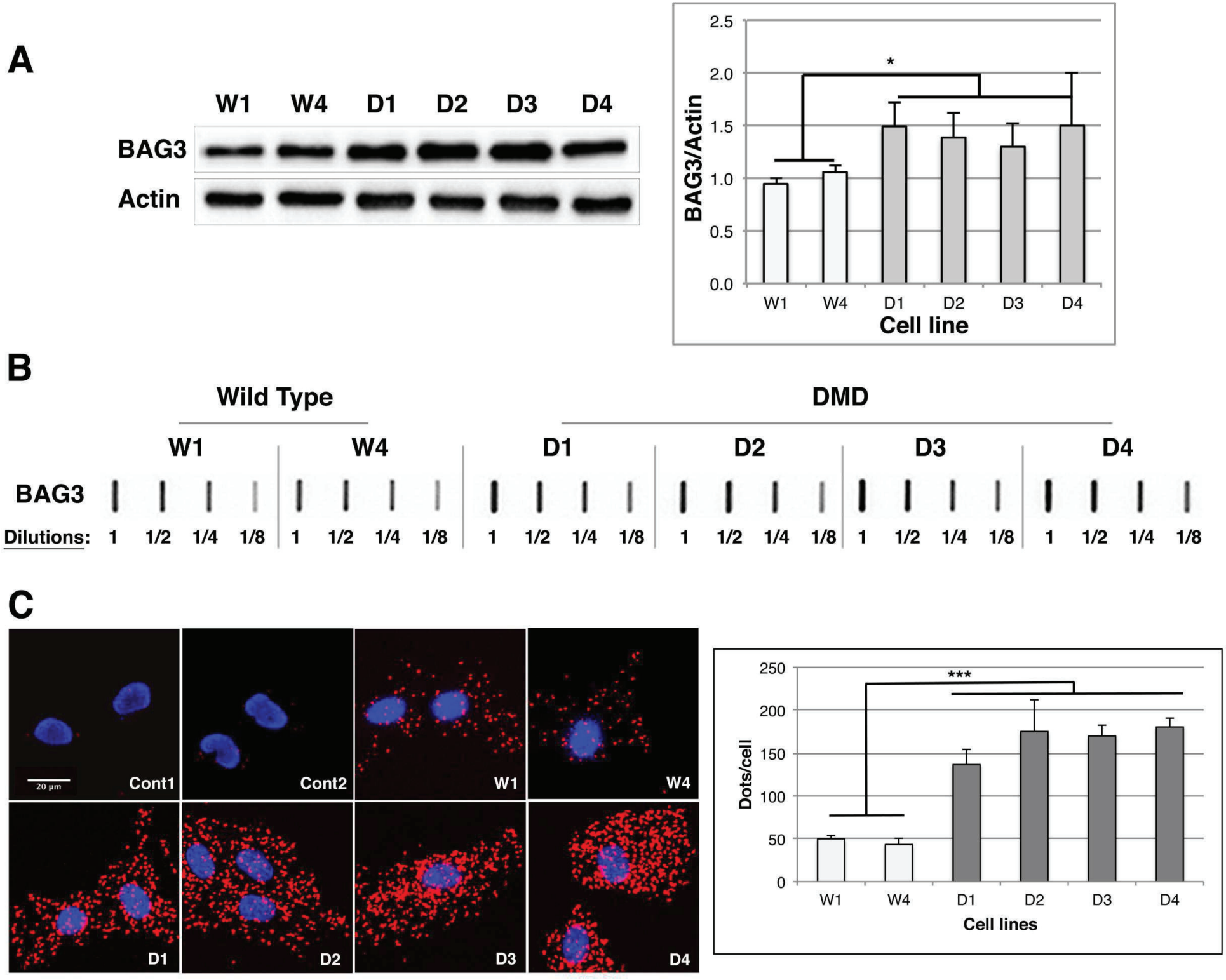

Chymotrypsin-like activity
(relative luminescence)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
***
W1
W4
D1
D2
D3
D4
W1 + MG132
W1 + Lacta
Cell line

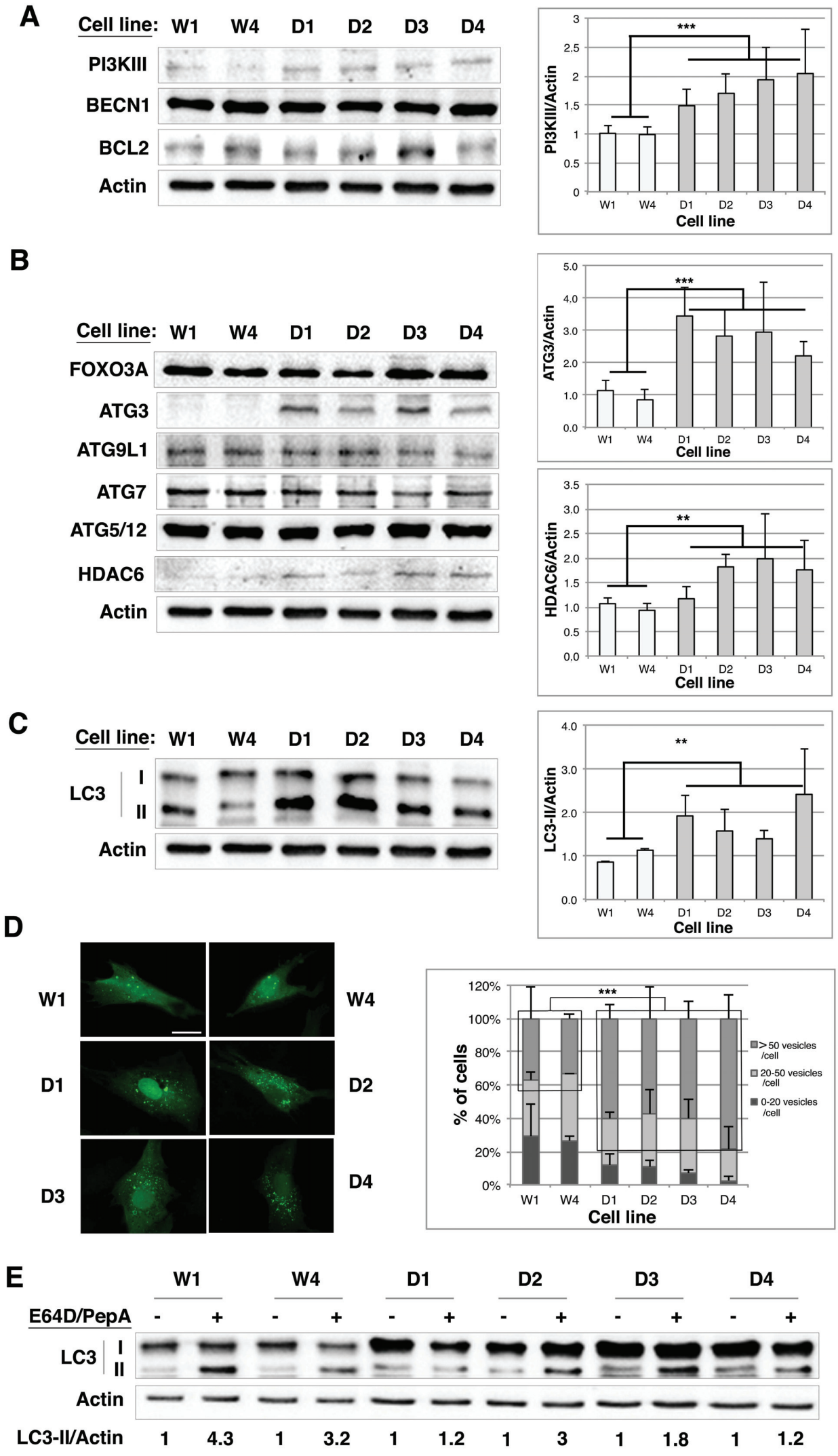

Caspase-like activity
(relative luminescence)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
W1
W4
D1
D2
D3
D4
W1 + MG132
W1 + Lacta
Cell line

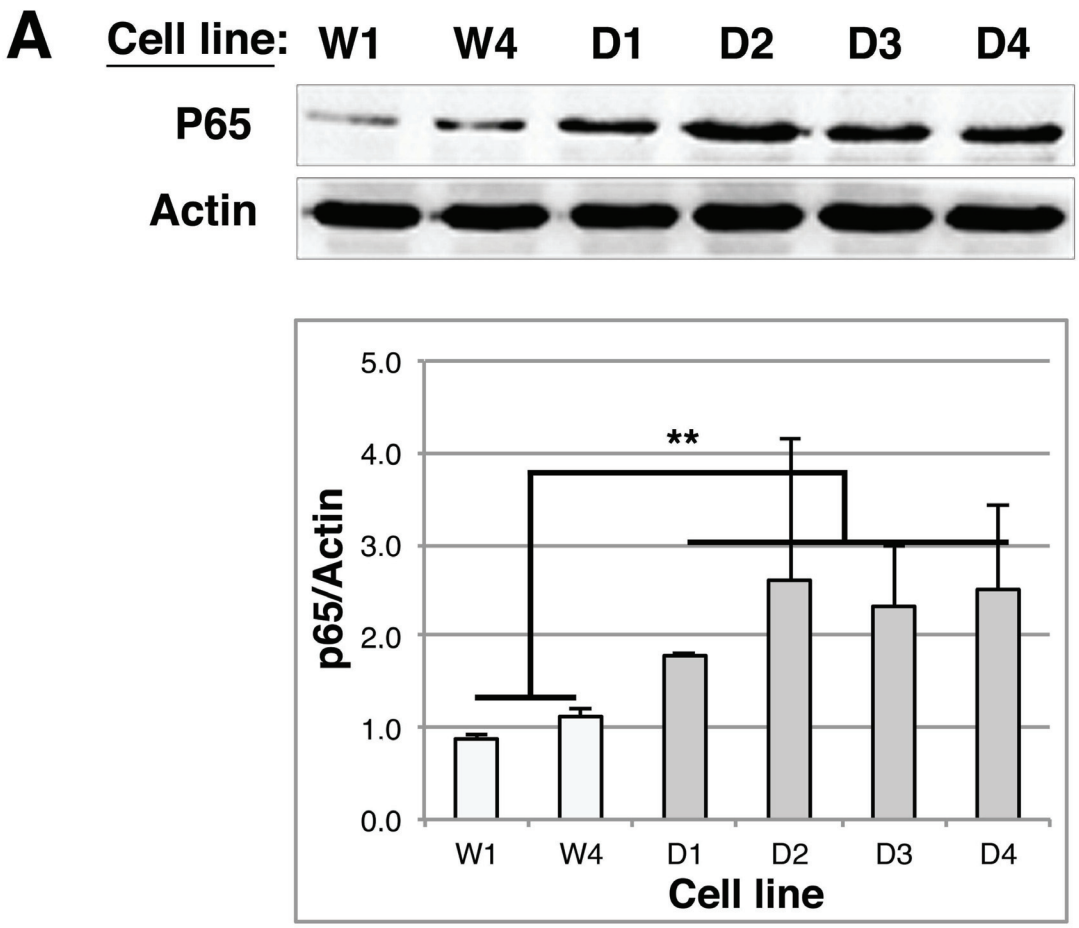
B


Cell line:
W1
W4
D1
D2
D3
D4
MuRF1
MAFbx/Atrogin
BAG1
L
M
S
BAG1
Actin


BAG1-M/Actin
1.5
1.0
0.5
0.0
***
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Cell line


A
W1
W4
D1
D2
D3
D4
BAG3
Actin
BAG3/Actin
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Cell line
B
Wild Type
DMD
W1
W4
D1
D2
D3
D4
BAG3
Dilutions:
1
1/2
1/4
1/8
C
Cont1
Cont2
W1
W4
D1
D2
D3
D4
20 µm
Dots/cell
250
200
150
100
50
0
***
W1
W4
D1
D2
D3
D4
Cell lines


