



HAL
open science

Le rôle des Annexines dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines

Coralie Croissant

► **To cite this version:**

Coralie Croissant. Le rôle des Annexines dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0316 . tel-02464307

HAL Id: tel-02464307

<https://theses.hal.science/tel-02464307>

Submitted on 3 Feb 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET
PHYSIOPATHOLOGIE**
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Coralie Croissant

**LE RÔLE DES ANNEXINES DANS LA REPARATION
MEMBRANAIRE DES CELLULES MUSCULAIRES
SQUELETTIQUES HUMAINES**

Sous la direction de : Anthony BOUTER

Soutenue le 09 décembre 2019

Membres du jury :

Mme BAYER, Emmanuelle

Mme BONNE, Gisèle

Mme CHASSEROT-GOLAZ, Sylvette

M. AUGUSTE, Patrick

Directrice de recherche CNRS-Université de Bordeaux

Directrice de recherche INSERM-Sorbonne Université

Chargée de recherche CNRS-Neuropôle de Strasbourg

Maître de conférences Université de Bordeaux

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Invité

Titre : Les Annexines dans la réparation membranaire des cellules musculaires humaines

Résumé :

Les dystrophies musculaires sont un groupe de pathologies génétiques qui cause une faiblesse et une perte progressive des muscles squelettiques. Parmi elles, la dystrophie des ceintures de type 2B (LGMD2B) est caractérisée par des mutations dans le gène codant la dysferline, entraînant de sévères dysfonctionnements, dont un défaut de réparation membranaire. Les ruptures de la membrane plasmique sont des évènements physiologiques induits par des contraintes mécaniques, comme lors de la contraction des fibres musculaires. Les cellules eucaryotes possèdent donc une machinerie protéique assurant une réparation rapide de larges ruptures membranaires. La liste exhaustive des composants de la machinerie de réparation et leur mode d'action reste à établir.

Les annexines (Anx) sont de petites protéines solubles, au nombre de 12 chez les mammifères, qui partagent la propriété de lier les membranes exposant des phospholipides chargés négativement en présence de calcium (Ca^{2+}). De nombreuses études ont montré l'implication de certaines Anx (AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7) dans la réparation membranaire de différents types cellulaires (muscle, cancer, endothélium...) et dans différentes espèces (souris, poisson-zèbre, homme...). La présence des Anx dans le muscle squelettique, et la participation de plusieurs membres de la famille des Anx dans la réparation membranaire, soulèvent la question d'un rôle collectif de ces protéines dans la protection et la réparation des ruptures du sarcolemme.

Les objectifs de ce travail ont été 1) d'identifier les Anx impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines, 2) développer une stratégie de microscopie corrélative pour étudier le site de rupture et la distribution subcellulaire des Anx à haute résolution, 3) élucider la fonction des Anx dans le mécanisme de réparation, et 4) analyser les Anx dans des cellules musculaires dystrophiques. Avec des approches en biologie cellulaire et moléculaire, et en microscopie de fluorescence et électronique à transmission, nous avons donc étudié le comportement des Anx lors d'un dommage du sarcolemme.

Nous avons ainsi montré que les AnxA1, A2, A4, A5 et A6 sont exprimées dans les myoblastes et les myotubes humains, et sont recrutées au site de rupture quelques secondes après le dommage, en formant une structure dense à l'extérieur du myotube endommagé appelé

domaine « cap ». De plus, nous avons pu déterminer l'ordre relatif de recrutement des Anx au site membranaire endommagé. Les premières Anx à être recrutées sont l'AnxA1, suivies des AnxA6 et A5, les moins sensibles au Ca^{2+} . Les dernières Anx recrutées sont les plus sensibles au Ca^{2+} , les AnxA4 puis A2. Elles semblent se lier en revanche à des vésicules intracellulaires initialement éloignées du site de rupture. Nous avons également étudié l'ultrastructure du site de rupture à haute résolution. Nos résultats ont révélé que le domaine « cap » correspondait à une accumulation de matériel membranaire qui est associé au Anx. En s'appuyant sur nos résultats et la littérature, nous avons proposé un modèle de réparation membranaire, impliquant les AnxA1, A2, A4, A5 et A6, dans les cellules musculaires striées squelettiques humaines. Nous nous sommes également intéressés à l'expression des Anx dans des lignées de cellules musculaires dystrophiques issues de patients atteints de dystrophies musculaires des ceintures de type 2B (déficients en dysferline) et 1C (déficients en cavéoline-3). Nous avons ainsi montré que le contexte pathologique perturbait l'expression de certaines Anx, sans en modifier leur localisation subcellulaire.

En conclusion, ce travail de thèse montre que plusieurs membres de la famille des Anx sont impliqués dans la réparation membranaire, et agissent de concert pour réparer un dommage de la membrane plasmique. L'implication des Anx dans d'autres pathologies, comme le cancer et la pré-éclampsie, renforce l'intérêt de leur étude dans les processus de réparation membranaire et en font une cible thérapeutique potentielle.

Mots clés : [3 minimum]

Annexines ; réparation membranaire ; muscle squelettique ; microscopie électronique ; dystrophie musculaire ; humain

Title: Annexins in membrane repair of human muscle cells

Abstract:

Muscular dystrophy encompasses a group of genetic disorders which cause progressive weakness and wasting of skeletal muscle. Among them, limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) is characterized by mutations in the dysferlin gene leading to several dysfunctions including a failure in cell membrane repair process. Cell membrane disruption is a physiological phenomenon induced by mechanical stress, such as contraction of muscle fibers. Thus, eukaryotic cells have a repair protein machinery ensuring a rapid resealing of large cell membrane ruptures. The exhaustive list of components of the repair machinery and their interplay remain to be established.

The annexin (Anx) family consists of twelve soluble proteins in mammals and share the property of binding to membranes exposing negatively charged phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner. Several studies have shown the involvement of Anx (AnxA1, A2, A4, A5, A6 and A7) in membrane repair of different cell types (muscle, cancer, endothelium...) in different species (mouse, zebrafish, human...). The presence of different Anx in skeletal muscle, together with the participation of several members of the Anx family in membrane repair processes, raise the question of a collective role of these proteins in the protection and repair of sarcolemma injuries.

The PhD project aimed 1) at identifying Anx that are essential for membrane repair in human skeletal muscle cells, 2) developing a correlative light and electron microscopy to study the wounded site and the Anx distribution at high resolution, 3) elucidating the function of each Anx in this process and 4) analyzing Anx in dystrophic muscle cells. Using approaches including cellular and molecular biology, fluorescence microscopy and transmission electron microscopy, we studied the behavior of Anx during sarcolemma damage.

We showed that AnxA1, A2, A4, A5 and A6 are expressed in human myoblasts and myotubes and are recruited at the disruption site within seconds after the sarcolemmal damage, forming a dense structure outside the cell, named the “cap” domain. Furthermore, we determined the relative order of Anx recruitment at the disruption site. The first Anx recruited are AnxA1, followed by AnxA6 and A5, the less sensitive to Ca^{2+} . The last Anx recruited are the most sensitive to Ca^{2+} , AnxA4 and A2. AnxA2 and A4 are instead rapidly recruited to intracellular vesicles present deeper in the cytosol. We also studied the ultrastructure of the disruption site

at high resolution. Our results revealed that the “cap” domain correspond to a disorganized membrane structure, associated with the Anx. Thanks to our results and the literature, we have proposed a model for membrane repair involving Anx in human skeletal muscle cells. We also looked at the expression of Anx in dystrophic muscle cell lines from patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B (dysferlin deficient) and 1C (deficient in caveoline-3). We have thus shown that the pathological context disrupts the expression of some Anx, without altering their subcellular location.

In conclusion, this work shows that several members of the Anx family are involved in membrane repair and act together to repair plasma membrane damage. The involvement of Anx in other pathologies, such as preeclampsia or cancer, reinforces the interest of their study in the process of membrane repair.

Keywords : [3 minimum]

Annexins; membrane repair; skeletal muscle; electron microscopy; muscular dystrophy; human

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets

UMR 5248 CBMN, équipe Vésicules Extracellulaires et Réparation Membranaire, Bât
14 Allée Geoffroy Saint-Hilaire, 33600 PESSAC

Remerciements

Dans un premier temps, j'aimerais remercier les docteurs Sylvette Chasserot-Golaz et Gisèle Bonne pour avoir accepté le rôle de rapporteur. Je remercie également le docteur Emmanuelle Bayer de faire à nouveau partie du jury après ma présentation de mi-thèse, ainsi que le docteur Patrick Auguste de venir en tant qu'invité.

Je remercie le professeur Alain Brisson de m'avoir donné l'opportunité de travaillé dans son équipe. J'ai vu en vous une personne animée par la passion de la recherche et la soif de connaissance, un expert dans son domaine qui aime partager son savoir tout en étant d'une grande humilité. Je vous admire pour toutes ces qualités.

Je remercie bien évidemment le docteur Anthony Bouter, qui a été un excellent directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance, et ce depuis mon tout premier stage réalisé à la fin de ma Licence 1, celui qui m'a fait découvrir le monde de la recherche. A l'époque, je n'aurais jamais cru être capable de réaliser une thèse, et je me souviens que vous m'aviez dit le contraire. Et finalement me voilà à écrire mon manuscrit, résultat du travail de 3 années au sein de votre équipe. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée et votre disponibilité. Merci pour votre bonne humeur sans faille, même lorsque nos cellules avaient décidé de nous mener la vie dure. Je ne suis pas la première et je ne serai sûrement pas la dernière personne à penser que vous êtes une personne formidable, tant sur le plan professionnel qu'humain. Un grand merci pour cela.

Je remercie également les autres membres de mon équipe, sur qui je pouvais toujours compter en cas de besoin. Merci à Flora Bouvet pour ses conseils, son amitié et nos discussions diverses et variées. Merci à Sisareuth Tan pour son aide lors de mes séances de microscopie électronique, sa bonne humeur au quotidien, et nos discussions autour de la danse et des origamis. Merci à Céline Gounou pour son aide sur ce projet. Je sais que tu as passé beaucoup de temps à construire des plasmides et faire des western-blots à cause de moi.

J'aimerais également remercier le professeur Volker Gerke, de l'Université de Münster en Allemagne, pour nous avoir fourni les constructions plasmidiques qui ont été un outil indispensable à notre étude.

Je remercie également le personnel du Bordeaux Imaging Center (Université de Bordeaux), Christel Poujol et en particulier Sébastien Marais, pour leur aide précieuse lors des (nombreuses) séances d'irradiation laser.

Enfin, je remercie mes parents, qui ont toujours respecté et soutenu mes choix dans la vie, et sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Merci à mon compagnon, Bruno, et mes plus proches amis, Elsa, Ugo, pour votre soutien, vos rires, votre bonne humeur, et ce parfois malgré la distance. Sans vous tous, ces dernières années auraient été beaucoup moins joyeuses.

Sommaire

Introduction.....	1
1. La membrane plasmique	3
A. Présentation.....	3
B. Pourquoi étudier la réparation membranaire ?.....	4
2. Mécanismes de réparation membranaire proposés	5
A. Modèle du « self-sealing ».....	5
B. Modèle de réduction de la tension membranaire.....	6
C. Modèle du « patch » lipidique.....	7
D. Modèle de l'exocytose/endocytose	8
E. Modèle du « membrane shedding ».....	10
3. La machinerie protéique de réparation	11
A. La dysferline	12
B. La cavéoline-3.....	12
C. L'actine	13
4. Les Annexines	15
A. Structure et interaction avec les membranes.....	15
B. Les Annexines dans la réparation membranaire.....	17
i. AnxA1 et A2	17
ii. AnxA4.....	20
iii. AnxA5	21
iv. AnxA6	22
v. AnxA7	23
5. Défaut de réparation membranaire et dystrophie musculaire.....	24
A. Le muscle strié squelettique sain : organisation et contraction.....	25
B. Les dystrophies musculaires.....	28

i.	Les dystrophies musculaires des ceintures	28
ii.	Les dysferlinopathies	31
iii.	Les cavéolinopathies	31
Objectifs.....	33
Matériels et Méthodes.....	33
1. Culture cellulaire.....	37
A.	Lignées cellulaires	37
B.	Milieus de culture.....	37
C.	Entretien des cellules	38
2. Western-blot.....	39
A.	Préparation des extraits protéiques.....	39
B.	Migration et transfert des protéines.....	39
C.	Détection des protéines d'intérêt.....	39
3. Rupture de la membrane plasmique.....	41
A.	Test de réparation membranaire.....	41
B.	CLEM	42
4. Immunocytofluorescence	43
A.	Dans les cellules intactes	43
B.	Dans les cellules endommagées.....	43
C.	Quantification de l'intensité de fluorescence	44
5. Diminution (knock-down) de l'expression des Anx dans les myotubes	44
A.	Les shARN (short hairpin RNA)	44
B.	CRISPR-Cas9.....	47
6. Imagerie en temps réel des Anx couplées à des protéines fluorescentes	48
A.	Amplification et extraction des plasmides.....	48
B.	Expression des Anx couplées à des protéines fluorescentes	51
C.	Expériences de rupture de la membrane plasmique.....	51

7. Analyse statistique	52
Résultats	53
1. Expression et localisation des AnxA1 à A7 endogènes dans les cellules intactes saines....	55
A. Expression.....	55
B. Localisation.....	58
C. Conclusion	58
2. Développements moléculaire, cellulaire et méthodologique.....	59
A. Construction des outils moléculaires et cellulaires nécessaires à l'étude.....	59
i. Etablissement de myotubes déficients en Anx.....	59
ii. Caractérisation des Anx couplées à des protéines fluorescentes	67
B. Développement méthodologique.....	71
i. Dommage membranaire par irradiation laser	71
ii. Microscopie corrélative.....	74
3. Trafic des Anx lors d'un dommage membranaire dans des myotubes sains	76
A. AnxA1-GFP.....	76
B. AnxA2-GFP.....	79
C. AnxA4-GFP.....	81
D. AnxA5-GFP.....	82
E. AnxA6-GFP.....	82
F. Cinétique comparée.....	85
i. AnxA1-mCherry et AnxA6-GFP	85
ii. AnxA2-mCherry et AnxA6-GFP.....	86
iii. AnxA4-mCherry et AnxA6-GFP.....	88
iv. AnxA5-mCherry et AnxA6-GFP.....	90
G. Conclusion	91
4. Observation du site de rupture et localisation des Anx par microscopie électronique à transmission.....	94

A.	Structure du site de rupture.....	94
B.	AnxA1.....	96
C.	AnxA2.....	99
D.	AnxA4.....	102
E.	AnxA6.....	103
F.	Conclusion.....	106
5.	Etude cinétique de la réparation des LHCN sauvages et déficients en Anx.....	108
6.	Expression des Anx dans des cellules musculaires dystrophiques.....	109
A.	Expression comparée des Anx dans les myotubes sains vs les myotubes dystrophiques.....	110
B.	Les cellules déficientes en cavéoline-3.....	112
C.	Les cellules déficientes en dysferline.....	114
D.	Conclusion.....	117
	Discussion.....	119
1.	Intervention et localisation des Anx au site de rupture.....	121
2.	Structure du site de rupture et localisation des Anx à haute résolution.....	123
3.	Mode d'action des Anx dans la réparation membranaire.....	125
4.	Anx et dystrophies musculaires.....	127
5.	Perspectives.....	127
	Bibliographie.....	129
	Annexes.....	161
	Annexe 1.....	163
	Annexe 2.....	179

Abréviations

Ac : anticorps

ANO5 : Anoctamine 5

Anx : Annexine

AnxA1 : Annexine-A1

AnxA2 : Annexine-A2

AnxA3 : Annexine-A3

AnxA4 : Annexine-A4

AnxA5 : Annexine-A5

AnxA6 : Annexine-A6

AnxA7 : Annexine-A7

ARNm : ARN messagers

BSA : Bovine Serum Albumine

Ca²⁺ : calcium

CLEM : Correlative Light and Electron Microscopy

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DMEM : Dubelcco's modified Eagle Medium

DPBS : Dubelcco's Phosphate Buffer Saline

DPBS^{-/-} : DPBS sans calcium ni magnésium

DPBS^{+/+} : DPBS avec calcium et magnésium

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFP : Green Fluorescent Protein

HeLa : Henrietta Lacks

LGMD : Limb Girdle Muscular Dystrophy, ou dystrophie musculaire des ceintures

MDA-MB-231 : M.D. Anderson - Metastatic Breast cancer - 231

MET : microscopie électronique à transmission

PS : phosphatidylsérine

PVDF : polyfluorure de vinylidène

shARN : small hairpin RNA, ou petit ARN à structure en épingle à cheveux

sgRNA : small guide RNA, ou petit ARN guide

SLO : Streptolysine-O

SVF : sérum de veau fœtal

TBST : Tris-buffered saline Tween-20

Introduction

1. La membrane plasmique

A. Présentation

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est majoritairement constituée de lipides et de protéines. Sa principale fonction est de séparer le cytosol du milieu extracellulaire, assurant ainsi l'intégrité de la cellule. Les principaux lipides qui la composent sont les glycérophospholipides, la sphingomyéline, et le cholestérol (**Figure 1.1a-c**). La structure des glycérophospholipides et de la sphingomyéline en fait des molécules amphiphiles. En d'autres termes, ces phospholipides possèdent une partie hydrophile, la « tête » polaire, et une partie hydrophobe, la « queue » apolaire, qui permet l'organisation de la membrane sous forme de bicouche lipidique. Les queues hydrophobes sont tournées vers l'intérieur de la bicouche et les têtes polaires vers le milieu aqueux (**Figure 1.1d**). Les glycérophospholipides les plus représentés dans la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

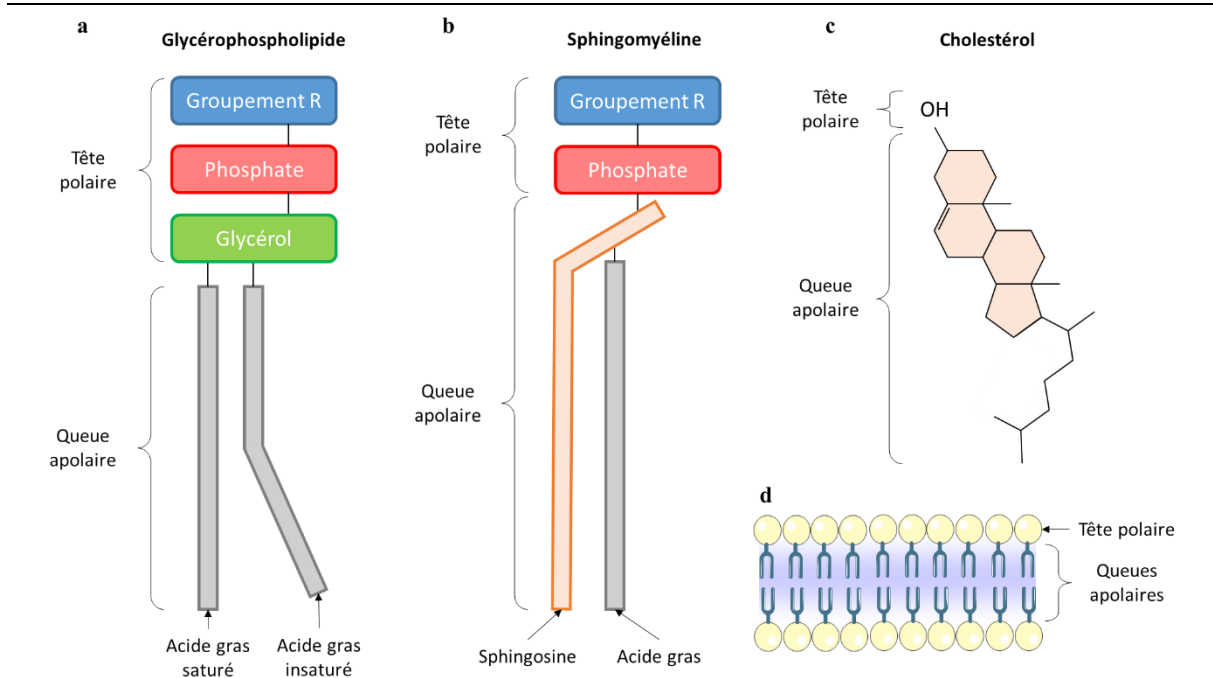


Figure 1.1 : Représentation schématique de la structure des principaux lipides composant la membrane plasmique. (a) Structure générale du glycérophospholipide. Dans la membrane plasmique, les groupements R les plus représentés sont la choline, l'éthanolamine, la sérine, et l'inositol. (b) Structure schématique générale de la sphingomyéline. Le groupement R peut être la choline ou l'éthanolamine. (c) Représentation topologique du cholestérol. (d) Organisation des phospholipides en bicouche. [Image](#) modifiée de [smart.servier.com](#), [CC BY 3.0](#).

Introduction

La composition en lipides et la présence de protéines (trans)membranaires déterminent les propriétés physico-chimiques de la membrane, telles que la fluidité ou la perméabilité. La membrane plasmique est généralement imperméable aux ions et aux petites molécules chargées, mais laisse traverser les petites molécules non chargées telles que l'eau ou l'O₂. La présence d'acides gras insaturés augmente la perméabilité de la membrane en diminuant la densité des phospholipides, tandis que la présence de cholestérol diminue la perméabilité de la membrane en la rigidifiant. La membrane n'est pas une bicouche figée, il existe une diffusion latérale passive des phospholipides au sein des feuillettes. Comme énoncé précédemment, la présence de cholestérol rigidifie la membrane, limitant ainsi la diffusion des phospholipides. En revanche, la diffusion passive d'un phospholipide d'un feuillet à l'autre est très rare, due à la présence de la tête polaire. Pour avoir lieu, ce déplacement nécessite de l'ATP et une enzyme appelée flippase.

Il existe également une asymétrie entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique (Van Meer et al., 2008). De manière générale, les lipides majoritairement présents sur le feuillet externe de la membrane plasmique sont la PC, les sphingomyélines et les glycolipides ([Structure of the Plasma Membrane](#), Cooper, 2000). Le feuillet interne contient principalement la PE, la PS, et le PI. Le cholestérol est quant à lui présent dans les deux feuillettes. Cette asymétrie est très importante pour assurer la fonctionnalité de la membrane. A titre d'exemple, les PI présents sur le feuillet interne permettent la liaison de différentes enzymes nécessaires à certaines voies de signalisation (Van Meer et al., 2008).

Une autre particularité de la membrane plasmique est la présence de radeaux lipidiques, ou microdomaines (Brown and Rose, 1992). Il s'agit de régions de quelques dizaines de μm^2 enrichies en sphingomyélines et en cholestérol, ce qui leur confère une certaine stabilité. Ces microdomaines sont importants pour l'ancrage et/ou l'agrégation de nombreuses protéines membranaires telles que des récepteurs nécessaires à l'initiation de voies de signalisation.

Ainsi, la membrane plasmique est une structure fluide, dynamique et hétérogène, dont la composition lipidique et protéique lui confère des fonctions spécifiques.

B. Pourquoi étudier la réparation membranaire ?

La membrane plasmique est une barrière biologique qui assure l'intégrité de la cellule. Des contraintes mécaniques ou biologiques peuvent endommager la membrane plasmique et la rendre perméable, ce qui peut mener à la perte du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire, mais également à l'entrée de molécules potentiellement toxiques dans la cellule. A terme, une

Introduction

rupture non réparée conduit à la mort cellulaire. De nombreuses cellules sont soumises à des contraintes mécaniques, comme lors de la contraction des cellules musculaires squelettiques et cardiaques (McNeil and Khakee, 1992 ; Clarke et al., 1995), du passage du bol alimentaire sur les cellules épithéliales (McNeil and Ito, 1989), ou encore du flux sanguin sur les cellules endothéliales (Yu and McNeil, 1992). Les cellules peuvent également être soumises à des contraintes biologiques, comme des toxines bactériennes formant des pores dans la membrane plasmique. Les ruptures de la membrane plasmique surviennent fréquemment. Par exemple, il a été montré que 20% des cellules musculaires squelettiques subissent des ruptures pendant une activité physique (McNeil and Khakee, 1992). Les dommages doivent donc être rapidement réparés pour la survie des cellules. En d'autres termes, ces cellules possèdent un mécanisme de réparation membranaire. Un défaut dans ce processus entraîne la mort des cellules endommagées et une dégénérescence tissulaire, et peut contribuer au développement de maladies dégénératives telles que les dystrophies musculaires (Bansal et al., 2003). L'étude de la réparation membranaire a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes possibles, d'identifier certaines protéines impliquées dans le processus, et d'ouvrir la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques.

2. Mécanismes de réparation membranaire proposés

A ce jour, cinq modèles de réparation membranaire sont décrits dans la littérature. Dans ce chapitre, les modèles présentés sont : le « self-sealing » ou réparation spontanée, la réduction de la tension membranaire, le « patch » lipidique, la réparation par exocytose/endocytose, et le « membrane shedding ».

A. Modèle du « self-sealing »

Le modèle du « self-sealing » a vu le jour à partir des observations faites sur des liposomes (bicouche circulaire purement lipidique) et des globules rouges, où une rupture de l'ordre du nm est rapidement réparée (McNeil and Steinhardt, 2003 ; Hoffman, 1992). La particularité de ces deux systèmes est l'absence de noyau et d'organelle. Après un dommage, l'exposition des parties hydrophobes des lipides de la membrane au milieu aqueux entraîne un réarrangement des lipides aux bords de la rupture (**Figure 2.1**). Cette disposition engendre une tension de surface qui favorise le rapprochement des bords de la rupture et sa réparation. Dans les cellules, la présence

Introduction

du cytosquelette cortical génère une tension sur la membrane qui s'oppose à la tension de surface, compromettant ainsi la réparation spontanée (**Figure 2.1**, panel du bas). Il est important de noter que la réparation spontanée des globules rouges a été observée dans des conditions non physiologiques, en absence de calcium (Ca^{2+}). En conditions physiologiques, avec une concentration calcique de l'ordre de 1 mM, les globules rouges sont incapables de réparer des ruptures de l'ordre du nm, alors que des cellules nucléées sont capables de réparer des ruptures plus larges (McNeil and Kirchhausen, 2005). Le modèle du « self-sealing » n'est donc pas applicable aux cellules eucaryotes. La présence d'endomembrane étant la principale différence entre les globules rouges et les autres cellules, cela a mené à l'hypothèse selon laquelle les compartiments intracellulaires sont nécessaires à la réparation membranaire (McNeil et al., 2003).

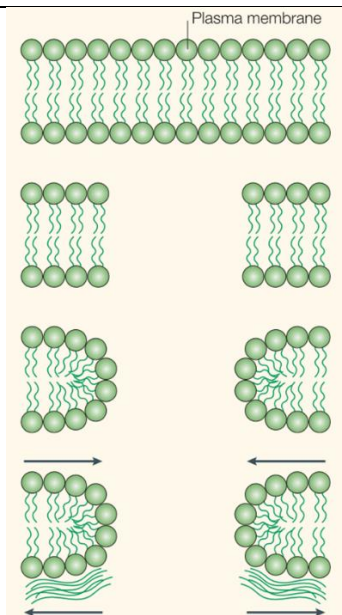


Figure 2.1 : Modèle du « self-sealing ».

Après une rupture de quelques nm, les queues hydrophobes des lipides sont exposées au milieu aqueux et entraînent un réarrangement des lipides aux bords de la rupture. Cette disposition thermodynamiquement défavorable engendre une tension de surface (flèches tournées vers l'intérieur) qui favorise le rapprochement des bords de la rupture, et sa réparation. En revanche, le cytosquelette cortical exerce une force qui s'oppose à la tension de surface (flèches tournées vers l'extérieur), et qui peut donc empêcher la réparation spontanée du dommage. Figure tirée de (McNeil and Kirchhausen, 2005).

B. Modèle de réduction de la tension membranaire

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la tension du cytosquelette cortical s'oppose à la réparation d'un dommage de la membrane plasmique. La réduction de cette tension faciliterait donc la réparation. Le mécanisme proposé repose d'une part sur un processus d'exocytose et d'autre part sur la dépolymérisation de l'actine corticale (McNeil and Steinhardt, 2003). En effet, il a été montré qu'un événement d'exocytose précédait la baisse de la tension membranaire pendant la réparation d'une rupture, et que son inhibition empêchait la réparation (Togo et al., 2000). De plus, l'inhibition

Introduction

de la polymérisation de l'actine favorise la réparation, voire la restaure dans les cellules où l'exocytose a été inhibée (Togo et al., 2000 ; Miyake et al., 2001). L'apport de matériel membranaire par exocytose et la dépolymérisation de l'actine corticale au site de rupture permettrait donc respectivement d'augmenter la tension de surface et de diminuer la tension exercée par le cytosquelette cortical, et de favoriser ainsi le rapprochement des bords de la rupture. Cependant, le mécanisme exact de ce modèle reste à élucider, et ne permet pas d'expliquer la réparation rapide de rupture membranaire de plusieurs μm .

C. Modèle du « patch » lipidique

Le modèle du « patch » lipidique a été proposé suite aux observations faites sur les oocytes d'oursin (Terasaki et al., 1997). Après injection d'eau de mer à l'aide d'une aiguille contenant du Ca^{2+} (9,25 mM), une accumulation rapide de matériel membranaire a été observée au site d'injection. En revanche, en l'absence de Ca^{2+} , aucune accumulation membranaire n'a été observée et l'oocyte ne s'est pas réparé. Ainsi, le modèle du « patch » propose que l'élévation de la concentration calcique intracellulaire induise le recrutement de vésicules intracellulaires au site de rupture. Les vésicules fusionnent pour former un « patch », qui fusionne avec la membrane plasmique endommagée pour colmater la déchirure (**Figure 2.2**).

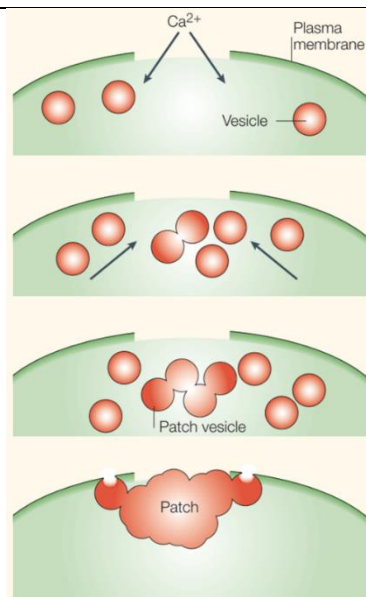


Figure 2.2 : Modèle du « patch » lipidique. Après un dommage de l'ordre du μm , le Ca^{2+} entre dans la cellule. L'augmentation locale de la concentration calcique intracellulaire induit le recrutement de vésicules au site de rupture. La fusion des vésicules entraîne la formation d'un « patch », qui fusionne ensuite avec la membrane endommagée pour colmater la déchirure. Figure tirée de (McNeil and Kirchhausen, 2005).

Introduction

D'autres études révélant la présence d'un amas vésiculaire au site de rupture corroborent ce modèle (Miyake and McNeil, 1995 ; McNeil et al., 2000 ; McNeil and Baker, 2001 ; Davenport et al., 2016 ; Carmeille et al., 2016). En revanche, une partie non élucidée est l'élimination de l'excès de membrane issu du « patch » pour restaurer l'intégrité de la membrane plasmique. Davenport et collaborateurs ont proposé un phénomène appelé « explodosis » où la face extracellulaire du « patch » se rompt pour retrouver une unique bicouche lipidique (Davenport et al., 2016).

Si les vésicules principalement mobilisées pour la réparation des oocytes d'oursin sont les granules de « Yolk » (McNeil et al., 2000), la littérature cite plusieurs types de vésicules ou organelles possibles pour la réparation d'autres types cellulaires. Ainsi, des endosomes s'accumulent au site de rupture des axones géants de calamar (Eddleman et al., 1998), tandis qu'une population d'organelles appelée « enlargeosome » intervient après un dommage mécanique dans divers types cellulaires (Borgonovo et al., 2002). Les mitochondries sont également retrouvées accumulées au site de rupture de fibres musculaires de souris (Sharma et al., 2012). Enfin, les lysosomes sont les vésicules les plus souvent citées dans la réparation membranaire (Rodríguez et al., 1997 ; Reddy et al., 2001 ; Jaiswal et al., 2002). Il est fort probable que l'ensemble de ces organelles participe au processus de réparation, dans des proportions différentes selon le type cellulaire, la nature et l'amplitude du dommage.

D. Modèle de l'exocytose/endocytose

Les modèles présentés précédemment ont principalement été proposés à partir d'observations faites sur des cellules après un dommage mécanique. Cependant, il existe d'autres formes de dommages membranaires, notamment ceux causés par des toxines bactériennes formant des pores, comme la streptolysine-O (SLO). Il a été montré que les pores créés par la SLO étaient endocytés de manière Ca^{2+} -dépendante dans les cellules rénales de rat (Idone et al., 2008). Deux ans plus tard, Tam et collaborateurs ont montré que cette endocytose était induite par un événement d'exocytose lysosomale avec libération d'une enzyme appelée sphingomyélinase acide (SMA) (Tam et al., 2010) et ont proposé le modèle suivant : l'entrée de calcium par les pores induit l'exocytose de lysosomes contenant la SMA (**Figure 2.3**). La SMA hydrolyse alors la tête polaire des sphingomyélines présentes dans le feuillet externe de la membrane plasmique, formant ainsi des céramides. La structure des céramides induit une invagination de la membrane (Holopainen et al., 2000), et l'endocytose des pores. Corrotte et collaborateurs ont montré par

Introduction

la suite que les pores endocytés étaient dégradés par la voie endosomale/lysosomale (Corrotte et al., 2012). D'autres protéases lysosomales libérées dans le milieu extracellulaire, telles que les cathepsines B et L, peuvent également favoriser la réparation membranaire (Castro-Gomes et al., 2016), en hydrolysant la matrice extracellulaire, facilitant ainsi l'accès à la membrane plasmique de la SMA.

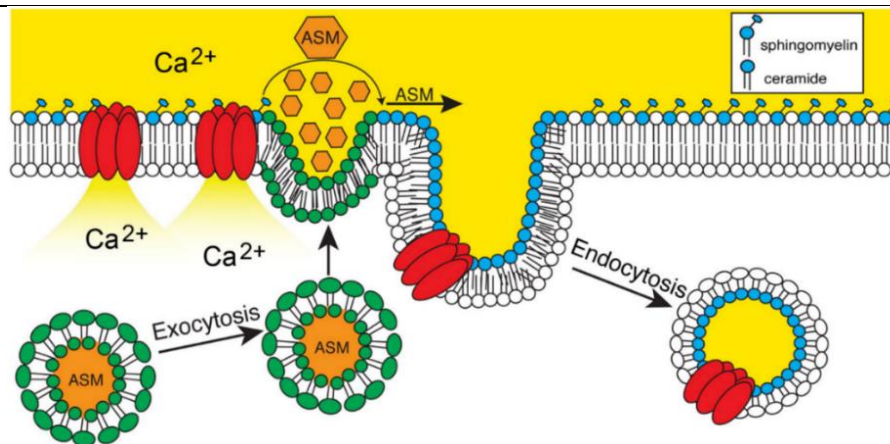


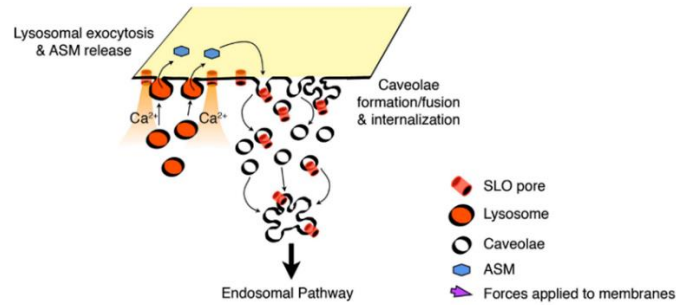
Figure 2.3 : Modèle de l'exocytose/endocytose.

L'insertion de toxines bactériennes formant des pores dans la membrane induit l'augmentation locale de la concentration calcique intracellulaire. Cela provoque l'exocytose de lysosomes et le relargage de sphingomyélinase acide (ASM) dans le milieu extracellulaire. Cette enzyme hydrolyse les têtes polaires des sphingomyélines présentes au feuillet externe de la membrane plasmique, formant ainsi des céramides. La structure des céramides induit une courbure qui crée une invagination de la membrane perméabilisée et l'endocytose des pores. Figure tirée de (Tam et al., 2010).

L'observation que l'exocytose induit un phénomène d'endocytose a remis en question le modèle du « patch » lipidique. Il a été suggéré que l'accumulation de vésicules ne serait pas un « patch » exocyté destiné à fusionner avec la membrane plasmique endommagée pour colmater la rupture, mais le résultat de l'endocytose et de la fusion de vésicules. En effet, des cellules perméabilisées par la SLO en présence d'un traceur extracellulaire d'endocytose, telles que la BSA (Bovine Serum Albumine), présentent des endosomes contenant ce traceur (Idone et al., 2008 ; Tam et al., 2010). De plus, dans les fibres musculaires de souris exposées à la SLO et à des dommages mécaniques, des vésicules suggérant des cavéoles s'accumulent au site de rupture et sont internalisées (Corrotte et al., 2013). Ainsi, l'exocytose de la SMA par les lysosomes entraînerait la formation et l'endocytose de cavéoles à la zone endommagée (**Figure 2.4**). L'internalisation des cavéoles induirait alors une constriction de la déchirure, et les cavéoles endocytées fusionneraient pour être ensuite dégradées.

Introduction

A Transmembrane Pores



B Mechanical Wounding

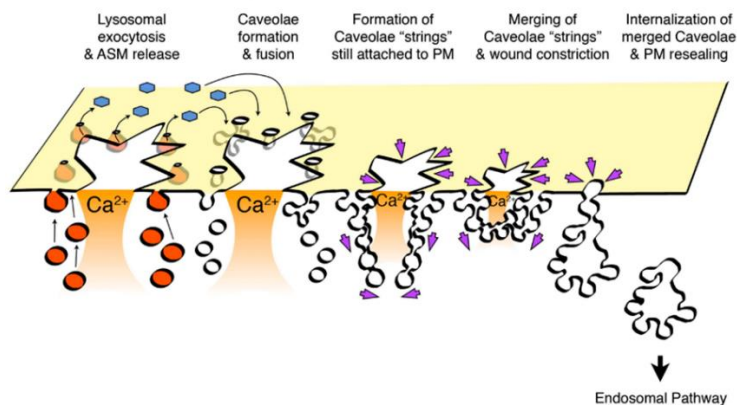


Figure 2.4 : Modèle de réparation membranaire par l'endocytose de cavéoles.