A
Cell line: W1 W4 D1 D2 D3 D4
PI3KIII
BECN1
BCL2
Actin
PI3KIII/Actin
***
Cell line
B
Cell line: W1 W4 D1 D2 D3 D4
FOXO3A
ATG3
ATG9L1
ATG7
ATG5/12
HDAC6
Actin
ATG3/Actin
HDAC6/Actin
**
C
Cell line: W1 W4 D1 D2 D3 D4
LC3 I II
Actin
LC3-II/Actin
D
W1 W4 D1 D2 D3 D4
% of cells
> 50 vesicles /cell
20-50 vesicles /cell
0-20 vesicles /cell
E
W1 W4 D1 D2 D3 D4
E64D/PepA - + - + - + - + - + - +
LC3 I II
Actin
LC3-II/Actin 1 4.3 1 3.2 1 1.2 1 3 1 1.8 1 1.2


A
Cell line: W1 W4 D1 D2 D3 D4
P65
Actin
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
p65/Actin
**
W1 W4 D1 D2 D3 D4
Cell line

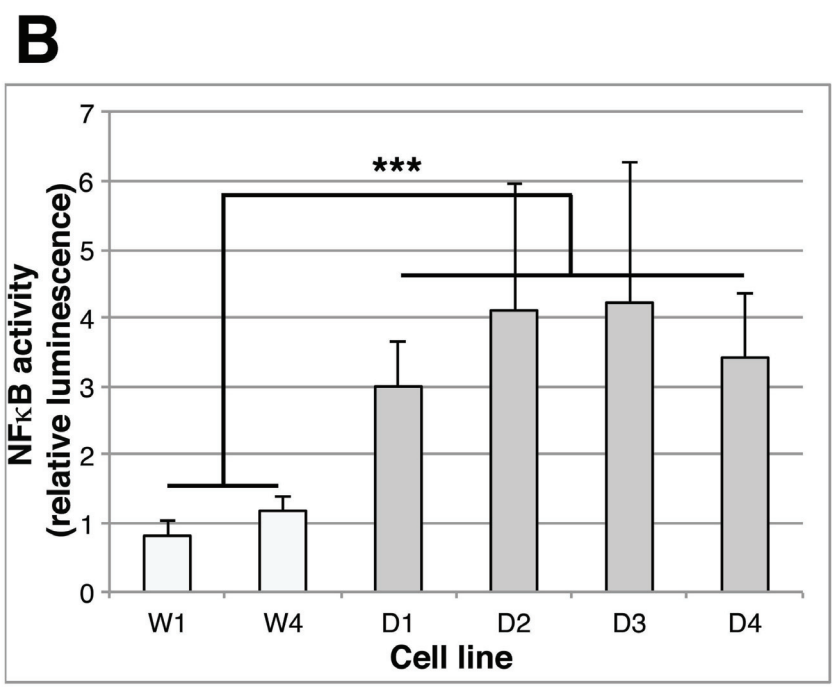

B
7
6
5
4
3
2
1
0
NFκB activity
(relative luminescence)
***
W1 W4 D1 D2 D3 D4
Cell line

Figure S1

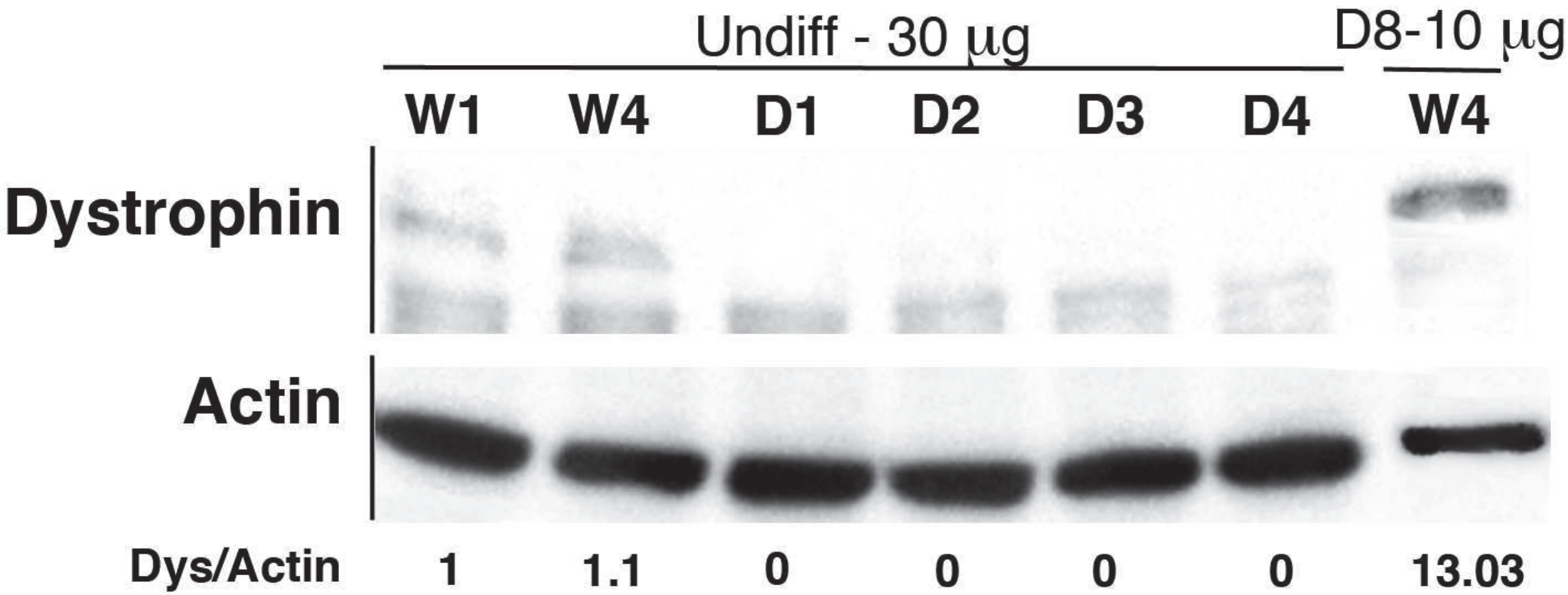


Figure S1: Characterization of dystrophin expression in human immortalized myoblasts. 30 µg of total protein extracts from undifferentiated Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell line were separated by SDS-PAGE. Analysis of Dystrophin expression was performed by immunoblotting thanks to the use of Mandra1 antibody. Actin is used as a loading control. As a positive control, 10 µg of total protein extracts of 8 days differentiated W4 cell line (D8, W4) were submitted to the same protocol (n=2).

Figure S2

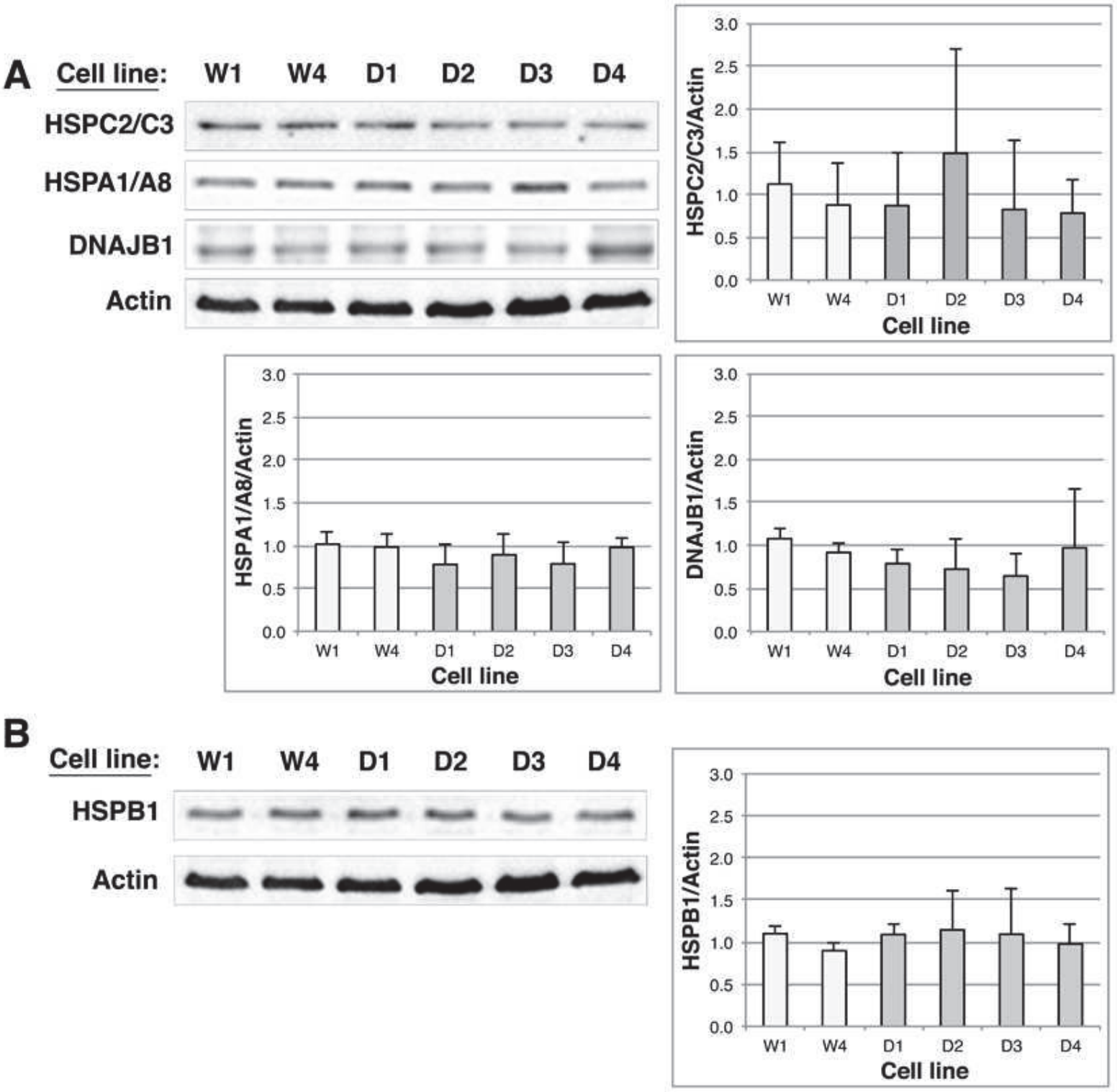


Figure S2: Foldases and HSPB1 holdase expression are not modulated in human immortalized DMD myoblasts. (A and B) 10 µg of total protein extracts from Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were separated by SDS-PAGE. Heat Shock proteins expression was analyzed by immunoblotting using (A) anti-HSPC2/C3, -HSPA1/A8, -DNAJB1 and -Actin antibodies; (B) anti-HspB1 and -Actin. Histograms indicate HSPC2/C3/Actin, HSPA1/A8/Actin, DNAJB1/Actin and HSPB1/Actin ratios. No statistically significant differences were observed between control and DMD cell lines (ANOVA, n=3)

Figure S3

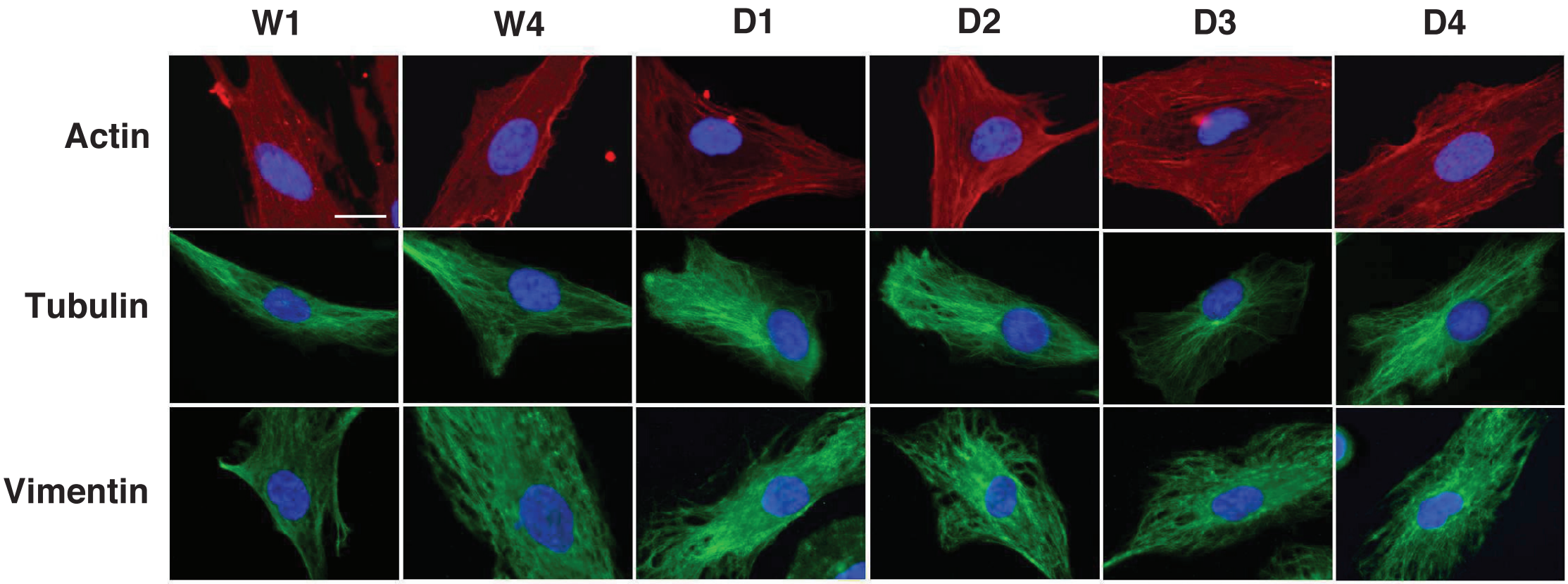


Figure S3: Cytoskeleton filaments are not altered in DMD myoblasts. Wild Type (W1 & W4) and DMD (D1 to D4) cell lines were fixed, permeabilized and stained with antibodies against, actin (red), α–tubulin (green) or vimentin (green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Cells were analyzed with a fluorescence microscope (scale bar: 50 μm) (n=3).

Figure S4

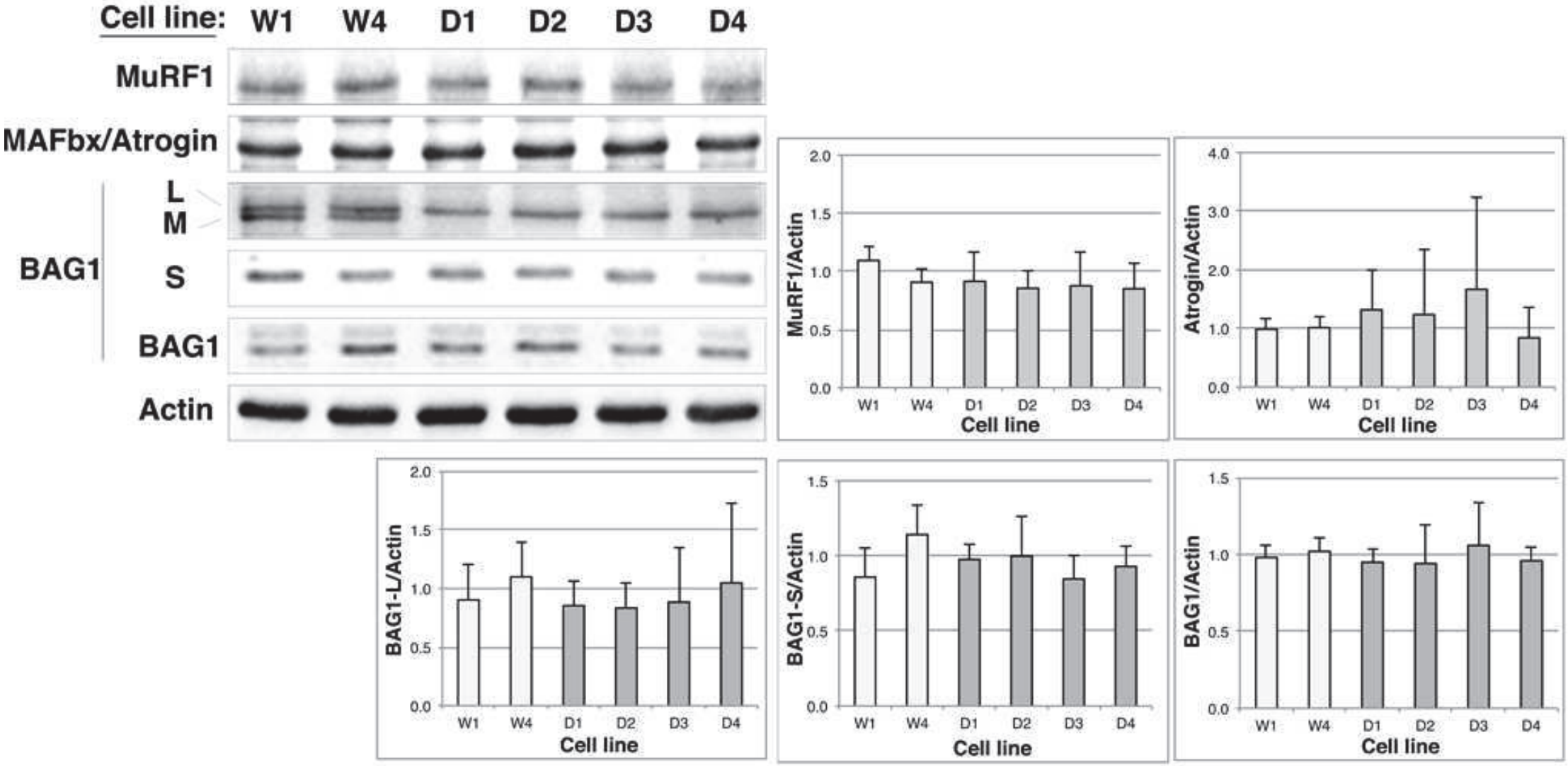


Figure S4: E3 Ub ligases, BAG1, BAG1-L and BAG1 expression is not modulated in DMD myoblasts. 10 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell lines were separated by SDS-PAGE. Analysis of the expression of the E3 Ub ligases MuRF1 and MAFbx/Atrogin and of BAG1 isoforms expression was performed using specific antibodies. Actin is revealed as a loading control. Histograms show the ratios of the various proteins *vs* Actin. No statistically significant differences could be observed (ANOVA test, n=3).

Figure S5

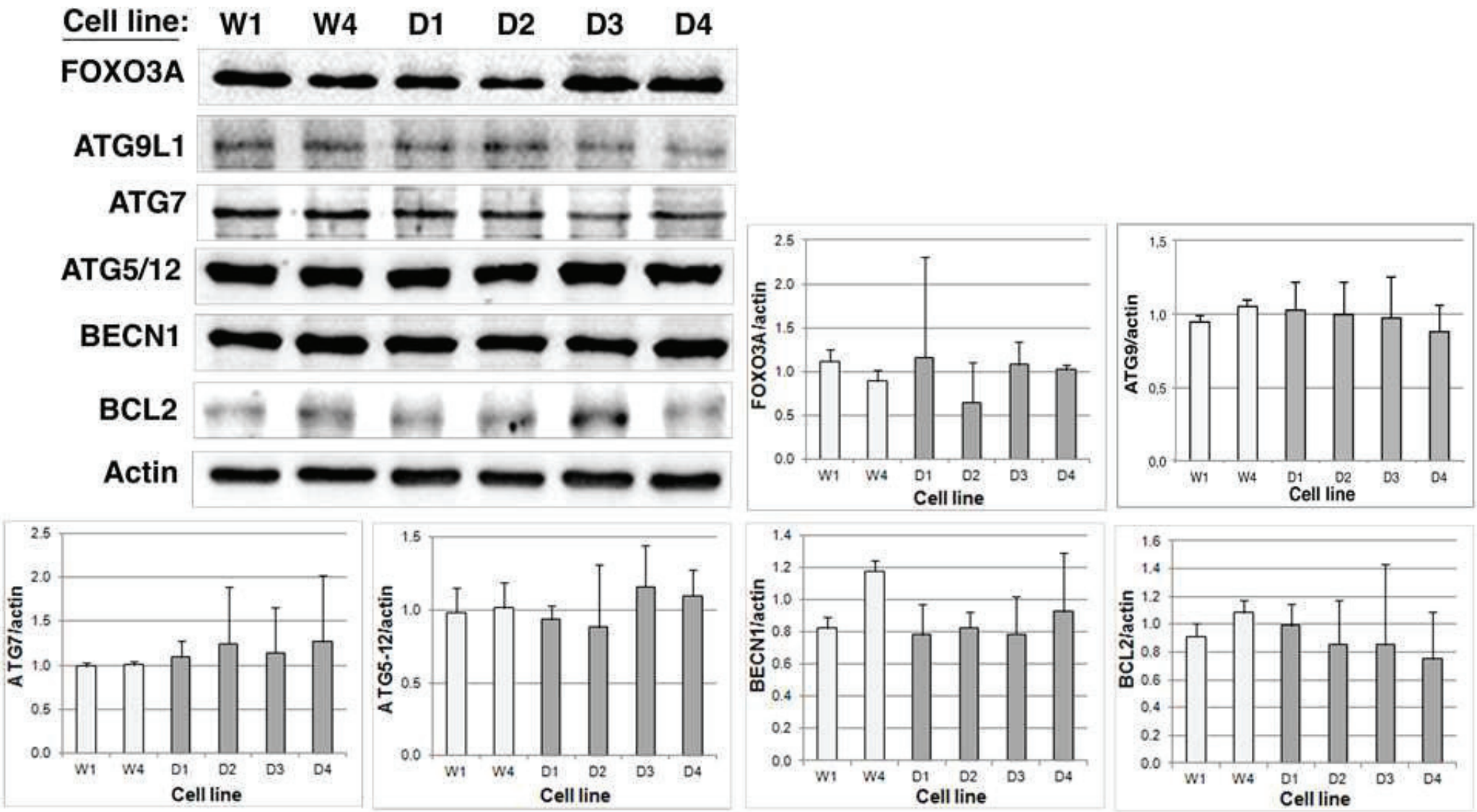


Figure S5: FOXO3A, ATG9L, ATG7, ATG5/12, BECN1 and BCL2 levels are not modulated in DMD myoblasts. 10 µg of total protein extracts of Wild Type and DMD cell lines were separated by SDS-PAGE. Analysis of the expression of FOXO3a, ATG9L1, ATG7, ATG5/12 BECN1, BCL2 and Actin was performed using specific antibodies. Actin is revealed as a loading control. Histograms show the ratios of the various proteins *vs* Actin. No statistically significant differences could be observed (ANOVA test, n=3).

MATERIEL & METHODES

➢ Lignées cellulaires et entretien

Les lignées utilisées durant ma thèse nous ont été gracieusement fournies par Bénédicte CHAZAUD. Des myoblastes ont été isolés à partir de biopsies musculaires de donneurs sains ou de patients atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), puis immortalisés par transduction virale de plasmides permettant la surexpression de la télomérase et de CDK4 (**Mamchaoui et al., 2011**). Différents clones ont ensuite été isolés, cultivés dans différents milieux de prolifération et placés en incubation à 37°C, en atmosphère 5% de CO_2 :

- Milieu 1 : Milieu composé de DMEM et de M199 (selon un ratio 4 : 1 ; *Invitrogen*), complémenté par 20% de sérum de veau fœtal (SVF ; *Invitrogen*), 0,2% de déxaméthasone (D4902, *Sigma*), et 1µg/mL de puromycine (marqueur de sélection ; p8833, *Sigma*).
- Milieu 2 : 50% Milieu 1 + 50% milieu commercial « ready to use » (C-23060 ; *Promocell*).

6 lignées ont été utilisées dans cette étude : W1 et W4, deux lignées issues de donneurs sains ; D1, D2, et D3 présentant un codon STOP dans l'exon 41 du gène de la dystrophine (C5760>T ; Gln1920X) et D4 présentant une délétion de l'exon 44 du gène de la dystrophine.