Après la formation de pores (A) ou un dommage mécanique (B), l'entrée de Ca^{2+} induit l'exocytose de lysosomes contenant la sphingomyélinase acide (ASM). L'enzyme induit la formation et l'endocytose de cavéoles à la membrane plasmique endommagée. L'internalisation des cavéoles entraîne l'élimination des pores (A) ou la constriction de la rupture (B). Les cavéoles internalisées fusionnent pour permettre la restauration de la membrane plasmique et la constriction de la rupture. L'excès membranaire est ensuite dégradé par la voie endosomale. Figure tirée de (Corrotte et al., 2013).

E. Modèle du « membrane shedding »

Un autre modèle proposé pour l'élimination des pores formés par des toxines est leur expulsion dans le milieu extracellulaire sous forme de microvésicules membranaires, ou « membrane shedding » (Babiyshuk et al., 2009, 2011). Dans ce modèle, des protéines Ca^{2+} -dépendantes induisent une courbure de la membrane plasmique contenant le pore vers le milieu extracellulaire, aboutissant à la formation d'un bourgeon (**Figure 2.5**). Ce bourgeon est ensuite éliminé par l'émission d'une microvésicule. Il a été proposé que des sphingomyélinases neutres induisent la formation de céramides, de la même manière que la SMA, mais sur le feuillet interne de la membrane plasmique (Walev et al., 2000). La courbure induite par les céramides permettrait ainsi

Introduction

la formation d'un bourgeon membranaire. D'autres protéines participeraient à la formation et/ou à la fermeture du bourgeon telles que les complexes ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III), ALG-2 (Apoptosis Linked Gene-2), ALIX (ALG-2 interacting protein X) et des Anx (Babiychuk et al., 2009 ; Jimenez et al., 2014 ; Scheffer et al., 2014).

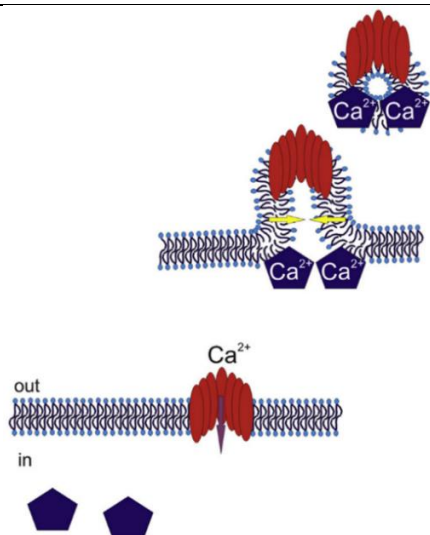


Figure 2.5 : Modèle du « membrane shedding ».
Après la formation d'un pore dans la membrane plasmique, l'entrée de calcium dans la cellule induit le recrutement de protéines Ca²⁺-dépendantes (diamants bleus) et un bourgeonnement de la membrane. Le bourgeon de membrane contenant le pore est ensuite éliminé dans le milieu extracellulaire. Figure tirée de (Draeger et al., 2014).

3. La machinerie protéique de réparation

Quel que soit le mécanisme de réparation membranaire mis en place par la cellule pour réparer un dommage, une machinerie protéique est indispensable au bon déroulement du processus. De nombreuses protéines ont été identifiées dans la réparation membranaire, telles que AHNAK, la sphingomyélinase acide (SMA), les Anx, les complexes ESCRT, la mitsugumin 53 (MG53), les protéines S100, les SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Attachment protein REceptor) et les synaptotagmines, les calpaïnes, les cavéolines, ou encore la dysferline (Blazek et al., 2015). Dans cette section, nous nous intéresserons à deux protéines liées au développement de dystrophie musculaire, la dysferline et la cavéoline-3, et à une protéine intervenant dans plusieurs modèles de réparation membranaire, l'actine. Un autre chapitre sera entièrement consacré aux Anx.

Introduction

A. La dysferline

La dysferline est l'une des 6 protéines à activité Ca^{2+} -dépendante appartenant à la famille des ferlines. Les ferlines sont des protéines transmembranaires qui ont la particularité de posséder de nombreux domaines C2 permettant notamment la liaison avec le Ca^{2+} . La dysferline, d'une masse molaire de 230 kDa, est fortement exprimée dans le tissu musculaire strié squelettique et cardiaque (Anderson et al., 1999). Des mutations dans sa séquence codante sont responsables de deux dystrophies musculaires, la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B) et la myopathie de Miyoshi de type 1 (Liu et al., 1998). Il s'agit de la première protéine à avoir été identifiée comme participant à la réparation membranaire des cellules de mammifères. En effet, son absence entraîne un défaut de réparation des cellules musculaires et le développement d'une myopathie. Alors que les cellules sauvages présentent une accumulation de dysferline au site de rupture et se réparent en formant un « patch » lipidique, des cellules déficientes en dysferline présentent une faible densité de vésicules au site de rupture (Bansal et al., 2003 ; Roostalu and Strähle, 2012 ; Carmeille et al., 2016). En ajoutant à cette observation la capacité de la dysferline à interagir avec les protéines SNAREs impliquées dans les événements de fusion (Coddling et al., 2016), il a été proposé que la dysferline pourrait jouer un rôle dans l'attachement du « patch » lipidique à la membrane plasmique endommagée pour faciliter la fusion. De plus, il a été montré qu'en présence de Ca^{2+} , une forme clivée de la dysferline, appelée mini-dysferline C_{72} , était générée par des protéases appelées calpaïnes et recrutée au site de rupture par l'intermédiaire de vésicules (Lek et al., 2013 ; Redpath et al., 2014). Cette forme tronquée aurait une activité fusogénique spécifique lors de la réparation membranaire. Une autre étude a montré que la dysferline accumulée au site de rupture avait pour origine le sarcolemme situé près du dommage, dont le recrutement était dépendant du cytosquelette cortical, et était ensuite endocytée (McDade et al., 2014). Il a donc été suggéré que la dysferline endocytée était clivée par les calpaïnes, et que la mini-dysferline C_{72} ainsi générée était ensuite recrutée au site de rupture. La dysferline interagit également avec d'autres partenaires impliqués dans la réparation membranaire. Parmi eux, on retrouve les AnxA1 et A2 (Cagliani et al., 2005 ; Lennon et al., 2003), MG53 (Cai et al., 2009b), et la cavéoline-3 (Cai et al., 2009b ; Matsuda et al., 2001).

B. La cavéoline-3

La famille des cavéolines, des petites protéines membranaires, est composée de 3 membres chez l'Homme. L'une d'entre elles, la cavéoline-3 (Cav3), d'environ 20 kDa, est retrouvée spécifiquement dans le tissu musculaire. Des mutations dans cette protéine conduisent à des

Introduction

cavéolinopathies, dont fait partie la dystrophie musculaire LGMD1C (Minetti et al., 1998). Les cavéolines sont des protéines indispensables à la formation des cavéoles, des structures membranaires invaginées de 60 à 80 nm de diamètre. La formation des cavéoles est assurée par l'ancrage et l'oligomérisation des cavéolines à la membrane plasmique, et par l'interaction des cavéolines avec des protéines de la famille des cavines qui régulent la formation des cavéoles (Bastiani and Parton, 2010). Plusieurs fonctions sont associées aux cavéoles, telles que des voies de signalisation, l'endocytose, la régulation de l'assimilation et du stockage des lipides, ou encore la réponse à un stress mécanique (Bastiani and Parton, 2010 ; Parton and Del Pozo, 2013).

Le tissu musculaire est particulièrement riche en cavéoles, et il a été observé que l'aplanissement de ces structures permettait de protéger le sarcolemme des dommages mécaniques en réduisant la tension exercée par le cytosquelette cortical (Sinha et al., 2011 ; Lo et al., 2015). Il a ainsi été montré qu'un choc osmotique ou un étirement dans les cellules endothéliales de souris induisait la perte d'interaction entre la cavéoline-1 et la cavine-1 permettant ainsi le désassemblage des cavéoles et la réduction de la tension exercée sur la membrane plasmique. Bien qu'une implication directe de la Cav3 dans la réparation membranaire n'a pas encore été démontrée, il a été reporté que des myotubes déficients en Cav3 présentaient un défaut de réparation membranaire (Corrotte et al., 2013). Dans cette étude de Corrotte et collaborateurs, les auteurs ont proposé un mécanisme de réparation par l'internalisation des cavéoles (voir **Figure 2.4**). Cependant, la Cav3 pourrait avoir un rôle indirect dans la réparation membranaire. En effet, des mutations de la Cav3 induisent une localisation aberrante de la dysferline en la séquestrant dans l'appareil de Golgi (Hernández-Deviez et al., 2006, 2008 ; Matsuda et al., 2001) et de MG53 (Cai et al., 2009b). Or la dysferline et MG53 sont essentielles à la réparation d'une rupture membranaire (Bansal et al., 2003 ; Cai et al., 2009a), ce qui expliquerait que la déficience en Cav3 entraîne un défaut de réparation.

C. L'actine

L'actine est une protéine qui constitue les microfilaments du cytosquelette. Sa forme monomérique et globulaire, l'actine-G, est capable de polymériser spontanément pour former les filaments d'actine, ou actine-F. L'ATP et des protéines régulatrices, comme la profiline ou la cofiline, interviennent dans les processus de polymérisation et dépolymérisation des filaments (Pollard and Cooper, 2009). Le réseau d'actine est présent dans toute la cellule, mais est particulièrement concentré sous la membrane plasmique où il constitue le cytosquelette cortical. L'actine corticale est impliquée dans de nombreuses fonctions. Elle permet notamment le

Introduction

maintien de la forme de la cellule, la migration des cellules par élongation des filaments d'actine, ou encore le transport de vésicules sur une courte distance via une protéine motrice appelée myosine (Pollard and Cooper, 2009 ; DePina and Langford, 1999). Dans les cellules musculaires, l'actine corticale est capable de lier la dystrophine, une des protéines qui constitue le complexe DPC (Dystrophin-associated Protein Complex) présent au niveau de la membrane plasmique (Blake et al., 2002). Ce complexe fait le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, stabilisant ainsi le sarcolemme et assurant sa résistance aux stress mécaniques pendant la contraction. Plusieurs mutations dans le gène de la dystrophine sont responsables de la myopathie de Duchenne qui se caractérise par une fragilité du sarcolemme, menant à des ruptures plus fréquentes de la membrane plasmique. Près de 65% de ces mutations sont dues à des délétions dans le gène codant la dystrophine, mais il existe également quelques mutations faux sens. Parmi elles, nous pouvons citer la mutation faux sens remplaçant la Leu54 en Arg dans le domaine de liaison à l'actine (Blake et al., 2002). Cela indique que la liaison de l'actine à la dystrophine est primordiale au bon fonctionnement du tissu musculaire. L'actine corticale participe donc à la stabilisation du sarcolemme lors des stress mécaniques, mais interviendrait également directement dans la réparation membranaire après un dommage.

Comme décrit précédemment, la tension exercée par le cytosquelette cortical peut inhiber la réparation membranaire. Plusieurs études ont montré l'importance de l'actine dans la réparation. En inhibant la dépolymérisation des filaments d'actine, les cellules sont incapables de réparer une rupture membranaire. Au contraire, favoriser la dépolymérisation du cytosquelette cortical au site de rupture diminuerait la tension exercée sur la membrane et faciliterait l'accès des vésicules exocytiques à la membrane endommagée (Miyake et al., 2001). Cette dépolymérisation est suivie par une repolymérisation de l'actine pour la reconstitution de la nouvelle membrane (Godin et al., 2011 ; Jaiswal et al., 2014). Dans le cas d'un dommage par la SLO, l'actine, associée à la myosine, pourrait également intervenir dans la formation de bourgeons membranaires dans le modèle du « membrane shedding » en contractant la membrane plasmique. De plus, la présence de l'actine est liée à d'autres protéines impliquées dans la réparation membranaire. Dans les cellules cancéreuses endommagées, la repolymérisation de l'actine est médiée par le complexe AnxA2-S100A11 (Jaiswal et al., 2014). Dans les cellules musculaires de souris, l'accumulation d'actine au site de rupture permet le recrutement de la dysferline présente au sarcolemme, et de l'AnxA6 (McDade et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016). L'actine pourrait donc jouer plusieurs rôles pour prévenir les ruptures de la membrane plasmique et favoriser leur réparation.

4. Les Annexines

Les Annexines (Anx) sont des protéines solubles comprenant 12 membres chez l'Homme, nommés AnxA1 à AnxA13, l'AnxA12 n'étant pas attribuée dans la nomenclature officielle. Leur capacité commune à lier les membranes en présence de Ca^{2+} les implique dans de nombreux processus cellulaires. Parmi les nombreuses fonctions des Anx, nous pouvons citer le transport et l'agrégation de vésicules, la régulation du cytosquelette, l'exocytose, l'inflammation, la migration cellulaire, la fusion cellulaire, la coagulation, ou encore la réparation membranaire (Gerke and Moss, 2002 ; Draeger et al., 2011). Jusqu'à présent, les Anx décrites dans la littérature comme impliquées dans le processus de réparation membranaire sont les AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7. C'est pourquoi après avoir décrit brièvement la structure des Anx et leur interaction avec les membranes, leur implication dans la réparation membranaire sera abordée plus en détails, en se focalisant sur les AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7.

A. Structure et interaction avec les membranes

La structure générale des Anx est divisée en deux parties : une partie C-terminale très conservée dans la famille des Anx, et une partie N-terminale très variable en taille et en séquence. L'AnxA5 a été la première Anx dont la structure a été résolue (Huber et al., 1990). La partie C-terminale est constituée d'un module Anx formant un disque compact légèrement incurvé, organisé en 4 domaines Anx répétés, à l'exception de l'AnxA6 qui compte deux modules Anx (**Figure 4.1a**). Chaque domaine Anx (environ 70 acides aminés) est constitué de 5 hélices- α reliées par des boucles, et présente 3 sites de liaison au Ca^{2+} situés sur la face convexe de la protéine (**Figure 4.1b**).

Introduction

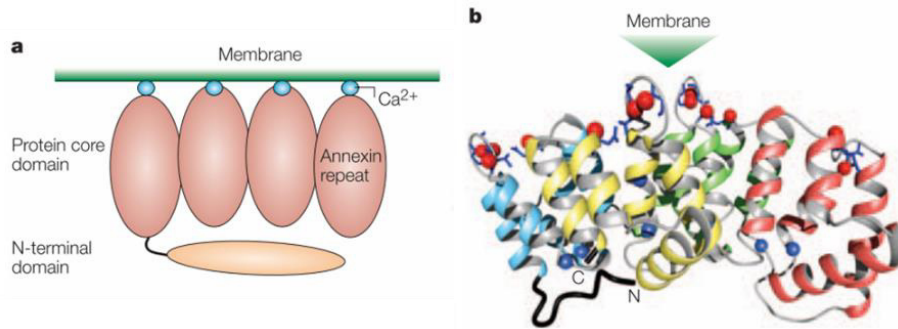


Figure 4.1 : Structure des Anx.

(a) Représentation schématique d'une Anx. Les 4 domaines Anx (Annexin repeat), qui compose le module Anx (Protein core domain), lient le Ca^{2+} , sur la face convexe du module, permettant son interaction avec les membranes. Le domaine N-terminal, variant selon les Anx, reste alors accessible pour interagir avec d'autres protéines. (b) Représentation 3D du module Anx. Chaque domaine est représenté par une couleur différente (bleu, jaune, vert et rouge), et les ions Ca^{2+} sont représentés par les sphères rouges. Image tirée de (Gerke et al., 2005).

La liaison du Ca^{2+} induit un changement de conformation de la protéine et permet l'interaction des domaines Anx avec les membranes via un pont électrostatique entre les ions Ca^{2+} et les têtes polaires des phospholipides, en particulier les phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine (PS) (Gerke et al., 2005). Malgré une forte conservation du module Anx, chaque Anx a une sensibilité différente au Ca^{2+} , la plus sensible étant l'AnxA2, et la moins sensible l'AnxA5 (Blackwood and Ernst, 1990 ; Skrahina et al., 2008). A titre d'exemple, la concentration calcique nécessaire pour que la moitié des protéines AnxA2 lient des liposomes constitués de PS est de $0,65 \mu\text{M}$, contre $16 \mu\text{M}$ pour l'AnxA5, (Blackwood and Ernst, 1990). Cette différence de sensibilité pourrait permettre d'induire la liaison d'une Anx spécifique selon la concentration calcique. En effet, il a été montré dans des cellules de mammifères que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induisait la translocation des Anx à la membrane plasmique de manière séquentielle (Monastyrskaya et al., 2007 ; Skrahina et al., 2008). Cependant, l'ordre de translocation varie selon les études, probablement due à l'utilisation d'approches et de types cellulaires différents pour induire l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

Certaines Anx, telles que l'AnxA4 ou A5, ont la capacité de s'oligomériser en interagissant avec les membranes biologiques pour former un réseau bidimensionnel (2D), et stabiliser ainsi les membranes (Kaetzel et al., 2001 ; Govorukhina et al., 2003). Le réseau se forme en trois temps. Tout d'abord, les Anx monomériques se lient aux membranes contenant des PS en présence de Ca^{2+} . Les Anx forment ensuite des trimères, puis les trimères s'oligomérisent pour former un réseau 2D (Govorukhina et al., 2003). De plus, des études ont montré que les AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7, ainsi que le complexe AnxA2/S100A10, peuvent induire l'agrégation de vésicules

Introduction

en interagissant avec deux membranes simultanément (Blackwood and Ernst, 1990 ; Kaetzel et al., 2001 ; Gotow et al., 1996 ; Buzhynskyy et al., 2009 ; Caohuy and Pollard, 2001 ; Lambert et al., 1997). Le complexe AnxA2/S100A10 est un hétérodimère comprenant l'AnxA2 et la protéine S100A10 liée à la partie N-terminale de l'AnxA2. Dans la famille des Anx, le domaine N-terminal, situé vers la face concave de la protéine, permet l'interaction avec d'autres protéines. C'est cette partie N-terminale, différente pour chaque Anx, qui leur confère des fonctions spécifiques. La capacité des Anx à lier les membranes, former des réseaux 2D, agréger des vésicules, et interagir avec différents partenaires, le tout en présence de Ca^{2+} , suggère un rôle important des Anx dans divers processus cellulaires, notamment dans la réparation membranaire.

B. Les Annexines dans la réparation membranaire

i. AnxA1 et A2

Les AnxA1 et A2 ont été les premières Anx à être identifiées comme participant à la réparation membranaire (Lennon et al., 2003). D'une masse moléculaire de 37 et 38 kDa respectivement, les AnxA1 et A2 partagent de nombreuses caractéristiques, dont la capacité d'agréger des vésicules en présence de Ca^{2+} (Blackwood and Ernst, 1990 ; Bitto and Cho, 1999 ; Lambert et al., 1997), et d'interagir avec les protéines S100 (Rintala-Dempsey et al., 2008). Trois modèles d'agrégation ont été proposés. Le premier suggère que les Anx sous forme monomérique, notamment l'AnxA1, lient une deuxième membrane via un site de liaison situé dans le domaine N-terminal (de la Fuente and Parra, 1995). Le second mécanisme proposé est une dimérisation des Anx via leur domaine N-terminal, exposant ainsi leur face convexe pour interagir avec deux membranes adjacentes (Ayala-Sanmartin et al., 2008). Enfin, le troisième modèle implique la formation d'un hétérotétramère Anx/S100, comprenant deux Anx et deux protéines S100 au centre du complexe (Lambert et al., 1997). Chaque Anx pourrait ainsi lier une membrane. Cette capacité d'agréger des vésicules pourrait jouer un rôle dans le recrutement de vésicules au site d'un dommage membranaire, notamment dans le modèle du « patch » lipidique.

Comme les Anx, les protéines S100 peuvent lier le Ca^{2+} , et certaines d'entre elles, comme la protéine S100A11, sont nécessaires à la réparation membranaire (Jaiswal et al., 2014). De plus, les AnxA1 et A2 interagissent avec la dysferline, formant un complexe qui jouerait un rôle dans l'agrégation des vésicules intracellulaires au site de rupture et l'attachement du « patch » lipidique à la zone endommagée dans les cellules musculaires de souris (Lennon et al., 2003). Plus précisément, l'hétérotétramère AnxA1/S100A11 permettrait l'agrégation des vésicules,

Introduction

notamment des lysosomes, et l'hétérotétramère AnxA2/S100A10 recruterait l'amas de vésicules au site de rupture via son interaction avec la dysferline (**Figure 4.2**). Il a également été montré que des patients atteints de dysferlinopathies (déficients en dysferline) présentaient une surexpression des AnxA1 et A2, probablement pour compenser la perte de fonction de la dysferline dans la réparation membranaire (Cagliani et al., 2005). De plus, l'AnxA2 est impliquée dans l'exocytose, notamment en liant l'actine qui favorise le recrutement des vésicules à la membrane (Gabel et al., 2015), ce qui pourrait suggérer un rôle dans le recrutement des vésicules au site de rupture dans l'hypothèse du « patch » lipidique.

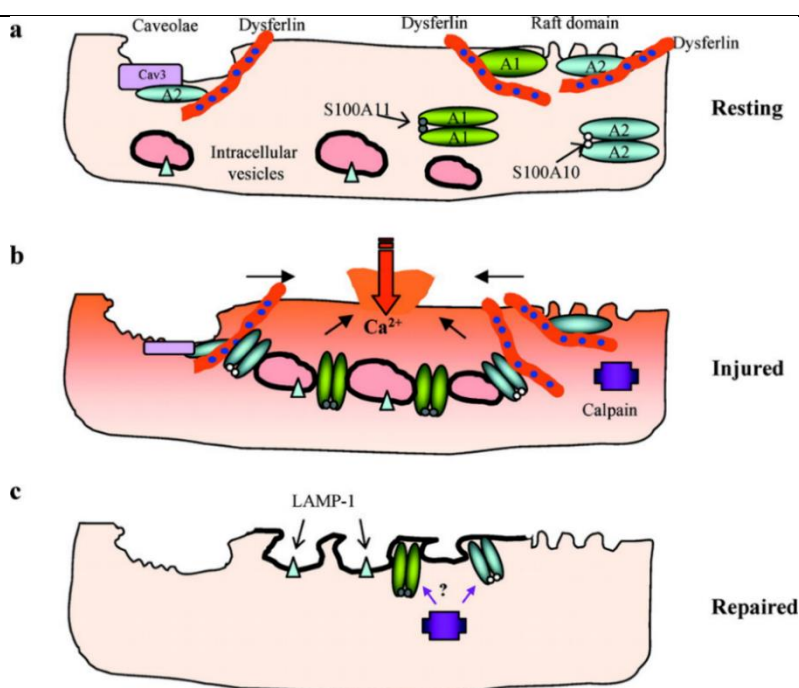


Figure 4.2 : Modèle proposé pour le rôle des AnxA1 et A2 dans la réparation membranaire des cellules musculaires de souris.

(a) Au repos, les AnxA1 et A2 peuvent être cytosoliques sous leur forme hétérotétramérique (avec leur partenaire respectif, S100A11 et S100A10), ou liées à la membrane plasmique sous leur forme monomérique via la dysferline (AnxA1 et A2) ou la Cav3 (AnxA2). (b) Lors d'une rupture, l'entrée de Ca²⁺ entraîne la liaison des complexes AnxA1/S100A11 aux vésicules qui s'agrègent. Les complexes AnxA2/S100A10 recrutent alors ces vésicules au site de rupture via la dysferline pour faciliter la fusion du « patch » avec la membrane endommagée. Image tirée de (Lennon et al., 2003).

D'autres études ont montré la nécessité de ces Anx dans la réparation membranaire. L'AnxA1 intervient notamment dans la réparation des cellules cancéreuses lors d'un dommage mécanique (McNeil et al., 2006), des HEK et des cellules primaires de muscle lisse lors d'une exposition à la SLO (Potez et al., 2011 ; Babiychuk et al., 2011). Lors d'une perméabilisation à la SLO, il a été

Introduction

proposé que l'AnxA1 joue un rôle dans la formation de microvésicules dans le modèle du « membrane shedding ». Lors du bourgeonnement de la microvésicule contenant le pore, l'AnxA1 s'accumule à la base du bourgeon de membrane, séquestrant ainsi le Ca^{2+} dans la microvésicule. La microvésicule contenant l'AnxA1 est ensuite rejetée dans le milieu extracellulaire.

Concernant l'AnxA2, son implication dans la réparation membranaire a été montrée dans les cellules primaires endothéliales humaines et les cellules cancéreuses lors d'un dommage mécanique (Jaiswal et al., 2014 ; Koerdt and Gerke, 2017). Dans le modèle proposé par Jaiswal et collaborateurs, l'hétérotétramère AnxA2/S100A11 s'accumule en retrait de la zone endommagée où il favorise la repolymérisation de l'actine et facilite la formation de la nouvelle membrane. Quant à l'AnxA1, elle s'accumule au site de rupture où a lieu la dépolymérisation des filaments d'actine pour réduire la tension du cytosquelette.

Une étude récente a proposé un modèle différent quant à l'action des Anx dans la réparation des cellules musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b). Après un dommage mécanique par un laser, les auteurs ont observé une protubérance au site de rupture qu'ils ont nommée domaine « cap ». La particularité de ce domaine est qu'il est enrichi en Anx, dont les AnxA1 et A2 (**Figure 4.3**). Au contraire, les autres protéines impliquées dans la réparation membranaire, telles que la dysferline ou MG53, sont retrouvées dans un domaine « shoulder » situé à la base du « cap ». Enfin, des filaments d'actine s'accumulent sous le « cap », une zone caractérisée par l'absence d'Anx.

Membrane Injury



Membrane Repair



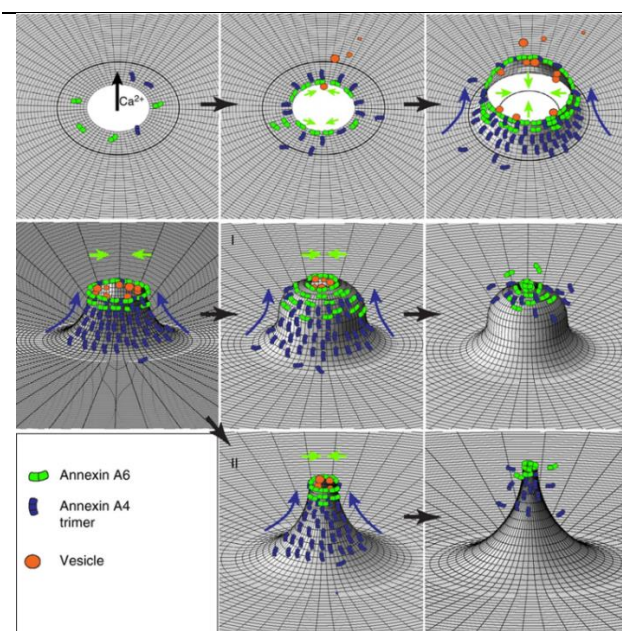
Figure 4.3 : Modèle du domaine « cap ».

Après un dommage membranaire, les protéines impliquées dans la réparation membranaire s'accumulent dans deux domaines distincts. Les AnxA1, A2 et A6 forment un domaine « cap », tandis que la dysferline, MG53, BIN1 et EHD s'accumulent dans un domaine « shoulder » à la base du « cap ». Des filaments d'actine sont retrouvés sous le « cap », dans une zone où les Anx sont absentes. Image tirée de (Demonbreun et al., 2016b).

Introduction

ii. AnxA4

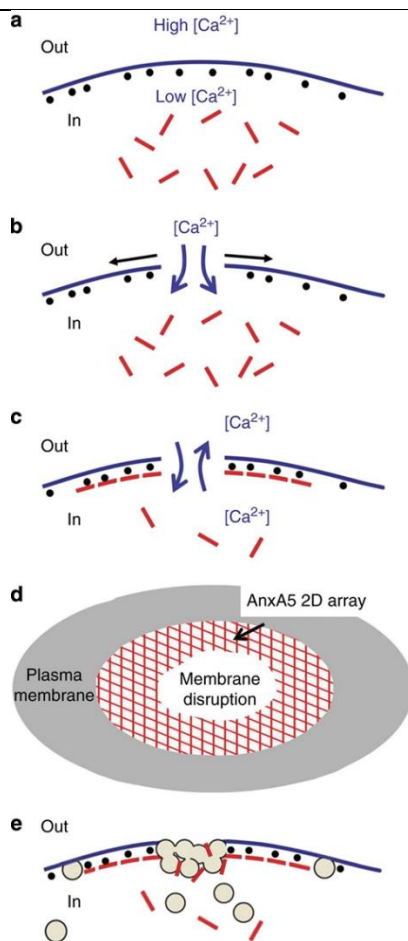
L'AnxA4 est l'une des plus petites Anx, avec une masse moléculaire de 36 kDa. Comme les AnxA1 et A2, l'AnxA4 est capable d'agréger des vésicules en présence de Ca^{2+} (Kaetzel et al., 2001). Dans cette étude, il a été observé que la distance entre deux membranes agrégées était compatible avec deux couches d'AnxA4, suggérant une interaction possible entre les deux protéines. Bien que cela n'ait pas encore été démontré, ce résultat pourrait indiquer un rôle de l'AnxA4 dans le recrutement de vésicules pendant la réparation membranaire, comme proposé pour les AnxA1 et A2. L'AnxA4 est également capable de former des trimères et des réseaux bidimensionnels (2D) sur des membranes artificielles (Kaetzel et al., 2001), et de s'auto-assembler sur les membranes biologiques pour former des agrégats immobiles (Crosby et al., 2013). Cette propriété partagée avec l'AnxA5 pourrait également intervenir dans la réparation membranaire en stabilisant la membrane endommagée (voir paragraphe sur l'AnxA5 pour plus de détails). L'implication de l'AnxA4 dans la réparation membranaire n'a été montrée que récemment dans les cellules cancéreuses (Boye et al., 2017). Dans le modèle de Boye et collaborateurs, l'AnxA4 accumulée sous forme de trimères à la zone endommagée induit une invagination des bords de la rupture pour faciliter la constriction de la déchirure par l'AnxA6 (**Figure 4.4**). De plus, l'AnxA4, comme d'autres Anx, sont surexprimées dans plusieurs types de cancer (Deng et al., 2013 ; Choi et al., 2016). Leur surexpression et leur rôle dans la réparation membranaire dans les cellules cancéreuses pourraient expliquer la capacité d'invasion de ces cellules qui subissent de nombreuses contraintes mécaniques pendant la migration. Aucune implication de l'AnxA4 n'a été reportée à ce jour dans la réparation membranaire des cellules musculaires.



Introduction

iii. AnxA5

L'AnxA5 est la plus petite des Anx, avec une masse moléculaire de 35 kDa. Elle est probablement l'Anx dont le rôle dans la réparation membranaire est le mieux décrit dans la littérature. L'AnxA5 est incapable d'agréger des liposomes (Blackwood and Ernst, 1990), mais il a été rapporté qu'elle agrégeait des vésicules synaptiques dans le tissu nerveux central du rat (Gotow et al., 1996). L'AnxA5 peut également créer des réseaux 2D en interagissant avec la membrane (Govorukhina et al., 2003). Cette propriété joue un rôle important dans la réparation membranaire, elle permet de stabiliser la membrane endommagée pour éviter l'expansion de la déchirure (Bouter et al., 2011). En effet, l'absence d'AnxA5 empêche les cellules périsvasculaires murines de réparer un dommage mécanique. L'ajout exogène d'AnxA5 sauvage restaure la réparation, tandis qu'une AnxA5 mutée incapable de former des réseaux 2D n'a aucun effet (Bouter et al., 2011). De plus, l'équipe a récemment montré que l'AnxA5 est indispensable à la réparation des cellules musculaires squelettiques humaines (Carmeille et al., 2016). Ces observations ont mené au modèle suivant (**Figure 4.5**).



Introduction

L'entrée de Ca^{2+} par la rupture entraîne la liaison de l'AnxA5 aux PS du feuillet interne proche de la membrane plasmique endommagée. La formation du réseau 2D d'AnxA5 empêche l'expansion de la déchirure due à la tension exercée par le cytosquelette corticale. Des vésicules intracellulaires sont ensuite recrutées pour former un « patch » et colmater la rupture. Dans cette étude, l'AnxA5 est présente à la membrane plasmique endommagée et à la surface des vésicules intracellulaires accumulées au site de rupture, suggérant un rôle possible de l'AnxA5 dans le recrutement des vésicules.

iv. AnxA6

L'AnxA6 est la plus grande des Anx, d'une masse moléculaire de 68 kDa, et a la particularité de posséder deux modules Anx (Gerke et al., 2005). Une étude a montré qu'à forte concentration de Ca^{2+} (environ 2 mM), l'AnxA6 était capable de lier deux membranes distinctes contenant des PS (Buzhynskyy et al., 2009). Il a été suggéré que l'AnxA6 pouvait lier les deux membranes via chacun de ces modules Anx, ou via un second site de liaison aux membranes présent dans la région connectant les deux modules. A ce jour, aucune étude n'a montré de lien entre cette propriété et un rôle possible dans la réparation membranaire.

Son implication dans la réparation membranaire a été montrée pour la première fois dans des cellules de mammifères exposées à la SLO, où elle jouerait un rôle dans l'élimination des pores en coopération avec l'AnxA1 selon le modèle du « membrane shedding » (Potez et al., 2011). L'AnxA6 interviendrait lorsque les cellules sont faiblement perméabilisées, tandis que l'AnxA1 serait recrutée en cas d'une perméabilisation plus importante par la SLO.

Dans le cas de dommage mécanique, il a été montré qu'un knockdown de l'AnxA6 chez le poisson-zèbre entraînait une forme de myopathie et un défaut de réparation des cellules musculaires (Roostalu and Strähle, 2012). Roostalu et Strähle ont observé que, lors d'un dommage mécanique, la dysferline et l'AnxA6 s'accumulent au site de rupture indépendamment l'une de l'autre, suivies des AnxA2 et A1 (**Figure 4.6**). L'absence d'AnxA6 inhibe l'accumulation des AnxA1 et A2. Ce recrutement séquentiel est donc essentiel à la réparation membranaire.

Introduction

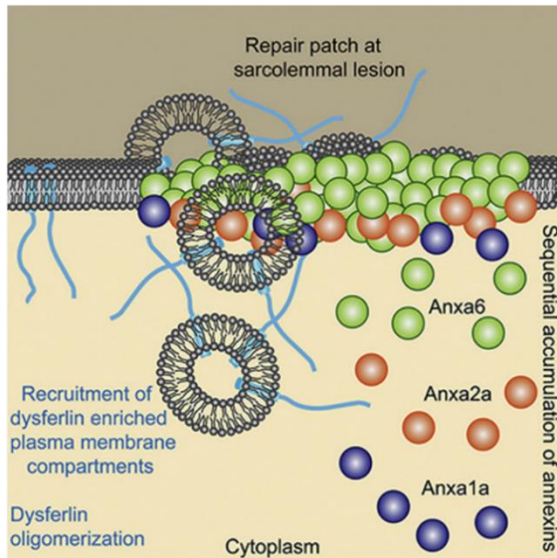


Figure 4.6 : Modèle de réparation membrane des cellules musculaires squelettiques du poisson-zèbre. Après un dommage, la dysferline et l'AnxA6 sont recrutées au site de rupture, suivies des AnxA2 et A1. Ce recrutement séquentiel forme un échafaudage essentiel pour la réparation de la membrane plasmique. Image tirée de (Roostalu and Strähle, 2012).

Comme pour les AnxA1 et A2, il a été montré que l'AnxA6 s'accumule dans une structure appelée domaine « cap » au site de rupture de fibres musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b) (voir **Figure 4.3**). L'AnxA6 a également été identifiée comme étant un modificateur génétique de dystrophie musculaire (Swaggart et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016a). En effet, dans les fibres musculaires de souris, une forme tronquée de l'AnxA6, nommée AnxA6N32, empêche la translocation de l'AnxA6 sauvage au site de rupture, conduisant à un domaine « cap » plus petit ou inexistant, et à une inhibition de la réparation membranaire des cellules musculaires. Malgré ces études, la fonction de l'AnxA6 dans la réparation membranaire n'est pas encore élucidée. Récemment, Boye et collaborateurs ont proposé que l'AnxA6 générât une constriction de la membrane, en coopération avec l'AnxA4, pour refermer une rupture dans les cellules cancéreuses (Boye et al., 2017) (voir **Figure 4.4**). Il a également été montré qu'à forte concentration de Ca^{2+} (2 mM), l'AnxA6 était capable de lier deux membranes, suggérant un rôle possible dans l'agrégation de vésicules (Buzhynskyy et al., 2009). La liaison de l'AnxA6 avec les filaments d'actine en présence de Ca^{2+} pourrait également contribuer à la stabilisation du cytosquelette cortical lors de la réparation de la membrane (Monastyrskaya et al., 2009).

v. AnxA7

L'AnxA7 a été la première Anx découverte chez l'Homme (Creutz et al., 1978). Dans les cellules musculaires, l'AnxA7 est présente sous deux isoformes : celle à 47 kDa est retrouvée dans les cellules à l'état de myoblaste (cellules précurseurs des cellules musculaires matures), tandis que celle à 51 kDa est exprimée uniquement dans les cellules musculaires différenciées (Selbert et al., 1995). Son implication dans la réparation membranaire n'a été montrée que très récemment, dans

Introduction

les cellules cancéreuses (Sønder et al., 2019). L'AnxA7 permettrait la formation du complexe ESCRT-III via le recrutement des protéines ALG-2 et ALIX à la membrane endommagée (**Figure 4.7**). Le complexe ESCRT-III induit alors la formation de microvésicules qui éliminent le dommage selon le modèle du « membrane shedding » (voir **Figure 2.5**).