Type	Lignée	Age du donneur (en années)	Mutation
Donneurs sains	W1	7,8	
	W4	10,1	
Patients DMD	D1	11,8	Codon STOP dans l'exon 41 du gène de la dystrophine
	D2		
	D3		
	D4	12,3	Délétion de l'exon 44

➢ Anticorps, plasmides et réactifs

L'E64D (E3132), le Triton X100 et le Hoechst (33258) ont été obtenus chez *Sigma* ; la Pepstatine A provient de chez *Merck-Millipore* (516481). Le produit de transfection JetPrime provient de chez *Polyplus* (114-75). Le réactif SteadyGlo® Luciferase vient de chez *Promega*.

Anticorps	Espèce	Référence	Fournisseur
BAG3	Lapin (polyclonal)	ABC277	Millipore
p65		06-418	
Actine	Souris (monoclonal)	MAB1501	
HSPB8/HSP22		H00026353	Enzo Lifesciences
HSP40		SPA-450	
HSP70		ADI-SPA-822F	
HSPB5/αBcry		ADI-SPA-222F	
HSP90	Rat (monoclonal)	ADI-SPA-835F	
LC3B	Lapin (polyclonal)	L7543	Sigma
ATG16L1		AB47946	Abcam
Beclin1		AB51031	
HDAC6		AB133493	
Pericentrine		AB4448	
ATG3	Souris (monoclonal)	AB56409	
VCP		AB11433	
Multiubiquitine		D071-3	MBL
Tubuline α acétylée		MABT868	Sigma
HSPB1/HSP27	Chèvre (polyclonal)	sc-1190	Santacruz
Dystrophine/MANDRA1	Souris (monoclonal)	sc-73592	
BCL-2		sc-509	
Atrogin		sc-166806	
MuRF1		sc-398608	
BAG1		sc-33704	
ATG7	Lapin (polyclonal)	sc-2630	
NBR1		16-004-1-AP	PTG Lab
ATG5		2630	Cell Signaling
FOXO3A		9467	
PI3K III		3811	
Tubuline α		2144	
Vimentine	Souris (monoclonal)	M0725	DAKO
p62		610832	BD Sciences
MHC (MF20)		M4470	R&D Systems
GAM	Chèvre	170-6516	Biorad
GAR		170-6515	
DAG	Âne	sc-2020	Santacruz
RAR	Lapin	A5795	Sigma
GAM 488	Souris	A11001	ThermoFischer
GAM 568		A11031	
GAR 488	Lapin	A11034	
GAR 568		A11011	

Le plasmide pNFκBluc provient de chez *Clontech* ; le plasmide pGL3-promoter, ainsi que le kit Proteasome-Glo Cell-Based Assay (G1180) proviennent de chez *Promega*. La BSA (pour *Bovine Serum Albumine*) vient de chez *Euromedex*.
Le révélateur ECL Clarity Substrate (1705060) provient de chez *Biorad* ; Le révélateur Western Lightning ECL plus (NEL120001E1) a été obtenu chez *Perkin Elmer*. Le réactif de Bradford provient de chez *Biorad*.

- Test de prolifération

Les lignées ont été ensemencées à une densité de $5x10^4$ cellules/boite 35mm Ø, dans les différents milieux cités précédemment. Les cellules ont été trypsinées puis comptées sur cellule de Malassez de façon quotidienne durant 4 à 5 jours.

- Test de différenciation

Des boites 35mm Ø ont été recouvertes d'un mélange Matrigel (1/100ème ; 356231, *Dutscher*)/milieu Promocell pur (sans additif) et placées 30min à 37°C. Les myoblastes ont été ensemencés à une densité de $1,5x10^5$ cellules/boite 35mm Ø dans du milieu de prolifération. Le jour suivant, les boites ont été rincées avec du PBS 1X préalablement chauffé, et du milieu de différenciation (milieu *Promocell* pur, complémenté avec 2% de sérum de cheval ; *Invitrogen*) a été ajouté. Le milieu a été remplacé tous les 2 jours. Après 8, 12 ou 15 jours de différenciation, les cellules ont été fixées au méthanol froid (10min à température ambiante), perméabilisées et saturées (PBS 2% BSA, 1h sous agitation), et un immunomarquage de la MHC (pour *Myosin Heavy Chain*) a été réalisé (anticorps primaire anti-MHC, 1h à température ambiante en chambre humide ; anticorps secondaire GAM 488, 1h à température ambiante en chambre humide obscure).

- Transfections

24 heures avant leur transfection, des myoblastes immortalisés ont été ensemencés à une densité de 10^6 cellules/boite 100mm Ø ou $5,8x10^5$ cellules/boite 60mm Ø. Les cellules ont ensuite été transfectées de façon transitoire avec différents plasmides (pNFκBluc ou pGL3-promoter), grâce au réactif de transfection JetPrime, selon le protocole du fournisseur.

- Western Blot

Les myoblastes ont été ensemencés à une densité de 20 000 cellules/boite 100mm Ø. Le jour suivant, les cellules ont été grattées dans du PBS 1X froid, centrifugées, et les culots ont été repris dans différents volumes de PBS 1X. Un dosage protéique a été réalisé par la méthode de Bradford, et 10µg de protéines ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide/bisacrylamide (10, 12,5 ou 16% ; Euromedex) ou Tris-Acétate (gradient 3-15%), dans du tampon Tris-Glycine 1X 0,1% SDS (Biosolve) ou Tris-Acétate. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Protran (*Perkin Elmer*), et incubées avec des anticorps primaires puis secondaires. La révélation a été faite par grâce à des kits d'électrochimioluminescence (*Biorad* & *Perkin Elmer*). Les Western Blot ont ensuite été quantifiés grâce au logiciel ImageLab 4.0.

- Filter Trap Assay

La présence de différentes protéines (p62, multiubiquitine, HSPB5, HSPB8, BAG3) dans les agrégats protéiques a été testée par la technique du Filter Trap : Des myoblastes ont été ensemencés à une densité de $5x10^5$ cellules/boîte 60mm Ø. Le jour suivant, les cellules ont été grattées dans du tampon FTA (150mM NaCl, 50mM DTT, 10mM Tris-HCl pH 8) complémenté avec 2% SDS. Les échantillons ont été homogénéisés par passages répétés (au moins 3 fois) à travers une aiguille de 25 Gauge. 5 µg d'extraits protéiques ont ensuite été dilués (dilutions 1, ½, ¼ et 1/8), portés à ébullition durant 5min, et déposés dans les puits d'un appareil à Slot Blot, sur membrane d'acétate de cellulose de 0,22µm, préalablement lavée avec du tampon FTA, 0,1% SDS. Des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt ont ensuite été utilisés pour réaliser un immunoblotting.

- Test luciférase de reconformation (**Nivon et al., 2009**)

Les cellules ont été transfectées transitoirement avec 10µg de plasmide pGL3-promoter. L'activité luciférase a été quantifiée 48 heures post-transfection, en utilisant le kit Steady-Glo® Luciferase, en conditions basales ou après un traitement par choc thermique (30min à 43°C), suivi ou non d'une période de récupération à 37°C (30min, 1h, 2h ou 4h). La luminescence a été quantifiée grâce au luminomètre Victor3 (Perkin Elmer), et rapportée à 1µg de protéines.

- Test NFκB-luciférase

Les myoblastes ont été transfectés transitoirement avec 6µg de plasmide pNFκBluc. 24h plus tard, les cellules ont été soumises à un choc thermique (1h30 à 43°C). L'activité luciférase en conditions basales ou après un stress thermique a été quantifiée le lendemain, en utilisant le kit Steady-Glo® Luciferase, selon les instructions du fournisseur. La luminescence a été quantifiée grâce au luminomètre Victor3 et rapportée à 1µg de protéines.

- Immunofluorescence

Les myoblastes ont été ensemencés sur lamelles en verre ou en polymère (µ-Slide ibiTreat, *Ibidi*). Les cellules ont ensuite été fixées durant 10min au méthanol froid, perméabilisées et saturées (1h sous agitation dans du PBS 2% BSA, 0.2% Triton X100), puis hybridées avec différents anticorps primaires (p62, multiubiquitine, vimentine, desmine, actine & MHC) et secondaires (Goat anti-mouse/anti-rabbit Alexa Fluor 488; goat anti-mouse/anti-rabbit Alexa Fluor 568), ou transfectées avec un plasmide GFP-LC3. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst (1/2000). Les observations ont été réalisées sur le microscope à épifluorescence Z1 Axio Imager, au grossissement x10 ou x100. La digitalisation des images a été faite avec le logiciel Metavue et leurs ajustements avec ImageJ.

- Proximity Ligation Assay (PLA)

Les myoblastes ont été ensemencés à 10^5 cellules/boîte 35mm Ø sur lamelles de verre (12mm Ø). Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été mises en contact avec des anticorps primaires dirigés contre BAG3 et HSPB8, selon le même protocole que pour les immunofluorescences. La formation des complexes a été mise en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps secondaires spécifiquement conçus pour le PLA, ainsi que d'un réactif orange également présent dans le kit Duolink (Sigma-Aldrich). Les observations ont été réalisées au microscope confocal Zeiss LSM800. La digitalisation des images a été faite avec le logiciel ZEN, et leurs ajustements, ainsi que le comptage des complexes avec ImageJ.

- Mesure de l'activité du protéasome

Les cellules ont été ensemencées dans une plaque 96 puits, à une densité de 10^4 cellules/puits. Le lendemain, un traitement à base d'inhibiteurs du protéasome (MG132 10µM ; lactacystine 10µM) de 2 heures leur a été appliqué. L'activité enzymatique du protéasome a ensuite été

mesurée grâce à l'utilisation du kit Proteasome-Glo Cell-Based, d'après les instructions du fournisseur. La luminescence a été quantifiée par un luminomètre Victor3, puis normalisée par rapport aux lignées WT.

- Analyses statistiques

Les données ont été analysées grâce à l'utilisation de tests statistiques de type ANOVA ou de type STUDENT. La présence d'astérisques indique la significativité des différences observées (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). *Cell*, *72*(6), 971-983.

Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, *53*(3), 145-151.

Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., & Kelekar, A. (2006). Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death & Differentiation*, *14*(3), 500-510.

Agarraberes, F. A., & Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science*, *114*(13), 2491-2499.

Ahmad, M. F., Raman, B., Ramakrishna, T., & Rao, C. M. (2008). Effect of phosphorylation on alpha B-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of alpha B-crystallin and its phosphorylation-mimicking mutant. *Journal of Molecular Biology*, *375*(4), 1040-1051.

Akerfelt, M., Morimoto, R. I., & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(8), 545-555.

Allamand, V., & Guicheney, P. (2002). Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for α2 chain of laminin). *European Journal of Human Genetics*, *10*(2), 91.

Allard, B. (2006). Sarcolemmal ion channels in dystrophin-deficient skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *27*(5-7), 367-373.

Arechavala-Gomeza, V., Anthony, K., Morgan, J., & Muntoni, F. (2012). Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Current Gene Therapy*, *12*(3), 152-160.

Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M. et al. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Current Biology: CB*, *20*(2), 143-148.

Arrigo, A. P., & Welch, W. J. (1987). Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(32), 15359-15369.

Arrigo, A.-P. (2001). Hsp27: Novel Regulator of Intracellular Redox State. *IUBMB Life*, *52*(6), 303-307.

Arrigo, A.-P. (2013). Human small heat shock proteins: Protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: An update. *FEBS Letters*, *587*(13), 1959-1969.

Astrea, G., Pezzini, I., Picillo, E., Pasquariello, R., Moro, F., Ergoli, M., et al. (2016). TMEM5-associated dystroglycanopathy presenting with CMD and mild limb-girdle muscle involvement. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *26*(7), 459-461.

Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H., & Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Therapy*, *11 Suppl 1*, S109-121.

Bagh, M. B., Peng, S., Chandra, G., Zhang, Z., Singh, S. P., Pattabiraman, N. et al. (2017). Misrouting of v-ATPase subunit V0a1 dysregulates lysosomal acidification in a neurodegenerative lysosomal storage disease model. *Nature Communications*, *8*.

Balejčíková, L., Garamus, V. M., Avdeev, M. V., Petrenko, V. I., Almásy, L., & Kopčanský, P. (2017). The effect of solution pH on the structural stability of magnetoferritin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*(Supplement C), 375-381.

Barber, B. J., Andrews, J. G., Lu, Z., West, N. A., Meaney, F. J., Price, E. T. et al. (2013). Oral corticosteroids and onset of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of Pediatrics*, *163*(4), 1080-1084.

Bardwell, J. C., & Craig, E. A. (1984). Major heat shock gene of Drosophila and the Escherichia coli heat-inducible dnaK gene are homologous. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 848-852.

Bassett, D., & Currie, P. D. (2004). Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *31*(8), 537-540.

Behl, C. (2011). BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy*, *7*(7), 795-798.

Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., & Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY)*, *8*(1), 3-11.

Besche, H. C., Sha, Z., Kukushkin, N. V., Peth, A., Hock, E.-M., Kim, W. et al. (2014). Autoubiquitination of the 26S Proteasome on Rpn13 Regulates Breakdown of Ubiquitin Conjugates. *The EMBO Journal*, *33*(10), 1159-1176.

Beytía, M. de los A., Vry, J., & Kirschner, J. (2012). Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myologica: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology*, *31*(1), 4-8.

Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., Kosma, K. et al. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human Mutation*, *36*(4), 395-402.

Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, *82*(2), 291-329.

Blankinship, M. J., Gregorevic, P., & Chamberlain, J. S. (2006). Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *13*(2), 241-249.

Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Bécane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L. et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, *21*(3), 285-288.

Bonne, G., Leturcq, F., & Ben Yaou, R. (1993). Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, H. C. Mefford, *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Bonuccelli, G., Sotgia, F., Schubert, W., Park, D. S., Frank, P. G., Woodman, S. E. et al. (2003). Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *The American Journal of Pathology*, *163*(4), 1663-1675.

Borgia, M. B., Nickson, A. A., Clarke, J., & Hounslow, M. J. (2013). A Mechanistic Model for Amorphous Protein Aggregation of Immunoglobulin-like Domains. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(17), 6456-6464.

Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, *15*(7), 713-720

Brais, B., Bouchard, J.-P., Xie, Y.-G., Rochefort, D. L., Chrétien, N., Tomé, F. M. S. et al. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics*, *18*(2), 164.

Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L. H. et al. (2016). Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(32), E4639-E4647.

Briguet, A., Erb, M., Courdier-Fruh, I., Barzaghi, P., Santos, G., Herzner, H. et al. (2008). Effect of calpain and proteasome inhibition on Ca2+-dependent proteolysis and muscle histopathology in the mdx mouse. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(12), 4190-4200.

Brocchieri, L., Conway de Macario, E., & Macario, A. J. (2008). hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 19.

Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A. et al. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Human Molecular Genetics*, *10*(25), 2851-2859.

Bronietzki, A. W., Schuster, M., & Schmitz, I. (2015). Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunology and Cell Biology*, *93*(1), 25-34.

Brouilly, N., Lecroisey, C., Martin, E., Pierson, L., Mariol, M.-C., Qadota, H. et al. (2015). Ultra-structural time-course study in the C. elegans model for Duchenne muscular dystrophy highlights a crucial role for sarcomere-anchoring structures and sarcolemma integrity in the

earliest steps of the muscle degeneration process. *Human Molecular Genetics*, *24*(22), 6428-6445.

Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C. et al. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*, *2*(9), 645-652.

Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E. et al. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, *18*(23), 2893-2904.

Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchère, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G. S., & Mandel, J.-L. (2002). Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Human Molecular Genetics*, *11*(19), 2297-2307.

Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., & Moore, K. J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(4), 1189-1192.

Bullard, B., Ferguson, C., Minajeva, A., Leake, M. C., Gautel, M., Labeit, D. et al. (2004). Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(9), 7917-7924.

Buller, C. L., Loberg, R. D., Fan, M.-H., Zhu, Q., Park, J. L., Vesely, E. et al. (2008). A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *295*(3), C836-843.

Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G. P. et al. (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle & Nerve*, *50*(4), 477-487.

Buyse, G. M., Goemans, N., van den Hauwe, M., & Meier, T. (2013). Effects of glucocorticoids and idebenone on respiratory function in patients with duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Pulmonology*, *48*(9), 912-920.

Buyse, G. M., Van der Mieren, G., Erb, M., D'hooge, J., Herijgers, P., Verbeken, E. et al. (2009). Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the

dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *European Heart Journal*, *30*(1), 116-124.

Buyse, G. M., Voit, T., Schara, U., Straathof, C. S. M., D'Angelo, M. G., Bernert, G. et al. (2015). Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *385*(9979), 1748-1757.

Buysse, K., Riemersma, M., Powell, G., van Reeuwijk, J., Chitayat, D., Roscioli, T. et al. (2013). Missense mutations in β-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Human Molecular Genetics*, *22*(9), 1746-1754.

Calado, A., Tomé, F. M., Brais, B., Rouleau, G. A., Kühn, U., Wahle, E., & Carmo-Fonseca, M. (2000). Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Human Molecular Genetics*, *9*(15), 2321-2328.

Caplan, A. J. (2003). What is a co-chaperone? *Cell Stress & Chaperones*, *8*(2), 105-107.

CARBERRY, S., BRINKMEIER, H., ZHANG, Y., WINKLER, C. K., & OHLENDIECK, K. (2013). Comparative proteomic profiling of soleus, extensor digitorum longus, flexor digitorum brevis and interosseus muscles from the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *International Journal of Molecular Medicine*, *32*(3), 544-556.

Carberry, S., Zweyer, M., Swandulla, D., & Ohlendieck, K. (2014). Comparative proteomic analysis of the contractile-protein-depleted fraction from normal versus dystrophic skeletal muscle. *Analytical Biochemistry*, *446*, 108-115.

Celegato, B., Capitanio, D., Pescatori, M., Romualdi, C., Pacchioni, B., Cagnin, S. et al. (2006). Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*, *6*(19), 5303-5321.

Chan, E. Y. (2009). mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Science Signaling*, *2*(84), pe51.

Chang, N. C., Chevalier, F. P., & Rudnicki, M. A. (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(6), 479-496.

Chang, W. J., Iannaccone, S. T., Lau, K. S., Masters, B. S., McCabe, T. J., McMillan, K. et al. (1996). Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(17), 9142-9147.

Charette, S. J., & Landry, J. (2000). The Interaction of HSP27 with Daxx Identifies a Potential Regulatory Role of HSP27 in Fas-Induced Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *926*(1), 126-131.

Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N. et al. (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*, *102*(9), 3379-3386.

Cho, D. H., & Tapscott, S. J. (2007). Myotonic dystrophy: Emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1772*(2), 195-204.

Ciehanover, A., Hod, Y., & Hershko, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *81*(4), 1100-1105.

Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E. et al. (2013). Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*.

Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T. G., & Kunkel, L. M. (2006). Loss of FilaminC (FLNc) Results in Severe Defects in Myogenesis and Myotube Structure. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(17), 6522-6534.

Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, *581*(19), 3702-3710.

David Jones, J. R., & Sesboüé, ; traduction et adaptation de l'anglais [par] Bruno. (2005). *Physiologie du muscle squelettique: de la structure au mouvement*. Paris: Elsevier.

De Palma, C., Morisi, F., Cheli, S., Pambianco, S., Cappello, V., Vezzoli, M. et al. (2012). Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death & Disease*, *3*(11), e418.

De Palma, C., Perrotta, C., Pellegrino, P., Clementi, E., & Cervia, D. (2014). Skeletal muscle homeostasis in duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *6*, 188.

Den Engelsman, J., Gerrits, D., de Jong, W. W., Robbins, J., Kato, K., & Boelens, W. C. (2005). Nuclear import of {alpha}B-crystallin is phosphorylation-dependent and hampered by hyperphosphorylation of the myopathy-related mutant R120G. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(44), 37139-37148.

Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(10), 722-737.

Di Fiore, P. P., Polo, S., & Hofmann, K. (2003). When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *4*(6), 491-497.

Dimberg, A., Rylova, S., Dieterich, L. C., Olsson, A.-K., Schiller, P., Wikner, C. et al. (2008). alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood*, *111*(4), 2015-2023.

Ding, W.-X., & Yin, X.-M. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*, *393*(7), 547-564.

Dixit, M., Ansseau, E., Tassin, A., Winokur, S., Shi, R., Qian, H. et al. (2007). DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(46), 18157-18162.

Djabali, K., de Néchaud, B., Landon, F., & Portier, M. M. (1997). AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *Journal of Cell Science*, *110 (Pt 21)*, 2759-2769.

Doran, P., Gannon, J., O'Connell, K., & Ohlendieck, K. (2007). Aging skeletal muscle shows a drastic increase in the small heat shock proteins alphaB-crystallin/HspB5 and cvHsp/HspB7. *European Journal of Cell Biology*, *86*(10), 629-640.

Dovidchenko, N. V., Leonova, E. I., & Galzitskaya, O. V. (2014). Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry. Biokhimiia*, *79*(13), 1515-1527.

Dreiza, C. M., Komalavilas, P., Furnish, E. J., Flynn, C. R., Sheller, M. R., Smoke, C. C. et al. (2010). The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease. *Cell Stress & Chaperones*, *15*(1), 1-11.

Du, W., Su, Q. P., Chen, Y., Zhu, Y., Jiang, D., Rong, Y. et al. (2016). Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation. *Developmental Cell*, *37*(4), 326-336.

Duan, D. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy in the Canine Model. *Human Gene Therapy. Clinical Development*, *26*(1), 57-69.

Dumont, N. A., Wang, Y. X., von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C. F., Brun, C. E., & Rudnicki, M. A. (2015). Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nature Medicine*, *21*(12), 1455-1463.

Ecroyd, H., Meehan, S., Horwitz, J., Aquilina, J. A., Benesch, J. L. P., Robinson, C. V. et al. (2007). Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin affects its chaperone activity. *The Biochemical Journal*, *401*(1), 129-141.

Elliott, E., Tsvetkov, P., & Ginzburg, I. (2007). BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(51), 37276-37284.

Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, *61*, 243-282.

Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3305-3312.

Figueiredo-Pereira, M. E., Berg, K. A., & Wilk, S. (1994). A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *Journal of Neurochemistry*, *63*(4), 1578-1581.

Finkel, R. S., Flanigan, K. M., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H. L. et al. (2013). Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PloS One*, *8*(12), e81302.

Fontaine, J.-M., Sun, X., Hoppe, A. D., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M. J., & Benndorf, R. (2006). Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(12), 2168-2170.

Fuentealba, L. C., Eivers, E., Geissert, D., Taelman, V., & De Robertis, E. M. (2008). Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(22), 7732-7737.

Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A. et al. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine*, *17*(6), 720-725.

Furuta, N., & Amano, A. (2012). SNARE mediates autophagosome–lysosome fusion. *Journal of Oral Biosciences*, *54*(2), 83-85.

Gambill, B. D., Voos, W., Kang, P. J., Miao, B., Langer, T., Craig, E. A., & Pfanner, N. (1993). A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *The Journal of Cell Biology*, *123*(1), 109-117.

Gamerdinger, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U., & Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO Journal*, *28*(7), 889-901.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., & Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(22), 2592-2601.

Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P. et al. (1998). Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Research*, *58*(23), 5495-5499.

Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., & Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *286*(3), 433-442.

Gaschen, F., & Burgunder, J.-M. (2001). Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathologica*, *101*(6), 591-600.

Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., … Saudou, F. (2004). Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell*, *118*(1), 127-138.

Geeraert, C., Ratier, A., Pfisterer, S. G., Perdiz, D., Cantaloube, I., Rouault, A. et al. (2010). Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(31), 24184-24194.

Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, *12*(2), 119-131.

Ghaoui, R., Benavides, T., Lek, M., Waddell, L. B., Kaur, S., North, K. N. et al. (2016). TOR1AIP1 as a cause of cardiac failure and recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *26*(8), 500-503.

Ghaoui, R., Palmio, J., Brewer, J., Lek, M., Needham, M., Evilä, A. et al. (2016). Mutations in HSPB8 causing a new phenotype of distal myopathy and motor neuropathy. *Neurology*, *86*(4), 391-398.

Ghosh, J. G., Houck, S. A., & Clark, J. I. (2007). Interactive Domains in the Molecular Chaperone Human αB Crystallin Modulate Microtubule Assembly and Disassembly. *PLoS ONE*, *2*(6).