Aucune étude n'a reporté l'implication de l'AnxA7 dans la réparation membranaire des cellules musculaires. Cependant, il a été montré que la localisation de l'AnxA7 était altérée dans les fibres musculaires de patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (Selbert et al., 1996). L'AnxA7 est capable d'agréger des vésicules et de favoriser la fusion membranaire pendant l'exocytose, et ce de manière Ca^{2+} -dépendante (Creutz et al., 1978 ; Caohuy and Pollard, 2001 ; Pollard et al., 1990, 1991). Ces propriétés pourraient suggérer un rôle dans la réparation selon le modèle du « patch » lipidique (voir **Figure 2.2**).

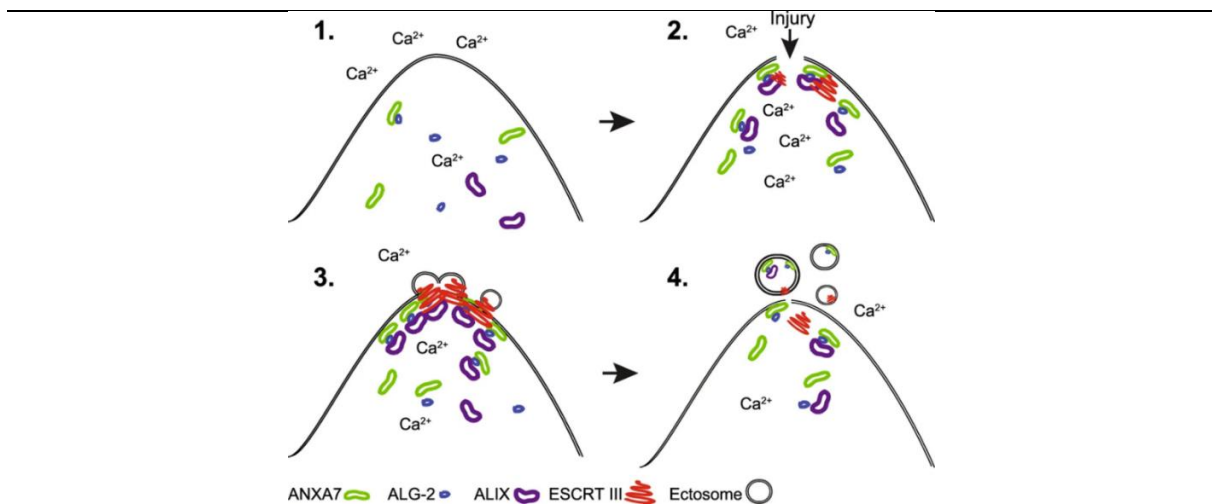


Figure 4.7 : Modèle proposé pour le rôle de l'AnxA7 dans la réparation membranaire des cellules cancéreuses. (1) Au repos, l'AnxA7, ALG-2 et ALIX ont une localisation cytosolique. (2) L'entrée de Ca^{2+} par la rupture entraîne la liaison de l'AnxA7 à la membrane endommagée, et le recrutement des protéines ALG-2 et ALIX. (3) Le complexe ainsi formé sert d'échafaudage pour l'assemblage d'ESCRT-III, qui participe à la formation de microvésicules (ectosomes). (4) Le relargage des microvésicules dans le milieu extracellulaire permet d'éliminer le dommage, selon le modèle du « membrane shedding ». Image tirée de (Sønder et al., 2019).

5. Défaut de réparation membranaire et dystrophie musculaire

Les cellules musculaires sont parmi les cellules les plus exposées au stress mécanique. Un mécanisme de réparation membranaire fonctionnel est donc indispensable à leur survie. Un défaut

Introduction

de réparation contribue au développement de maladies dégénératives. Ce chapitre présentera de façon générale le muscle sain, puis décrira certaines formes de dystrophies musculaires, qui pourraient résulter d'un défaut de la machinerie de réparation membranaire.

A. Le muscle strié squelettique sain : organisation et contraction

Il existe trois types de tissu musculaire : le muscle lisse, présent autour de la majorité des organes, du tube digestif et des vaisseaux sanguins ; le muscle strié cardiaque retrouvé uniquement dans le cœur ; et le muscle strié squelettique, relié au squelette par des tendons. Les cellules musculaires sont caractérisées par leur propriété d'excitabilité et de contractilité. Le muscle strié squelettique a la particularité de se contracter de façon volontaire, contrairement aux deux autres types de tissu musculaire. Il est sollicité pour la locomotion, le maintien de la posture du corps, ou encore les expressions du visage.

Le muscle strié squelettique est constitué de plusieurs faisceaux musculaires, eux-mêmes constitués de plusieurs dizaines de fibres musculaires (**Figure 5.1**). Une fibre musculaire est une cellule cylindrique plurinucléée, de plusieurs centaines de μm à plusieurs dizaines de cm de long, capable de se contracter. Il s'agit d'une cellule post-mitotique, c'est-à-dire qu'elle n'est plus capable de se diviser. En cas de lésion conduisant à la mort de fibres musculaires, des cellules particulières appelées cellules satellites permettent de régénérer de nouvelles fibres. Il s'agit de cellules indifférenciées mononucléées, localisées en périphérie des fibres musculaires, qui sont essentielles à la régénération musculaire chez l'adulte (**Figure 5.1**).

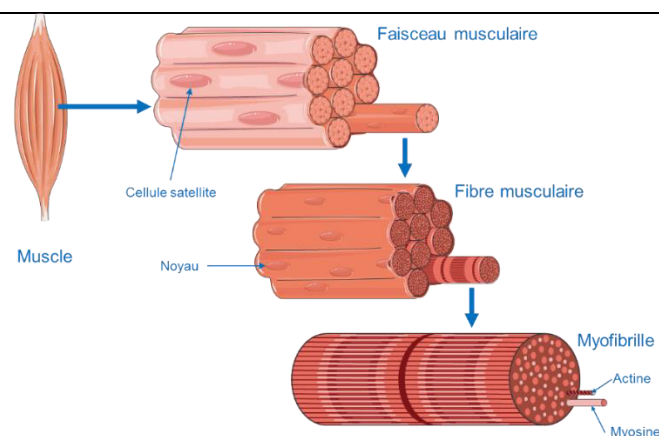


Figure 5.1 : Représentation schématique de l'organisation du muscle strié squelettique.

Un muscle est constitué de plusieurs faisceaux, eux-mêmes constitués de plusieurs fibres musculaires. Une fibre musculaire représente une cellule musculaire mature plurinucléée, capable de se contracter grâce aux myofibrilles. La myofibrille comprend principalement des filaments de myosine et des filaments d'actine.

Images tirées de smart.servier.com, [CC BY 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Introduction

Lorsqu'une fibre musculaire subit un dommage qu'elle ne peut pas réparer, une série d'événements permet de retrouver l'intégrité du tissu. La mort de la fibre musculaire est suivie d'une inflammation, notamment via l'infiltration de macrophages, puis d'une phase de régénération, durant laquelle les cellules satellites prolifèrent, se différencient et fusionnent pour former une nouvelle fibre. Une partie des cellules satellites activées restent à l'état de cellules indifférenciées et redeviennent quiescentes pour renouveler le stock de cellules satellites. Parmi les autres cellules présentes dans le tissu musculaire, on retrouve également des cellules nerveuses qui permettent la stimulation des cellules musculaires via les jonctions neuromusculaires, des cellules endothéliales qui constituent les vaisseaux sanguins, ou encore des fibroblastes formant le tissu conjonctif qui assure l'ancrage, le maintien et la protection du muscle (Giordani et al., 2019).

Les fibres musculaires sont constituées de nombreuses structures contractiles appelées myofibrilles. Les myofibrilles sont principalement composées de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine (**Figure 5.1**). Le terme de muscle « strié » vient de l'alternance de bandes claires et sombres visualisées en microscopie optique, qui correspondent respectivement aux filaments d'actine et de myosine organisés sur toute la longueur des fibres musculaires. Une autre caractéristique des fibres musculaires est leur réticulum sarcoplasmique entourant chaque myofibrille, et les invaginations spécifiques de leur sarcolemme (membrane plasmique) appelées tubules-T (**Figure 5.2**). Lors d'une stimulation nerveuse, les tubules-T permettent de propager la dépolarisation de la membrane jusqu'aux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique au niveau des triades. La dépolarisation entraîne alors la libération de Ca^{2+} par le réticulum pour induire la contraction. Le réticulum sarcoplasmique est l'organelle permettant le stockage, la libération et la recapture du Ca^{2+} .

La contraction est assurée par l'organisation en sarcomère des filaments fins d'actine et des filaments épais de myosine (**Figure 5.3**). Un sarcomère est délimité par les lignes Z et représente la plus petite unité contractile. Les filaments fins d'actine sont associés à la tropomyosine et aux complexes des troponines. La contraction est initiée par la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique induite par la dépolarisation du sarcolemme, et nécessite la présence d'ATP. Brièvement, les sites de liaison de la myosine sur les filaments d'actine sont normalement masqués par la tropomyosine. Le Ca^{2+} permet de démasquer ces sites en se liant à la troponine qui, en se déplaçant, entraîne avec elle la tropomyosine. Le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine est assuré par l'hydrolyse de l'ATP, et permet alors le raccourcissement des sarcomères et la contraction globale du muscle (**Figure 5.3**). La relaxation est assurée par la recapture du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique.

Introduction

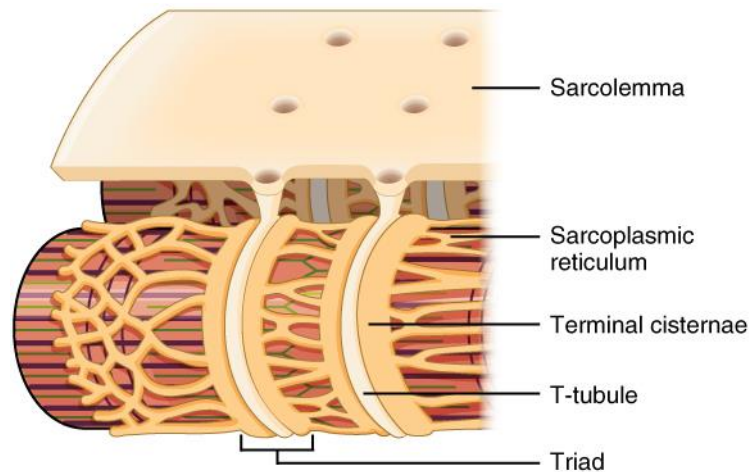


Figure 5.2 : Représentation schématique du réticulum sarcoplasmique et des tubules-T.

Chaque myofibrille est en contact étroit avec le réticulum sarcoplasmique et les tubules-T. Les triades sont formées par un tubule-T et deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Ces structures permettent le couplage excitation-contraction nécessaire au bon fonctionnement du muscle. [Image](#) tirée de [cnx.org](#), *Anatomy & Physiology*, [CC BY 4.0](#).

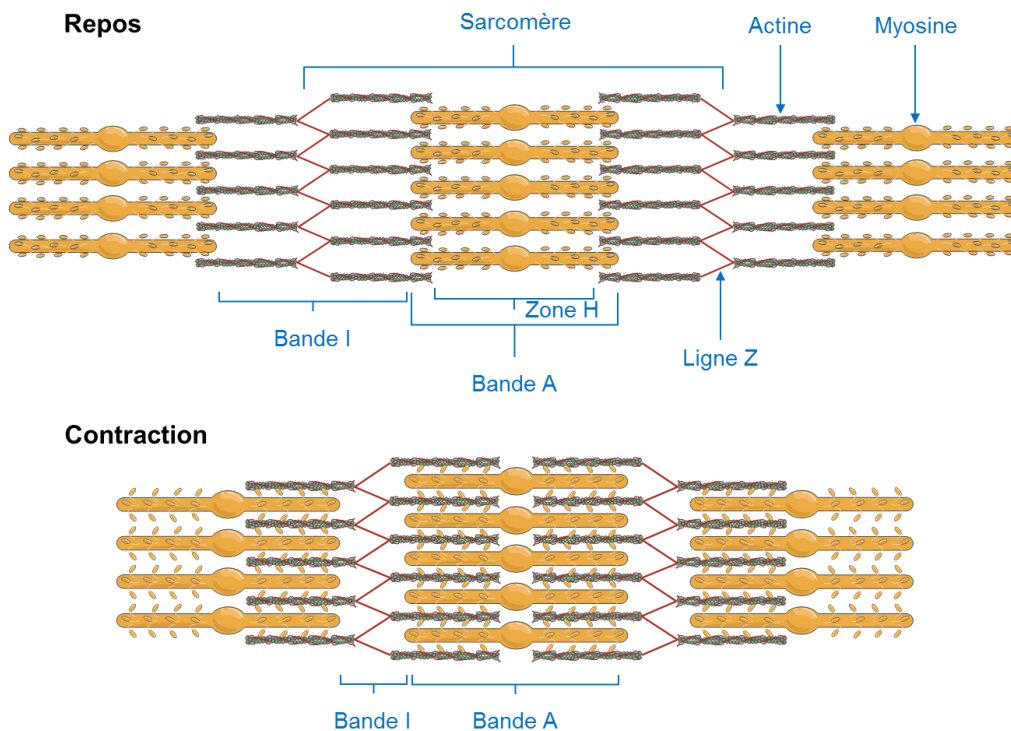


Figure 5.3 : Représentation schématique de la contraction d'un sarcomère.

Un sarcomère est délimité par les lignes Z et est composé par une bande A et deux demi-bandes I. Le Ca^{2+} permet d'initier la contraction, et l'ATP permet le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine. Il en résulte un raccourcissement des sarcomères, et donc du muscle à l'échelle tissulaire. [Images](#) tirées de [smart.servier.com](#), [CC BY 3.0](#).

B. Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires sont des myopathies d'origine génétique caractérisées par une faiblesse musculaire et une perte progressive de la masse musculaire. Plusieurs causes peuvent mener à la mort des fibres musculaires et à la dégénération du tissu musculaire. Les deux principales sont une fragilité accrue du sarcolemme qui subit alors davantage de dommages que des cellules saines, comme dans le cas de la myopathie de Duchenne, et un défaut de réparation membranaire qui empêche la cellule de réparer efficacement un dommage membranaire, comme proposé pour la dystrophie des ceintures de type 2B. Les dystrophies musculaires regroupent plusieurs pathologies présentant des signes cliniques variables. Les dystrophies musculaires des ceintures en font partie.

i. Les dystrophies musculaires des ceintures

Comme leur nom l'indique, les dystrophies des ceintures (ou LGMD pour « Limb Girdle Muscular Dystrophy ») touchent les muscles des ceintures scapulaire et pelvienne. Certains sous-types de LGMD peuvent également toucher les muscles cardiaques et respiratoires. Les LGMD sont séparées en deux groupes selon le mode de transmission : les formes autosomales dominantes ou LGMD1, et les formes autosomales récessives ou LGMD2. Chaque sous-type de LGMD est caractérisé par des mutations d'un gène spécifique. Par exemple, la LGMD1C est une forme autosomale dominante liée à des mutations du gène codant la cavéoline-3, tandis que la LGMD2B est une forme autosomale récessive liée à des mutations du gène codant la dysferline. Dans cette nomenclature, la dernière lettre (C et B dans les deux exemples) correspond à la chronologie de découverte de la pathologie. Malheureusement, la découverte de nombreuses LGMD récessives a enrichi la classification jusqu'à la lettre Z. Suite à un atelier organisé par l'European Neuromuscular Centre en mars 2017, il a donc été décidé de modifier la classification et la nomenclature des LGMD pour constituer des groupes de pathologies plus homogènes, et permettre l'ajout de nouvelles LGMD (Straub et al., 2018). Concernant la nomenclature, l'information sur le mode de transmission et la chronologie de découverte a été conservé, sous la forme D ou R (dominant ou récessif, respectivement) et un chiffre indiquant l'ordre chronologique. Pour plus de clarté, il a été décidé de rajouter la protéine liée à la pathologie (lorsqu'elle est connue). Par exemple, la LGMD2B devient LGMD R2 liée à la dysferline. D'autre part, la définition d'une LGMD a été révisée : « *[Les LGMD sont] des maladies génétiques héréditaires qui touchent primitivement le muscle squelettique et qui se manifestent par une faiblesse musculaire progressive, à prédominance proximale en rapport*

Introduction

avec une perte de fibres musculaires. Pour être considérée comme une dystrophie musculaire des ceintures, une LGMD doit avoir été rapportée dans au moins deux familles non apparentées dont les membres malades ont acquis la marche sans aide. Les patients doivent présenter un taux de CPK élevé, des images de dégénérescence musculaire au cours de l'évolution de la maladie et des altérations dystrophiques à l'histologie musculaire, le tout pouvant aboutir à terme à une dégénérescence complète des muscles les plus touchés. » ([Avancées dans les myopathies des ceintures, Juin 2019, AFM-Téléthon](#)). Cette nouvelle définition exclut certaines pathologies et en ajoute des nouvelles dans la classification. Ainsi l'ex-LGMD1C, liée à la cavéoline-3, n'est plus considéré comme une LGMD. Avec cette nouvelle classification, 5 formes autosomales dominantes et 25 formes autosomales récessives sont désormais répertoriées (**Tableau 5.1** et **Tableau 5.2**) ([Avancées dans les myopathies des ceintures, Juin 2019, AFM-Téléthon](#)).

Nouvelle nomenclature	Anciennement	Gène	Protéine	Rôle de la protéine
LGMD D1 liée à DNAJB6	LGMD1D	<i>DNAJB6</i>	DNAJB6	Protéine chaperonne, qui permet aux protéines en cours de synthèse de prendre leur forme dans l'espace (repliement tridimensionnel adéquat).
LGMD D2 liée à transportine 3	LGMD1F	<i>TNPO3</i>	Transportine 3	Protéine de la membrane nucléaire qui permet le transport de protéines dans le noyau.
LGMD D3 liée à HNRNPDL	LGMD1G	<i>HNRPDL</i>	HNRPDL	Protéine impliquée dans le métabolisme des ARN.
LGMD D4 liée à la calpaïne 3	LGMD 1I	<i>CAPN3</i>	Calpaïne 3	Enzyme spécifique du muscle squelettique, qui scinde les protéines en petits morceaux (protéase), et qui joue un rôle dans l'organisation du sarcomère, la régulation du cytosquelette et l'apoptose.
LGMD D5 liée au collagène 6	Myopathie de Bethlem dominante	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>		Constituant du tissu conjonctif qui entoure les fibres musculaires, qui les soutient et les relie entre elles.

Tableau 5.1 : Les formes autosomales dominantes de dystrophies musculaires des ceintures.
Tableau issu de « [Avancées dans les myopathies des ceintures](#) », Juin 2019, AFM-Téléthon ».

Introduction

<i>Nouvelle nomenclature</i>	<i>Anciennement</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine</i>	<i>Rôle de la protéine</i>
LGMD R1 liée à la calpaïne 3	LGMD2A	<i>CAPN3</i>	Calpaïne 3	Enzyme spécifique du muscle squelettique, qui scinde les protéines en petits morceaux (protéase). Rôle dans l'organisation du sarcomère, la régulation du cytosquelette et l'apoptose.
LGMD R2 liée à la dysferline	LGMD2B	<i>DYSF</i>	Dysferline	Protéine localisée dans la membrane de la fibre musculaire, impliquée dans la réparation de la membrane de la cellule musculaire et dans les mécanismes de transport à l'intérieur de la cellule.
LGMD R3 liée à l' α -sarcoglycane	LGMD2D	<i>SGCA</i>	α -sarcoglycane	Les sarcoglycanes forment un complexe situé dans la membrane des cellules musculaires qui concourt à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions du muscle.
LGMD R4 liée au β -sarcoglycane	LGMD2E	<i>SGCB</i>	β -sarcoglycane	
LGMD R5 liée au γ -sarcoglycane	LGMD2C	<i>SGCG</i>	γ -sarcoglycane	
LGMD R6 liée au δ -sarcoglycane	LGMD2F	<i>SGCD</i>	δ -sarcoglycane	
LGMD R7 liée à la téléthonine	LGMD2G	<i>TCAP</i>	Téléthonine	Rôle dans le développement et la structure du sarcomère.
LGMD R8 liée à TRIM 32	LGMD2H	<i>TRIM32</i>	TRIM32	Enzyme qui se fixe aux protéines abimées pour qu'elles soient dégradées.
LGMD R9 liée à FKRP	LGMD2I	<i>FKRP</i>	FKRP	Protéine impliquée dans le bon fonctionnement de l' α -dystroglycane.
LGMD R10 liée à la titine	LGMD2J	<i>TTN</i>	Titine	Protéine impliquée dans le développement et la structure du sarcomère.
LGMD R11 liée à POMT1	LGMD2K	<i>POMT1</i>	POMT1	Protéine impliquée dans le bon fonctionnement de l' α -dystroglycane.
LGMD R12 liée à l'anoctamine 5	LGMD2L	<i>ANO5</i>	Anoctamine 5	Protéine impliquée dans les mécanismes de réparation membranaire.
LGMD R13 liée à la fukutine	LGMD2M	<i>FKTN</i>	Fukutine	Protéines impliquées dans le bon fonctionnement de l' α -dystroglycane.
LGMD R14 liée à POMT2	LGMD2N	<i>POMT2</i>	POMT2	
LGMD R15 liée à POMGnT1	LGMD2O	<i>POMGnT1</i>	POMGnT1	
LGMD R16 liée à l' α -dystroglycane	LGMD2P	<i>DAG1</i>	α et β dystroglycanes	Rôle dans la stabilité et la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions musculaire.
LGMD R17 liée à la plectine	LGMD2Q	<i>PLEC</i>	Plectine	Protéine qui fait le lien entre la membrane des cellules et l'armature interne de ces cellules (cytosquelette).
LGMD R18 liée à TRAPPC11	LGMD2S	<i>TRAPPC11</i>	TRAPPC11	Protéine du complexe TRAPP impliqué dans le trafic membranaire.
LGMD R19 liée à GMPPB	LGMD2T	<i>GMPPB</i>	GMPPB	Rôle dans la glycosylation de l' α -dystroglycane
LGMD R20 liée à ISPD	LGMD2U	<i>ISPD</i>	ISPD	
LGMD R21 liée à POGLUT1	LGMD2Z	<i>POGLUT1</i>	Protéine O-transférase 1	Enzyme qui intervient dans un mécanisme de régénération musculaire
LGMD R22 liée au collagène 6	Myopathie de Bethlem récessive	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	Collagène 6	Constituant du tissu conjonctif qui entoure les fibres musculaires, qui les soutient et les relie entre elles.
LGMD R23 liée à la laminine- α 2 (mérosine)	Dystrophie musculaire liée à la laminine α 2	<i>LAMA2</i>	Laminine α 2 (mérosine)	Protéine de la membrane basale, laquelle entoure chaque fibre musculaire.
LGMD R24 liée à POMGNT2	Dystrophie musculaire liée à POMGNT2	<i>POMGNT2</i>	POMGNT2	Rôle dans la glycosylation de l' α -dystroglycane, lui permettant de se lier à la laminine α 2.

Tableau 5.2 : Les formes autosomales récessives de dystrophies musculaires des ceintures.
Tableau issu de « [Avancées dans les myopathies des ceintures](#) », Juin 2019, AFM-Téléthon ».

Introduction

ii. Les dysferlinopathies

Les dysferlinopathies regroupent les maladies ayant pour origine des mutations dans le gène DYSF codant la dysferline. Les deux pathologies majoritaires liées à une déficience en dysferline sont la myopathie de Miyoshi de type 1 et la LGMD R2 liée à la dysferline (ex-LGMD2B) (Liu et al., 1998). Elles apparaissent chez le jeune adulte et ne touchent pas le muscle cardiaque. La myopathie de Miyoshi touche les muscles distaux (éloignés de l'axe du corps comme les muscles des pieds et des jambes) tandis que la LGMD R2 liée à la dysferline touche les muscles proximaux (proche de l'axe du corps comme les muscles des cuisses). Comme décrit précédemment, la dysferline a été la première protéine identifiée dans le mécanisme de réparation membranaire (Bansal et al., 2003). Dans le cas de la LGMD R2 liée à la dysferline, le déficit en dysferline dans les fibres musculaires conduit à une absence de réparation en cas de dommage, la mort des cellules musculaires, et une dégénérescence du tissu musculaire. Le mécanisme exact menant au défaut de réparation n'est pas encore élucidé, mais il a été suggéré que l'absence de dysferline empêche l'attachement du « patch » lipidique à la membrane endommagée dans l'hypothèse où la rupture membranaire serait réparée par la formation d'un « patch » lipidique (Lennon et al., 2003 ; Carmeille et al., 2016). Il est également intéressant de constater que des mutations récessives dans un autre gène codant une protéine appelée Anoctamine 5 (ANO5), responsable de la LGMD R12 liée à l'ANO5, mène à un phénotype proche de celui des dysferlinopathies (Bolduc et al., 2010; Griffin et al., 2016). En effet, l'absence de cette protéine entraîne une diminution de la capacité de réparation et de régénération des fibres musculaires chez la souris, impliquant donc l'ANO5 dans la réparation membranaire (Griffin et al., 2016). De plus, comme précisé précédemment, des modificateurs génétiques comme l'AnxA6 peuvent empirer les signes cliniques de la pathologie (Swaggart et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016a). Ainsi, deux patients atteints de la même mutation de la dysferline peuvent avoir des symptômes plus ou moins sévères selon son « background » génétique. De plus, une étude a montré que les AnxA1 et A2 sont surexprimées dans certaines dysferlinopathies et autres dystrophies musculaires, et cette surexpression est corrélée avec des phénotypes sévères (Cagliani et al., 2005).

iii. Les cavéolinopathies

Les cavéolinopathies regroupent des maladies variées ayant pour origine des mutations dans le gène codant la cavéoline-3 (Cav3) et celui codant la cavine-1. Parmi elles, on retrouve l'ex-LGMD1C, causée par des mutations de la Cav3 (Minetti et al., 1998). Cette dystrophie se transmet de façon dominante et se manifeste à l'enfance ou à l'âge adulte. Elle touche les

Introduction

muscles proximaux mais n'est pas associée à des problèmes cardiaques. Comme décrit précédemment, la capacité de réparation des cellules musculaires est réduite en l'absence de la Cav3 (Corrotte et al., 2013). Cependant le rôle exact joué par la Cav3 dans la réparation membranaire est encore un mystère. Il se pourrait qu'elle n'intervienne pas directement dans le processus de réparation, mais jouerait un rôle dans la localisation physiologique d'autres protéines impliquées dans la réparation membranaire telles que la dysferline et MG53 (Hernández-Deviez et al., 2006, 2008; Matsuda et al., 2001; Cai et al., 2009b).

Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse peuvent se résumer en quatre points :

1. Déterminer quelles Anx interviennent dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.
2. Développer et optimiser une stratégie de microscopie corrélative pour étudier à haute résolution la structure du site de rupture et la localisation des Anx après un dommage du sarcolemme.
3. Proposer un mode d'action pour chaque Anx impliquée dans la réparation membranaire.
4. Déterminer si le contexte pathologique de cellules dystrophiques (dysferlinopathie et cavéolinopathie) influe sur l'expression des Anx.

Pour mener à bien ce travail, nous nous sommes focalisés sur les AnxA1 à A7, et avons utilisé une lignée musculaire établie à partir du muscle d'un homme sain. Nous avons suivi plusieurs axes d'études :

1. Détermination des Anx exprimées dans la lignée musculaire.
2. Etablissement d'outils moléculaires et cellulaires pour étudier l'implication des Anx dans la réparation membranaire.
3. Etude du trafic des Anx lors d'un dommage membranaire par microscopie de fluorescence.
4. Etude du site de rupture et de la localisation des Anx à haute résolution par microscopie électronique à transmission. Le développement de la technique a conduit à une publication présentée en Annexes.
5. Etude préliminaire de la capacité de réparation de la membrane plasmique de cellules musculaires déficientes en Anx.
6. Etude comparative de l'expression des Anx dans des cellules saines et des cellules dystrophiques issues de patients atteints de dysferlinopathie (ex-LGMD2B) et cavéolinopathie (ex-LGMD1C).

Matériels et Méthodes

1. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées dans ce projet sont présentées ci-dessous.

- La lignée LHCN-M2 a été établie à partir de cellules satellites du muscle pectoral d'un homme sain de 41 ans (Zhu et al., 2007). LHCN est un acronyme signifiant Lox-Hygro-hTERT et Cdk4-Neo, qui correspondent aux deux constructions plasmidiques utilisées pour l'immortalisation des myoblastes. Le terme M2 fait référence au sous-clone très bien différencié et caractérisé des myoblastes LHCN.
- La lignée 578, déficiente en dysferline, a été établie à partir de cellules satellites du triceps d'une femme de 25 ans atteinte de l'ex-LGMD2B (Philippi et al., 2012). La patiente a été diagnostiquée comme étant porteuse de la mutation homozygote c.2810 + 2T>A dans le gène codant la dysferline, qui a pour conséquence l'absence d'expression de la protéine (Carmeille et al., 2016).
- La lignée 650, déficiente en cavéoline-3, a été établie à partir de cellules satellites du muscle vaste latéral d'un homme de 44 ans atteint de l'ex-LGMD1C (Timmel et al., 2015). Ce patient est porteur de la mutation hétérozygote c.80 G>A dans le gène de la cavéoline-3, remplaçant l'Arg27 en Glu. Cela a pour conséquence la séquestration de la protéine dans l'appareil de Golgi et une forte diminution de son expression (Carmeille et al., 2016).

Ces lignées nous ont été fournies par l'équipe de Vincent Mouly du Centre de recherche en Myologie de Paris (Sorbonne Université – Inserm UMRS 974).

- La lignée MDA-MB-231 (désignée ci-après comme MDA) est une lignée établie à partir de cellules de l'effusion pleurale (fluide s'accumulant dans la cavité pleurale qui entoure les poumons) d'une femme de 51 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique (Cailleau et al., 1974). Elle nous a été fournie par l'équipe de Frédéric Saltel de l'Université de Bordeaux (INSERM U1053, Université de Bordeaux).

B. Milieux de culture

La lignée saine LHCN-M2 a été cultivée dans un milieu de croissance appelé KMEM. Ce milieu est composé d'un volume de milieu 199 + GlutamaxTM (Gibco® by Life Technologies), de 4

Matériels et Méthodes

volumes de milieu Dubelcco's modified Eagle Medium (DMEM) « high glucose » + GlutamaxTM sans pyruvate (Gibco® by Life Technologies), de 20% de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco® by Life Technologies), de gentamycine à 50 µg/mL (Gibco® by Life Technologies), et d'un mélange d'additifs « Skeletal Muscle Cell Growth Medium SupplementMix » (Promocell). Ces additifs comprennent la fétuine (12,5 µg/mL), le facteur de croissance épidermique (2,5 ng/mL), le facteur de croissance fibroblastique basique (0,25 ng/mL), l'insuline recombinante humaine (2,5 µg/mL), et la dexaméthasone (0,1 µg/mL).

Les deux lignées dystrophiques étant plus difficiles à maintenir en culture comparées à la lignée saine, elles ont été cultivées dans le milieu de croissance KMEM complémenté par deux fois plus d'additifs.

La différenciation des myoblastes en myotubes a été induite par un milieu de différenciation composé d'un volume de milieu 199 + GlutamaxTM, de 4 volumes de milieu DMEM « high glucose » + GlutamaxTM sans pyruvate, et d'insuline recombinante humaine à 10 µg/mL. Le processus de différenciation commence dès l'ajout du milieu de différenciation et les myotubes apparaissent après une incubation de 72 h à 37°C.

La lignée MDA-MB231 a été cultivée dans un milieu de croissance composé de milieu DMEM « high glucose » + GlutamaxTM avec pyruvate (Gibco® by Life Technologies) supplémenté de 10% de SVF.

C. Entretien des cellules

Les cellules ont été cultivées dans des flasks de 25 cm², dans un incubateur à 37°C et une atmosphère humide à 5% de CO₂. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80 à 90%, elles sont décollées pour être réensemencées selon le protocole suivant.

Les cellules ont été lavées une fois au Dubelcco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) dépourvu de calcium et de magnésium (noté DPBS^{-/-}), puis décollées avec une solution de trypsine-EDTA à 0,05% (Gibco®) pendant 5 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées avec l'ajout de milieu de croissance, puis centrifugées à 200g pendant 5 min à température ambiante afin d'éliminer le surnageant. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans 1 mL de milieu de croissance, puis la concentration cellulaire a été estimée à l'aide d'une cellule de Thoma. Le volume adéquat a alors été calculé pour réensemencer le nombre de cellules souhaité.

2. Western-blot

A. Préparation des extraits protéiques

Les cellules ont été cultivées, décollées, centrifugées, lavées au DPBS supplémenté de calcium et de magnésium (noté DPBS+/+) puis centrifugées à 200g 5 min dans les mêmes conditions que lors d'un passage. Le culot a été repris dans du DPBS/- supplémenté d'Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) à 1 mM et d'inhibiteurs de protéases (Sigma) dilués au 1/10^e, et placé 24 h à -20°C. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication (sonicateur Branson digital sonifier, amplitude 20%, durée de 2 min avec des impulsions de 5 s et intervalles de 5 s). Après deux centrifugations à 12000g d'1 min afin d'éliminer les débris du surnageant, les extraits protéiques ont été dosés selon la méthode de Bradford.

B. Migration et transfert des protéines

Les protéines ont été séparées en conditions dénaturantes. L'équivalent de 3 ou 10 µg de protéines a été mélangé au tampon de charge (10% glycérol, 2% SDS, 0,05% bleu de bromophénol, 50 mM Tris-HCl, 0,29 M β-mercapto-éthanol, pH 6,8) et soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 10% et 0,1% SDS. La migration a été réalisée dans un tampon de migration (25 mM Trizma®Base (Sigma), 200 mM glycine, 1% SDS) sous un courant d'intensité de 30 mA pendant environ 1 h 30. Le marqueur de masse moléculaire Precision Plus Protein Dual Color standards (Biorad) a été utilisé pour estimer la masse moléculaire apparente des protéines d'intérêt.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Biorad) dans un tampon de transfert (20% éthanol, 25 mM Trizma®Base, 200 mM glycine, 1% SDS) pendant 1 h sous une tension de 100 V.

C. Détection des protéines d'intérêt

Après transfert, la membrane de PVDF a été rincée rapidement à l'eau distillée puis saturée avec du tampon Tris-buffered saline Tween-20 (TBST)/lait (10 mM Trizma®Base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5% lait écrémé, pH 8) sous agitation pendant 2 h à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps (Ac) primaire dilué dans le tampon TBST/lait (**Tableau 2.1**) sur la nuit à 4°C sous agitation. Après 5 lavages de 5 min avec le tampon TBST/lait,

Matériels et Méthodes

les anticorps secondaires couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase) dilués dans le tampon TBST/lait (**Tableau 2.1**) ont été incubés avec la membrane pendant 2 h à température ambiante sous agitation. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme témoin de charge. Après 5 nouveaux lavages de 5 min avec le tampon TBST/lait, les protéines d'intérêt ont été révélées à l'aide du kit Opti-4CN™ Substrate kit (Biorad) à température ambiante sous agitation, ou du kit Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad) 5 min à température ambiante, et lavées à l'eau distillée. Les membranes révélées en colorimétrie (kit Opti-4CN) ont été scannées avec l'ImageScanner (Amersham) et le logiciel LabScan, et l'intensité des bandes analysée avec le logiciel ImageJ. Les membranes révélées en chimiluminescence (kit Clarity) ont été scannées avec le FluorChem Imaging System (Alpha Innotech Corporation) et traitées avec ImageJ.

Anticorps primaires						
Cible	Espèce de provenance	Clonalité	Fournisseur (référence)	Dilution		
				WB	IF	
AnxA1	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (A3359)	1:1000	1:100	
AnxA1	Lapin	Polyclonal	Boster Biological (PA1006)	1:1000	1:100	
AnxA2	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (WH0000302M1)	1:500	1:100	
AnxA3	Souris	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-390502)	1:200	-	
AnxA4	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (SAB4200121)	1:500	-	
AnxA4	Lapin	Polyclonal	Boster Biological (PA1007-1)	1:1000	-	
AnxA5	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (A8604)	1:1000	1:400	
AnxA5	Lapin	Polyclonal	Abcam (ab14196)	-	1:100	
AnxA6	Souris	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-271859)	1:1000	1:100	
AnxA7	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (A4475)	1:1000	1:400	
GFP	Lapin	Polyclonal	Novusbio (NB600-308)	1:1000	-	
GAPDH	Lapin	Polyclonal	Sigma-Aldrich (G9545)	1:3000	-	
Anticorps secondaires						
Cible	Espèce de provenance	Clonalité	Couplage	Fournisseur	Dilution	
					WB	IF
IgG de souris	Mouton	Polyclonal	HRP	Amersham	1:2000	-
IgG de lapin	Gorille	Polyclonal	HRP	Amersham	1:2000	-
IgG de souris	Chèvre	Polyclonal	Alexa488	Thermofisher	-	1:1000
IgG de souris	Chèvre	Polyclonal	Alexa488 + bille d'or	Nanoprobes	-	1:100
IgG de lapin	Âne	Polyclonal	Alexa546	Invitrogen	-	1:1000

Tableau 2.1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt en Western-Blot (WB) et immunocytofluorescence (IF).

3. Rupture de la membrane plasmique

A. Test de réparation membranaire

Pour déterminer la capacité des cellules à réparer une rupture de la membrane plasmique, nous avons utilisé la sonde FM1-43 (N-(3-Triéthylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide). Cette molécule amphiphile possède deux caractéristiques importantes pour nos expériences. La première est sa propriété de s'insérer dans le feuillet lipidique des membranes sans la possibilité de les traverser ; la deuxième est sa capacité d'émettre de la fluorescence en milieu hydrophobe (**Figure 3.1**). En d'autres termes, le FM1-43 devient fluorescent lorsqu'il s'insère dans les membranes.