Gieseler, K., Grisoni, K., & Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in Caenorhabditis elegans. *Current Biology: CB*, *10*(18), 1092-1097.

Goldfarb, L. G., Olivé, M., Vicart, P., & Goebel, H. H. (2008). Intermediate Filament Diseases: Desminopathy. *Advances in experimental medicine and biology*, *642*, 131-164

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., & Boyse, E. A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(1), 11-15.

Groh, N., Bühler, A., Huang, C., Li, K. W., van Nierop, P., Smit, A. B. et al. (2017). Age-Dependent Protein Aggregation Initiates Amyloid-β Aggregation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*.

Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., Cescon, M., Angelin, A., Bertaggia, E. et al. (2010). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature Medicine*, *16*(11), 1313-1320.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., & Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature Cell Biology*, *5*(5), 461-466.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, *495*(7441), 389-393.

Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, *475*(7356), 324-332.

Hassett, M. R., Sternberg, A. R., & Roepe, P. D. (2017). Inhibition of Human Class I vs Class III Phosphatidylinositol 3′-Kinases. *Biochemistry*, *56*(33), 4326-4334.

Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., Martin, J. L., Botla, V., Ruchalski, K. et al. (2008). Hsp27 Inhibits Bax Activation and Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(18), 12305-12313.

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M. et al. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMPactivated protein kinase. *Cell Metabolism*, *2*(1), 9-19.

Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(1), 62-76.

Henderson, P., & Stevens, C. (2012). The Role of Autophagy in Crohn's Disease. *Cells*, *1*(3), 492-519.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, *419*(6903), 135-141.

Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10449-10453.

Houck, S. A., & Clark, J. I. (2010). Dynamic Subunit Exchange and the Regulation of Microtubule Assembly by the Stress Response Protein Human αB Crystallin. *PLoS ONE*, *5*(7).

Huynh, K. K., Eskelinen, E.-L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P., & Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal*, *26*(2), 313-324.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N. et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*(6811), 488-492.

Ikeda, F., & Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Reports*, *9*(6), 536-542.

Ingolia, T. D., & Craig, E. A. (1982). Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(7), 2360-2364.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, *4*(9), 648-657.

Isaac, C., Wright, A., Usas, A., Li, H., Tang, Y., Mu, X. et al. (2013). Dystrophin and utrophin « double knockout » dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *31*(3), 343-349.

Itoh, T., & De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane–cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(8), 897-912.

Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *9*(4), 574-587.

Johnson, N. M., Farr, G. H., & Maves, L. (2013). The HDAC Inhibitor TSA Ameliorates a Zebrafish Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS Currents*, *5*.

Jonak, C., Mildner, M., Klosner, G., Paulitschke, V., Kunstfeld, R., Pehamberger, H. et al. (2011). The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *Journal of Dermatological Science*, *61*(1), 32-37.

Jones, K., Jin, B., Iakova, P., Huichalaf, C., Sarkar, P., Schneider-Gold, C. et al. (2011). RNA Foci, CUGBP1, and ZNF9 are the primary targets of the mutant CUG and CCUG repeats expanded in myotonic dystrophies type 1 and type 2. *The American Journal of Pathology*, *179*(5), 2475-2489.

Ju, J.-S., Fuentealba, R. A., Miller, S. E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R. H., & Weihl, C. C. (2009). Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *The Journal of Cell Biology*, *187*(6), 875-888.

Juban, G., & Chazaud, B. (2017). Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. *FEBS Letters*, *591*(19), 3007-3021.

Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A. et al. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress & Chaperones*, *14*(1), 105-111.

Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D. et al. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5652), 1978-1980.

Kanagasabai, R., Krishnamurthy, K., Vedam, K., Wang, Q., Zhu, Q., & Ilangovan, G. (2010). Hsp27 Protects Adenocarcinoma Cells from UV-induced Apoptosis by Akt and p21 Dependent Pathway of Survival. *Molecular cancer research : MCR*, *8*(10), 1399-1412.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., & Yao, T. P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, *115*(6), 727-738.

Keady, B. T., Samtani, R., Tobita, K., Tsuchya, M., San Agustin, J. T., Follit, J. A. et al. (2012). IFT25 Links the Signal-Dependent Movement of Hedgehog Components to Intraflagellar Transport. *Developmental Cell*, *22*(5), 940-951.

Kieny, P., Chollet, S., Delalande, P., Le Fort, M., Magot, A., Pereon, Y., & Perrouin Verbe, B. (2013). Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, *56*(6), 443-454. 2

Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H. et al. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *14*(15), 2189-2200.

Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O., & Rubinsztein, D. C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, *4*(7), 849-850.

Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A. et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Human Molecular Genetics*, *22*(21), 4368-4382.

Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, *11*(11), 2134-2137.

Kodali, R., & Wetzel, R. (2007). Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, *17*(1), 48-57.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, *37*(5), 937-953.

Koo, T., & Wood, M. J. (2013). Clinical trials using antisense oligonucleotides in duchenne muscular dystrophy. *Human Gene Therapy*, *24*(5), 479-488.

Kretz-Remy, C., Bates, E. E., & Arrigo, A. P. (1998). Amino acid analogs activate NF-kappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(6), 3180-3191.

Kretz-Remy, C., Munsch, B., & Arrigo, A. P. (2001). NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 43723-43733.

Kuballa, P., Nolte, W. M., Castoreno, A. B., & Xavier, R. J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annual Review of Immunology*, *30*, 611-646.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T. et al. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, *432*(7020), 1032-1036.

Kumamoto, T., Fujimoto, S., Ito, T., Horinouchi, H., Ueyama, H., & Tsuda, T. (2000). Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica*, *100*(6), 595-602.

Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*.

Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(12), 759-774.

Lampe, A. K., & Bushby, K. M. D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *Journal of Medical Genetics*, *42*(9), 673-685.

Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V. et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PloS One*, *9*(10), e110371.

Lattanzi, A., Duguez, S., Moiani, A., Izmiryan, A., Barbon, E., Martin, S. et al. (2017). Correction of the Exon 2 Duplication in DMD Myoblasts by a Single CRISPR/Cas9 System. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *7*, 11-19.

Laumonier, T., & Menetrey, J. (2016). Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*, *3*(1), 15.

Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., & Landry, J. (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(32), 24210-24214.

Lebel, D. E., Corston, J. A., McAdam, L. C., Biggar, W. D., & Alman, B. A. (2013). Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, *95*(12), 1057-1061.

Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., & Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current Biology: CB*, *17*(18), 1561-1567.

Lee, J.-Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.-S. et al. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*, *29*(5), 969-980.

Lemmers, R. J. L. F., Tawil, R., Petek, L. M., Balog, J., Block, G. J., Santen, G. W. E. et al. (2012). Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nature genetics*, *44*(12), 1370-1374.

Leturcq, F., & Tuffery-Giraud, S. (2015). [Genetics and molecular aspects of dystrophinopathies]. *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie*, *22*(12 Suppl 1), 12S3-11.

Li, B., Smith, C. C., Laing, J. M., Gober, M. D., Liu, L., & Aurelian, L. (2007). Overload of the heat-shock protein H11/HspB8 triggers melanoma cell apoptosis through activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1. *Oncogene*, *26*(24), 3521-3531.

Li, M., Andersson-Lendahl, M., Sejersen, T., & Arner, A. (2014). Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *28*(4), 1593-1599.

Li, X., Xu, Q., Fu, X., & Luo, W. (2014). Heat shock protein 22 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *140*(8), 1305-1313.

Liang, W.-C., Mitsuhashi, H., Keduka, E., Nonaka, I., Noguchi, S., Nishino, I., & Hayashi, Y. K. (2011). TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-related myopathy. *Annals of Neurology*, *69*(6), 1005-1013.

Lidov, H. G., & Kunkel, L. M. (1997). Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics*, *45*(1), 132-139.

Lidov, H. G., Selig, S., & Kunkel, L. M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics*, *4*(3), 329-335.

Lim, K. R. Q., Maruyama, R., & Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 533-545.

Lin, S.-P., Lee, Y.-T., Wang, J.-Y., Miller, S. A., Chiou, S.-H., Hung, M.-C., & Hung, S.-C. (2012). Survival of Cancer Stem Cells under Hypoxia and Serum Depletion via Decrease in PP2A Activity and Activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27. *PLoS ONE*, *7*(11).

Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T. et al. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *15*(13), 2087-2097.

Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H. et al. (2014). Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer cell*, *26*(1), 106-120.

Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N. et al. (2003). Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Human Molecular Genetics*, *12*(21), 2853-2861.

Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y., & Duan, D. (2014). Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. *Human Gene Therapy*, *25*(6), 552-562.

Lu, Q., Cirak, S., & Partridge, T. (2014). What Can We Learn From Clinical Trials of Exon Skipping for DMD? *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *3*(3), e152.

Lu, Y., Lee, B., King, R. W., Finley, D., & Kirschner, M. W. (2015). Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6231), 1250834.

Lüders, J., Demand, J., & Höhfeld, J. (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 4613-4617.

Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, *121*(2), 179-193.

Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P., & Poüs, C. (2013). Autophagy and microtubules - new story, old players. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 5), 1071-1080.

Maddala, R., & Rao, V. P. (2005). alpha-Crystallin localizes to the leading edges of migrating lens epithelial cells. *Experimental Cell Research*, *306*(1), 203-215.

Madonna, G., Ullman, C. D., Gentilcore, G., Palmieri, G., & Ascierto, P. A. (2012). NF-κB as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of Translational Medicine*, *10*, 53.

Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P. et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*, *26*(10), 2527-2539.

Malik, V., Rodino-Klapac, L. R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R.et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, *67*(6), 771-780.

Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A. et al.(2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle*, *1*, 34.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P. et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, *6*(6), 458-471.

Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T. et al. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Molecular Cell*, *10*(1), 35-44.

Manzini, M. C., Tambunan, D. E., Hill, R. S., Yu, T. W., Maynard, T. M., Heinzen, E. L. et al. (2012). Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *91*(3), 541-547.

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M. et al. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metabolism*, *10*(6), 507-515.

Massouridès, E., Polentes, J., Mangeot, P.-E., Mournetas, V., Nectoux, J., Deburgrave, N. et al. (2015). Dp412e: a novel human embryonic dystrophin isoform induced by BMP4 in early differentiated cells. *Skeletal Muscle*, *5*, 40.

Matsumoto, M., & Fujimoto, H. (1990). Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *166*(1), 43-49.

Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D. et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, *21*(24), 6820-6831.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *9*, 493-495.

Mayer, U., Saher, G., Fässler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H et al., (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nature Genetics*, *17*(3), 318-323.

Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & Development*, *10*(10), 1173-1183.

Melià, M. J., Kubota, A., Ortolano, S., Vílchez, J. J., Gámez, J., Tanji, K. et al. (2013). Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain*, *136*(5), 1508-1517.

Memmott, R. M., & Dennis, P. A. (2010). The role of the Akt/mTOR pathway in tobacco-carcinogen induced lung tumorigenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(1), 4-10.

MESSINA, S., VITA, G. L., AGUENNOUZ, M., SFRAMELI, M., ROMEO, S., RODOLICO, C., & VITA, G. (2011). Activation of NF-kB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myologica*, *30*(1), 16-23.

Min, M., Mevissen, T. E. T., De Luca, M., Komander, D., & Lindon, C. (2015). Efficient APC/C substrate degradation in cells undergoing mitotic exit depends on K11 ubiquitin linkages. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(24), 4325-4332.

Minetti, G. C., Colussi, C., Adami, R., Serra, C., Mozzetta, C., Parente, V. et al. (2006). Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nature Medicine*, *12*(10), 1147-1150.

Minoia, M., Boncoraglio, A., Vinet, J., Morelli, F. F., Brunsting, J. F., Poletti, A. et al. (2014). BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy*, *10*(9), 1603-1621.

Miranda, A. F., Bonilla, E., Martucci, G., Moraes, C. T., Hays, A. P., & Dimauro, S. (1988). Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. *The American Journal of Pathology*, *132*(3), 410-416.

Mitsuhashi, S., Ohkuma, A., Talim, B., Karahashi, M., Koumura, T., Aoyama, C. et al. (2011). A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *American Journal of Human Genetics*, *88*(6), 845-851.