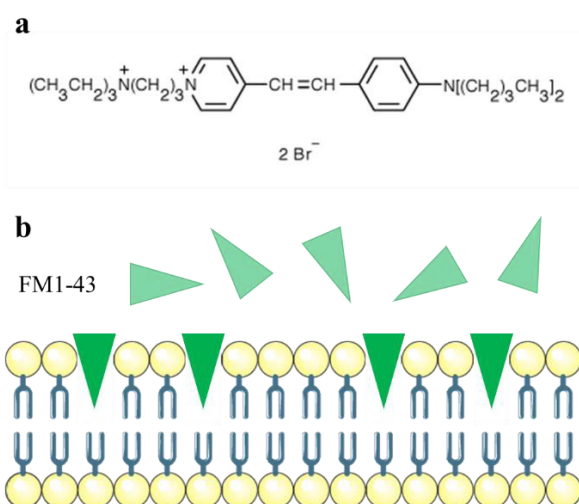


Figure 3.1 : Représentation schématique de la sonde FM1-43.

(a) Formule semi-développée du FM1-43. Image tirée de thermofisher.com. (b) Représentation schématique de l'insertion de la sonde FM1-43 dans une bicouche lipidique. [Image](#) modifiée de smart.servier.com, [CC BY 3.0](#).

Les cellules ont été incubées avec la sonde FM1-43, et la rupture de la membrane plasmique a été induite par irradiation laser selon le protocole développé dans notre équipe (voir Annexe 1) (Carmeille et al., 2017). Lors d'une rupture, le FM1-43 entre dans la cellule et s'insère dans les membranes des organelles, augmentant ainsi la fluorescence intracellulaire de la cellule. Après réparation du dommage, l'entrée de FM1-43 est stoppée, stabilisant l'intensité de fluorescence de la cellule. Au contraire, en absence de réparation, la fluorescence augmente en continu. Ainsi, un suivi cinétique de la fluorescence globale de la cellule irradiée permet de déterminer

Matériels et Méthodes

si elle se répare ou non. Deux exemples de cinétique sont décrits dans la section 2B de la partie Résultats pour plus de détails. R. Carmeille, doctorant de l'équipe de 2012 à 2015, est le principal contributeur de ce protocole. Au commencement de ma thèse, le Bordeaux Imaging Center, où la rupture de la membrane plasmique est réalisée, a remplacé le microscope inversé équipé du laser infrarouge pour l'irradiation par un microscope droit. Le travail de ma première année de thèse a contribué à adapter le protocole à l'utilisation d'un microscope droit en développant un nouveau support qui permet l'irradiation des cellules (**Figure 3.2**). Une lamelle est fixée au support avec de la graisse. La lamelle où les cellules sont adhérees est placée au-dessus du support, après avoir rempli l'espace entre les deux lamelles de DPBS/-/ supplémenté de Ca^{2+} à 1 mM pour l'irradiation.

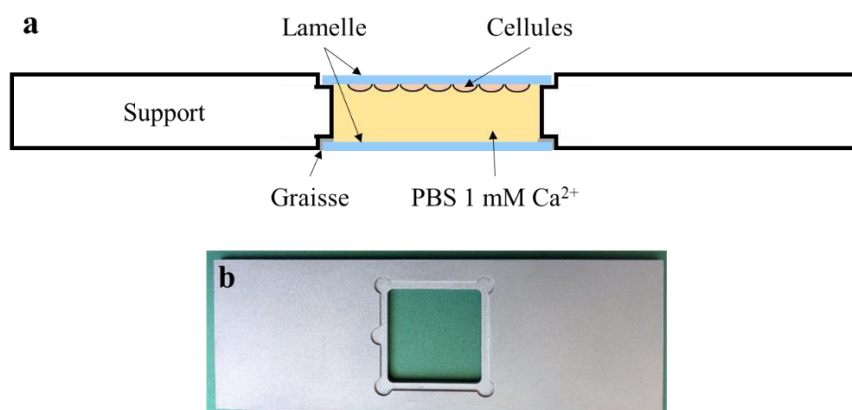


Figure 3.2 : Support utilisé pour l'irradiation des cellules.

(a) Représentation schématique de l'assemblage pour l'irradiation des cellules. (b) Photographie du support en métal pour des lamelles 18x18 mm.

B. CLEM

Nous avons également développé une méthodologie de microscopie corrélative (CLEM pour Correlative Light and Electron Microscopy) permettant de déterminer la localisation subcellulaire des Anx dans les cellules endommagées à haute résolution pour comprendre le mécanisme de la réparation membranaire. Cette méthode combine la microscopie de fluorescence et la microscopie électronique à transmission et a conduit à une publication (Croissant et al., 2018) (voir Annexe 2).

4. Immunocytofluorescence

A. Dans les cellules intactes

Les myoblastes et les myotubes ont été cultivées sur des lamelles de verre compartimentées (Lab-Tek™). Les cellules ont ensuite été lavées au DPBS+/+ et fixées au méthanol 100% pendant 5 min à -20°C. Après lavages au DPBS+/+, elles ont été saturées dans un tampon de saturation de DPBS+/+ et 2% de BSA pendant 10 min, puis incubées avec les Ac primaires monoclonaux de souris (**Tableau 2.1**) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages au DPBS/BSA2%, les cellules ont été incubées pendant 1 h à température ambiante avec les Ac secondaires polyclonaux de chèvre anti-IgG de souris couplés au fluorochrome Alexa488, puis de nouveau lavées au DPBS/BSA2%. Les cellules ont ensuite été incubées avec du DAPI à 200 nM pendant 5 min à température ambiante, et lavées 3 fois en DPBS+/+. Les cellules immunomarquées ont alors été observées au microscope d'épifluorescence (Olympus IX81) équipé des cubes de fluorescence présentés ci-dessous.

- U-MINIBA2 : observation dans le vert (Alexa488 ou GFP), filtre d'excitation passe-bande 470-490 nm, miroir dichroïque 505 nm, filtre d'émission passe-bande 510-550 nm
- U-MWU2 : observation dans le bleu (DAPI), filtre d'excitation passe-bande 330-385 nm, miroir dichroïque 400 nm, filtre d'émission passe-haut 420 nm
- U-MWG2 : observation dans le rouge (Alexa546 ou mCherry), filtre d'excitation passe-bande 510-550 nm, miroir dichroïque 570 nm, filtre d'émission passe-haut 590 nm.

B. Dans les cellules endommagées

Les myotubes ont été générés comme décrit dans le paragraphe 1B dans des boîtes de Pétri à fond en verre équipées d'une lamelle quadrillée présentant un code alphanumérique dans chaque case (MatTeks™). Les cellules irradiées ont pu ainsi être aisément retrouvées au cours des étapes ultérieures. Avant l'induction de la rupture, les cellules ont été incubées dans du DPBS/-/ suppléé en Ca²⁺ à 1 mM. Les protocoles de dommage membranaire et de microscopie corrélative ont été réalisés comme indiqué dans la publication présentée en Annexe 2 (Croissant et al., 2018).

C. Quantification de l'intensité de fluorescence

Dans certaines expériences, l'intensité de fluorescence traduisant la quantité d'Anx endogène cytosolique dans les myoblastes et les myotubes a été quantifiée en utilisant une macro à l'aide du logiciel ImageJ. Pour cela, sur des images 8 bits, le cytosol des cellules a été isolé des noyaux grâce à un marquage au DAPI, et du fond grâce à un seuil de fluorescence. L'intensité moyenne de fluorescence a ensuite été mesurée, à laquelle est soustrait l'intensité moyenne de fluorescence de cellules contrôles incubées sans anticorps primaires.

5. Diminution (knock-down) de l'expression des Anx dans les myotubes

A. Les shARN (short hairpin RNA)

Dans un premier temps, la diminution de l'expression des Anx a été réalisée selon la stratégie des shARN comme décrit précédemment pour le knock-down de l'AnxA5 dans les cellules musculaires (Carmeille et al., 2016). Les shARN sont des petits ARN à épingle à cheveux. Ils consistent en une séquence sens suivie d'une boucle et de la séquence anti-sens complémentaire sous forme palindromique (**Figure 5.1a**). Une fois le shARN transcrit, il est reconnu par le complexe DICER dans le cytoplasme qui le clive en petit ARN interférent (siRNA) (**Figure 5.1b**). Le siRNA lie le complexe RISC qui élimine le brin sens. Le complexe brin antisens/RISC activé reconnaît l'ARN messager (ARNm) cible et induit sa dégradation, empêchant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt.

Matériels et Méthodes

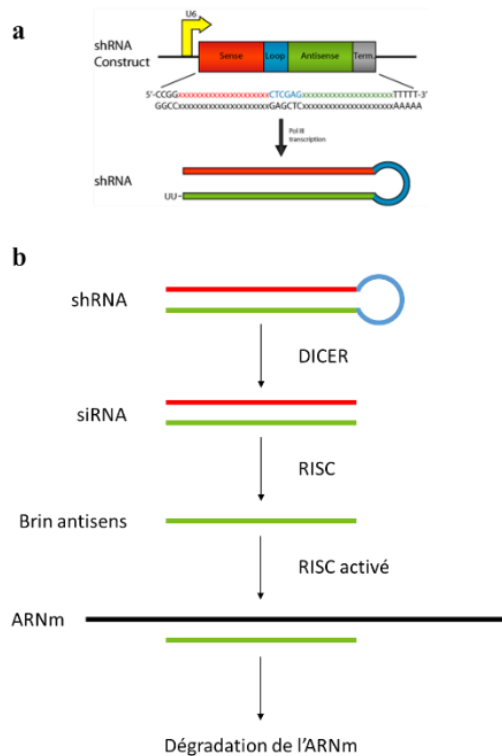


Figure 5.1 : shARN et mécanisme du knock-down.
 (a) Représentation schématique d'un shARN. Un shARN est constitué d'une séquence sens (rouge) et une séquence antisens palindromique (vert) séparées par une boucle (bleu). [Image](#) tirée de [addgene.org](#).
 (b) Représentation schématique du mécanisme d'action d'un shARN. Dans le cytoplasme, le shARN est reconnu par le complexe DICER qui clive la boucle pour former un siRNA. Ce dernier lie le complexe RISC qui induit la dégradation du brin sens. Le complexe brin antisens/RISC activé lie l'ARNm cible qui est dégradé, empêchant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt.

Les séquences des shARN ciblant les différentes Anx étudiées et la séquence contrôle (Sigma) sont présentées ci-après.

- shARN ciblant l'AnxA1 (shARNA1) :
 5'CCGGGCATTCTATCAGAAGATGTATCTCGAGATACATCTTCTGATAGAAT
 GCTTTTTG^{3'}
- shARN ciblant l'AnxA2 (shARNA2) :
 5'CCGGCGGGATGCTTTGAACATTGAACTCGAGTTCAATGTTCAAAGCATCC
 CGTTTTTG^{3'}
- shARN ciblant l'AnxA6 :
 - shARNA6-1 :
 5'CCGGCGGGCACTTCTGCCAAGAAATCTCGAGATTTCTTGGCAGAA
 GTGCCCGTTTTT^{3'}
 - shARNA6-2 :
 5'CCGGCGGTTGGTGTTCGATGAGTATCTCGAGATACTCATCGAACA
 CCAACCGTTTTT^{3'}
- shARN contrôle :
 5'CCTAAGGTAAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG^{3'}

Matériels et Méthodes

Les séquences ont été introduites dans le plasmide pLKO.1-puro (Sigma) (**Figure 5.2**, position indiquée en pointillés rouges).

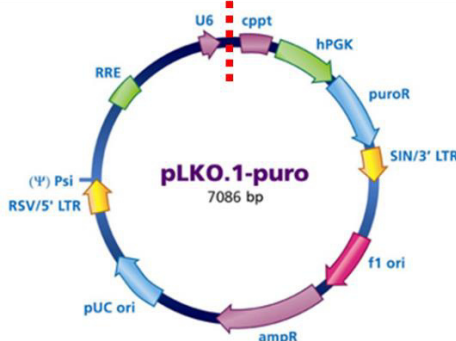


Figure 5.2 : Représentation schématique du plasmide pLKO.1-puro. Image modifiée de sigmaaldrich.com.

Les particules lentivirales contenant les différents plasmides ont été produites par la plateforme de vectorologie de Bordeaux (US005, Université de Bordeaux). Les particules lentivirales dérivent des lentivirus, des virus à ARN capables d'intégrer leur génome dans celui d'une cellule hôte grâce à la présence de séquences LTR (Long Terminal Repeat). Comme ces derniers, les particules lentivirales sont capables d'infecter les cellules cibles et d'injecter leur génome (dans notre cas un plasmide) qui s'intègre dans celui de la cellule. En revanche, l'absence de séquences codant les protéines de l'enveloppe les rend incapables de se répliquer.

Les cellules à l'état de myoblastes et les MDA ont été transduites à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 100 en milieu Opti-MEM® (Gibco® by Life Technologies) pendant 24 h à 37°C, cultivées en milieu de croissance pendant 24 h à 37°C, puis sélectionnées dans leur milieu de croissance supplémenté de puromycine à 2 µg/mL pendant 72 h à 37°C. Les protéines totales ont ensuite été extraites pour analyse en Western-Blot.

Pour l'obtention de myotubes déficients en Anx, les myoblastes ont été incubés en milieu de différenciation pendant 7 h 30 à 37°C, puis transduits à une MOI de 100 (pour la condition shARNA6-1 + shARNA6-2, MOI de 50 pour chaque plasmide) en milieu Opti-MEM® pendant 24 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées en milieu de différenciation pendant 24 h, puis sélectionnées en milieu de différenciation supplémenté de puromycine à 2 µg/mL pendant 72 h. Des expériences d'immunocytofluorescence ou de tests de réparation membranaire ont ensuite été réalisées.

B. CRISPR-Cas9

La diminution de l'expression de l'AnxA6 a également été testée en utilisant la stratégie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9. Contrairement aux shARN qui s'hybrident avec les ARN messagers cibles pour induire leur dégradation, les ARN guides s'hybrident avec une séquence du gène cible et guident la nucléase Cas9 qui induit une coupure dans la séquence reconnue. Le système de réparation non homologue de l'ADN induit une mutation d'insertion ou de délétion qui décale le cadre de lecture et inactive le gène. Cette stratégie est réputée pour être beaucoup plus efficace que la transduction de shARN pour l'inactivation génique.

Deux séquences d'ARN guides (sgRNA pour short guide RNA) ont été utilisées.

- sgRNA ciblant l'AnxA6 (sgAnx6) : 5'CGTAGAGGGACTTGTAGCTC3'
- sgRNA contrôle (sgCtl) : 5'ATATTCGGCAGTTGCAGCA3'

Les séquences utilisées ont été introduites dans le vecteur lentiCRISPRv2 (**Figure 5.3**) fourni par Feng Zhang (Addgene, plasmide #52961) (Sanjana et al., 2014) aux sites BsmBI (positions 2852 et 4737 indiquées en pointillés rouges). Les particules lentivirales contenant les différents plasmides ont été produites par la plateforme de vectorologie de Bordeaux (US005, Université de Bordeaux).

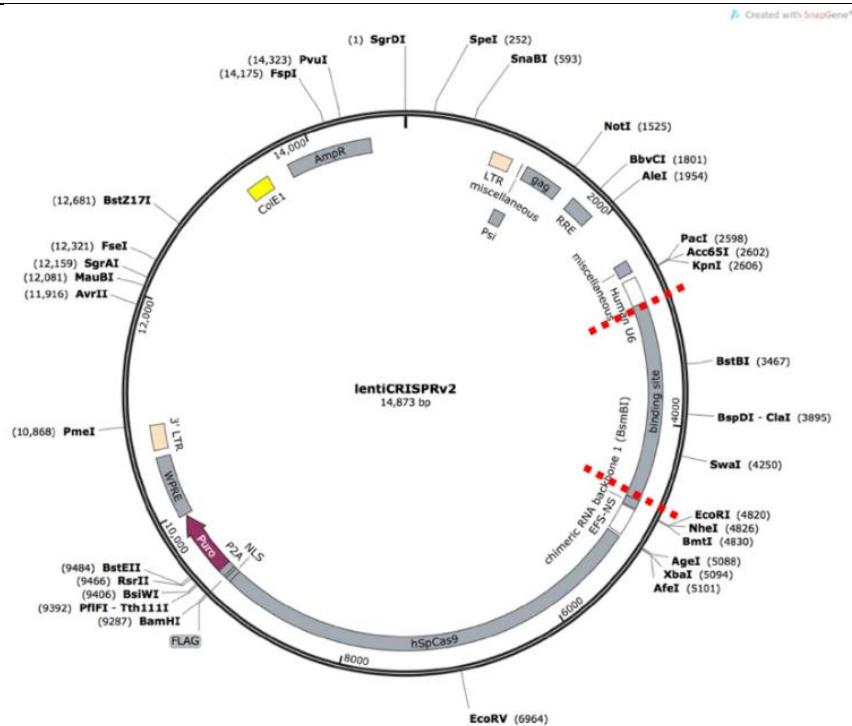


Figure 5.3 : Représentation schématique du plasmide lentiCRISPRv2. *Image* modifiée de addgene.org.

Matériels et Méthodes

Les cellules à l'état de myoblastes ont été transduites à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 50 en milieu Opti-MEM® (Gibco® by Life Technologies) pendant 24 h à 37°C, puis en milieu de croissance pendant 24 h, et sélectionnées en milieu de croissance supplémenté de puromycine à 2 µg/mL pendant 4 jours à 37°C. Les cellules ont ensuite été observées en immunocytofluorescence, ou les protéines totales ont été extraites pour analyse en Western-Blot.

6. Imagerie en temps réel des Anx couplées à des protéines fluorescentes

A. Amplification et extraction des plasmides

Le plasmide commercial pEGFP-N3 (Clontech) contenant la construction AnxA1-GFP ou AnxA2-GFP ou AnxA2-mCherry et le plasmide commercial pEGFP-N1 contenant la construction AnxA6-GFP (Figure 6.1) nous ont été fournis par Volker Gerke (Université de Münster, Allemagne).

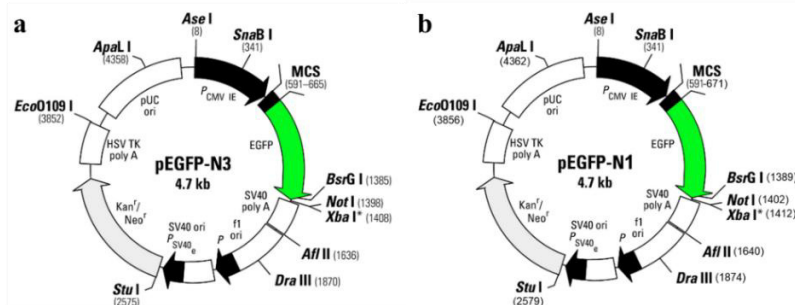


Figure 6.1 : Représentation schématique des plasmides pEGFP-N3 (a) et pEGFP-N1 (b). Images (a) et (b) modifiées de addgene.org.

Les constructions ont été vérifiées par digestion et migration sur gel d'agarose. Pour cela, 2 µL de plasmide ont été mélangés à 0,3 µL d'enzyme de restriction BamHI (Roche) et 1 µL de tampon de digestion B 10X (Roche), le tout dans un volume total de 10 µL, et incubés pendant 1 h à 37°C. Le même mélange sans enzyme de restriction nous a servi de condition contrôle (plasmides non digérés). Après ajout de tampon de charge, les différents mélanges ont été déposés dans un gel d'agarose à 0,8% et SyBr® Safe DNA Gel Stain (Roche). La migration a été réalisée dans un tampon de migration TAE (40 mM Tris, 20 mM d'acide acétique, 1 mM d'EDTA) sous une tension

Matériels et Méthodes

de 50 V pendant 25 min. Le marqueur 1 Kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher) a été utilisé pour estimer le poids des fragments plasmidiques. Les images des gels ont ensuite été prises à l'aide du système GeneFlash et Video Graphic Printer UP-895MD (Syngene).

La souche bactérienne *Escherichia coli* XL1-Blue a été transformée avec les différents plasmides pour amplification. Pour cela, 200 μ L de bactéries ont été mélangés à 1 μ L de plasmide et incubés 40 min à 4°C. Après un choc thermique de 2 min au bain-marie à 42°C, le mélange a été incubé avec 800 μ L de milieu LB sans antibiotique sous agitation pendant 45 min à 37°C. 100 μ L de la suspension ont ensuite été étalés sur des boîtes de Pétri en milieu LB supplémenté de l'antibiotique de sélection, la kanamycine à 50 μ g/mL, et incubés sur la nuit à 37°C. Une colonie a été prélevée et amplifiée dans du milieu LB/kanamycine sous agitation pendant 8 h à 37°C, puis 200 μ L de cette pré-culture ont été inoculés dans 100 mL de milieu LB/kanamycine et incubés sous agitation sur la nuit à 37°C. Après deux centrifugations à 6000g de 15 min, les différents plasmides ont été extraits des bactéries transformées à l'aide du kit Plasmid DNA purification Maxi Prep (Marchery-Nagel). Les plasmides amplifiés sont désignés par la suite pA1-GFP, pA2-GFP, pA2-mCh et pA6-GFP (« p » pour plasmide, suivi de l'Anx et du fluorophore correspondants).

A partir de ces plasmides, les plasmides contenant les constructions AnxA4-GFP, AnxA5-GFP, AnxA1-mCherry, AnxA4-mCherry, et AnxA5-mCherry ont été obtenus au laboratoire grâce au kit In-Fusion® HD Cloning (Takara Bio USA, Inc). Une nouvelle construction plasmidique a été obtenue à partir de deux plasmides existants. A titre d'exemple, pour obtenir le plasmide pA1-mCh, nous avons utilisé le pA1-GFP et le pA2-mCh (**Figure 6.2**).

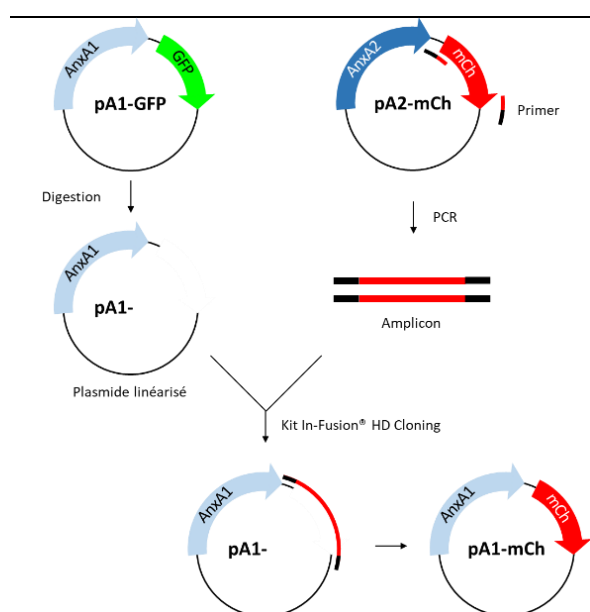


Figure 6.2 : Représentation schématique de la construction des plasmides.

Le plasmide contenant l'Anx d'intérêt (ici pA1-GFP) est digéré par les enzymes de restriction adéquates (voir Tableau 6.1) pour éliminer la séquence de la protéine fluorescente (ici GFP) et obtenir un vecteur linéarisé. La séquence de la protéine fluorescente d'intérêt (ici mCh) est amplifiée par PCR à partir du plasmide pA2-mCh. L'amplicon est ensuite inséré dans le plasmide linéarisé à l'aide du kit In-Fusion® HD Cloning (Takara Bio USA, Inc). La partie noire des primers correspondent aux séquences capables de s'hybrider sur le plasmide receveur.

Matériels et Méthodes

Le pA1-GFP a été digéré avec les enzymes NotI et SmaI pour éliminer la séquence GFP, tandis que la séquence mCherry du pA2-mCh a été amplifiée par PCR en présence de l'enzyme CloneAmp HiFi PCR (Clontech) et des « primers » résumés dans le **Tableau 6.1**. La particularité de ces « primers » est qu'ils sont capables de s'hybrider avec le pA2-mCh et le pA1-GFP, même digéré. Le pA1-GFP digéré (sans la GFP) et les amplicons mCherry ont ensuite été mélangés avec le kit In-Fusion® HD Cloning (Clontech) permettant l'insertion de l'amplicon dans le plasmide linéarisé. Les autres plasmides ont été construits et validés selon le même procédé.

L'ensemble des séquences comprenant la construction Anx + GFP ou Anx + mCherry a été validée par séquençage (société Genewiz).

Nouveau plasmide	Plasmides de départ	Enzymes (digestion du plasmide (1))	Primers (amplification d'une séquence du plasmide (2))
pA4-GFP	(1) pA1-GFP (2) pDONR-A4	NotI et SmaI	5' CGAGCTCAAGCTTCGAATTC ATG GCCATGGCAACCAAAG 3' GTGGCGATGGATCCCGGG TAAT CATCTCCTCCACAGAGA
pA5-GFP	(1) pA1-GFP (2) pDest-A5	EcoRI et SmaI	5' CGAGCTCAAGCTTCGAATTC AAT GGCACAGGTTCTCAGAGGCAC 3' GTGGCGATGGATCCCGGG GTCA TCTTCTCCACAGAGCAG
pA1-mCh	(1) pA1-GFP (2) pA2-mCh	NotI et SmaI	5' CGACGGTACCGCGGGCCCGGGA TCCGCCACCA 3' TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACTT GTACAGCTCGTCC
pA4-mCh	(1) pA4-GFP (2) pA2-mCh	NotI et SmaI	5' AGGAGATGATTACCGGGGATCC GCCACCATGGTG 3' TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACTT GTACAGCTCGTCC
pA5-mCh	(1) pA5-GFP (2) pA2-mCh	NotI et SmaI	5' GGAGAAGATGACCCCCCGGGAT CCGCCACCATGGTG 3' TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACTT GTACAGCTCGTCC

Tableau 6.1 : Outils moléculaires utilisés pour la construction de nouveaux plasmides.

Les séquences en rouge représentent celles qui sont capables de s'hybrider à la fois sur les plasmides (1) et (2) correspondants.

B. Expression des Anx couplées à des protéines fluorescentes

Les cellules MDA, les myoblastes LHCN-M2 et les myotubes à 65 h de différenciation ont été transfectés avec les différents plasmides en utilisant des lipides cationiques. Pour cela, 0,52 μL de lipofectamine 2000 (Life Technologies) et 0,4 μg de plasmide ont été mélangés en milieu Opti-MEM® et incubés 20 min à température ambiante. En parallèle, les cellules ont été incubées en Opti-MEM® pendant 20 min à 37°C, puis avec la solution de transfection pendant 4 h à 37°C. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu de croissance DMEM complet, KMEM ou du milieu de différenciation, respectivement, pendant 20 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été transfectées une seconde fois selon le même protocole.

Des co-transfections de deux plasmides (une Anx-GFP et une Anx-mCherry) ont également été réalisées sur des myotubes. Le protocole utilisé reste le même, à la différence des quantités de plasmides, qui sont de 0,4 μg pour chaque couple de plasmides.

C. Expériences de rupture de la membrane plasmique

Les myotubes transfectés ont été utilisés dans les expériences de microscopie corrélative 48 h après la deuxième transfection. Brièvement, une rupture du sarcolemme a été réalisée en présence de Ca^{2+} à 1 mM avec un laser infrarouge réglé à 820 nm et une puissance de 110 mW. Le suivi cinétique des Anx-GFP et des Anx-mCherry a été réalisé à l'aide d'un microscope confocal biphoton SP5 (Leica) en prenant une image toutes les 1,3 s pendant environ 90 s, avec les réglages suivants :

- GFP : excitation à 488 nm, détection des longueurs d'ondes 500 à 550 nm.
- mCherry : excitation à 561 nm, détection des longueurs d'ondes 570 à 670 nm.

Les cellules ont ensuite été fixées et immunomarquées en utilisant un anticorps secondaire couplé à une bille d'or (Nanoprobes, voir **Tableau 2.1**). Après les étapes de déshydratation, inclusion en résine, réalisation des coupes et coloration, les sites de rupture ont été observés en microscopie électronique à transmission (pour plus de détails sur le protocole de microscopie corrélative cf (Croissant et al., 2018)).

7. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois expériences indépendantes. Les tests statistiques (test de Student pour échantillons indépendants, test de Wilcoxon, ANOVA à un facteur et test de Kruskal-Wallis) ont été réalisés avec le logiciel R. La significativité est fixée à $p < 0,05$.

Résultats

1. Expression et localisation des AnxA1 à A7 endogènes dans les cellules intactes saines

Pour étudier les Anx dans la réparation membranaire du muscle humain, il faut tout d'abord déterminer quelles Anx sont présentes dans les cellules musculaires. La première étape de l'étude a donc consisté à analyser l'expression et la localisation des Anx dans les cellules musculaires squelettiques humaines. La famille des Anx est composée de 12 membres chez l'Homme, mais notre étude s'est focalisée sur les 7 premières, de l'AnxA1 à A7, qui sont les Anx les plus étudiées et les mieux documentées.

A. Expression

L'expression relative des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2 a été examinée par Western-Blot. Nous avons tout d'abord utilisé des anticorps (Ac) primaires monoclonaux de souris pour une analyse comparée des Anx. Par définition, un Ac monoclonal ne reconnaissant qu'un seul épitope, la stœchiométrie de la liaison Ac – protéine cible est de 1:1. L'Ac secondaire utilisé étant le même pour la détection de toutes les Anx, nous avons fait l'hypothèse qu'une quantité équivalente d'Ac secondaires se fixait sur chaque Ac primaire, permettant ainsi une analyse semi-quantitative. Dans ces conditions, les AnxA1, A3 et A4 ne sont pas détectées, indiquant qu'elles sont faiblement ou pas exprimées (**Figure 1.1a-b**). En revanche, les AnxA2, A5, A6 et A7 sont détectées. Les AnxA2 et A5 sont exprimées à des niveaux similaires dans les myoblastes et les myotubes. Par comparaison avec le signal de 50 ng d'AnxA5 recombinante pure (**Figure 1.1c**), la quantité d'AnxA5 endogène est d'environ 60 ng pour 10 µg d'extrait protéique issus de myoblastes ou de myotubes, soit 6 ng/µg d'extrait protéique. Nous estimons que l'AnxA2 est présente à un niveau similaire à l'AnxA5 dans les myotubes. Deux signaux d'AnxA2 sont détectés, une forme majeure à 37 kDa et une forme mineure à 34 kDa correspondant probablement à une forme clivée de l'AnxA2. En effet, il a été observé que la partie N-terminale de l'AnxA2 pouvait être clivée quand les cellules musculaires lisses humaines sont détachées de leur substrat, ou encore lors de processus d'autophagie dans les fibroblastes humains (Babiychuk et al., 2002; Wang and Lin, 2014). La partie N-terminale est sujette à des modifications post-traductionnelles et est notamment essentielle à l'interaction entre l'AnxA2 et la protéine S100A10 pour la formation d'hétérotétramère, ainsi qu'à la régulation de l'exocytose (Grindheim et al., 2017; Gabel et al., 2019). La forme clivée d'AnxA2 ne peut donc pas former d'hétérotétramère ou subir certaines modifications, ce qui peut avoir des conséquences sur sa

Résultats

fonction. L'AnxA6 est exprimée deux fois plus dans les myotubes que dans les myoblastes humains (**Figure 1.1a-b**). Cette observation est en contradiction avec une étude montrant une baisse d'expression de l'AnxA6 après la différenciation (Draeger et al., 2003). Cependant, les résultats de cette étude ont été obtenus à partir de myoblastes immortalisés murins et de fibres musculaires primaires porcines, ce qui peut expliquer cette différence. Une isoforme d'AnxA7 à 47 kDa est détectée dans les myoblastes et les myotubes, et une isoforme à 51 kDa est détectée uniquement dans les myotubes. Dans les fibres musculaires de mammifères, seule l'isoforme à 51 kDa est détectée, tandis que la forme à 47 kDa est présente uniquement dans les myoblastes (Selbert et al., 1995). Malgré la différenciation des myoblastes en myotubes, de nombreuses cellules restent à l'état de myoblastes, ce qui explique la présence des deux isoformes dans l'extrait protéique des myotubes.

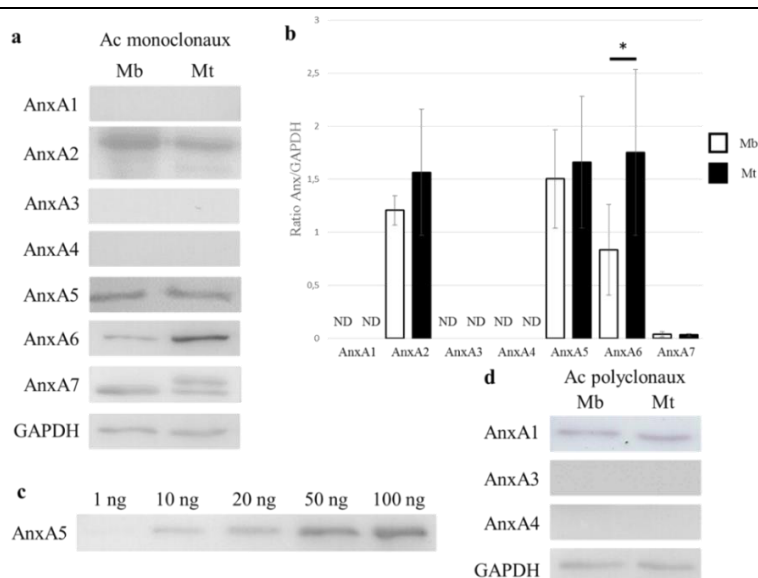


Figure 1.1 : Expression des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2.

Le contenu cellulaire des AnxA1, A2, A3, A4, A5, A6 et A7 dans les myoblastes (Mb) et les myotubes (Mt) LHCN-M2 après 3 jours de différenciation a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 μ g d'extraits protéiques a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (a-b) Les AnxA1 (37 kDa), A2 (38 kDa), A3 (36 kDa), A4 (36 kDa), A5 (35 kDa), A6 (68 kDa) et A7 (47 et 51 kDa) ont été détectées avec un anticorps (Ac) primaire monoclonal de souris, et la GAPDH (contrôle de charge) a été détectée avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin. ND : non détectée. Test de Wilcoxon, * : $p < 0.05$. (c) 1, 10, 20, 50 et 100 ng d'AnxA5 pure ont été soumis à un SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (d) Les AnxA1, A3 et A4 ont été détectées avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin.

Afin de savoir si les AnxA1, A3 et A4 sont présentes, nous avons utilisé des Ac primaires polyclonaux de lapin, reconnaissant plusieurs épitopes, pour augmenter le signal et détecter ces Anx (**Figure 1.1d**). L'AnxA1 est exprimée à un niveau similaire dans les myoblastes et les myotubes, alors que les AnxA3 et A4 n'ont pas été détectées. Les expériences d'immunocytofluorescence montrent la présence d'AnxA4 dans le cytoplasme des cellules LHCN-M2, bien que sa concentration soit faible (**Figure 1.2**). Des expériences supplémentaires de Western-Blot avec de

Résultats

plus grande quantité d'extraits protéiques totaux seraient nécessaires pour quantifier l'AnxA4 endogène. Les expériences d'immunofluorescence n'ont pas permis de détecter l'AnxA3 qui ne semble donc pas être exprimée dans les cellules musculaires humaines. Leur faible concentration rend peu probable leur implication dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées.

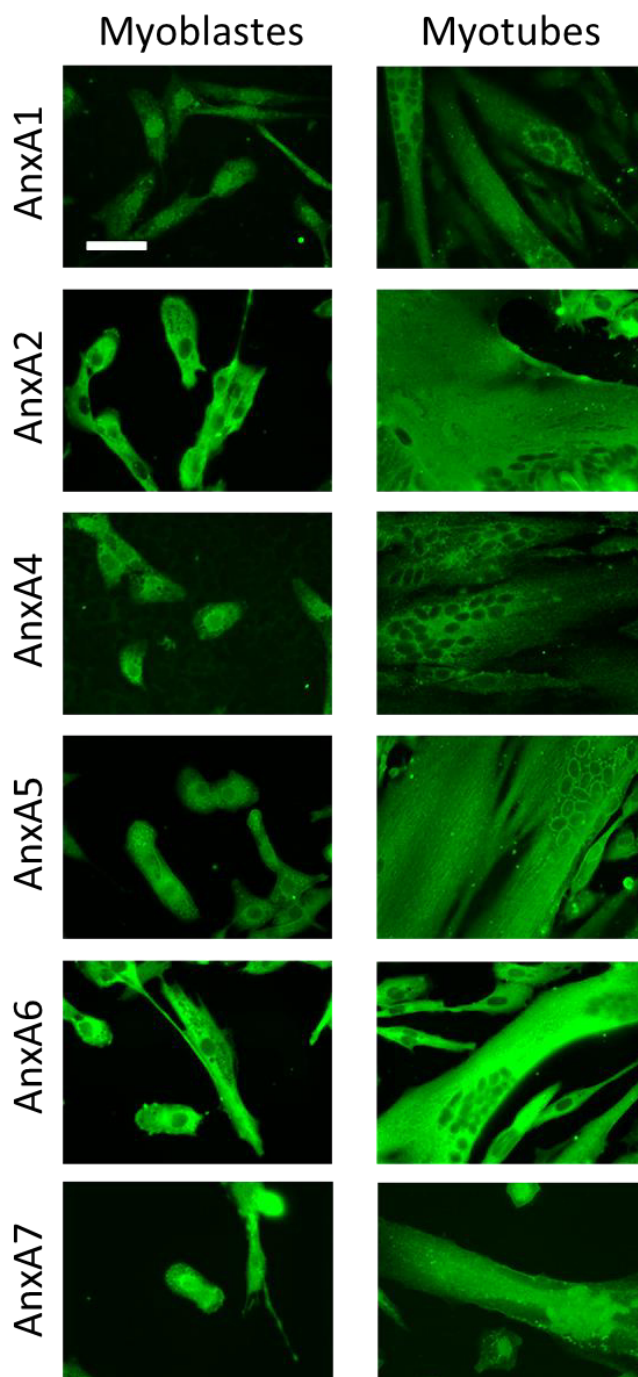


Figure 1.2 : Localisation subcellulaire des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes intacts LHCN-M2. La localisation subcellulaire des AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7 endogènes dans les myoblastes (colonne gauche) et les myotubes (colonne droite) intacts LHCN-M2 a été analysée par immunocytofluorescence. Barre d'échelle : 50 μ m.