Mitzelfelt, K. A., Limphong, P., Choi, M. J., Kondrat, F. D. L., Lai, S., Kolander, K. D. et al. (2016). The Human 343delT HSPB5 Chaperone Associated with Early-onset Skeletal Myopathy Causes Defects in Protein Solubility. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(29), 14939-14953.

Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 823-830.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D. et al. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, *395*(6700), 395-398.

Mizzen, L., Chang, C., I Garrels, J., & J Welch, W. (1990). Identification, characterization, and purification of two mammalian stres proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *The Journal of biological chemistry*, *264*, 20664-75.

Moghadaszadeh, B., Petit, N., Jaillard, C., Brockington, M., Quijano Roy, S., Merlini, L. et al. (2001). Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nature Genetics*, *29*(1), 17-18.

Mollapour, M., & Neckers, L. (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1823*(3), 648-655.

Molza, A.-E., Mangat, K., Le Rumeur, E., Hubert, J.-F., Menhart, N., & Delalande, O. (2015). Structural Basis of Neuronal Nitric-oxide Synthase Interaction with Dystrophin Repeats 16 and 17. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(49), 29531-29541.

Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., & Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, *323*(6089), 646-650.

Morreale, F. E., & Walden, H. (2016). Types of Ubiquitin Ligases. *Cell*, *165*(1), 248-248.e1.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1793*(9), 1524-1532.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1793*(9), 1524-1532.

Moyano, J. V., Evans, J. R., Chen, F., Lu, M., Werner, M. E., Yehiely, F. et al. (2006). αB-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(1), 261-270.

Muntoni, F., Brockington, M., Godfrey, C., Ackroyd, M., Robb, S., Manzur, A. et al. (2007). Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. *Acta Myologica: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology*, *26*(3), 129-135.

Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., & Gusev, N. B. (2011). Large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1123-1159.

Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R. et al. (1996). Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, *12*(3), 254-259.

Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Shanthakumar, S., Linetsky, M., Padmanabha, S., Pasupuleti, N., … Biswas, A. (2012). Acetylation of αA-crystallin in the human lens: effects on structure and chaperone function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1822*(2), 120-129.

Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M. et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine*, *13*(5), 619-624.

Nakamura, N., Matsuura, A., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997). Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biochemistry*, *121*(2), 338-344.

Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Cell Science*, *130*(7), 1209-1216.

NIGRO, V., & SAVARESE, M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myologica*, *33*(1), 1-12.

Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S. et al. (2013). Aβ secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Reports*, *5*(1), 61-69.

Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A. et al. (2012). Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *20*(1), 168-177.

Nivon, M., Abou-Samra, M., Richet, E., Guyot, B., Arrigo, A.-P., & Kretz-Remy, C. (2012). NF-κB regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 5), 1141-1151.

Nivon, M., Fort, L., Muller, P., Richet, E., Simon, S., Guey, B. et al. (2016). NFκB is a central regulator of protein quality control in response to protein aggregation stresses via autophagy modulation. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(11), 1712-1727.

Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.-P., & Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy*, *5*(6), 766-783.

Odom, G. L., Gregorevic, P., Allen, J. M., Finn, E., & Chamberlain, J. S. (2008). Microutrophin delivery through rAAV6 increases lifespan and improves muscle function in dystrophic dystrophin/utrophin-deficient mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *16*(9), 1539-1545.

O'Grady, G. L., Best, H. A., Oates, E. C., Kaur, S., Charlton, A., Brammah, S. et al. (2015). Recessive ACTA1 variant causes congenital muscular dystrophy with rigid spine. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *23*(6), 883-886.

Okada, T., & Takeda, S. (2013). Current Challenges and Future Directions in Recombinant AAV-Mediated Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *6*(7), 813-836.

Olzmann, J. A., Li, L., Chudaev, M. V., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D., & Chin, L.-S. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *The Journal of Cell Biology*, *178*(6), 1025-1038.

Orr, R., & Fiatarone Singh, M. (2004). The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders: review of efficacy and safety. *Drugs*, *64*(7), 725-750.

Oshita, S. E., Chen, F., Kwan, T., Yehiely, F., & Cryns, V. L. (2010). The small heat shock protein HspB2 is a novel anti-apoptotic protein that inhibits apical caspase activation in the extrinsic apoptotic pathway. *Breast cancer research and treatment*, *124*(2), 307-315.

Otterson, G. A., Flynn, G. C., Kratzke, R. A., Coxon, A., Johnston, P. G., & Kaye, F. J. (1994). Stch encodes the « ATPase core » of a microsomal stress 70 protein. *The EMBO Journal*, *13*(5), 1216-1225.

Paepe, B. D., Creus, K. K., Weis, J., & Bleecker, J. L. D. (2012). Heat shock protein families 70 and 90 in Duchenne muscular dystrophy and inflammatory myopathy: balancing muscle protection and destruction. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *22*(1), 26-33.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, *18*(49), 6853-6866.

Pai, J.-T., Hsu, C.-Y., Hua, K.-T., Yu, S.-Y., Huang, C.-Y., Chen, C.-N. et al. (2015). NBM-T-BBX-OS01, Semisynthesized from Osthole, Induced G1 Growth Arrest through HDAC6 Inhibition in Lung Cancer Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(5), 8000-8019.

Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C. et al. (2000). Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, *19*(16), 1975-1981.

Pasquier, C., Vazdar, M., Forsman, J., Jungwirth, P., & Lund, M. (2017). Anomalous Protein-Protein Interactions in Multivalent Salt Solution. *The Journal of Physical Chemistry. B*, *121*(14), 3000-3006.

Patnaik, A., Chau, V., & Wills, J. W. (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(24), 13069-13074.

Patterson, C., & Höhfeld, J. (2007). Molecular Chaperones and the Ubiquitin–Proteasome System. In R. Johnyer, A. J. Ciechanover, & rtin Rechsteiner (Éd.), *Protein Degradation Series* (p. 1-30). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N. et al. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*(6), 927-939.

Pearl, L. H., & Prodromou, C. (2006). Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 271-294.

Pham, A. D., & Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5488), 2357-2360.

Pirkkala, L., Nykänen, P., & Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(7), 1118-1131.

Plantié, E., Migocka-Patrzałek, M., Daczewska, M., & Jagla, K. (2015). Model organisms in the fight against muscular dystrophy: lessons from drosophila and Zebrafish. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(4), 6237-6253.

Ponnusamy, S., Sullivan, R. D., You, D., Zafar, N., He Yang, C., Thiyagarajan, T. et al. (2017). Androgen receptor agonists increase lean mass, improve cardiopulmonary functions and extend survival in preclinical models of Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *26*(13), 2526-2540.

Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A. et al. (2013). Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Human Gene Therapy*, *24*(7), 692-701.

Pratt, W. B. (1998). The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *217*(4), 420-434.

Pridgeon, J. W., Olzmann, J. A., Chin, L.-S., & Li, L. (2007). PINK1 Protects against Oxidative Stress by Phosphorylating Mitochondrial Chaperone TRAP1. *PLoS Biology*, *5*(7).

Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., & Jung, Y.-K. (2013). The Interplay between Autophagy and Aging. *Diabetes & Metabolism Journal*, *37*(5), 333-339.

Raben, N., Hill, V., Shea, L., Takikita, S., Baum, R., Mizushima, N. et al. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Human Molecular Genetics*, *17*(24), 3897-3908.

Ramos, F. J., Chen, S. C., Garelick, M. G., Dai, D.-F., Liao, C.-Y., Schreiber, K. H. et al. (2012). Rapamycin Reverses Elevated mTORC1 Signaling in Lamin A/C–Deficient Mice, Rescues Cardiac and Skeletal Muscle Function, and Extends Survival. *Science translational medicine*, *4*(144), 144ra103.

Randow, F., & Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature Cell Biology*, *3*(10), 891-896.

Rane, M. J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D. W., Wu, R., Cummins, T. et al. (2003). Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(30), 27828-27835.

Rapino, F., Jung, M., & Fulda, S. (2014). BAG3 induction is required to mitigate proteotoxicity via selective autophagy following inhibition of constitutive protein degradation pathways. *Oncogene*, *33*(13), 1713-1724.

Rashmi, R., Pillai, S. G., Vijayalingam, S., Ryerse, J., & Chinnadurai, G. (2008). BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene*, *27*(10), 1366-1375.

Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell*, *6*(1), 79-90.

Relizani, K., Mouisel, E., Giannesini, B., Hourdé, C., Patel, K., Morales Gonzalez, S. et al. (2014). Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *22*(8), 1423-1433.

Ricotti, V., Ridout, D. A., Scott, E., Quinlivan, R., Robb, S. A., Manzur, A. Y. et al. (2013). Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *84*(6), 698-705.

Rigamonti, D., Bauer, J. H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C. et al. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(10), 3705-3713.

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., & Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of Procaspase-9 Processing. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 14545-14548.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, *18*(12), 571-573.

Roberts, C. J. (2007). Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, *98*(5), 927-938.

Robzyk, K., Recht, J., & Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5452), 501-504.

Romero, N. B. (2010). Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *20*(4), 223-228.

Rumeur, E. L. (2015). Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, *15*(3), 14-20.

Rüßmann, F., Stemp, M. J., Mönkemeyer, L., Etchells, S. A., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2012). Folding of large multidomain proteins by partial encapsulation in the chaperonin TRiC/CCT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(52), 21208-21215.

Rusten, T. E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L. M. W., Nezis, I. P., Sem-Jacobsen, C. et al. (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Current Biology: CB*, *17*(20), 1817-1825.

Safieh, L. A., Khan, A. O., & Alkuraya, F. S. (2009). Identification of a novel CRYAB mutation associated with autosomal recessive juvenile cataract in a Saudi family. *Molecular Vision*, *15*, 980-984.

Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S. A., Iannaccone, S. T., Stull, J. T., Thomas, G. D., & Victor, R. G. (2000). Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(25), 13818-13823.

Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P., & Bonaldo, P. (2013). Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 23), 5325-5333.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5712), 1098-1101.

Sato, K., Yokota, T., Ichioka, S., Shibata, M., & Takeda, S. (2008). Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myologica*, *27*(1), 30-36.

Schindler, R. F. R., Scotton, C., Zhang, J., Passarelli, C., Ortiz-Bonnin, B., Simrick, S. et al. (2016). POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(1), 239-253.

Schram, G., Fournier, A., Leduc, H., Dahdah, N., Therien, J., Vanasse, M., & Khairy, P. (2013). All-cause mortality and cardiovascular outcomes with prophylactic steroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology*, *61*(9), 948-954.

Selsby, J. T., Ross, J. W., Nonneman, D., & Hollinger, K. (2015). Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR Journal*, *56*(1), 116-126.

Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, *46*(5), 705-716.

Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., & Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 4788-4793.

Shcherbata, H. R., Yatsenko, A. S., Patterson, L., Sood, V. D., Nudel, U., Yaffe, D. et al. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy. *The EMBO Journal*, *26*(2), 481-493.

Shi, B., Grahn, J. C., Reilly, D. A., Dizon, T. C., & Isseroff, R. R. (2008). Responses of the 27-kDa heat shock protein to UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Experimental Dermatology*, *17*(2), 108-114.

Sica, V., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Izzo, V., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2015). Organelle-Specific Initiation of Autophagy. *Molecular Cell*, *59*(4), 522-539.

Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., & Barnard, P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science (New York, N.Y.)*, *244*(4912), 1578-1580.

Simon, S., Fontaine, J.-M., Martin, J. L., Sun, X., Hoppe, A. D., Welsh, M. J. et al. (2007). Myopathy-associated alphaB-crystallin mutants: abnormal phosphorylation, intracellular location, and interactions with other small heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(47), 34276-34287.

Simon, S., Michiel, M., Skouri-Panet, F., Lechaire, J. P., Vicart, P., & Tardieu, A. (2007). Residue R120 is essential for the quaternary structure and functional integrity of human alphaB-crystallin. *Biochemistry*, *46*(33), 9605-9614.

Sinadinos, A., Young, C. N. J., Al-Khalidi, R., Teti, A., Kalinski, P., Mohamad, S. et al. (2015). P2RX7 purinoceptor: a therapeutic target for ameliorating the symptoms of duchenne muscular dystrophy. *PLoS Medicine*, *12*(10), e1001888.