B. Localisation

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation subcellulaire des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2 par immunocytofluorescence (**Figure 1.2**). Dans les cellules musculaires de souris, l'AnxA1 est exclusivement cytoplasmique dans les myoblastes et les myotubes (Bizzarro et al., 2010). En revanche, nos résultats montrent que l'AnxA1 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes, mais exclusivement dans le cytoplasme des myotubes humains. Comme précédemment décrit pour d'autres lignées cellulaires, nous avons observé que les AnxA2 (Skrahina et al., 2008) et A6 (de Muga et al., 2009) sont localisées exclusivement dans le cytoplasme des myoblastes et des myotubes humains. Dans la littérature, l'AnxA4 endogène, ou exprimée de façon recombinante, est présente dans le cytoplasme et le noyau de différents types cellulaires (Piljić and Schultz, 2006 ; Boye et al., 2017). Dans les cellules musculaires squelettiques humaines, l'AnxA4 est également présente dans le cytoplasme et le noyau des myoblastes, mais uniquement dans le cytoplasme des myotubes (**Figure 1.2**). Enfin, nous avons observé, comme précédemment décrit, que l'AnxA5 (Skrahina et al., 2008 ; Wang et al., 2001) et l'AnxA7 (Selbert et al., 1995) sont localisées dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes et des myotubes. L'AnxA3 n'a pas été détectée par immunocytofluorescence (données non montrées).

C. Conclusion

Les AnxA1, A2, A5, A6 et A7 sont exprimées dans les myoblastes et les myotubes de la lignée LHCN-M2. L'AnxA6 est surexprimée dans les myotubes, ce qui pourrait indiquer son importance dans des fonctions physiologiques des cellules musculaires différenciées, comme la réparation membranaire. Les Anx sont toutes localisées dans le cytosol des myoblastes et des myotubes, à l'exception des AnxA1, A4, et A5 que l'on retrouve également dans le noyau des myoblastes, et l'AnxA7 dans le noyau des myoblastes et des myotubes. Dans l'ensemble, ces résultats concordent avec ceux de la littérature. Bien qu'il ait été récemment montré que l'AnxA4 est impliquée dans la réparation membranaire des cellules cancéreuses (Boye et al., 2017), elle semble peu présente dans les cellules musculaires squelettiques humaines pour y jouer un rôle. L'AnxA3 semble absente des cellules musculaires, et par conséquent son implication dans la réparation membranaire peu probable.

2. Développements moléculaire, cellulaire et méthodologique

A. Construction des outils moléculaires et cellulaires nécessaires à l'étude

Pour pouvoir étudier l'implication et le comportement des Anx dans la réparation membranaire, nous avons construit des outils moléculaires et cellulaires. Pour déterminer si une Anx donnée est nécessaire ou non à la réparation des cellules musculaires, nous avons cherché à établir des myotubes déficients en Anx. Pour cela, nous avons testé deux stratégies : les shARN et la CRISPR-Cas9. Enfin, pour étudier le comportement des Anx après un dommage membranaire en microscopie dans les myotubes sains, nous avons construit des plasmides permettant l'expression des AnxA1, A2, A4, A5 et A6 couplées à une protéine fluorescente (GFP ou mCherry).

i. Etablissement de myotubes déficients en Anx

Stratégie shARN

Les Anx les plus souvent décrites comme jouant un rôle dans la réparation membranaire des cellules musculaires sont les AnxA1, A2, A5 et A6 (Roostalu and Strähle, 2012; Demonbreun et al., 2016b; Carmeille et al., 2016). Le rôle de l'AnxA5 dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées a déjà été bien étudié au laboratoire (Carmeille et al., 2016). Pour analyser les conséquences de l'absence des AnxA1, A2 et A6 dans la réparation membranaire, nous avons appliqué la stratégie des shARN comme décrit précédemment pour l'AnxA5 (Carmeille et al., 2016). Les shARN s'hybrident avec les ARN messagers cibles pour induire leur dégradation via le complexe RISC (voir Matériels et Méthodes pour plus de détails). Nous avons utilisé des séquences commerciales (Sigma) en choisissant celles présentant le niveau moyen de knock-down le plus élevé selon le fournisseur. Dans un premier temps, les particules lentivirales contenant les différentes constructions plasmidiques (shARNA1 ciblant l'AnxA1, shARNA2 ciblant l'AnxA2, et shARNA6-1 et shARNA6-2 ciblant l'AnxA6) ont été testées sur les cellules cancéreuses MDA. Ces cellules ont la capacité d'être facilement modifiées (source : <https://www.atcc.org>), contrairement aux cellules musculaires réputées difficiles à transfecter ou transduire. Après plusieurs tests préliminaires, nous avons choisi de transduire les cellules à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 100 pour un taux de transduction optimale. Le contenu cellulaire des cellules transduites et des cellules non transduites (CTL), a été analysé par Western-Blot (**Figure 2.1**). Les résultats montrent la grande efficacité des séquences shARN à diminuer l'expression des Anx correspondantes, avec une diminution de plus de 85% de

Résultats

l'AnxA1, de 85% de l'AnxA2, et de plus de 90% de l'AnxA6. Nous avons également testé une séquence shARN contrôle (shARNctl) ne reconnaissant aucune séquence d'ARNm chez l'humain, et aucune différence n'a été observée entre les cellules transduites contrôles et les cellules non transduites (**Figure 2.1d**).

Cette première série d'expériences a permis de valider les séquences shARN choisies et de valider le protocole.

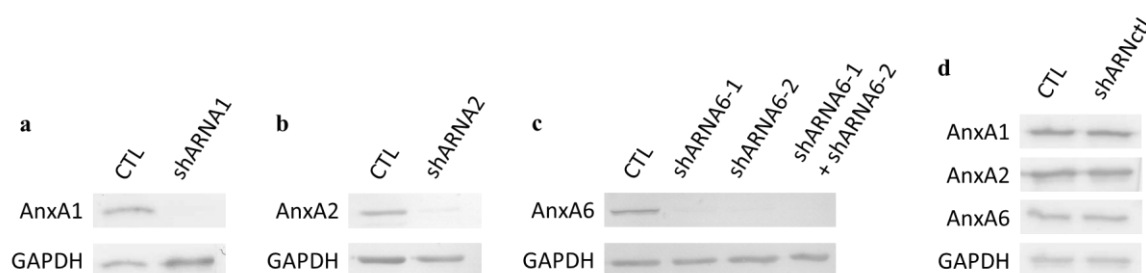


Figure 2.1 : Diminution du taux d'expression des AnxA1, A2 et A6 endogènes dans les cellules MDA par la stratégie des shARN.

Les cellules MDA ont été transduites à une MOI de 100 avec les séquences shARN A1 (a), shARN A2 (b), shARN A6-1, shARN A6-2, ou transduites avec les deux séquences shARN A6-1 + shARN A6-2 à une MOI de 50 chacune (c), ou avec une séquence shARN contrôle (shARNctl) (d). Des cellules non transduites (CTL) ont servi de contrôle. Le contenu cellulaire des AnxA1, A2 et A6 a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 μ g d'extraits protéiques a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. L'AnxA1 a été détectée avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin, et les AnxA2 et A6 avec des anticorps primaires monoclonaux de souris. La GAPDH (contrôle de charge) a été détectée avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin.

Nous avons ensuite analysé le contenu cellulaire des myoblastes LHCN-M2 transduits et non transduits (CTL) dans les mêmes conditions que les cellules MDA. Les shARN induisent la diminution du taux d'expression des Anx cibles, mais, avec une efficacité plus faible que dans les cellules MDA (**Figure 2.2**). La séquence shARN A1 induit une baisse de 92 (\pm 5) % de l'AnxA1 ; la séquence shARN A2 une baisse de 51 (\pm 3) % de l'AnxA2 ; la séquence shARN A6-1 une baisse de 57 (\pm 15) % de l'AnxA6 ; la séquence shARN A6-2 une baisse de 53 (\pm 18) % de l'AnxA6 ; et le mélange des séquences shARN A6-1 et shARN A6-2 une baisse de 63 (\pm 11) % de l'AnxA6. Aucune différence d'expression n'est observée entre les cellules non transduites (CTL) et les cellules transduites avec la séquence shARN contrôle (shARNctl) (**Figure 2.2d**), indiquant que la baisse d'expression n'est pas due au « stress » subi par les cellules lors des étapes de transduction. De plus, nous avons vérifié la spécificité des séquences shARN. Par exemple, l'expression des AnxA2 et A6 n'est pas affectée par l'introduction des shARN A1 dirigés contre l'AnxA1 (**Figure 2.2e**).

Résultats

Comme attendu, nous avons observé le plus souvent une baisse d'expression des Anx moins forte dans les cellules musculaires que dans la lignée cancéreuse.

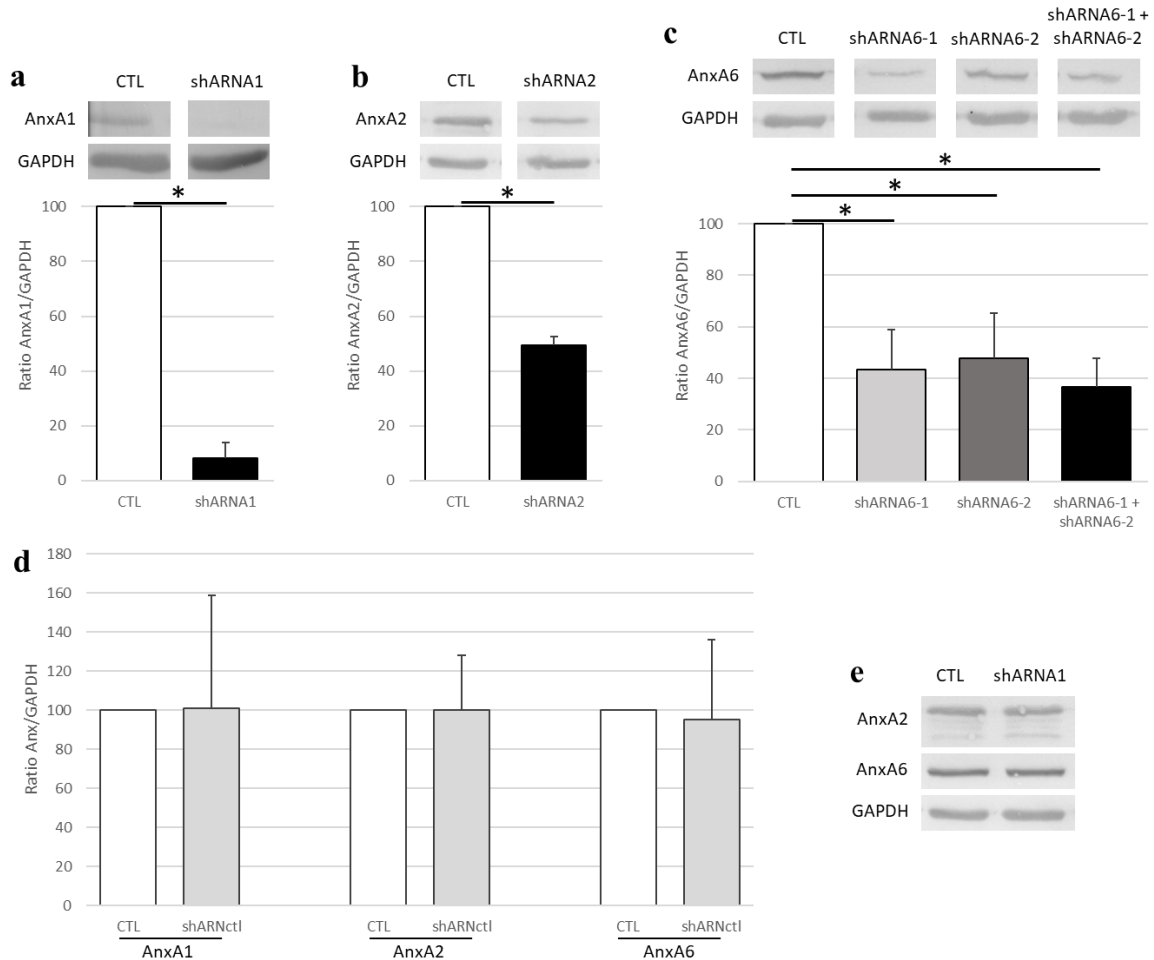


Figure 2.2 : Analyse par Western-Blot de la diminution du taux d'expression des AnxA1, A2 et A6 endogènes dans les myoblastes LHCN-M2 par la stratégie des shARN.

Les myoblastes LHCN-M2 ont été transduits à une MOI de 100 avec les séquences shRNA1 (a et e), shRNA2 (b), shRNA6-1, shRNA6-2, shRNA6-1 + shRNA6-2 (c), ou avec une séquence shARN contrôle (shARNct1) (d). Des cellules non transduites (CTL) ont servi de contrôle. Le contenu cellulaire des AnxA1, A2 et A6 dans les myoblastes a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 µg de protéines a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. Les AnxA1, A2 et A6 et la GAPDH ont été détectées comme décrit dans la Figure 2.1. Test de Student (a-b et d), test ANOVA à un facteur (c), * : $p < 0,05$.

Résultats

Pour les cellules LHCN-M2, on observe la présence de myotubes, des cellules plurinucléées de plusieurs centaines de μm de long résultant de la fusion des myoblastes, dès 3 jours après la différenciation (**Figure 2.3**).

En revanche, comme observé pour les myoblastes LHCN-M2 déficients en AnxA5 (Carmeille et al., 2016), on observe que les myoblastes déficients en AnxA1, AnxA2 ou AnxA6 sont incapables de former des myotubes, et ce même au-delà de 10 jours de différenciation (**Figure 2.4**).

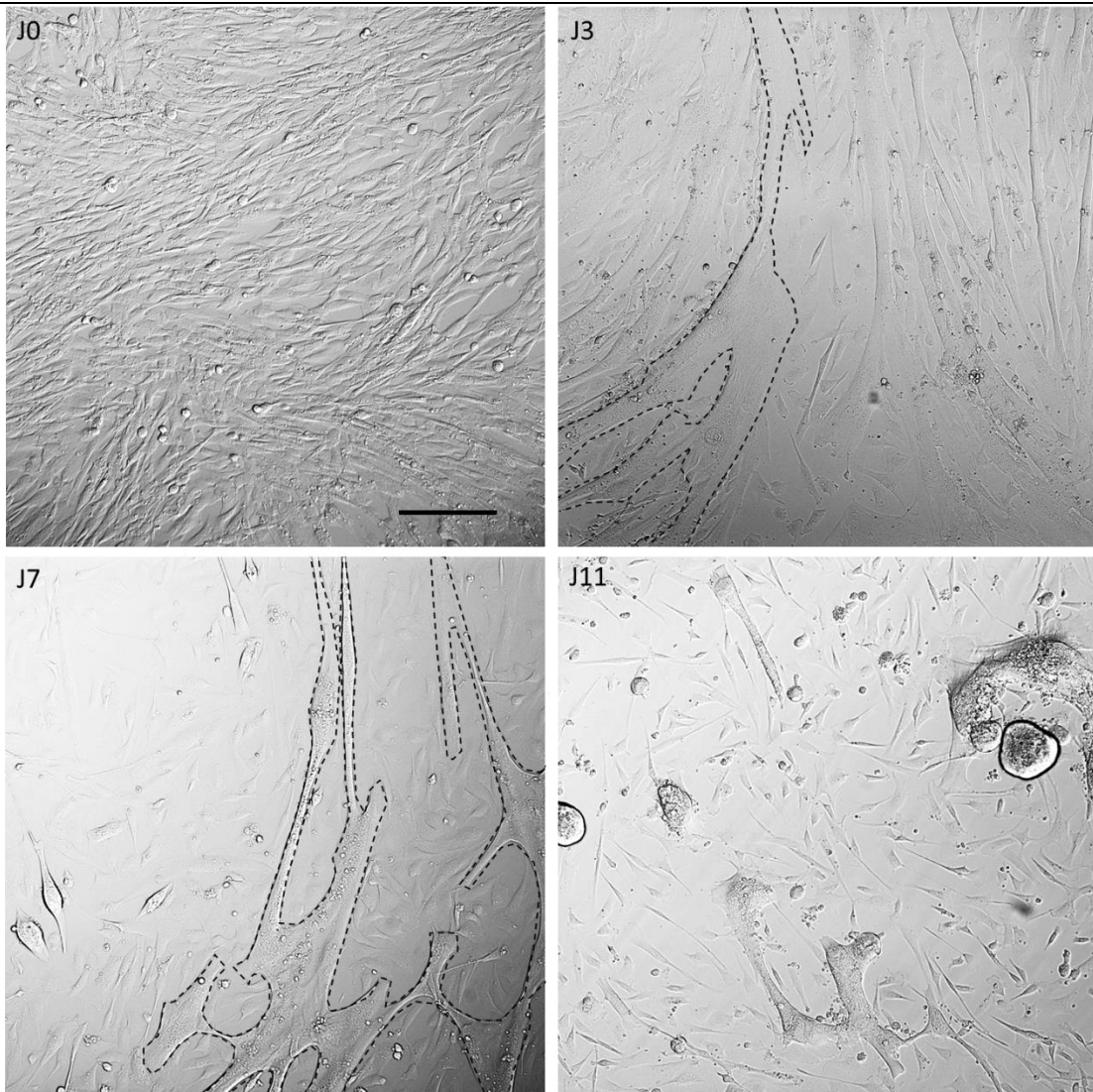


Figure 2.3 : Différenciation et fusion des myoblastes LHCN-M2 sauvages.

Les myoblastes LHCN-M2 ont été cultivés dans le milieu de différenciation pendant 11 jours. J0 correspond au jour où les cellules ont été mises en milieu de différenciation. La membrane plasmique de deux myotubes a été dessinée par souci de clarté. Barre d'échelle : 200 μm .

Résultats

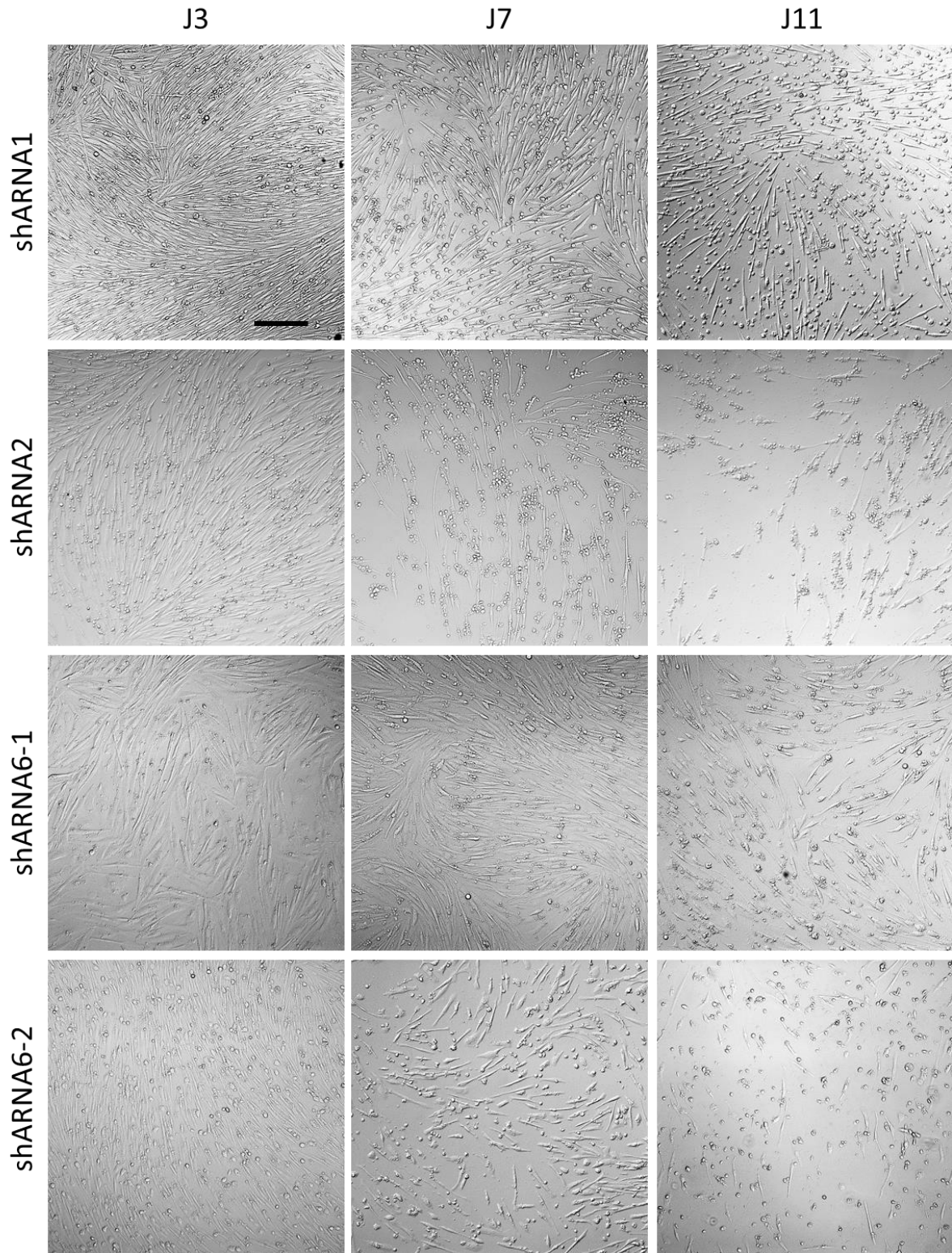


Figure 2.4 : Défaut de différenciation et de fusion des myoblastes LHCN-M2 déficients en Anx.
Les myoblastes LHCN-M2 ont été transduits à une MOI de 100 avec les séquences shARNA1, shARNA2, shARNA6-1 ou shARNA6-2, puis cultivés dans le milieu de différenciation supplémenté de puromycine à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 11 jours. J3 correspond au 3^e jour où les cellules ont été mises en milieu de différenciation et puromycine. Barre d'échelle : 200 μm .

Résultats

Ce résultat indique que les AnxA1, A2 et A6 peuvent jouer un rôle dans la différenciation et/ou la fusion des myoblastes squelettiques humains. En effet, l'AnxA1 a été montrée comme impliquée dans la différenciation des myoblastes et de leur fusion en myotube (Bizzarro et al., 2010). Cela indique également que la transduction doit être réalisée directement sur les myotubes en cours de formation, c'est-à-dire pendant le processus de différenciation. Les analyses par Western-Blot nécessitant une grande quantité de cellules, et empêchant de distinguer les myotubes des myoblastes restant en culture, nous avons préféré quantifier la baisse d'expression relative des Anx dans les myotubes par immunocytofluorescence. Dans un premier temps, nous avons appliqué ce protocole aux myoblastes pour déterminer si les baisses d'expression révélées par immunocytofluorescence étaient comparables à celles obtenues en Western-Blot (**Figure 2.5a-b**). La **Figure 2.5a** montre l'exemple des immunomarquages AnxA1 et A2 pour les myoblastes CTL vs shARNA1, et CTL vs shARNA2, respectivement. Les résultats montrent une baisse de 58 (± 11) % d'AnxA1, et de 57 (± 16) % d'AnxA2 dans les myoblastes transduits avec shARNA1 et shARNA2 respectivement. La baisse d'expression en AnxA6 est de 61 (± 17) %, 52 (± 13) %, et 65 (± 15) % dans les myoblastes shARNA6-1, shARNA6-2 et shARNA6-1 + shARNA6-2, respectivement. Excepté pour la baisse d'AnxA1, ces résultats sont très proches de ceux obtenus en Western-Blot, indiquant que les expériences d'immunocytofluorescence sont une bonne alternative pour la quantification relative des Anx. Nous avons donc ensuite transduit des myotubes par les shARN 7 h 30 après l'ajout du milieu de différenciation. Les résultats montrent une baisse d'expression des AnxA1 et AnxA2 de 31 (± 22) % et 32 (± 26) % dans les myotubes shARNA1 et shARNA2, respectivement (**Figure 2.5c**). L'intensité de fluorescence correspondant à l'AnxA6 a baissé de 48 (± 15) %, 57 (± 15) %, et 62 (± 19) %, dans les myotubes shARNA6-1, shARNA6-2, et shARNA6-1 + shARNA6-2, respectivement. Alors que les myotubes déficients en AnxA6 sont aisément générés, les myotubes déficients en AnxA2 et en AnxA1 restent difficiles à obtenir. Les différents pourcentages de baisse d'expression observés entre les myoblastes et les myotubes peuvent s'expliquer par le fait que la transduction des myoblastes en cours de différenciation est moins efficace.

Résultats

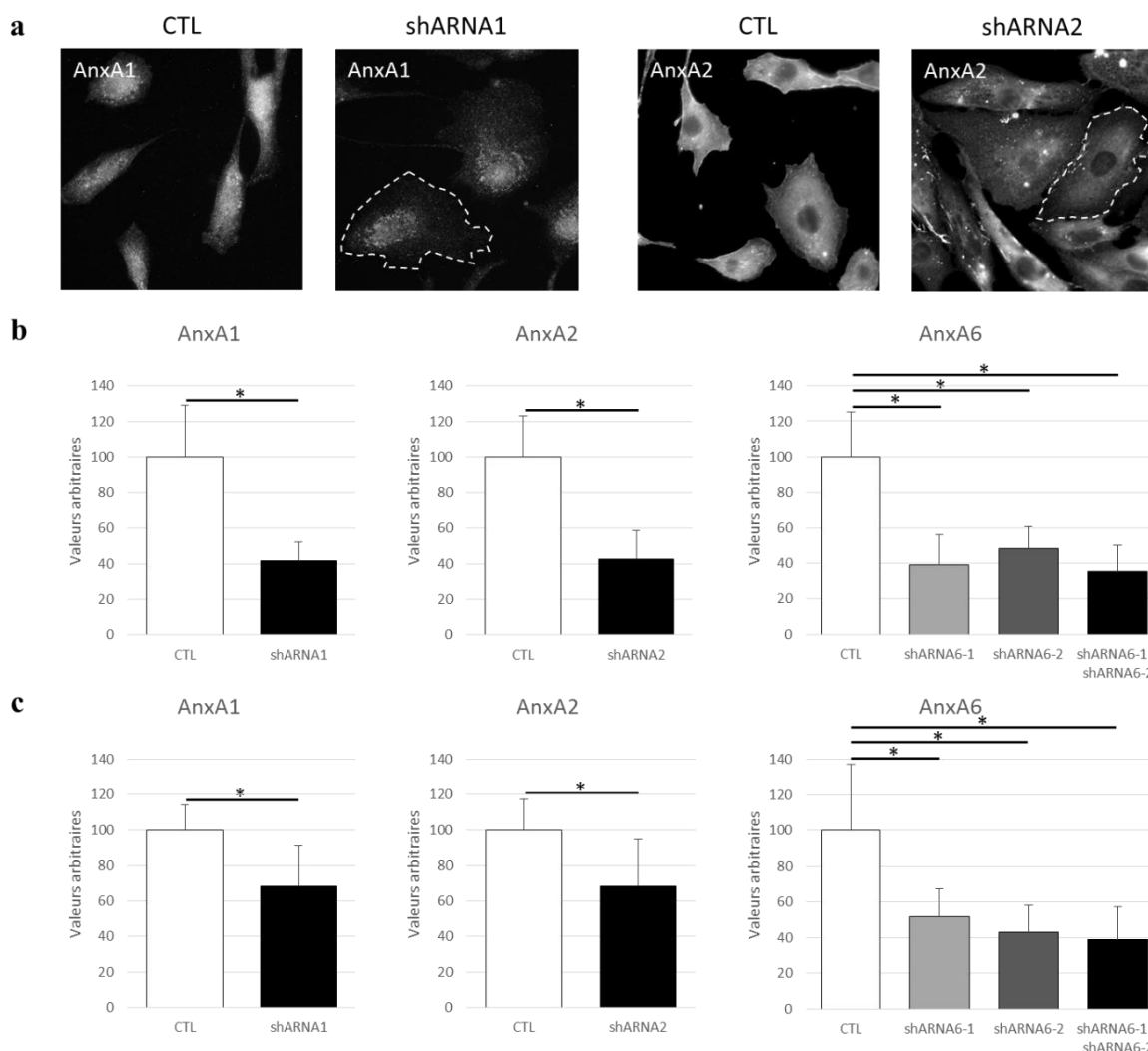


Figure 2.5 : Analyse en immunocytofluorescence de la diminution du taux d'expression des AnxA1, A2 et A6 endogènes dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2 par la stratégie des shARN.

Les myoblastes (a-b) et les myotubes (c) LHCN-M2 ont été transduits à une MOI de 100 avec les séquences shARNA1, shARNA2, shARNA6-1, shARNA6-2, ou transduites avec les deux séquences shARNA6-1 + shARNA6-2 à une MOI de 50 chacune. Des cellules non transduites (CTL) ont servi de contrôle. Un immunomarquage AnxA1, A2 ou A6 a ensuite été réalisé, les cellules ont été observées en microscopie de fluorescence et l'intensité de fluorescence analysée avec le logiciel ImageJ. Test de Wilcoxon (AnxA1 et AnxA2), test de Kruskal-Wallis (AnxA6), * : $p < 0,05$.

Stratégie CRISPR-Cas9

Pour améliorer la baisse d'expression des Anx, nous avons testé la stratégie CRISPR-Cas9. Contrairement aux shARN qui s'hybrident avec les ARN messagers cibles pour induire leur dégradation, les ARN guides s'hybrident avec une séquence du gène cible et guident la nucléase Cas9 qui induit une coupure dans la séquence reconnue. Le système de réparation non homologue de l'ADN induit une mutation d'insertion ou de délétion qui décale le cadre de lecture et inactive le gène. Cette stratégie est réputée pour être beaucoup plus efficace que la

Résultats

transduction de shARN pour l'inactivation génique. En guise d'expérience préliminaire, pour mettre au point le protocole, nous avons tout d'abord mis au point la stratégie contre l'AnxA6.

Le contenu cellulaire des cellules MDA et des myoblastes LHCN-M2 transduits à une MOI de 50 avec l'ARN guide contrôle (sgCtl) ou l'ARN guide ciblant l'AnxA6 (sgAnx6), et des cellules non transduites (CTL) a été analysé par Western-Blot (**Figure 2.6a-b**). Les résultats montrent une extinction quasi-totale de l'AnxA6 dans les cellules MDA sgAnx6, et une baisse de 66% dans les myoblastes sgAnx6. Aucune différence n'est observée entre les cellules CTL et celles transduites avec la séquence contrôle (sgCtl). Les expériences d'immunocytofluorescence montrent une baisse d'expression moyenne de 31 (\pm 13) % dans les myoblastes sgCtl, et de 73 (\pm 7) % dans les myoblastes sgAnx6 (**Figure 2.6c**).

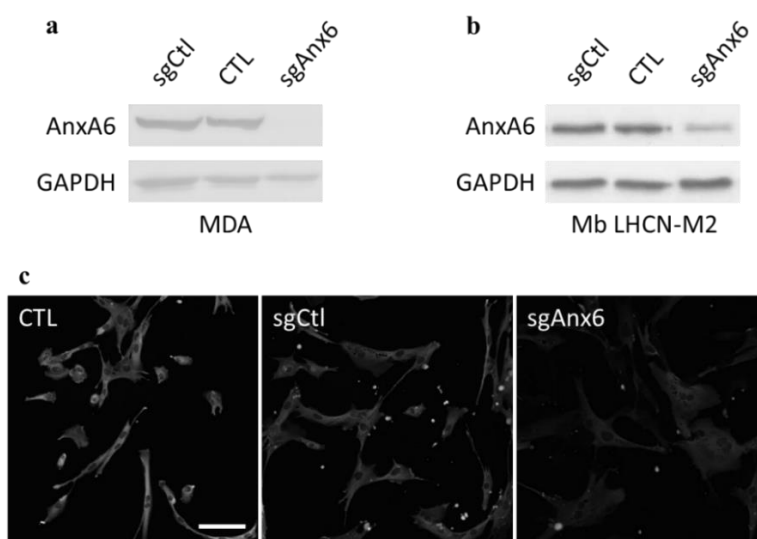


Figure 2.6 : Diminution du taux d'expression de l'AnxA6 endogène dans les cellules MDA et les myoblastes LHCN-M2 par la stratégie CRISPR-Cas9.

Les cellules MDA (a) et les myoblastes LHCN-M2 (b et c) ont été transduits à une MOI de 50 avec la séquence contrôle (sgCtl) ou la séquence ciblant l'AnxA6 (sgAnx6). Des cellules non transduites ont servi de contrôle (CTL). Après 4 jours de sélection en milieu de croissance supplémenté de puromycine à 2 μ g/ μ L, le contenu cellulaire a été analysé par Western-Blot (a-b), ou les cellules ont été immunomarquées pour l'AnxA6 et observées en microscopie de fluorescence (c). Barre d'échelle : 100 μ m.

Conclusion

La génération de cellules déficientes en Anx peut se faire à l'aide des stratégies shARN ou CRISPR-Cas9. Dans les deux cas, la baisse d'expression des Anx est plus importante dans les cellules MDA que les myoblastes ou les myotubes LHCN-M2, montrant qu'il est plus facile de modifier la lignée cancéreuse que la lignée musculaire. En utilisant les shARNs, la baisse d'expression des Anx dans les myoblastes varie autour de 50-60% pour les AnxA2 et A6, et 90%

Résultats

pour l'AnxA1. Les myoblastes déficients en AnxA1, A2 et A6 sont incapables de former des myotubes, malgré une baisse relativement peu importante des AnxA2 et A6, impliquant le rôle de ces Anx dans le processus de différenciation/fusion des myoblastes en myotubes. Cette observation explique pourquoi il est difficile d'obtenir des myotubes déficients en Anx. Pour obtenir des myotubes déficients en Anx, il faut transduire des myoblastes dont la différenciation a été engagée depuis au moins 7 h. Ces myoblastes ont la possibilité d'être transduits tout en conservant la capacité de fusionner. Les myotubes déficients générés avec la stratégie des shARN présentent une baisse d'expression comprise entre 30 et 45% selon les Anx. Enfin, la stratégie CRISPR-Cas9 permet d'obtenir une meilleure extinction de l'AnxA6 dans les myoblastes, mais il reste à réussir à générer des myotubes déficients en AnxA6 avec cette stratégie, avec a priori les mêmes contraintes que pour les shARN.

Il est fort probable qu'une diminution de l'expression des Anx de 30% en moyenne ne soit pas suffisante pour déterminer avec certitude l'impact d'une déficience en Anx. Pour surmonter cet obstacle, une solution envisagée par le laboratoire est l'utilisation de shARNs inducibles. Dans ces conditions, nous pourrions obtenir une lignée de myoblastes portant la séquence shARN, mais qui ne serait pas transcrite. Ainsi, les myoblastes auraient toujours la capacité de former des myotubes qui, une fois obtenus, seraient mis en présence du produit induisant la transcription du shARN et l'extinction de l'Anx cible. De plus, cette stratégie possède l'avantage qu'un gène rapporteur est induit en même temps que le shARN. Il est donc possible de visualiser les cellules transduites. Cette solution est testée au laboratoire depuis quelques semaines.

ii. Caractérisation des Anx couplées à des protéines fluorescentes

Elaboration et validation des constructions plasmidiques

Pour étudier le comportement des Anx pendant la réparation membranaire, les AnxA1, A2 et A6 couplées à des protéines fluorescentes (GFP ou mCherry) ont été exprimées dans les cellules LHCN-M2. Le plasmide commercial pEGFP-N3 (Clontech) contenant la construction AnxA1-GFP (pA1-GFP) ou AnxA2-GFP (pA2-GFP) ou AnxA2-mCherry (pA2-mCh), et le plasmide commercial pEGFP-N1 contenant la construction AnxA6-GFP (pA6-GFP) nous ont été fournis par Volker Gerke (Université de Münster, Allemagne). Ces plasmides permettent l'expression d'Anx recombinante couplée à la GFP ou mCherry sur son extrémité C-terminale. Les plasmides ont tout d'abord été vérifiés par digestion avec l'enzyme BamHI, et soumis à un gel d'agarose (**Figure 2.7a**). BamHI coupe pA1-GFP et pA6-GFP deux fois, une fois dans le site de clonage multiple et une fois dans la séquence Anx (en position 81 dans la séquence de l'AnxA1, et position

Résultats

1496 dans celle de l'AnxA6). BamHI coupe pA2-GFP et pA2-mCh une seule fois au site de clonage multiple. Les tailles attendues des fragments d'ADN après digestion des plasmides sont indiquées dans la **Figure 2.7b**. Les résultats montrent que deux fragments d'ADN sont détectés dans les pA1-GFP et pA6-GFP digérés, et un seul fragment dans les pA2-GFP et pA2-mCh, aux tailles attendues. De plus, la séquence des différents plasmides contenant l'Anx et la protéine fluorescente a été validée par séquençage (données non montrées).

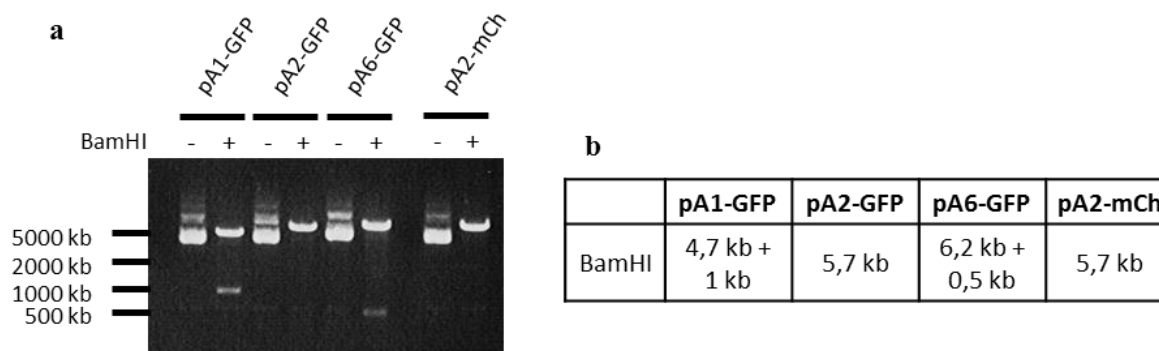


Figure 2.7 : Caractérisation des plasmides pA1-GFP, pA2-GFP, pA6-GFP et pA2-mCh.

(a) Les plasmides ont été digérés (+) ou non (-) avec BamHI pendant 1 h à 37°C, et soumis à un gel d'agarose à 0.8%. (b) Tailles attendues des fragments générés par la digestion avec BamHI.

Les plasmides étant validés, nous avons ensuite généré des plasmides contenant les constructions AnxA4-GFP, A1-mCherry, A4-mCherry et A5-mCherry à partir de ces plasmides. Par exemple, nous avons utilisé le pA1-GFP et le pA2-mCh pour obtenir le plasmide AnxA1-mCherry (voir Matériels et Méthodes pour plus de détails). La séquence AnxA1 + mCherry du nouveau plasmide a ensuite été vérifiée par séquençage (données non montrées). Les autres plasmides ont été construits et validés selon le même procédé. Les variantes mCherry et GFP permettent une étude simultanée de deux Anx.

Transfection des myoblastes et des myotubes LHCN-M2

Les myoblastes et les myotubes LHCN-M2 ont subi deux transfections consécutives à 24 h d'intervalle avec les plasmides pA1-GFP, pA2-GFP, pA4-GFP ou pA6-GFP. Les images en fluorescence et en transmission nous ont permis d'estimer le pourcentage de cellules transfectées 48 h après la dernière transfection (**Figure 2.8**). Dans nos conditions, 35% des myoblastes expriment l'AnxA1-GFP, 19% expriment l'AnxA2-GFP, 39% expriment l'AnxA4-GFP, et 30% expriment l'AnxA6-GFP (**Figure 2.8a**). Le taux de transfection des myotubes est plus élevé : 72% des myotubes

Résultats

expriment l'AnxA1-GFP, 42% expriment l'AnxA2-GFP, 58% expriment l'AnxA4-GFP, et 43% expriment l'AnxA6-GFP (**Figure 2.8b**). De plus, toutes les Anx-GFP conservent la localisation des Anx endogènes (exclusivement cytosolique, ou cytosolique et nucléaire, voir **Figure 1.2**), indiquant ainsi que le couplage GFP n'affecte pas la distribution subcellulaire des Anx.

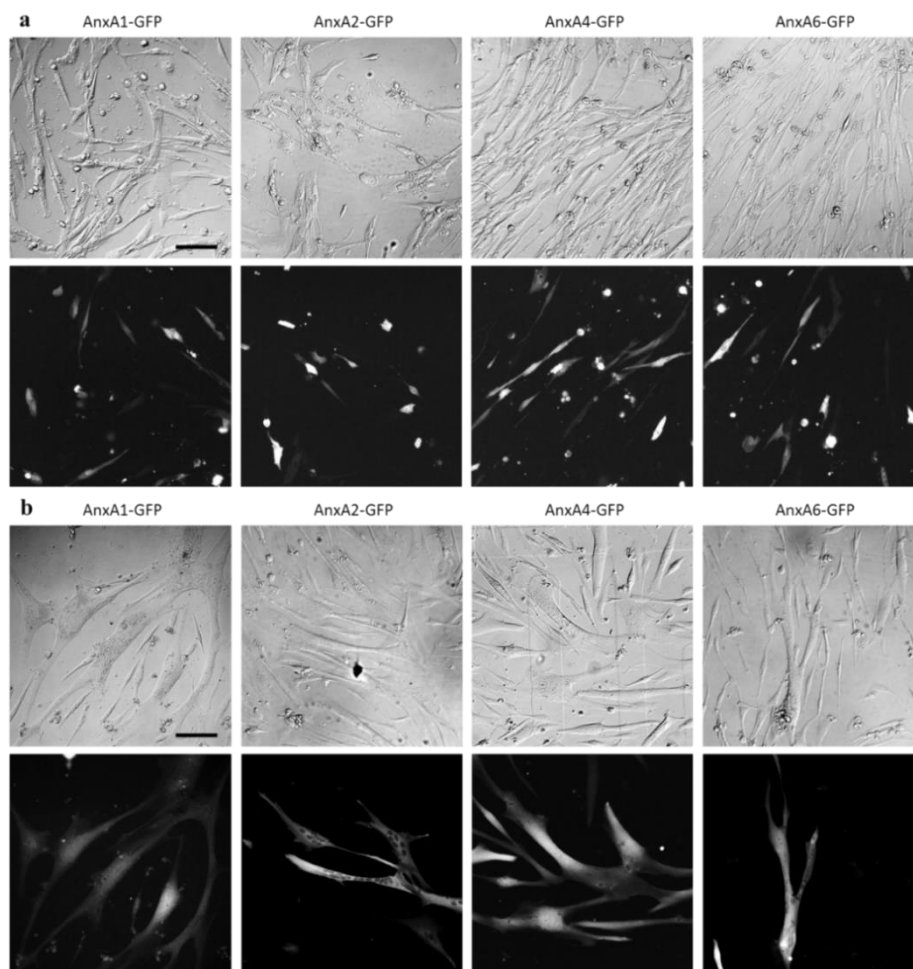


Figure 2.8 : Expression des AnxA1-GFP, A2-GFP, A4-GFP et A6-GFP dans les myoblastes et les myotubes LHCN-M2. Les myoblastes (a) et les myotubes (b) LHCN-M2 ont été transfectés à deux reprises avec les plasmides pA1-GFP, pA2-GFP, pA4-GFP ou pA6-GFP, et observés au microscope à transmission et de fluorescence 48 h après la dernière transfection. Barre d'échelle : 100 μ m.

Caractérisation des protéines recombinantes

Les différents plasmides Anx-GFP ont été introduits dans les cellules MDA, et le contenu cellulaire a été analysé par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-GFP (**Figure 2.9a**). Les résultats montrent que les protéines détectées correspondent aux tailles attendues des Anx recombinantes indiquées dans la **Figure 2.9c**. Deux signaux sont détectés pour l'AnxA1-GFP. Comme observé pour l'AnxA2, l'AnxA1 peut être clivée lors du décollement des cellules

Résultats

(Babiyshuk et al., 2002), ce qui peut expliquer le résultat observé avec l'AnxA1-GFP. La même expérience a été réalisée sur les myoblastes LHCN-M2 (**Figure 2.9b**). Les résultats obtenus sont similaires à ceux des MDA, à la différence que les AnxA1-GFP, A2-GFP et A6-GFP semblent présentes en plus faible quantité dans les cellules musculaires, ce qui peut être dû à une expression plus faible, une durée de vie plus faible de la protéine, ou un taux de transfection plus faible. On note également la présence d'une bande, probablement non spécifique, à une masse moléculaire équivalente à celle l'AnxA6-GFP, dans les échantillons CTL et AnxA1-, A2- et A4-GFP.

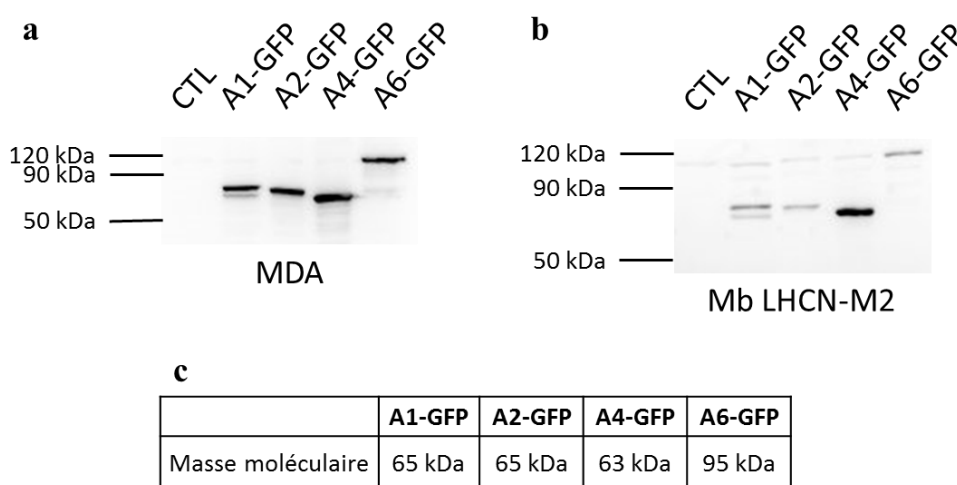


Figure 2.9 : Expression des AnxA1-GFP, A2-GFP, A4-GFP et A6-GFP dans les cellules MDA et les myoblastes LHCN-M2.

Les cellules MDA (a) et les myoblastes LHCN-M2 (b) ont été transfectés avec les plasmides pA1-GFP, pA2-GFP, pA4-GFP ou pA6-GFP, et leur contenu cellulaire a été analysé par Western-Blot. L'équivalent de 3 μ g de protéines a été séparé par SDS-PAGE à 10%. Les Anx-GFP ont été détectées avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin anti-GFP. (c) Masses moléculaires attendues des Anx-GFP.

Conclusion

Les plasmides qui nous ont été fournis ont été validés, et l'expression des Anx-GFP a été vérifiée dans les cellules MDA et les myoblastes LHCN-M2. Nous avons ensuite généré d'autres plasmides contenant des Anx recombinantes. Les constructions plasmidiques dont nous disposons et que nous avons utilisées par la suite sont les suivantes : pA1-GFP, pA2-GFP, pA4-GFP, pA6-GFP, pA1-mCherry, pA2-mCherry et pA5-mCherry. Nous avons ensuite établi un protocole de transfection permettant l'expression des Anx recombinantes dans 20 à 40% des myoblastes, et 42 à 72% des myotubes.

B. Développement méthodologique

La première étape dans l'étude de la réparation membranaire des cellules consiste à créer des dommages membranaires. *In vitro*, il existe deux approches principales : le traitement par des agents chimiques (détergents) ou biochimiques (toxines bactériennes), et les dommages mécaniques (aiguille, cisaillement, étirement, irradiation laser). Le muscle étant soumis à des stress mécaniques, nous nous sommes naturellement tournés vers ce type d'approche. Parmi les méthodes décrites dans la littérature, l'irradiation laser permet de créer des dommages membranaires de tailles variables mais contrôlés, permettant ainsi une très bonne reproductibilité d'une expérience à l'autre. Ma thèse a contribué à l'optimisation du protocole d'irradiation laser qui a été publié en 2017 (Carmeille et al., 2017), ainsi qu'au développement d'une stratégie de microscopie corrélative, permettant d'étudier la machinerie protéique de la réparation membranaire à haute résolution, en combinant microscopie de fluorescence et microscopie électronique à transmission (MET), publié en 2018 (Croissant et al., 2018). Le principe de ces approches expérimentales est décrit ci-dessous.

i. Dompage membranaire par irradiation laser

Le protocole d'irradiation de la membrane plasmique a été initialement développé en 2008 sur des cellules périvasculaires (Bouter et al., 2011), puis optimiser pour créer un dommage membranaire et étudier la réparation membranaire sur des cellules musculaires isolées (Carmeille et al., 2017) (voir Annexe 1). Cette stratégie consiste à utiliser un laser infrarouge Titanium:Sapphire à 820 nm couplé à un microscope confocal (Bordeaux Imaging Center, Institut Magendie) pour induire une rupture sur une zone d' $1 \mu\text{m}^2$. Pour les cellules musculaires, la puissance du laser a été définie à 110 mW, produisant une rupture d'environ $1 \mu\text{m}$ qu'un myotube sain est capable de réparer (Carmeille et al., 2016). La rupture est confirmée lorsqu'on visualise une petite bulle pendant l'irradiation (**Figure 2.10**). La capacité de réparation de la cellule est déterminée en utilisant le FM1-43. Cette molécule soluble devient fluorescente lorsqu'elle s'insère dans les bicouches lipidiques, mais ne les traverse pas. La **Figure 2.11** montre un test de réparation membranaire, avec comme exemple un myotube capable de se réparer (**a**) et un myotube présentant un défaut de réparation dû à l'absence de Ca^{2+} (**b**). Lorsque les cellules sont intactes, le FM1-43 ne s'insère que dans la membrane plasmique (-1,6 s). Après l'irradiation (+1,6 s), le FM1-43 rentre dans la cellule par la rupture et commence à s'insérer dans les membranes intracellulaires, augmentant la fluorescence moyenne de la cellule. Si la rupture est réparée, l'entrée de FM1-43 est stoppée

Résultats

et la fluorescence intracellulaire se stabilise au cours du temps (**Figure 2.11a** et **c**, cercles noirs). On note que le plateau est atteint à environ 80-90 s, indiquant qu'un myotube LHCN-M2 se répare en un peu plus d'une minute. En revanche, en absence de réparation, le FM1-43 continue de rentrer dans la cellule, ce qui se traduit par une intensité de fluorescence qui augmente fortement et en continu en fonction du temps (**Figure 2.11b** et **c**, cercles blancs). Ce cas de figure est notamment observé en absence de Ca^{2+} .

Ma thèse a participé au développement de ce protocole, notamment à des modifications dues au changement du microscope utilisé pour l'irradiation au Bordeaux Imaging Center. Le microscope inversé a été remplacé par un microscope droit, nous obligeant à adapter notre protocole en utilisant un nouveau support pour les cellules (voir **Figure 3.2** du Matériels et Méthodes pour plus de détails). De plus, nous procédons dorénavant à des irradiations à deux endroits différents de la cellule pour étudier le site de rupture à haute résolution selon deux points de vue différents (**Figure 2.12**). Le dommage membranaire est réalisé soit en périphérie du myotube, soit à la surface du myotube. L'irradiation en périphérie permet de visualiser le site de rupture de côté, tandis que l'irradiation en surface permet une vue du dessus. Nous avons ainsi mieux évalué la distribution dans l'espace des Anx au niveau du site endommagé.

Résultats

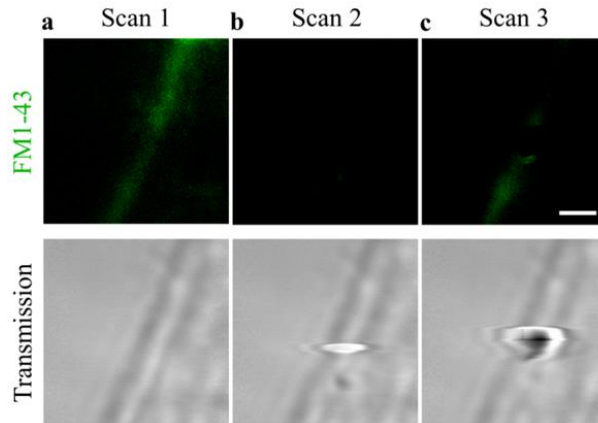


Figure 2.10 : Images des événements pendant l'irradiation laser.

L'irradiation consiste à scanner une zone de $1 \mu\text{m}^2$ à trois reprises, provoquant un échauffement localisé de la membrane plasmique et sa rupture, caractérisée par l'apparition d'une petite bulle. Barre d'échelle : 200 nm. Image tirée de (Carmeille et al., 2017).

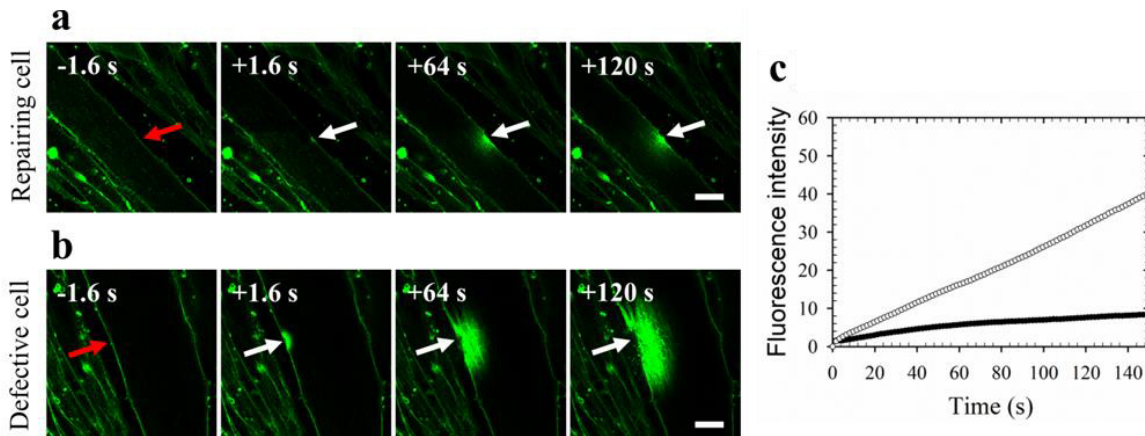


Figure 2.11 : Test de réparation membranaire.

Des myotubes LHCN-M2 ont été endommagés par irradiation laser en présence de FMI-43 (vert). (a) En présence de Ca^{2+} , le myotube se répare et stoppe l'entrée de FMI-43 induite par la rupture. (b) En absence de Ca^{2+} , le myotube ne se répare pas, provoquant une entrée massive et continue de FMI-43. Flèche rouge, zone avant l'irradiation ; flèche blanche, zone après l'irradiation. Barre d'échelle : $20 \mu\text{m}$. (c) Représentation graphique de la fluorescence intracellulaire au cours du temps des myotube présentés en (a) (cercles noirs) et en (b) (cercles blancs). Image modifiée à partir de (Carmeille et al., 2017).

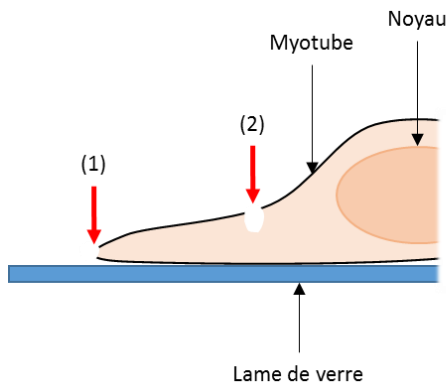


Figure 2.12 : Représentation schématique des irradiations réalisées sur les myotubes.

L'irradiation est réalisée par le dessus avec un microscope droit en périphérie du myotube (1), ou à la surface du myotube (2).

Résultats

ii. Microscopie corrélative

Ma thèse a également contribué au développement d'une méthode de microscopie corrélative (« Correlative Light and Electron Microscopy », ou CLEM), combinant l'observation du site membranaire endommagé par microscopie de fluorescence et microscopie électronique à transmission (MET) (Croissant et al., 2018) (voir Annexe 2). Cette stratégie permet d'étudier à haute résolution la machinerie de la réparation membranaire, ce qui nous a notamment permis de proposer un rôle pour l'AnxA5 dans la réparation des cellules musculaires (Carmeille et al., 2016). La **Figure 2.13** résume les différentes étapes du protocole. Les cellules sont cultivées dans une boîte de Pétri équipée d'une lamelle en verre quadrillée (MatTek corporation, USA), appelée MatTek par la suite. Un code alphanumérique est présent dans chaque case, ce qui permet d'identifier et de retrouver les cellules endommagées dans les étapes suivantes (**Figure 2.14**). L'étape d'irradiation des cellules est suivie par la fixation, la perméabilisation et l'immunomarquage des cellules pour la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire utilisé est couplé à un fluorophore et à une nanoparticule d'or (Nanoprobes™), permettant l'observation de la protéine en microscopie de fluorescence, et plus tard en MET. Les cellules sont ensuite incluses en résine, et des coupes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome, colorées, et observées en MET. La **Figure 2.15** montre l'exemple de l'AnxA5 qui est recrutée au site de rupture des myotubes endommagés, et est retrouvée à la surface des vésicules et aux bords de la membrane plasmique endommagée. A présent, les expériences sont également réalisées sur les myotubes exprimant les Anx couplées à la GFP, ce qui permet à la fois d'observer le trafic des Anx pendant et dans les secondes qui suivent le dommage membranaire en microscopie de fluorescence, puis d'étudier à haute résolution leur localisation au site de rupture en MET.

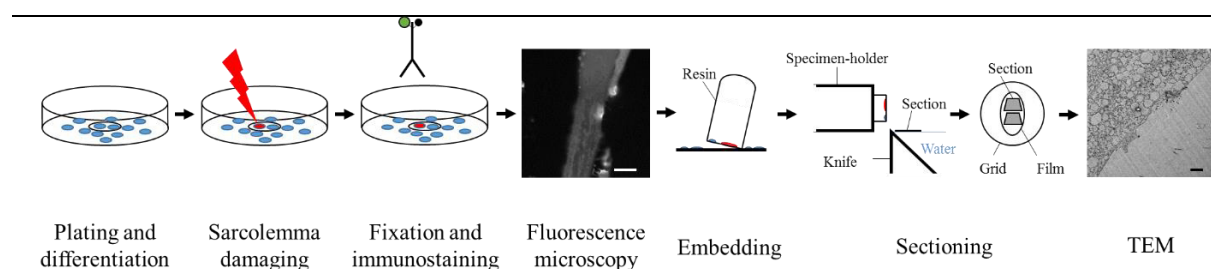


Figure 2.13 : Vue d'ensemble du protocole de CLEM.

Les myoblastes sontensemencés sur une MatTek, différenciés en myotubes, et le sarcolemme est endommagé par irradiation laser. Les cellules sont ensuite fixées et immunomarcuées pour la protéine d'intérêt avec un anticorps secondaire couplé à la fois à un fluorophore et à une nanoparticule d'or (Nanoprobes™), puis observées en microscopie de fluorescence. Enfin, les cellules sont incluses en résine, coupées, colorées et observées en MET. Image tirée de (Croissant et al., 2018).

Résultats

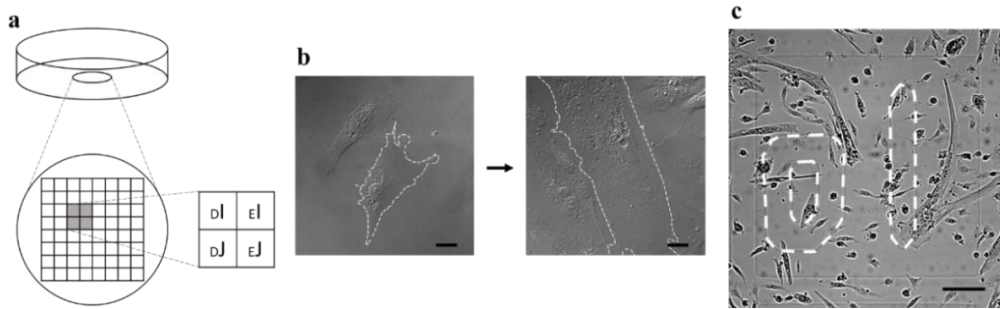


Figure 2.14 : Culture des cellules musculaires et différenciation.

(a) Représentation schématique d'une MatTek et de la lamelle quadrillée. (b) Images caractéristiques d'un myoblaste et d'un myotube observés en microscopie à contraste d'interférence. La membrane plasmique est dessinée en pointillés par souci de clarté. Barre d'échelle : 20 μm . (c) Des myoblastes et des myotubes sur la case DI. Les lettres sont dessinées en blanc pour faciliter la lecture. Barre d'échelle : 100 μm . Image tirée de (Croissant et al., 2018).

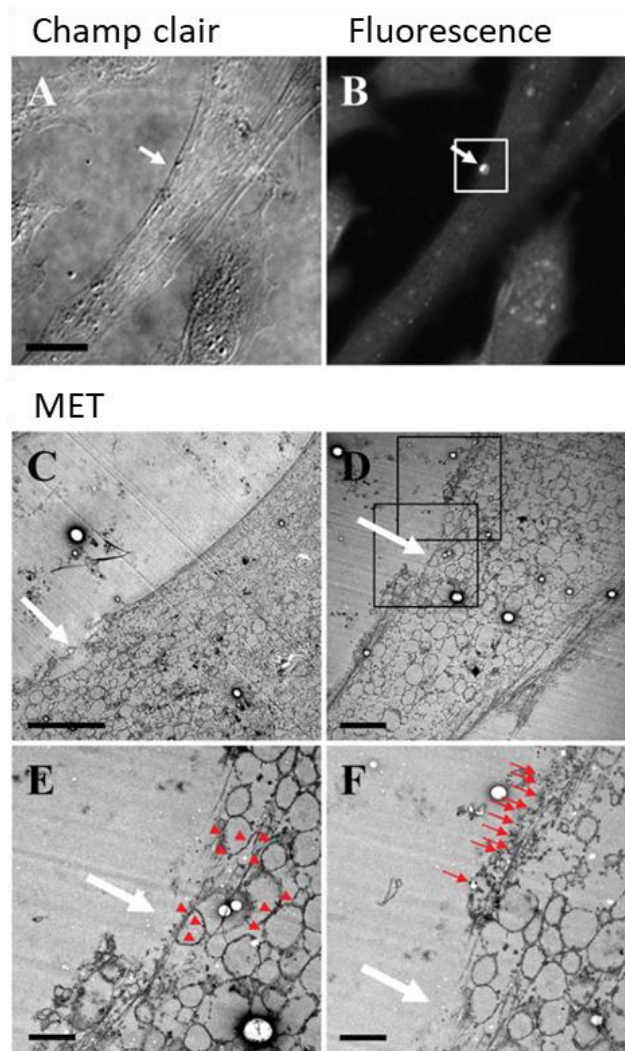


Figure 2.15 : Images de microscopie corrélative.

Un myotube endommagé et immunomarcqué observé en microscopie à contraste d'interférence (A), et en microscopie de fluorescence (B). La flèche blanche indique le site de rupture, où la protéine d'intérêt s'est accumulée. Barre d'échelle : 20 μm . Le même myotube est observé en MET à faible (C et D) et fort (E et F) grossissements. La flèche blanche indique le site de rupture. Les têtes de flèche et les flèches rouges indiquent les nanoparticules d'or qui correspondent à l'AnxA5, qui interagit avec les vésicules intracellulaires et les bords de la membrane endommagée, respectivement. Barre d'échelle pour (C) et (D) : 5 μm . Barre d'échelle pour (E) et (F) : 1 μm . Image tirée de (Croissant et al., 2018).

3. Trafic des Anx lors d'un dommage membranaire dans des myotubes sains

Pour étudier le comportement des Anx lors d'un dommage membranaire dans les myotubes sains, nous avons opté pour l'expression d'Anx couplées à des protéines fluorescentes. En créant un dommage membranaire par irradiation laser, nous pouvons suivre le trafic des Anx fluorescentes en microscopie confocale pendant et juste après (échelle de la seconde) le dommage. Ainsi, nous avons analysé la réponse des AnxA1-GFP, AnxA2-GFP, AnxA4-GFP et AnxA6-GFP. Pour savoir si les Anx endogènes ont la même localisation que les Anx recombinantes après un dommage membranaire, nous avons également endommagé des myotubes non modifiés, et immunomarcqué les Anx d'intérêt pour les visualiser en microscopie de fluorescence après le dommage.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la cinétique comparée de deux Anx fluorescentes exprimées simultanément dans un myotube. Afin d'avoir une référence, les myotubes ont été transfectés systématiquement avec l'AnxA6-GFP, combinée avec la transfection d'une autre Anx (A1, A2, A4 ou A5) couplée à la protéine fluorescente mCherry. Ces expériences nous ont permis de comparer la vitesse de recrutement relative et la localisation des Anx au site de rupture. Pour chacune des expériences qui suit, au moins deux expériences indépendantes ont été réalisées (irradiation sur des cultures différentes), et pour chaque expérience au moins cinq myotubes ont été irradiés.

A. AnxA1-GFP

Les expériences réalisées sur des myotubes exprimant l'AnxA1-GFP montrent deux types de résultats. Le cas le plus observé est celui représenté par le myotube 1 (**Figure 3.1a**). Après le dommage, l'AnxA1-GFP est immédiatement recrutée au site de rupture (+1,3 s). Au cours du temps, nous avons observé que l'AnxA1-GFP s'accumule progressivement au niveau de la membrane endommagée, sans modification de la fluorescence intracellulaire globale du myotube. Cela peut indiquer que l'influx de calcium est très localisé, entraînant uniquement le recrutement d'AnxA1-GFP proche du site de rupture. De plus, l'AnxA1-GFP accumulée forme une structure bien délimitée et localisée à la zone endommagée. Pendant la réparation membranaire des fibres musculaires de souris, il a été montré que l'AnxA1 se concentre dans

Résultats

une structure que les auteurs ont appelée domaine « cap » (Demonbreun et al., 2016b). Dans cette étude de Demonbreun et collaborateurs, ce domaine forme clairement une protubérance, et une zone sans AnxA1 est retrouvée sous le domaine « cap ». En regardant de plus près la zone de rupture du myotube 1 à différents plans, on constate que le cluster d'AnxA1-GFP est effectivement positionné au-delà de la position initiale du sarcolemme, et forme une structure très dense qui laisse penser à du matériel membranaire (**Figure 3.1b**).

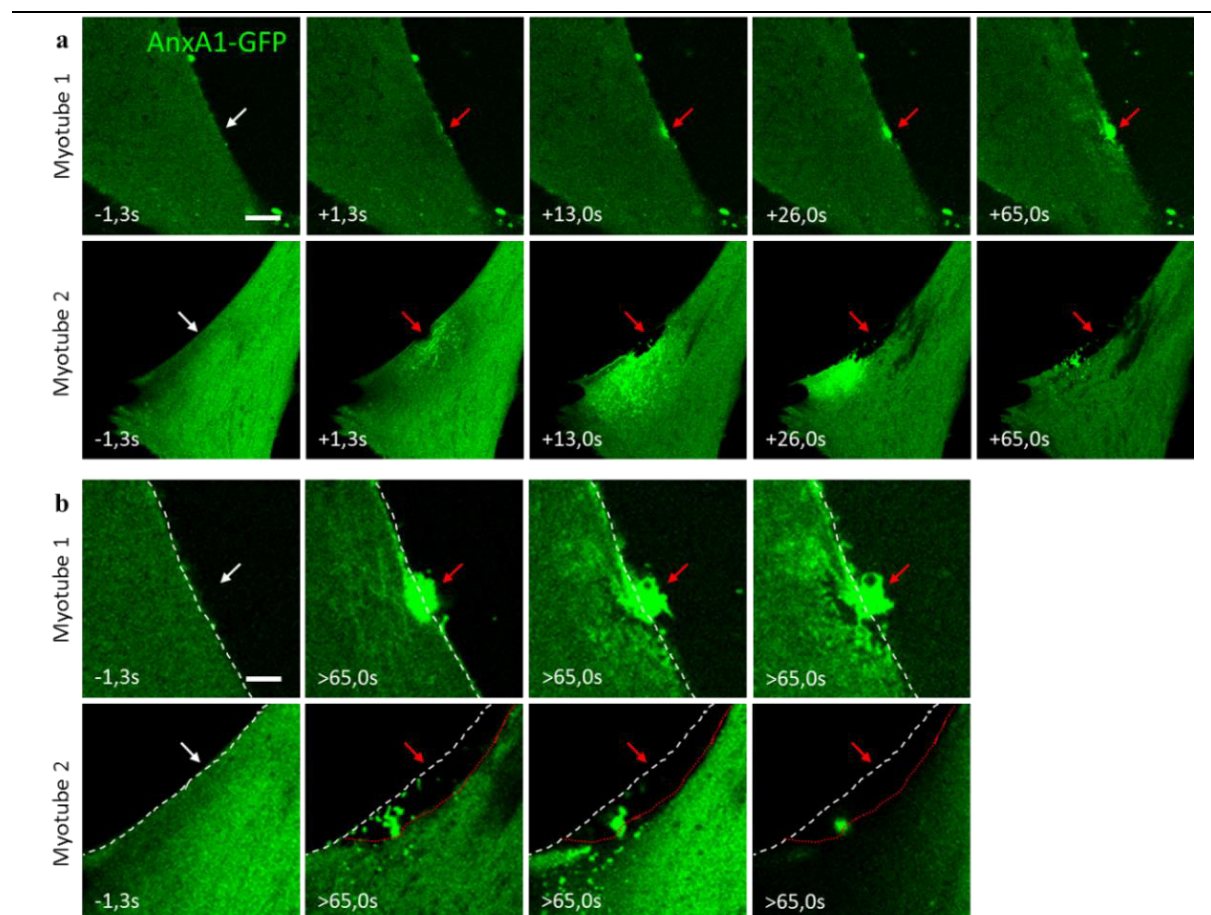


Figure 3.1 : Experiences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA1-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA1-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (a) Barre d'échelle : 10 μ m. (b) Zoom du site de rupture des myotubes 1 et 2 avant et plus de 65 s après l'irradiation. Les 3 images à plus de 65 s correspondent à 3 plans différents. Ligne blanche, membrane plasmique avant l'irradiation ; ligne rouge, membrane plasmique après l'irradiation. Barre d'échelle : 5 μ m.

Par la suite, nous appellerons domaine « cap » toute protubérance membranaire située au site de rupture. De plus, sur l'image de droite de la **Figure 3.1b**, on constate une zone dépourvue d'AnxA1-GFP sous le domaine « cap ». Un résultat similaire a été observé dans les fibres musculaires de souris, où il a été montré que cette zone était constituée d'actine (Demonbreun et

Résultats

al., 2016b). Bien que la présence d'actine ne soit pas à exclure dans notre cas, cette zone donne l'impression que le domaine « cap » est sur le point de se détacher de la cellule. L'utilisation de phalloïdine couplée à un fluorophore pour visualiser les filaments d'actine permettrait de répondre à cette question. Par manque de temps, nous n'avons pas encore réalisé cette expérience.

Le deuxième cas de figure observé, dû à la variabilité expérimentale, se produit lorsque le dommage est plus important, avec une rupture de la membrane large d'au moins 2 μm immédiatement après l'irradiation. Comme dans le myotube 1, l'AnxA1-GFP est immédiatement recrutée au site de rupture (**Figure 3.1a**, +1,3 s). En revanche, la déchirure semble s'étendre au cours du temps, tandis que de nombreux spots fluorescents apparaissent dans le cytoplasme (+13,0 s), en progressant vers le site de rupture (+26,0 s), comme observé dans les cellules endothéliales humaines (Koerdt and Gerke, 2017). De plus, la fluorescence globale de la cellule semble diminuer lorsque l'AnxA1-GFP se concentre à la zone endommagée. L'étendue du dommage implique une augmentation importante de la concentration calcique intracellulaire, ce qui peut expliquer un recrutement conséquent d'AnxA1-GFP au niveau de la zone endommagée. L'observation des spots fluorescents qui se concentrent au site de rupture pourrait correspondre au recrutement de vésicules intracellulaires tapissées d'AnxA1-GFP. L'AnxA1-GFP pourrait donc être associée aux vésicules intracellulaires pour la formation d'un « patch » qui colmate la rupture, comme proposé dans les fibres musculaires de souris (Lennon et al., 2003). La diminution de la fluorescence associée à l'AnxA1-GFP dans la cellule après 60 s peut indiquer la réparation de la membrane, le retour à l'homéostasie calcique, et la libération de l'AnxA1-GFP interagissant avec les membranes. Pour rappel, un myotube LHCN-M2 se répare en moyenne en 80-90 s (voir **Figure 2.11**). Seul un cluster d'AnxA1-GFP reste présent au-delà d'une minute. Les images zoomées du site de rupture montrent une rétractation de la membrane après le dommage (ligne rouge vs ligne blanche) qui peut s'expliquer par la déchirure de la membrane. Une zone concentrée en AnxA1-GFP est bien observée à l'extérieur du myotube. Elle pourrait correspondre au domaine « cap » décrit par Demonbreun et collaborateurs. En revanche, aucune zone dépourvue d'AnxA1-GFP n'est observée sous le domaine « cap ».

Dans les deux cas de figures, l'AnxA1-GFP est immédiatement recrutée au site de rupture après le dommage membranaire, et se concentre pour finalement former un domaine « cap » situé à l'extérieur du myotube endommagé. L'apparition de spots fluorescents pouvant correspondre à des vésicules intracellulaires associées à l'AnxA1-GFP n'a été observée que lors d'un dommage important induisant une déchirure de la membrane plasmique. Lors d'un dommage plus faible,

Résultats

l'AnxA1 pourrait être associée uniquement à la membrane plasmique et/ou aux vésicules les plus proches du site de rupture, ce qui suffirait à colmater la déchirure. La résolution du microscope pourrait nous empêcher de visualiser ces quelques vésicules.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'AnxA1 endogène est elle aussi retrouvée dans un domaine « cap ». Pour cela, nous avons irradié des myotubes non modifiés et immunomarcqué l'AnxA1 pour la visualiser en microscopie de fluorescence. Il faut noter que les cellules sont fixées plusieurs minutes (au moins 10 min) après l'irradiation, ce qui signifie que les images de fluorescence représentent la localisation des Anx bien après la réparation de la membrane. Le **Figure 3.2** montre un petit domaine « cap » enrichi en AnxA1 au niveau de la zone irradiée. Cette observation indique que le « cap » se forme dans les myotubes non modifiés, que l'AnxA1 endogène se concentre également dans ce domaine et que cette structure persiste plusieurs minutes après le dommage et la réparation de la membrane.

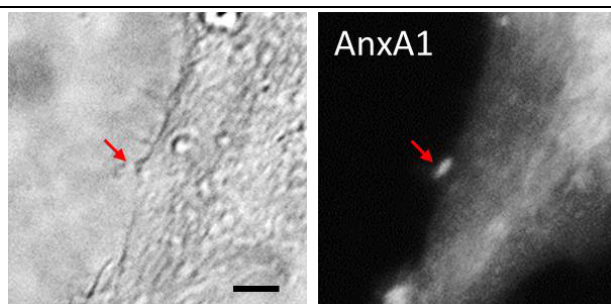


Figure 3.2 : Distribution de l'AnxA1 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés. La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarcqués pour l'AnxA1 et observés en microscopie de transmission et de fluorescence. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle : 5 μ m.

B. AnxA2-GFP

Comme l'AnxA1-GFP, l'AnxA2-GFP est recrutée au site de rupture (**Figure 3.3a**, +13,0 s). On note également que la fluorescence globale de la cellule n'a pas changé. Ces observations peuvent indiquer que la membrane a été rapidement réparée. Comme observé pour l'AnxA1-GFP, le recrutement d'AnxA2-GFP est localisé à la membrane plasmique endommagée. Il a été proposé que l'AnxA2 jouerait un rôle dans le recrutement des vésicules intracellulaires au site de rupture des cellules musculaires squelettiques de souris (Lennon et al., 2003). La résolution du microscope utilisé pour ces expériences ne nous permet pas d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse dans les cellules musculaires squelettiques humaines. L'AnxA2-GFP s'accumule dans un cluster qui persiste au-delà d'1 min. Les différents plans de la zone de rupture après 65,0 s montrent que ce

Résultats

cluster forme un domaine « cap » à l'extérieur du myotube (**Figure 3.3b**). Là encore, ces observations sont en accord avec les résultats obtenus chez la souris (Démonbreun et al., 2016b). Cependant, au lieu d'observer une zone dépourvue d'AnxA2-GFP en dessous du domaine « cap », on constate la présence de l'Anx recombinante dans la zone intracellulaire située sous le « cap ». De plus, on remarque que le « cap » n'a pas forcément une géométrie régulière, contrairement à la forme sphérique observée systématiquement dans les fibres musculaires de souris.