Singh, B. N., Rao, K. S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N., & Rao, C. M. (2007). Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *Journal of Molecular Biology*, *366*(3), 756-767.

Singh, S. M., Kongari, N., Cabello-Villegas, J., & Mallela, K. M. G. (2010). Missense mutations in dystrophin that trigger muscular dystrophy decrease protein stability and lead to cross-beta aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15069-15074.

Sparks, S. E., & Krasnewich, D. M. (1993). Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation and Multiple Pathway Overview. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, H. C. Mefford, … N. Ledbetter (Éd.), *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Spaulding, H. R., Kelly, E. M., Quindry, J. C., Sheffield, J. B., Hudson, M. B., & Selsby, J. T. (2017). Autophagic dysfunction and autophagosome escape in the mdx mus musculus model of Duchenne muscular dystrophy. *Acta Physiologica (Oxford, England)*.

Spencer, M. J., & Tidball, J. G. (2001). Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscular Disorders: NMD*, *11*(6-7), 556-564.

Spitali, P., Grumati, P., Hiller, M., Chrisam, M., Aartsma-Rus, A., & Bonaldo, P. (2013). Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice. *PLoS Currents*, *5*.

Sroka, K., Voigt, A., Deeg, S., Reed, J. C., Schulz, J. B., Bähr, M., & Kermer, P. (2009). BAG1 modulates huntingtin toxicity, aggregation, degradation, and subcellular distribution. *Journal of Neurochemistry*, *111*(3), 801-807.

Steffen, L. S., Guyon, J. R., Vogel, E. D., Beltre, R., Pusack, T. J., Zhou, Y. et al. (2007). Zebrafish orthologs of human muscular dystrophy genes. *BMC Genomics*, *8*, 79.

Stelter, P., & Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, *425*(6954), 188-191.

Stephanou, A., & Latchman, D. S. (2011). Transcriptional Modulation of Heat-Shock Protein Gene Expression. *Biochemistry Research International*, *2011*.

Sternlicht, H., Farr, G. W., Sternlicht, M. L., Driscoll, J. K., Willison, K., & Yaffe, M. B. (1993). The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(20), 9422-9426.

Stevens, E., Carss, K. J., Cirak, S., Foley, A. R., Torelli, S., Willer, T. et al. (2013). Mutations in B3GALNT2 Cause Congenital Muscular Dystrophy and Hypoglycosylation of α-Dystroglycan. *The American Journal of Human Genetics*, *92*(3), 354-365.

Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palù, G., & Göttlinger, H. G. (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(24), 13063-13068.

Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Waye, M. M. et al. (2000). Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(2), 1095-1104.

Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Research*, *21*(1), 71-85.

Sur, R., Lyte, P. A., & Southall, M. D. (2008). Hsp27 regulates pro-inflammatory mediator release in keratinocytes by modulating NF-kappaB signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*, *128*(5), 1116-1122.

Tabebordbar, M., Wang, E. T., & Wagers, A. J. (2013). Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair. *Annual Review of Pathology*, *8*, 441-475.

Tai, H.-C., & Schuman, E. M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(11), 826-838.

Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeleshwar, G. H., Singh, S., & Aggarwal, B. B. (2003). Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 24233-24241.

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y. et al. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, *9*(10), 1142-1151.

Tan, J. M. M., Wong, E. S. P., Kirkpatrick, D. S., Pletnikova, O., Ko, H. S., Tay, S.-P. et al. (2008). Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*, *17*(3), 431-439.

Tan, Q., Joshua, A. M., Wang, M., Bristow, R. G., Wouters, B. G., Allen, C. J., & Tannock, I. F. (2017). Up-regulation of autophagy is a mechanism of resistance to chemotherapy and can be inhibited by pantoprazole to increase drug sensitivity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *79*(5), 959-969.

Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, *85*(1), 12-36.

Tang, Z. Z., Yarotskyy, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K. et al. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Human Molecular Genetics*, *21*(6), 1312-1324.

Taylor, R. C., & Dillin, A. (2011). Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(5).

Thompson, T. G., Chan, Y.-M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G. W. et al. (2000). Filamin 2 (Fln2). *The Journal of Cell Biology*, *148*(1), 115-126.

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, *19*(1), 94-102.

Tidball, J. G. (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *27*(7), 1022-1032.

Tjondrokoesoemo, A., Schips, T. G., Sargent, M. A., Vanhoutte, D., Kanisicak, O., Prasad, V. et al. (2016). Cathepsin S Contributes to the Pathogenesis of Muscular Dystrophy in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(19), 9920-9928.

Tőkési, N., Lehotzky, A., Horváth, I., Szabó, B., Oláh, J., Lau, P., & Ovádi, J. (2010). TPPP/p25 Promotes Tubulin Acetylation by Inhibiting Histone Deacetylase 6. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17896-17906.

Trimarchi, F., Favaloro, A., Fulle, S., Magaudda, L., Puglielli, C., & Di Mauro, D. (2006). Culture of human skeletal muscle myoblasts: timing appearance and localization of dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin complex. *Cells, Tissues, Organs*, *183*(2), 87-98.

Tsukahara, F., & Maru, Y. (2010). Bag1 directly routes immature BCR-ABL for proteasomal degradation. *Blood*, *116*(18), 3582-3592.

Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., & Höhfeld, J. (2015). Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy*, *11*(3), 538-546.

Ulbricht, A., & Höhfeld, J. (2013). Tension-induced autophagy: may the chaperone be with you. *Autophagy*, *9*(6), 920-922.

Van Delft, S., Govers, R., Strous, G. J., Verkleij, A. J., & van Bergen en Henegouwen, P. M. (1997). Epidermal growth factor induces ubiquitination of Eps15. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14013-14016.

Van den Boogaard, M. L., Lemmers, R. J. L. F., Balog, J., Wohlgemuth, M., Auranen, M., Mitsuhashi, S. et al. (2016). Mutations in DNMT3B Modify Epigenetic Repression of the D4Z4 Repeat and the Penetrance of Facioscapulohumeral Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, *98*(5), 1020-1029.

Van Rijk, A. F., & Bloemendal, H. (2000). Alpha-B-crystallin in neuropathology. *Ophthalmologica. Journal International D'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Fur Augenheilkunde*, *214*(1), 7-12.

Vanderplanck, C., Ansseau, E., Charron, S., Stricwant, N., Tassin, A., Laoudj-Chenivesse, D. et al. (2011). The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PloS One*, *6*(10), e26820.

Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prévost, M. C., Faure, A. et al. (1998). A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics*, *20*(1), 92-95.

Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H. H. (2008). Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*, *47*(27), 7001-7011.

Vos, M. J., Zijlstra, M. P., Carra, S., Sibon, O. C. M., & Kampinga, H. H. (2011). Small heat shock proteins, protein degradation and protein aggregation diseases. *Autophagy*, *7*(1), 101-103.

Vos, M. J., Zijlstra, M. P., Kanon, B., van Waarde-Verhagen, M. A. W. H., Brunt, E. R. P., Oosterveld-Hut, H. M. J. et al. (2010). HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Human Molecular Genetics*, *19*(23), 4677-4693.

Wallace, E. W. J., Kear-Scott, J. L., Pilipenko, E. V., Schwartz, M. H., Laskowski, P. R., Rojek, A. E. et al. (2015). Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress. *Cell*, *162*(6), 1286-1298.

Walther, D. M., Kasturi, P., Zheng, M., Pinkert, S., Vecchi, G., Ciryam, P. et al. (2015). Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging C. elegans. *Cell*, *161*(4), 919-932.

Wan, T., Zhou, X., Chen, G., An, H., Chen, T., Zhang, W. et al. (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood*, *103*(5), 1747-1754.

Wang, W., Nema, S., & Teagarden, D. (2010). Protein aggregation--pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics*, *390*(2), 89-99.

Wang, X., Klevitsky, R., Huang, W., Glasford, J., Li, F., & Robbins, J. (2003). AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circulation Research*, *93*(10), 998-1005.

Wang, Y., Li, L., Hou, C., Lai, Y., Long, J., Liu, J. et al. (2016). SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *60*, 97-104.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, *30*(6), 678-688.

Weidberg, H., Shvets, E., & Elazar, Z. (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 125-156.

Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, *29*(11), 1792-1802.

Wersinger, E., Bordais, A., Schwab, Y., Sene, A., Bénard, R., Alunni, V. et al. (2011). Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(11), 7901-7908.

Winder, S. J., Lipscomb, L., Angela Parkin, C., & Juusola, M. (2011). The proteasomal inhibitor MG132 prevents muscular dystrophy in zebrafish. *PLoS Currents*, *3*, RRN1286.

Wolfe, D. M., Lee, J.-H., Kumar, A., Lee, S., Orenstein, S. J., & Nixon, R. A. (2013). Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *The European Journal of Neuroscience*, *37*(12), 1949-1961.

Woodard, D., Bell, D., Tipton, D., Durrance, S., Burnett, L. C., Cole, L. et al. (2014). Gel formation in protein amyloid aggregation: a physical mechanism for cytotoxicity. *PloS One*, *9*(4), e94789.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D. et al. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology: CB*, *13*(22), 2004-2008.

Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, W. L., & Liu, L. (2010). Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biology*, *11*, 89.

Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, *9*(10), 1102-1109.

Xu, L., Park, K. H., Zhao, L., Xu, J., El Refaey, M., Gao, Y. et al. (2016). CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *24*(3), 564-569.

Yam, A. Y., Xia, Y., Lin, H.-T. J., Burlingame, A., Gerstein, M., & Frydman, J. (2008). Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(12), 1255-1262.

Yamaguchi, T., Arai, H., Katayama, N., Ishikawa, T., Kikumoto, K., & Atomi, Y. (2007). Age-related increase of insoluble, phosphorylated small heat shock proteins in human skeletal muscle. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *62*(5), 481-489.

Yang, H., & Hu, H.-Y. (2016). Sequestration of cellular interacting partners by protein aggregates: implication in a loss-of-function pathology. *The FEBS Journal*, *283*(20), 3705-3717.

Yang, K., Meinhardt, A., Zhang, B., Grzmil, P., Adham, I. M., & Hoyer-Fender, S. (2012). The small heat shock protein ODF1/HSPB10 is essential for tight linkage of sperm head to tail and male fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(1), 216-225.

Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., & Hotamisligil, G. S. (2010). Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell metabolism*, *11*(6), 467-478.

Yoshida, K., Aki, T., Harada, K., Shama, K. M., Kamoda, Y., Suzuki, A., & Ohno, S. (1999). Translocation of HSP27 and MKBP in ischemic heart. *Cell Structure and Function*, *24*(4), 181-185.

Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M. E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F. et al. (2013). SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6148), 896-899.

Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S. et al. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 18), 3888-3900.

Yum, K., Wang, E. T., & Kalsotra, A. (2017). Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *44*, 30-37.

Zammit, P. S., Partridge, T. A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *54*(11), 11771191.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B. et al. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(16), 10892-10903.

Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N. F., Davies, J. D., Wasner, C., Feuer, A. et al. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Human Molecular Genetics*, *16*(23), 2816-2833.

Zhang, Y., Wang, J., Ji, H., Lu, H., Lu, L., Wang, J., & Li, Y. (2017). Effect of HSP27 and Cofilin in the injury of hypoxia/reoxygenation on hepatocyte membrane F-actin microfilaments. *Medicine*, *96*(16), e6658.

Zhang, Y., Zhu, Y., Li, Y., Cao, J., Zhang, H., Chen, M. et al. (2015). Long-term engraftment of myogenic progenitors from adipose-derived stem cells and muscle regeneration in dystrophic mice. *Human Molecular Genetics*, *24*(21), 6029-6040.

Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T. et al. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, *11*(4), 468-476.

Zhou, C., Slaughter, B. D., Unruh, J. R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K. et al. (2014). Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell*, *159*(3), 530-542.

Zhu, D., Dix, D. J., & Eddy, E. M. (1997). HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development (Cambridge, England)*, *124*(15), 3007-3014.

Zou, Y., Zwolanek, D., Izu, Y., Gandhy, S., Schreiber, G., Brockmann, K. et al. (2014). Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, *23*(9), 2339-2352.