Concernant l'AnxA2 endogène, elle est également retrouvée dans un domaine « cap » après un dommage membranaire (**Figure 3.4**). A ce stade, l'AnxA2 semble avoir un comportement similaire à celui de l'AnxA1.

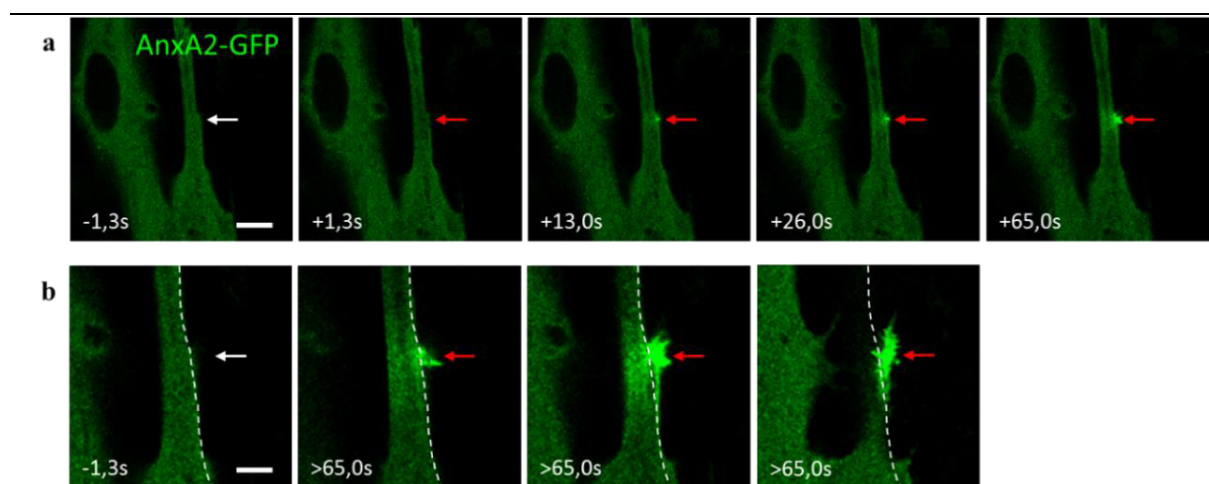


Figure 3.3 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA2-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (a) Barre d'échelle : 10 μm . (b) Zoom du site de rupture avant et plus de 65 s après l'irradiation. Les 3 images à plus de 65 s correspondent à 3 plans différents. Ligne blanche, membrane plasmique avant l'irradiation. Barre d'échelle : 5 μm .

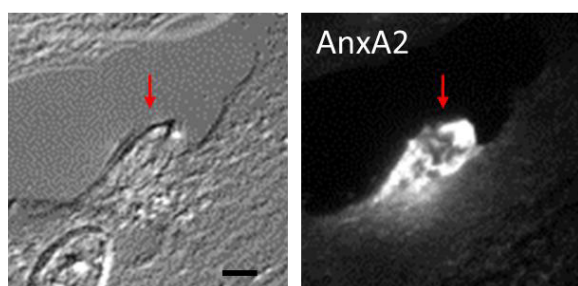


Figure 3.4 : Distribution de l'AnxA2 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés.

La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarqués pour l'AnxA2 et observés en microscopie de transmission et de fluorescence. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle : 5 μm .

C. AnxA4-GFP

Récemment, Boye et collaborateurs ont proposé un modèle de réparation membranaire pour les cellules cancéreuses impliquant une invagination de la membrane plasmique endommagée associée à l'AnxA4 et l'AnxA6 (Boye et al., 2017). Dans ce modèle, l'AnxA4 induirait l'invagination des bords de la rupture, et l'AnxA6 jouerait un rôle de constriction pour refermer la déchirure. Bien que son taux d'expression endogène soit faible (voir **Figure 1.2**), nous avons étudié l'AnxA4-GFP pour confronter nos résultats à ce modèle. Immédiatement après le dommage, des spots fluorescents intracellulaires apparaissent sur une large zone autour de la zone de rupture (**Figure 3.5**, +3,9 s). L'AnxA4-GFP est ensuite recrutée progressivement au site de rupture sous forme de vague (+9,1 à 26 s) et forme un domaine « cap » qui persiste au-delà de 90 s. A partir de ces observations, dans l'hypothèse où la réparation membranaire est réalisée via un « patch » lipidique, nous pouvons envisager que l'AnxA4 est associée à ces vésicules intracellulaires et pourrait jouer un rôle dans leur recrutement jusqu'au site de rupture pour colmater la déchirure. Le « cap » d'AnxA4-GFP se forme à l'extérieur du myotube (**Figure 3.5b**), ce qui est peu consistant avec le modèle selon lequel l'AnxA4 induirait une invagination des bords de la rupture vers l'intérieur de la cellule (Boye et al., 2017). De plus, la fluorescence entre le domaine « cap » et la cellule n'est pas continue, indiquant que l'AnxA4-GFP se concentre exclusivement dans le domaine « cap » sans faire de liaison avec le myotube comme l'AnxA2-GFP (**Figure 3.3**).

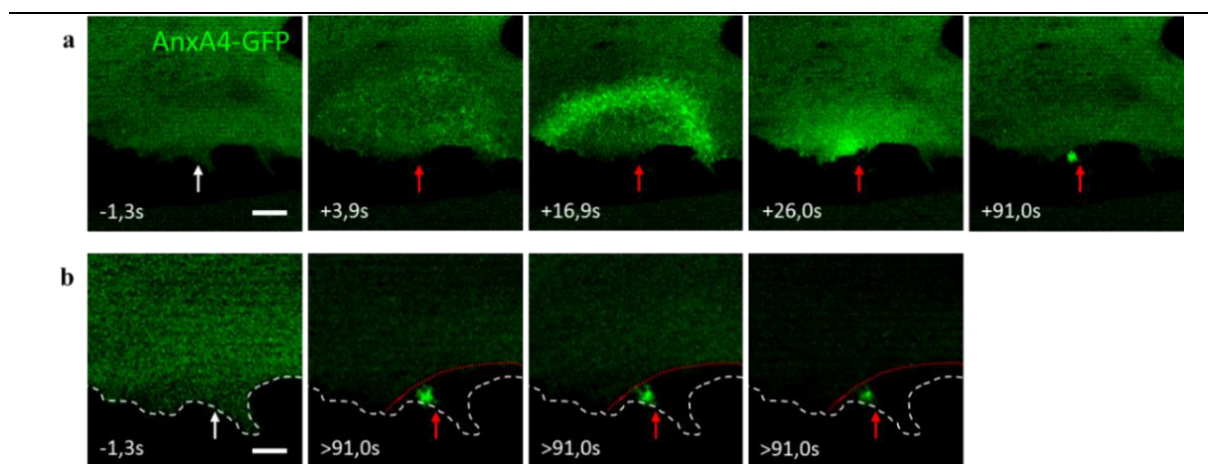
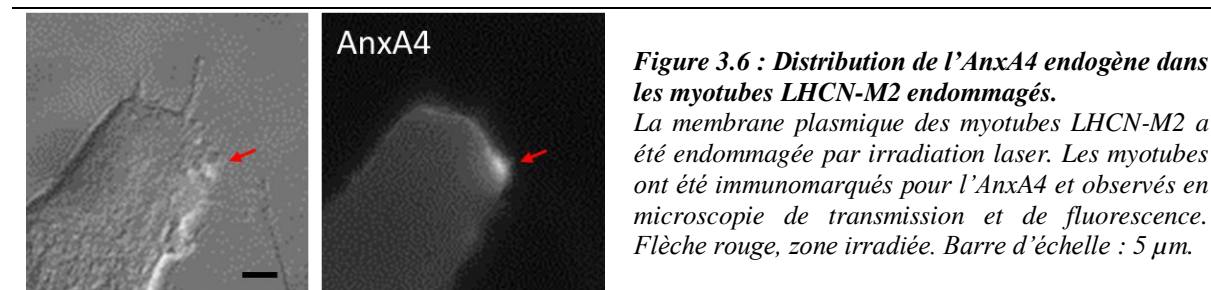


Figure 3.5 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA4-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA4-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (a) Barre d'échelle : 10 μm . (b) Zoom du site de rupture avant et plus de 91 s après l'irradiation. Les 3 images à plus de 91 s correspondent à 3 plans différents. Ligne blanche, membrane plasmique avant l'irradiation ; ligne rouge, membrane plasmique après l'irradiation. Barre d'échelle : 5 μm .

Résultats

Nos résultats préliminaires sur la localisation de l'AnxA4 endogène après un dommage du sarcolemme montrent une accumulation de l'AnxA4 au site de rupture plusieurs minutes après réparation, suggérant sa présence au domaine « cap » (**Figure 3.6**).



D. AnxA5-GFP

Le trafic de l'AnxA5-GFP et de l'AnxA5 endogène lors d'un dommage membranaire des myotubes humains a déjà fait l'objet d'une publication par l'équipe (Carmeille et al., 2016). Brièvement, les résultats ont montré que l'AnxA5-GFP est recrutée au site de rupture dans les premières secondes suivant le dommage, en formant un cluster persistant plus d'1 min. L'observation de l'AnxA5 endogène plusieurs minutes après le dommage membranaire a révélé que l'AnxA5 s'accumule dans un domaine « cap » comme décrit chez la souris (Demonbreun et al., 2016b).

E. AnxA6-GFP

Concernant l'AnxA6-GFP, dans la majorité des expériences, celle-ci est recrutée au site de rupture immédiatement après le dommage membranaire et semble être essentiellement associée à la membrane plasmique (**Figure 3.7a**, +1,3 s). La fluorescence n'augmente qu'au niveau de la membrane plasmique à proximité de la rupture en périphérie de la cellule (+13,0 s), puis se concentre dans un domaine « cap » (+26,0 s) qui persiste au-delà de 65 s. De nombreuses études ont montré le recrutement d'AnxA6 à la membrane plasmique en présence de toxines bactériennes formant des pores (Babiychuk et al., 2009 ; Potez et al., 2011) ou au site de rupture lors d'un dommage mécanique (Roostalu and Strähle, 2012 ; Swaggart et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016b, 2016a ; Boye et al., 2017), ce qui est en accord avec nos observations. Nous avons observé que la zone autour du domaine « cap » est dépourvue d'AnxA6-GFP (**Figure 3.7b**), comme observé pour les cellules musculaires squelettiques murines (Demonbreun et al., 2016b).

Résultats

Le domaine « cap » enrichi en AnxA6-GFP n'a pas une structure homogène avec une géométrie régulière, mais semble être plutôt un amas de matériel cellulaire. Dans le modèle proposé par Boye et collaborateurs, l'AnxA6 jouerait un rôle de constriction pour refermer la déchirure après son invagination induite par l'AnxA4 (Boye et al., 2017). Il est difficile d'affirmer ou d'infirmer le rôle de l'AnxA6 à partir de nos images, mais l'AnxA4-GFP étant retrouvée dans le domaine « cap » comme l'AnxA6-GFP, il est peu probable qu'une invagination se forme au site de rupture des cellules musculaires pour refermer la déchirure. Il est possible que le modèle proposé ne soit valable que pour les cellules cancéreuses, où l'expression de l'AnxA4 est élevée (Choi et al., 2016 ; Deng et al., 2013).

Concernant l'AnxA6 endogène, celle-ci est également retrouvée enrichie dans une structure visiblement composé d'un amas de matériel membranaire (**Figure 3.8**). Située à l'extérieur du myotube, cette structure peut être assimilée à un domaine « cap ».

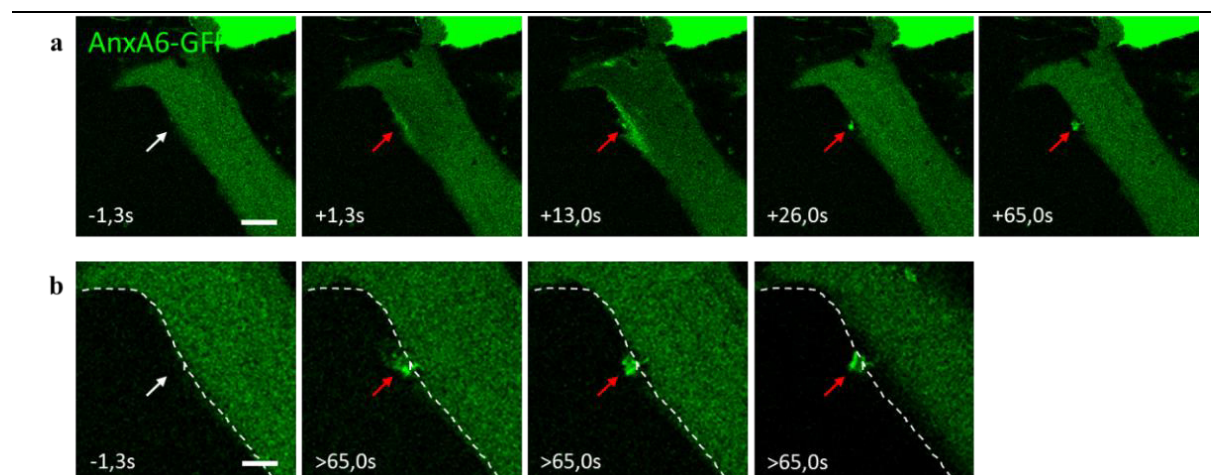


Figure 3.7 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA6-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA6-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (a) Barre d'échelle : 10 μm . (b) Zoom du site de rupture avant et plus de 65 s après l'irradiation. Les 3 images à plus de 65 s correspondent à 3 plans différents. Ligne blanche, membrane plasmique avant l'irradiation. Barre d'échelle : 5 μm .

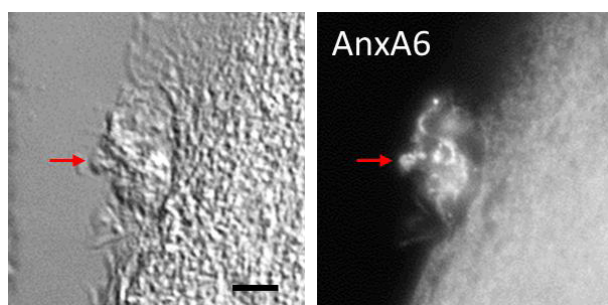


Figure 3.8 : Distribution de l'AnxA6 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés.

La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarqués pour l'AnxA6 et observés en microscopie de transmission et de fluorescence. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle : 5 μm .

Résultats

Dans le modèle proposé pour les fibres musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b), les AnxA1, A2 et A6 sont retrouvées exclusivement dans le domaine « cap », alors que d'autres protéines impliquées dans la réparation membranaire, comme la dysferline, sont présentes dans un domaine situé à la base du « cap », appelé domaine « shoulder ». Pour vérifier si une configuration similaire était retrouvée dans les cellules musculaires humaines, nous avons irradié des myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et réalisé un immunomarquage de la dysferline. La **Figure 3.9** montre que l'AnxA6-GFP est présente dans le « cap », alors que la dysferline se concentre à la membrane plasmique. L'image de superposition révèle trois zones, une présentant uniquement l'AnxA6-GFP (magenta), une présentant l'AnxA6-GFP et la dysferline (blanc), et une présentant uniquement la dysferline (vert). Nous pouvons donc supposer que les domaines « cap » et « shoulder » décrits dans les fibres musculaires de souris peuvent aussi s'appliquer aux cellules musculaires squelettiques humaines, le domaine « shoulder » étant caractérisé par la présence de la dysferline, et le domaine « cap » par celle de l'AnxA6.

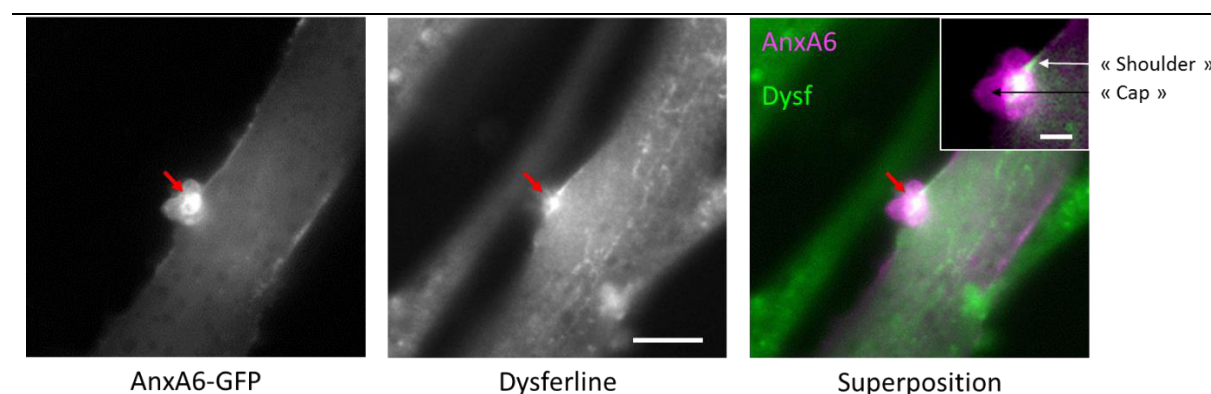


Figure 3.9 : Protéine du domaine « cap » vs protéine du domaine « shoulder ».

Des myotubes LHCN-M2 exprimant l'AnxA6-GFP ont été irradiés en périphérie puis immunomarqués pour la dysferline. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle : 10 μ m. Barre d'échelle de l'insert : 3 μ m.

F. Cinétique comparée

Pour déterminer l'ordre de recrutement relatif des Anx, nous avons réalisé les mêmes expériences de rupture membranaire sur des myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et une autre Anx (A1, A2, A4 ou A5) couplée à la protéine fluorescente mCherry.

i. AnxA1-mCherry et AnxA6-GFP

Le signal fluorescent de la mCherry est présenté en magenta, qui est la couleur que l'œil humain distingue le mieux du vert (Geissbuehler and Lasser, 2013). La **Figure 3.10** montre que l'AnxA1-mCherry et l'AnxA6-GFP sont toutes les deux recrutées au site de rupture et forment un domaine « cap », comme observé dans les myotubes exprimant uniquement l'AnxA1-GFP ou l'AnxA6-GFP (voir **Figure 3.1** et **Figure 3.7**). Cependant, l'AnxA1-mCherry est recrutée et se concentre dans le domaine « cap » beaucoup plus tôt que l'AnxA6-GFP. A 13,0 s, une concentration plus importante d'AnxA1-mCherry, comparée à l'AnxA6-GFP, est observée au site de rupture. Après environ 40 s, l'AnxA1-mCherry est concentrée au domaine « cap », alors que l'AnxA6-GFP est toujours située sur une zone plus large autour du site de rupture, et ne se concentre au domaine « cap » qu'à partir d'environ 80 s, où les deux Anx sont co-localisées.

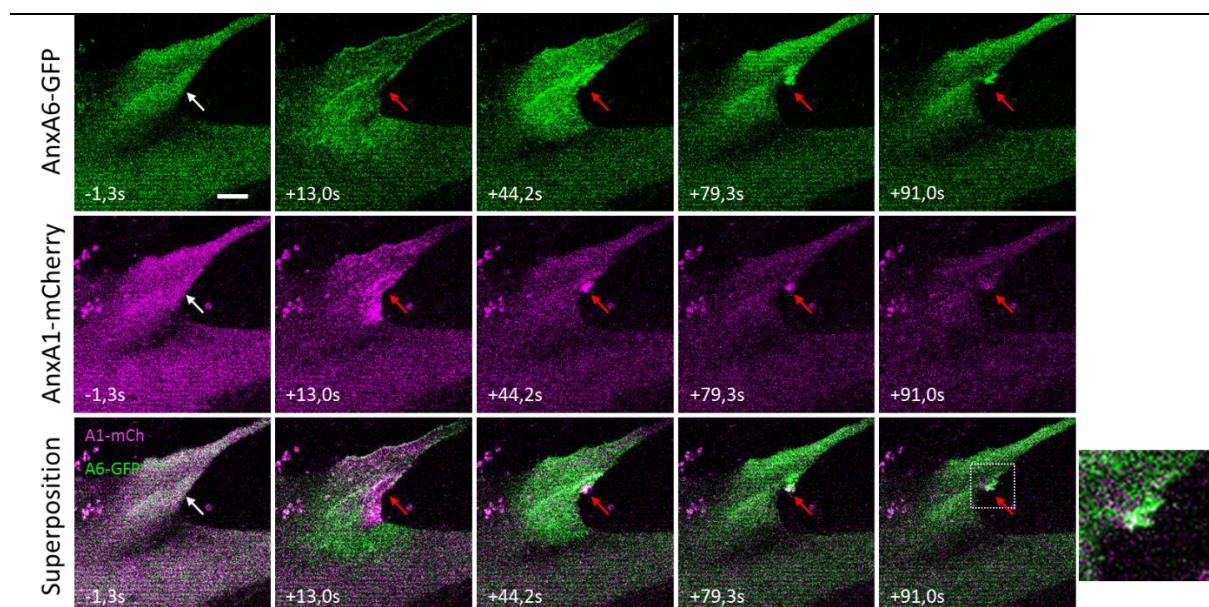


Figure 3.10 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et l'AnxA1-mCherry. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA6-GFP (vert) et pA1-mCherry (magenta), et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μ m.

Résultats

Plusieurs études se sont intéressées à l'ordre de translocation des Anx à une membrane lors d'une augmentation de la concentration calcique. Un traitement avec un ionophore calcique qui augmente la concentration calcique intracellulaire, sur des cellules HEK293 (Monastyrskaya et al., 2007) et des cellules de neuroblastome de souris (Skrahina et al., 2008), entraîne la translocation de l'AnxA6 à la membrane plasmique avant l'AnxA1. Dans le contexte de la réparation membranaire, l'AnxA6 est recrutée au site de rupture avant l'AnxA1 dans le muscle de poisson-zèbre (Roostalu and Strähle, 2012), alors que la cinétique du recrutement au site de rupture des deux Anx est similaire dans les fibres musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b). Les différences observées dans la littérature peuvent s'expliquer par l'utilisation d'espèces différentes et d'approches différentes pour induire la hausse du Ca^{2+} intracellulaire. Nos résultats indiquent que dans les cellules musculaires humaines endommagées, l'AnxA1 se concentre au site de rupture avant l'AnxA6. Sur la **Figure 3.10**, on note que la fluorescence liée à l'AnxA1-mCherry diminue dans le domaine « cap » après environ 90 s, alors que celle de l'AnxA6-GFP reste stable. Cela pourrait signifier que l'AnxA1 se dissocie des membranes du « cap ». Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle après réparation, une partie de l'AnxA1 serait à l'intérieur de la cellule et se dissocierait des membranes, tandis que l'AnxA6 serait entièrement à l'extérieur de la cellule et resterait associée aux membranes à cause de la concentration calcique extracellulaire de 1 mM. On remarque également que les temps de recrutement des Anx et de l'observation du domaine « cap » sont retardés par rapport aux myotubes exprimant une seule Anx fluorescente. Cela pourrait s'expliquer par la surexpression de deux protéines recombinantes qui entraîne une compétition pour leur recrutement au site de rupture. Cette compétition pourrait également expliquer la différence entre le recrutement presque immédiat des AnxA1-GFP et A6-GFP exprimées individuellement dans le myotube, et le délai de recrutement entre l'AnxA1-mCherry et l'AnxA6-GFP exprimées simultanément dans la cellule.

ii. AnxA2-mCherry et AnxA6-GFP

Nous nous sommes ensuite intéressés au recrutement des AnxA6-GFP et A2-mCherry. Sur l'expérience caractéristique qui est présentée, les images à 2,6 s et 18,2 s montrent que l'AnxA6-GFP est recrutée au site de rupture avant l'AnxA2-mCherry (**Figure 3.11**). Entre 18 s et 90 s, les deux Anx se concentrent progressivement au site de rupture, la zone de l'AnxA2-mCherry étant plus grande que celle de l'AnxA6-GFP. Le recrutement de l'AnxA6 suivie de l'AnxA2 est en corrélation avec les observations faites sur le muscle strié squelettique du poisson-zèbre (Roostalu and Strähle, 2012).

Résultats

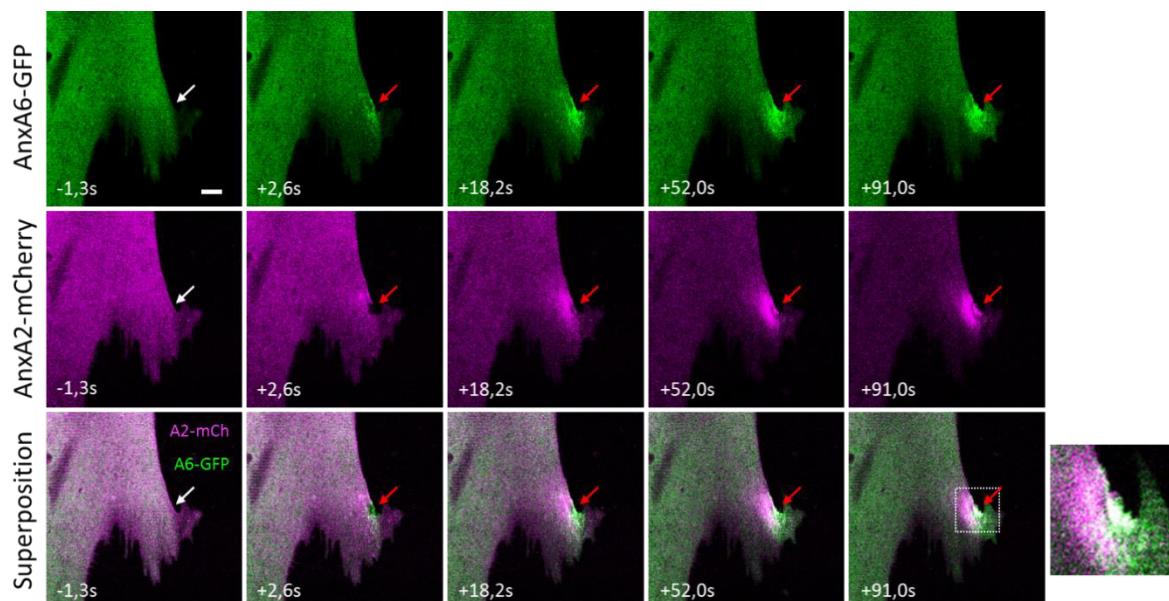


Figure 3.11 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et l'AnxA2-mCherry. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA6-GFP (vert) et pA2-mCherry (magenta), et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μ m.

A environ 90 s, les deux Anx co-localisent dans le « cap », mais l'AnxA2-mCherry est également retrouvée sous la zone endommagée. De plus, on note une continuité dans le signal de l'AnxA6-GFP alors que l'AnxA2-mCherry est présente au « cap » et dans la cellule avec une démarcation nette entre les deux zones (**Figure 3.11**, +52,0 s). Cette localisation différente pourrait s'expliquer par la sensibilité calcique de l'AnxA2 et de l'AnxA6. L'AnxA2 se lie aux membranes avec une concentration calcique plus faible que l'AnxA6 (Blackwood and Ernst, 1990 ; Skrahina et al., 2008 ; Monastyrskaya et al., 2007). Lors d'une entrée de Ca^{2+} , l'AnxA2 est activée plus en profondeur dans la cellule que l'AnxA6. La présence d'AnxA2-mCherry dans la zone intracellulaire pourrait être due à une concentration calcique résiduelle après la réparation de la rupture. Ce pool d'AnxA2 pourrait être associé à des vésicules intracellulaires dans l'hypothèse d'une réparation par un « patch » lipidique (Lennon et al., 2003). De plus, cette localisation corrobore le modèle de réparation membranaire proposé pour les cellules cancéreuses, où l'AnxA2 s'accumule en-dessous de la zone endommagée sous forme d'hétérotétramère avec la protéine S100A11 pour favoriser la repolymérisation de l'actine et la formation d'une nouvelle membrane (Jaiswal et al., 2014).

Résultats

iii. AnxA4-mCherry et AnxA6-GFP

Concernant le recrutement relatif des AnxA6-GFP et A4-mCherry, nous pouvons observer que l'AnxA6-GFP est recrutée au site de rupture plus tôt que l'AnxA4-mCherry (**Figure 3.12**, +18,2 s). L'AnxA6-GFP se concentre au niveau du site de rupture probablement en interaction avec la membrane plasmique. L'AnxA4-mCherry pourrait également interagir avec la membrane plasmique, mais aussi à des membranes intracellulaires. L'image de superposition révèle que l'AnxA6-GFP est la plus proche du site de rupture, suivie d'une vague d'AnxA4-mCherry qui co-localise partiellement, elle-même suivie par une deuxième vague d'AnxA6-GFP (notée * dans la **Figure 3.12**). A environ 40 s, l'AnxA6-GFP initialement présente au site de rupture et l'AnxA4-mCherry co-localisent dans le domaine « cap », tandis que la deuxième vague d'AnxA6-GFP se concentre progressivement vers le « cap ». Environ 90 s après le dommage, les deux Anx co-localisent dans le « cap ». Un pool d'AnxA4-mCherry est également retrouvé sous le « cap ».

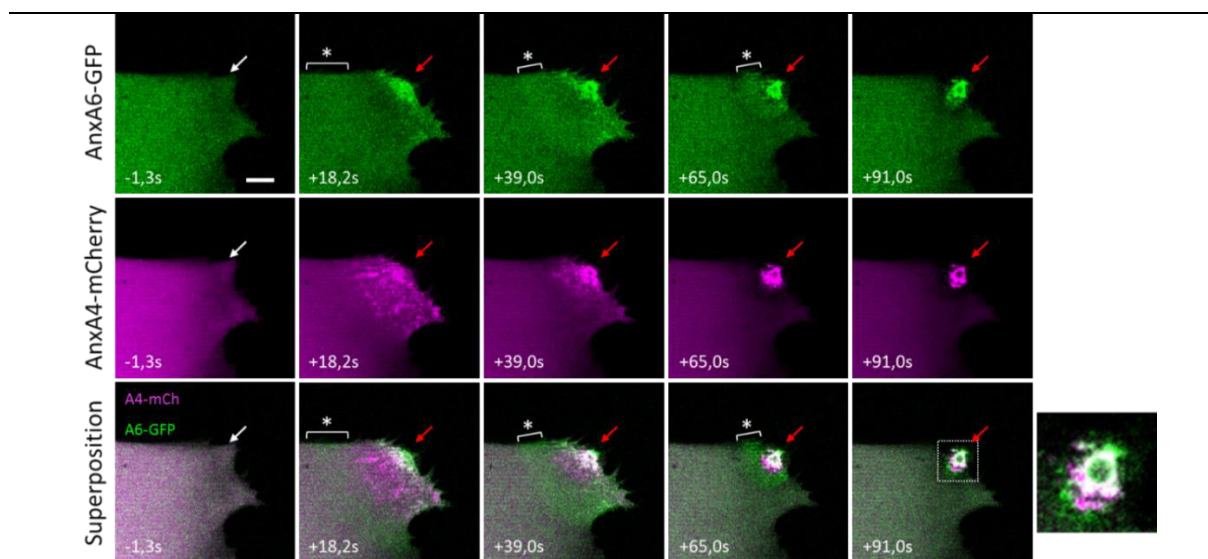


Figure 3.12 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et l'AnxA4-mCherry. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA6-GFP (vert) et pA4-mCherry (magenta) et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation ; *, deuxième vague d'AnxA6-GFP. Barre d'échelle : 10 μ m.

Dans les cellules cancéreuses, l'AnxA6 semble également être recrutée aux bords du site de rupture plus tôt que l'AnxA4 (Boye et al., 2017). En revanche, l'organisation des deux Anx après 90 s n'est pas consistante avec le modèle proposé par Boye et collaborateurs. D'après leur modèle, l'AnxA4 s'associerait à la membrane plasmique endommagée pour induire une courbure négative, aboutissant

Résultats

à une invagination du dommage vers l'intérieur de la cellule, et l'AnxA6 permettrait la constriction des bords de la rupture. Or, nos observations montrent que les AnxA4 et A6 sont présentes à l'extérieur du myotube, dans le domaine « cap ». De plus, nos images ne montrent aucune courbure notable de la membrane plasmique endommagée. Là encore, il est possible que le modèle proposé par Boye et collaborateurs ne soit valable que pour les cellules cancéreuses. D'après nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'AnxA4 s'associerait à la membrane plasmique et pourrait jouer un rôle dans le recrutement des vésicules jusqu'à la zone endommagée, pendant que l'AnxA6 déjà présente au site de rupture limite les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires.

Puisque nos expériences ont montré que les AnxA2- et A4-mCherry sont recrutées au site de rupture après l'AnxA6-GFP, nous avons voulu déterminer l'ordre de recrutement entre ces Anx. Nous avons réalisé la même expérience en co-exprimant l'AnxA2-GFP et l'AnxA4-mCherry (**Figure 3.13**). Nos résultats révèlent que l'AnxA2-GFP est recrutée au site de rupture après l'AnxA4-mCherry. Nous pouvons distinguer deux zones de recrutement des AnxA2 et A4 (+7,8 s), qui pourraient être liées à la sensibilité calcique différente des Anx (Skrahina et al., 2008). Dans l'hypothèse où un « patch » lipidique se forme, l'AnxA4, moins sensible au Ca^{2+} que l'AnxA2, se lierait à des vésicules plus proches du site de rupture, et l'AnxA2 sur des vésicules plus éloignées.

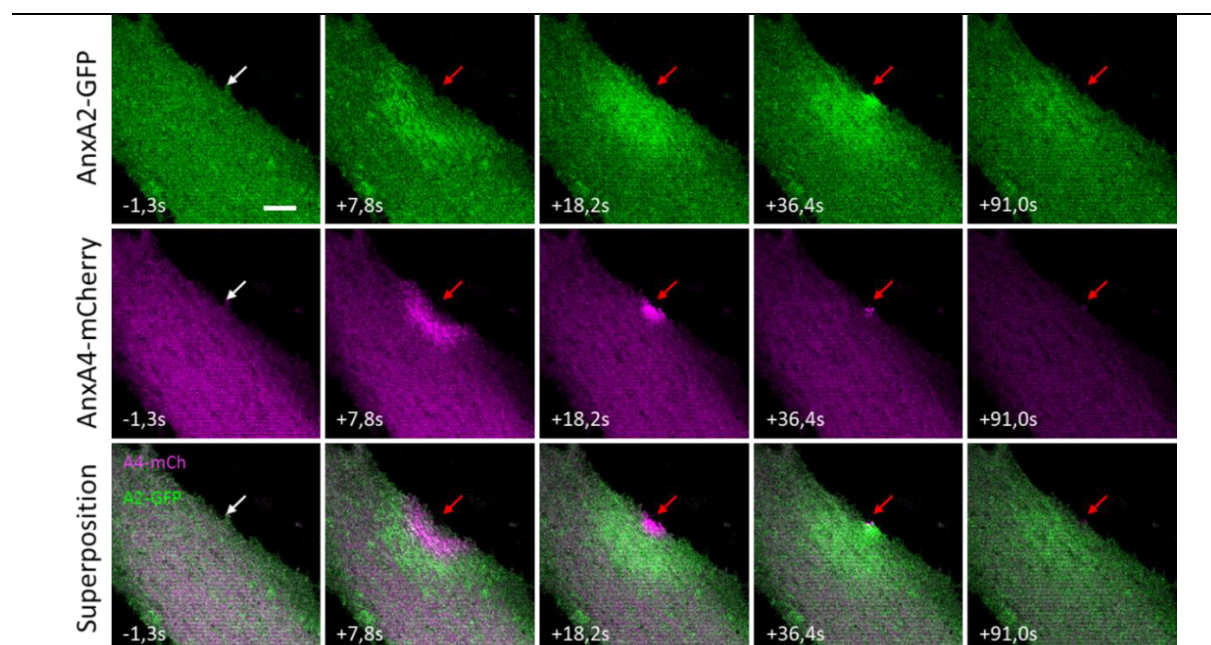


Figure 3.13 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA2-GFP et l'AnxA4-mCherry. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA2-GFP (vert) et pA4-mCherry (magenta) et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μ m.

Résultats

iv. AnxA5-mCherry et AnxA6-GFP

Nous avons également étudié le temps de recrutement relatif entre l'AnxA6-GFP et l'AnxA5-mCherry. Dans l'expérience caractéristique présentée, l'AnxA5-mCherry est recrutée et commence à former un domaine « cap » à partir de 14,3 s (**Figure 3.14**). Ceci est en accord avec les études montrant un domaine « cap » d'AnxA5-GFP au site de rupture de fibres musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b) ou un cluster d'AnxA5-GFP au site de rupture de myotubes LHCN-M2 (Carmeille et al., 2016) quelques secondes après le dommage. De plus, l'AnxA6-GFP est également recrutée pour former un domaine « cap » à 14.3 s. Dans les deux cas, le « cap » persiste au-delà de 90 s. Les deux Anx semblent donc être recrutées et former un domaine « cap » en même temps au site de rupture. Il a été montré que l'AnxA5 est capable de former des réseaux bi-dimensionnels autour du site de rupture pour empêcher son extension et favoriser la réparation (Carmeille et al., 2016). L'observation d'un petit cluster d'AnxA5-mCherry dans le domaine « cap » pourrait correspondre à l'AnxA5 située aux bords de la rupture empaquetée dans le « cap ».

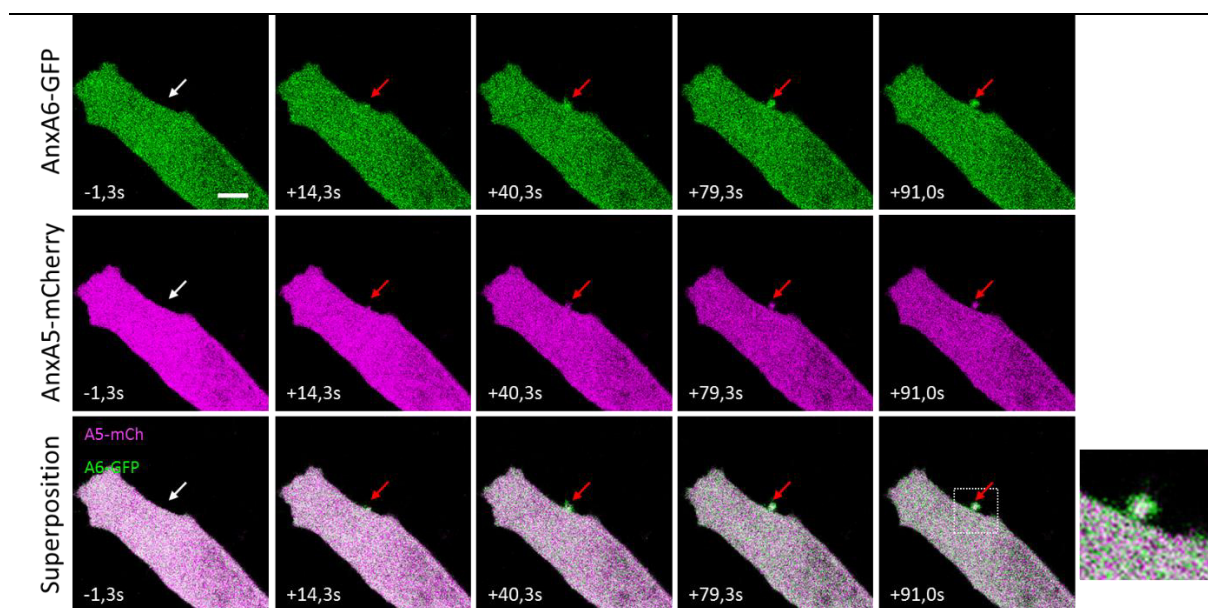


Figure 3.14 : Expériences de rupture membranaire sur les myotubes exprimant l'AnxA6-GFP et l'AnxA5-mCherry. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA6-GFP (vert) et pA5-mCherry (magenta), et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 2 jours après la dernière transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μ m.

G. Conclusion

En exprimant des Anx couplées à des protéines fluorescentes dans les myotubes LHCN-M2, nous avons pu analyser le trafic des Anx lors d'un dommage membranaire. Les AnxA1, A2, A4, A5 et A6-GFP sont toutes recrutées au site de rupture et s'accumulent dans une structure à l'extérieur de la zone endommagée, nommée domaine « cap » par Demonbreun et collaborateurs (Demonbreun et al., 2016b). Ces observations sont en corrélation avec d'autres études faites sur les cellules musculaires squelettiques de souris (Demonbreun et al., 2016b), les cellules musculaires squelettiques humaines (Carneille et al., 2016), ou encore les cellules endothéliales humaines (Koerdt and Gerke, 2017). Les AnxA4 et A6-GFP semblent se concentrer exclusivement dans le domaine « cap », où elles résident plusieurs minutes après la réparation. L'AnxA1 semble également se concentrer majoritairement dans le domaine « cap », mais contrairement aux AnxA4 et A6, elle semble se dissocier du « cap » sans que nous ayons identifié son devenir. En revanche, l'AnxA2-GFP est retrouvée dans le « cap » et dans le cytosol de la cellule. L'AnxA4 est capable d'agréger des liposomes (Kaetzel et al., 2001). L'apparition de spots fluorescents associés à l'AnxA4-GFP et le recrutement sous forme de vague suggèrent qu'elle pourrait interagir avec des vésicules intracellulaires et la membrane plasmique, et pourrait ainsi favoriser le recrutement des vésicules au site de rupture. Dans la littérature, l'AnxA1 interagirait avec les vésicules intracellulaires pour leur recrutement au site de rupture, et l'AnxA2 interagirait avec la dysferline et les vésicules pour leur attachement à la zone endommagée (Lennon et al., 2003). Si les AnxA1 et A2 interagissent avec des vésicules intracellulaires, la résolution du microscope utilisé pendant nos expériences ne nous permet pas de les visualiser. Il est plus difficile de proposer un rôle pour l'AnxA6 à partir des observations faites avec le couplage GFP. Elle semble être la seule à se lier directement et immédiatement avec la membrane plasmique. Étant l'une des premières Anx étudiées à être recrutée au site de rupture, son accumulation pourrait permettre de limiter les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires avant le colmatage par un « patch » de vésicules. Enfin, un co-marquage avec la dysferline a montré que cette protéine impliquée dans la réparation membranaire était localisée à la membrane plasmique endommagée, ou domaine « shoulder » (Demonbreun et al., 2016b), et non dans le « cap » comme l'AnxA6.

Nos résultats, qui montrent que, sur les cinq Anx étudiées, l'AnxA1 est la première à être recrutée au site de rupture et l'AnxA2 la dernière, ne sont pas en corrélation avec certaines études. D'après la littérature, l'AnxA2 est plus sensible au calcium que l'AnxA1 pour une interaction avec des liposomes (Blackwood and Ernst, 1990), et est transloquée à la membrane plasmique plus rapidement que l'AnxA1 dans les cellules de neuroblastome de souris (Skrachina

Résultats

et al., 2008), les cellules HEK293 (Monastyrskaya et al., 2007), et les fibres musculaires de poisson-zèbre (Roostalu and Strähle, 2012). En revanche, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les cellules primaires endothéliales humaines (Koerdt and Gerke, 2017). Ces études reposent sur l'utilisation d'espèces, de types cellulaires, et d'approches différents pour induire la liaison des Anx à la membrane, ce qui explique l'hétérogénéité des résultats.

Nos résultats sur des myotubes exprimant deux Anx fluorescentes ont permis de déterminer une localisation et un ordre de recrutement relatif des AnxA1, A2, A4, A5 et A6 recombinantes. L'AnxA1 semble être la première Anx recrutée au site de rupture pour former un « cap », suivies des AnxA6 et A5 qui sont recrutées simultanément. Une fois la rupture réparée, ces trois Anx sont retrouvées concentrées dans le domaine « cap ». Le recrutement de l'AnxA6 est suivi de près par celui des AnxA4, puis A2. Si l'AnxA4 est retrouvée uniquement dans le domaine « cap » comme les autres Anx testées, l'AnxA2 est à la fois présente dans le « cap » et dans la zone intracellulaire située sous le site de rupture.

Une hypothèse possible pour expliquer l'ordre de recrutement au site de rupture est la sensibilité calcique différente de chaque Anx. En effet, il a été montré qu'un traitement à l'ionomycine de cellules de neuroblastome de souris entraînait la translocation à la membrane plasmique des Anx dans l'ordre suivant : AnxA2 – AnxA4 – AnxA6 – AnxA1 – AnxA5 (Skrahina et al., 2008). L'ajout de l'ionophore calcique crée un influx de Ca^{2+} dans la cellule (**Figure 3.15a**, flèches vertes), et donc un gradient de Ca^{2+} intracellulaire (**Figure 3.15a**, dégradé de vert). Juste après l'ajout de l'ionomycine (t_1), la concentration calcique augmente progressivement, engendrant tout d'abord la translocation des Anx les plus sensibles, comme l'AnxA2 et l'AnxA4 (cercles rouges). A t_n , l'augmentation globale de la concentration calcique provoque la translocation séquentielle des Anx moins sensibles au Ca^{2+} , telles que les AnxA6, A1 et A5 (cercles bleus). La translocation traduit donc la sensibilité calcique des Anx, faisant de l'AnxA2 la plus sensible au Ca^{2+} , et l'AnxA5 la moins sensible.

Dans le cas d'une rupture mécanique de la membrane plasmique, nous n'analysons pas un ordre de translocation mais un ordre de recrutement au site de rupture. Nos observations ont mené à un ordre inversé par rapport à la sensibilité calcique des Anx (**Figure 3.15b**). Ici, la rupture induit une entrée massive de Ca^{2+} , créant un gradient important et une concentration calcique élevée près du site endommagé (t_1). Toutes les Anx peuvent potentiellement se lier aux membranes proches de la déchirure, notamment les Anx les moins sensibles (cercles bleus). En revanche, à t_1 , la concentration calcique est plus faible dans la zone intracellulaire, permettant aux Anx plus sensibles au Ca^{2+} de se lier aux membranes intracellulaires et/ou à la membrane plasmique

Résultats

éloignée du site de rupture. A t_n , la réparation de la cellule induit la formation d'un domaine « cap » contenant toutes les Anx, et une diminution de la concentration calcique intracellulaire. Dans cette configuration, seule l'AnxA2 est associée à des membranes dans la zone intracellulaire sous le site rupture, où elle pourrait remodeler le cytosquelette cortical pour la formation de la nouvelle membrane (Jaiswal et al., 2014). De plus, la présence de toutes les Anx dans le « cap » vs celle de l'AnxA2 seule en-dessous séparerait la partie à éliminer (le « cap » contenant les débris membranaires) de la partie réparée et intègre de la cellule (voir **Figure 3.11** et **Figure 3.13**).

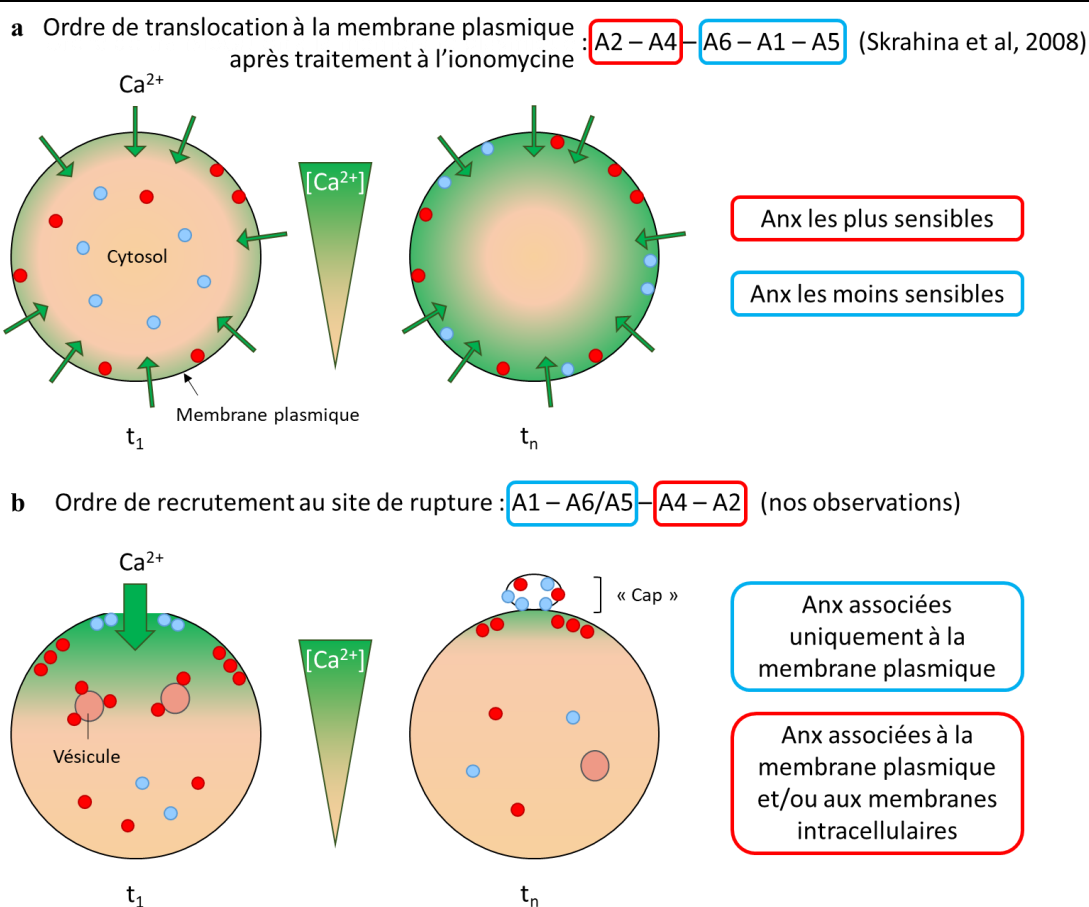


Figure 3.15 : Corrélation entre sensibilité calcique et ordre de recrutement au site de rupture.

(a) Un traitement à l'ionomycine, un ionophore calcique, induit un influx progressif de Ca^{2+} sur toute la surface de la cellule. A t_1 , les premières Anx à être transloquées à la membrane plasmique seront donc les plus sensibles, telles que les AnxA2 et A4 (cercles rouges). A t_n , l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire entraîne la translocation séquentielle des Anx moins sensibles au Ca^{2+} (cercles bleus). L'ordre de translocation obtenue dans l'étude est alors AnxA2, A4, A6, A1, et A5 (Skrahina et al., 2008). (b) Une rupture de la membrane plasmique provoque une entrée massive de Ca^{2+} , créant un gradient calcique important. A t_1 , la forte concentration calcique au site de rupture induit la liaison des Anx à la membrane plasmique, notamment les moins sensibles au Ca^{2+} telles que les AnxA1, A6 et A5. La concentration calcique intracellulaire plus faible vers l'intérieur de la cellule permet la liaison des Anx plus sensibles au Ca^{2+} aux membranes intracellulaires et/ou la membrane plasmique éloignée du site de rupture. A t_n , la réparation du dommage entraîne la formation d'un domaine « cap » contenant les Anx et une diminution de la concentration calcique près de la zone endommagée. Ainsi, seule l'AnxA2, la plus sensible au Ca^{2+} , peut se lier aux membranes. Dans ces conditions, l'ordre de recrutement au site de rupture est AnxA1, A6 et A5, A4, et A2.

4. Observation du site de rupture et localisation des Anx par microscopie électronique à transmission

Nous avons vu que les AnxA1, A2, A4, A5 et A6 sont recrutées séquentiellement au site de rupture et se retrouvent en majorité concentrées dans un domaine « cap ». Cependant, nous avons peu d'informations sur l'origine, la structure et la fonction de ce domaine « cap ». Demonbreun et collaborateurs ont fait l'hypothèse que ce domaine « cap » correspond à un échafaudage ordonné de protéines, notamment des Anx, dont l'élaboration est indispensable à la réparation membranaire (Demonbreun et al., 2016b). Pour aller plus loin, nous avons observé l'ultrastructure de la zone endommagée et la distribution des différentes Anx à haute résolution, grâce à la technique de microscopie corrélative combinant la microscopie de fluorescence et la microscopie électronique à transmission (Croissant et al., 2018).

A. Structure du site de rupture

La microscopie corrélative nous permet d'observer la même cellule en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission (MET) plusieurs minutes après le dommage membranaire. Pour pouvoir étudier le site de rupture et la distribution des Anx à haute résolution, nous avons réalisé des irradiations par le dessus avec un microscope droit à deux endroits différents des myotubes (voir **Figure 2.12**). Le dommage membranaire a été réalisé soit systématiquement en périphérie du myotube, soit à la surface du myotube pour l'AnxA2 et l'AnxA6. L'irradiation en périphérie permet de visualiser le site de rupture de côté, tandis que l'irradiation en surface permet une vue du dessus.

Pour l'étude de la structure du site de rupture, les myotubes LHCN-M2 non modifiés ont subi un dommage membranaire en périphérie, et ont été observés en microscopie photonique puis en MET.

Lorsqu'on constate la formation d'un domaine « cap », c'est-à-dire une structure protubérante située à l'extérieur du site de rupture, en microscopie photonique (**Figure 4.1a**), les images en MET révèlent une accumulation importante de matériel membranaire apparemment désorganisée à l'extérieur de la zone endommagée (**Figure 4.1a**, coupe 1). Cet amas de membrane ne semble pas provenir de vésicules, mais plus probablement d'une élongation de la membrane plasmique (têtes de flèche noires). Cet excès de membrane plasmique pourrait avoir comme origine l'exocytose de lysosomes, permettant la réduction de la tension exercée par le cytosquelette cortical en augmentant la surface

Résultats

membranaire (Togo et al., 2000). L'excès de membrane s'accumulerait donc au niveau du site de rupture. Dans le cas présent, le « cap » mesure environ 5 μm de long et 2 à 3 μm de large. Sur la coupe 2 distante de 400 nm de la coupe 1, nous pouvons distinguer des structures sphériques et très denses aux électrons délimitant la base du « cap » du reste de la cellule (têtes de flèche rouges). Ces structures pourraient correspondre à des mitochondries. En effet, il a été montré que les mitochondries s'accumulent au site de rupture et participent à la réparation membranaire des cellules musculaires en favorisant la polymérisation de l'actine (Sharma et al., 2012 ; Horn et al., 2017). Leur accumulation sous la surface de la zone endommagée, en dessous du « cap », pourrait permettre la polymérisation de l'actine pour reconstituer la nouvelle membrane plasmique et ainsi éliminer le « cap ».

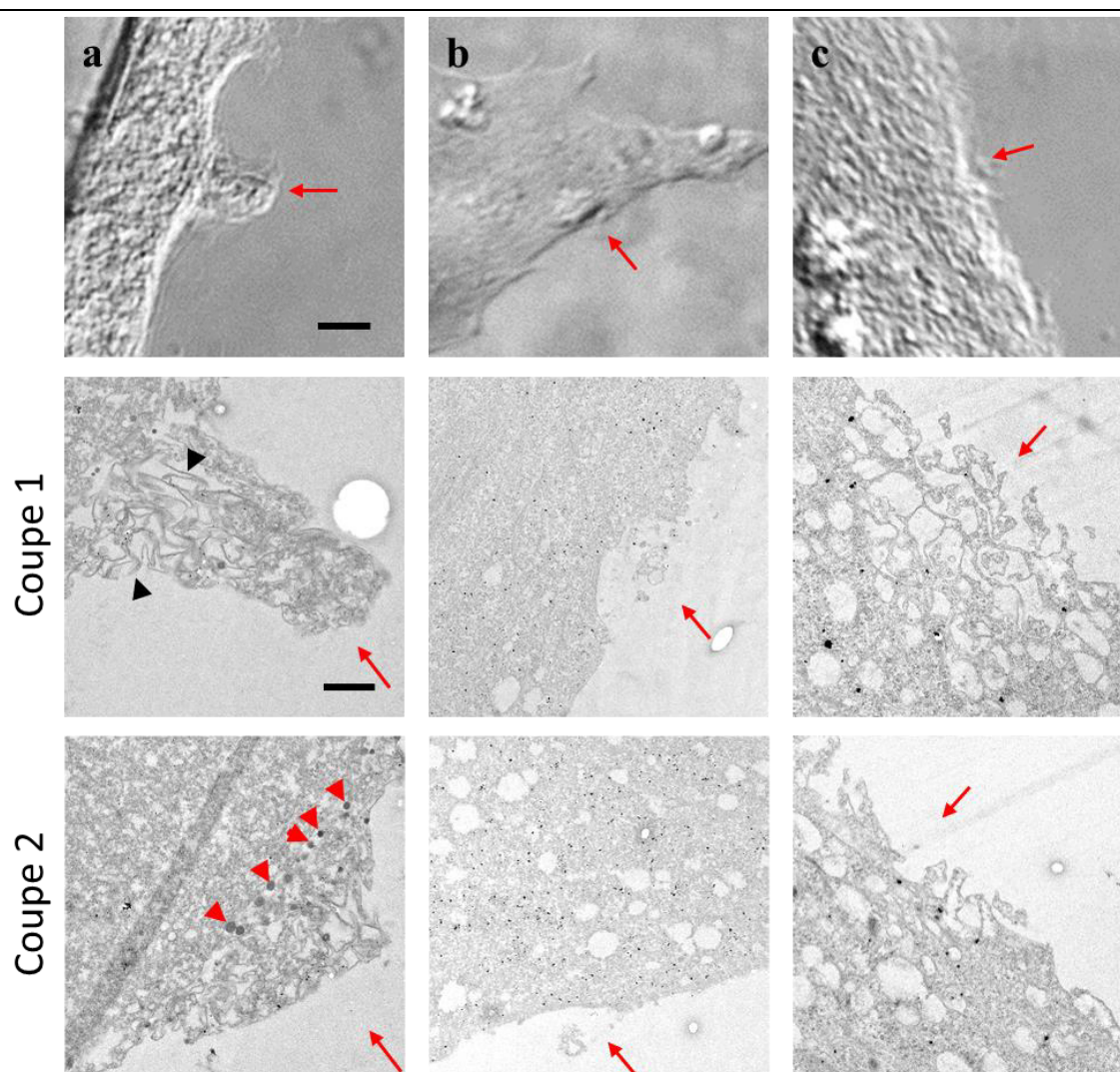


Figure 4.1 : Structure du site de rupture.

Des myotubes LHCN-M2 non modifiés ont été irradiés en périphérie et observés en microscopie photonique et en MET. Flèche rouge, zone irradiée. (a-b) Formation d'un domaine « cap ». Têtes de flèche noires, excès de membrane plasmique ; têtes de flèche rouges, mitochondries. (c) Formation d'un « patch ». Barre d'échelle en microscopie photonique : 5 μm . Barre d'échelle en MET : 1 μm .

Résultats

En revanche, lorsque le domaine « cap » n'est pas visible en microscopie photonique, nous pouvons observer deux situations. Dans la première, on constate un débris membranaire de moins de 1 μm de diamètre (**Figure 4.1b**), qui n'est constitué que de quelques fragments de membranes. Cela pourrait correspondre à un domaine « cap » de petite taille. De plus, on constate l'absence d'accumulation de vésicules ou de mitochondries sous la membrane plasmique qui s'est rétractée et semble presque intégralement reconstituée. Cela peut signifier que le dommage a été moins important que dans le cas présenté en **Figure 4.1a**, expliquant ainsi la plus petite taille du domaine « cap » et une réparation membranaire plus rapide.

Enfin, dans la deuxième situation, nous pouvons observer en MET une accumulation compacte de vésicules intracellulaires au site de rupture (**Figure 4.1c**, coupe 1). Ces vésicules de plusieurs centaines de nm semblent s'agréger au niveau de la membrane plasmique endommagée pour colmater la déchirure. De plus, cet amas n'est presque plus visible dans la coupe 2, distante de 300 nm de la coupe 1, montrant qu'il est très localisé. Cette observation, en accord avec le modèle du « patch » lipidique (McNeil and Steinhart, 2003), pourrait précéder l'étape de formation du domaine « cap ». Une partie non élucidée du modèle du « patch » lipidique est l'élimination de l'excès de membranes induit par l'amas vésiculaire pour retrouver l'intégrité de la membrane plasmique sous forme d'une simple bicouche lipidique. Le domaine « cap » est principalement constitué de membranes et semble être une structure destinée à être éliminée, ce qui pourrait correspondre à l'étape suivant le « patch ». En conclusion, il apparaît clairement que contrairement à l'hypothèse de Demonbreun et collaborateurs, le « cap » n'est pas une structure organisée mais un enchevêtrement de membranes, d'origine plasmique et vésiculaire.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des Anx recombinantes (couplées à la GFP) et endogènes au site de rupture. Pour cela, les myotubes ont été irradiés en périphérie (irradiation (1) sur la **Figure 2.12**) pour visualiser la zone endommagée de côté, ou à la surface (irradiation (2) sur la **Figure 2.12**) pour une vue de dessus.

B. AnxA1

Pour l'étude de la localisation de l'AnxA1-GFP, les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec les plasmides pA1-GFP et irradiés, et l'AnxA1-GFP a été suivie en temps réel en microscopie confocale. Les cellules ont ensuite été fixées et immunomarquées pour l'AnxA1 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or (Nanoprobes™). Après inclusion en résine, les cellules ont été coupées et les sections colorées pour les observations en MET. Après un

Résultats

dommage en périphérie, la **Figure 4.2** montre que l'AnxA1-GFP est associée aux membranes du domaine « cap ». En MET, l'AnxA1 (particules noires) est retrouvée aux membranes du « cap » et dans le cytosol sous la zone endommagée. Cependant, elle semble être peu abondante au site de rupture, que ce soit dans le domaine « cap » ou dans la zone intracellulaire située sous le « cap ». Cela corrobore l'observation de la **Figure 3.10**, où la concentration d'AnxA1-GFP dans le « cap » diminue au cours du temps. De plus, la membrane plasmique semble s'être en grande majorité reconstituée. L'AnxA1-GFP étant recrutée immédiatement au site de rupture après un dommage membranaire (voir **Figure 3.1**), et étant donné que l'observation est faite plusieurs minutes après le dommage, une partie de l'AnxA1 aurait pu être associée au « patch » lipidique, puis se dissocier des membranes et retrouver une localisation cytosolique.

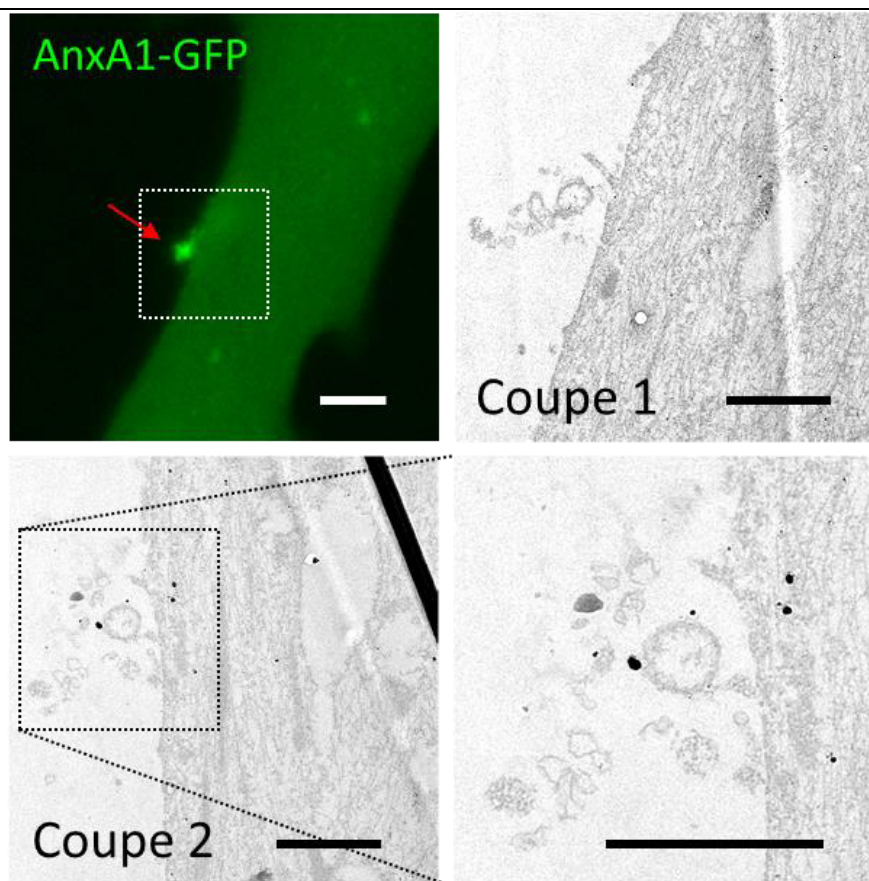


Figure 4.2 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés en périphérie exprimant l'AnxA1-GFP. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA1-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé en périphérie des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA1 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μm . Barre d'échelle en MET : 1 μm .

Résultats

Pour étudier la distribution de l'AnxA1 endogène, les myotubes LHCN-M2 non modifiés ont été irradiés, fixés et immunomarqués pour l'AnxA1 avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore et à une bille d'or (Nanoprobes™). Après observation en microscopie de fluorescence, les cellules sont incluses en résine, coupées, colorées et observées en MET. De la même manière, l'AnxA1 endogène semble interagir avec les membranes du « cap » (têtes de flèche rouges sur la **Figure 4.3**) et est présente dans le cytosol situé sous la zone endommagée (**Figure 4.3**, coupe 1), mais ne semble pas associée à la membrane plasmique ou à la surface des vésicules intracellulaires (coupe 2).

Des expériences sont prévues pour étudier la localisation de l'AnxA1 après une irradiation à la surface du myotube.

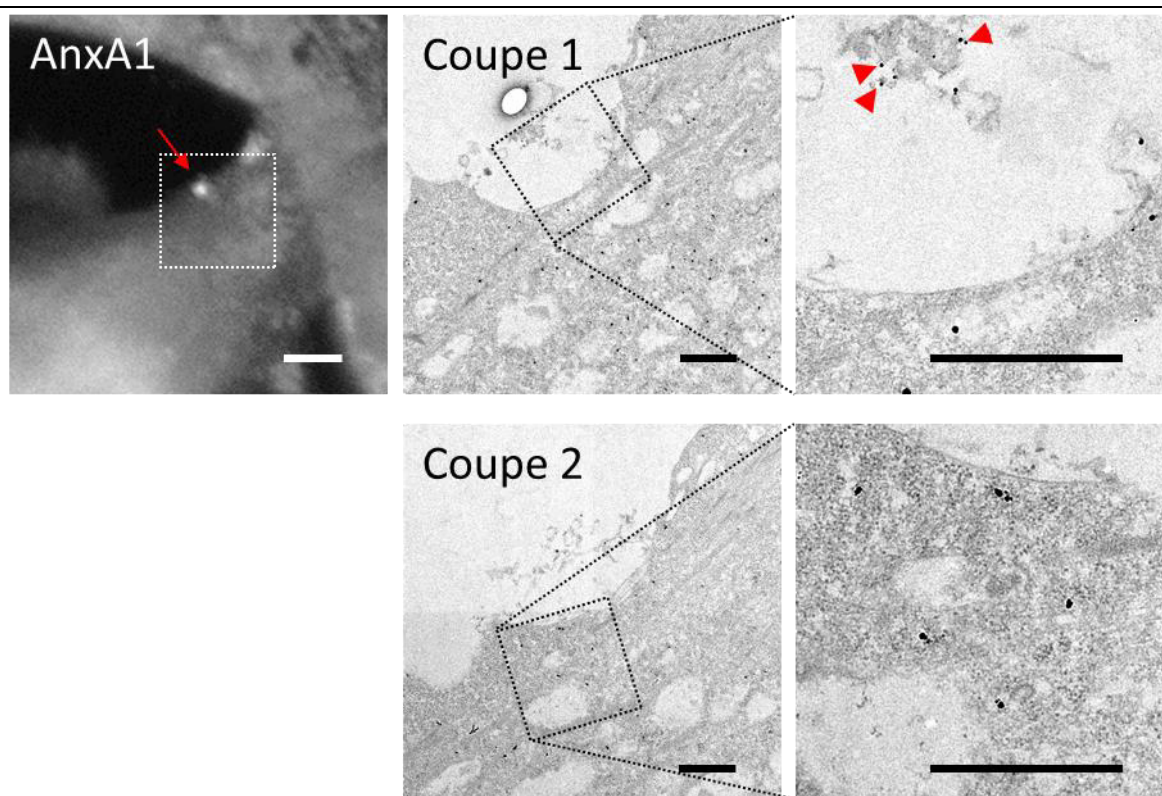


Figure 4.3 : Distribution subcellulaire de l'AnxA1 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés. La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarqués pour l'AnxA1 avec un anticorps secondaire couplé à la fois à un fluorophore et à une bille d'or, et observés en microscopie de fluorescence et en MET. Flèche rouge, zone irradiée ; têtes de flèche rouges, AnxA1 associée aux membranes du « cap ». Barre d'échelle en fluorescence : 5 μ m. Barre d'échelle en MET : 1 μ m.

C. AnxA2

La **Figure 4.4** montre un myotube LHCN-M2 exprimant l'AnxA2-GFP. Comme observé précédemment, l'AnxA2 est présente dans le domaine « cap » mais aussi plus profondément dans la cellule (image de fluorescence). L'image de la coupe 1 correspondant à la base du « cap » pourrait représenter une accumulation membranaire semblable à un « patch » qui aurait colmaté la déchirure, et le « cap » pourrait être en partie l'excès de membranes induit par la formation du « patch ». Dans le cas présent, l'AnxA2-GFP est également retrouvée sous la base du domaine « cap », mais ne semble pas être associée à des structures particulières (coupe 1, têtes de flèche rouges). Il pourrait s'agir d'AnxA2 initialement associée aux vésicules formant le « patch » qui se serait dissocié des membranes après le colmatage du dommage, expliquant leur localisation près de la zone endommagée. L'image de la coupe 2 représente le domaine « cap ». On observe que l'AnxA2-GFP semble être associée aux membranes du domaine « cap » (têtes de flèches noires sur le zoom de la coupe 2).

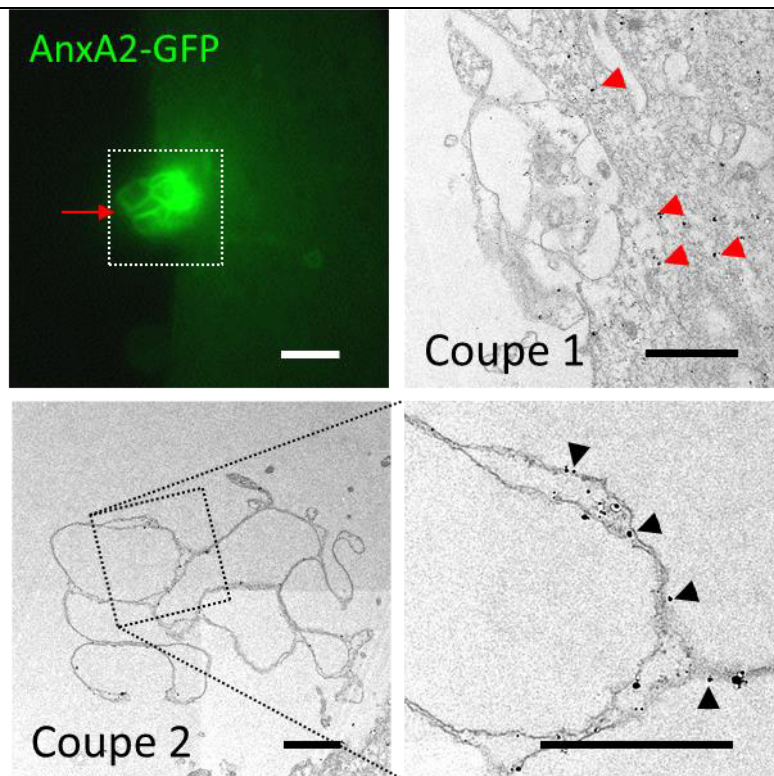


Figure 4.4 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés en périphérie exprimant l'AnxA2-GFP. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé en périphérie des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA2 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET. Flèche rouge, zone irradiée ; têtes de flèche rouges, AnxA2 cytosolique ; têtes de flèches noires, AnxA2 associée aux membranes du « cap ». Barre d'échelle en fluorescence : 5 μm . Barre d'échelle en MET : 1 μm .

Résultats

Nous avons ensuite réalisé la même expérience en créant un dommage membranaire à la surface des myotubes (**Figure 4.5**). Nous avons observé le site de rupture en MET à 3 hauteurs de coupe différentes (voir schéma) : une zone située au-dessus du site de rupture (coupe 1) ; une zone correspondant à la surface du myotube endommagé (coupe 2) ; et une zone intracellulaire située sous la membrane endommagée (coupe 3).

Dans la **Figure 4.5**, les trois coupes montrent une accumulation de matériel membranaire au site de rupture. La coupe 1, située environ 2 μm au-dessus de la membrane plasmique endommagée, montre de nombreux fragments de taille variée présents dans la zone du domaine « cap ». La zone endommagée est clairement délimitée dans les coupes 2 et 3. Sur la coupe 3, localisée environ 700 nm en dessous de la membrane plasmique, on observe que le dommage est étendu (4 à 5 μm de diamètre) et profond. Le dommage est visible à plus de 2,5 μm de profondeur. De plus, l'accumulation de matériel membranaire n'est pas homogène mais concentrée sur un tiers, voire la moitié de la surface de la zone endommagée. Concernant la distribution de l'AnxA2, celle-ci est associée aux différentes structures membranaires accumulées au site de rupture, et ce dans les trois zones de coupe (**Figure 4.5**, images zoomées). Nous pouvons noter que l'AnxA2 semble également associée à des vésicules (**Figure 4.5**, coupe 1 zoomée). De plus, l'AnxA2 est retrouvée en quantité équivalente dans les trois coupes, indiquant sa présence en continu entre le domaine « cap » à l'extérieur de la cellule et la zone intracellulaire endommagée, ce qui est en accord avec nos précédentes observations (voir **Figure 3.11**). L'AnxA2 pourrait donc permettre l'accumulation et la compaction des vésicules pour la formation d'un « patch », et sa présence dans le « cap » pourrait s'expliquer par l'élimination d'une partie de l'excès membranaire du « patch ».

L'AnxA2 endogène est également recrutée et accumulée au site de rupture, et associée aux membranes du domaine « cap ». (**Figure 4.6**, coupe 1). De plus, l'image zoomée de la coupe 1 montre une zone dense aux électrons qui rappelle la structure de l'actine (coupe 1, têtes de flèche rouges), et l'AnxA2 semble y être associée. L'AnxA2 est connue pour interagir et réguler la dynamique de l'actine en présence de Ca^{2+} , notamment dans le contexte de la réparation membranaire des cellules cancéreuses (Gerke and Weber, 1984 ; Hayes et al., 2006 ; Jaiswal et al., 2014). Dans ces cellules, l'AnxA2 complexée avec la protéine S100A11 s'accumule au site de rupture, et facilite la repolymérisation de l'actine pour la réparation de la membrane plasmique endommagée. En revanche, dans le modèle de Demonbreun et collaborateurs, l'AnxA2 serait accumulée uniquement dans le domaine « cap », et la zone sous le « cap » dépourvue d'AnxA2 serait constituée d'actine (Demonbreun et al., 2016b). Or, nos observations ne sont pas en corrélation avec ce modèle, du fait de la présence de l'AnxA2 sous le domaine « cap ». De plus, la coupe 2 montre que l'AnxA2 est

Résultats

également associée aux membranes qui lient le domaine « cap » au myotube endommagé, comme observé avec l'AnxA2-GFP. L'AnxA2 pourrait donc contribuer au recrutement des vésicules et à la régulation de l'actine pour faciliter la réparation membranaire. De plus, les filaments d'actine étant impliqués dans le transport local de vésicules et d'organelles (DePina and Langford, 1999), les vésicules pourraient être véhiculées au site de rupture via ces filaments d'actine.

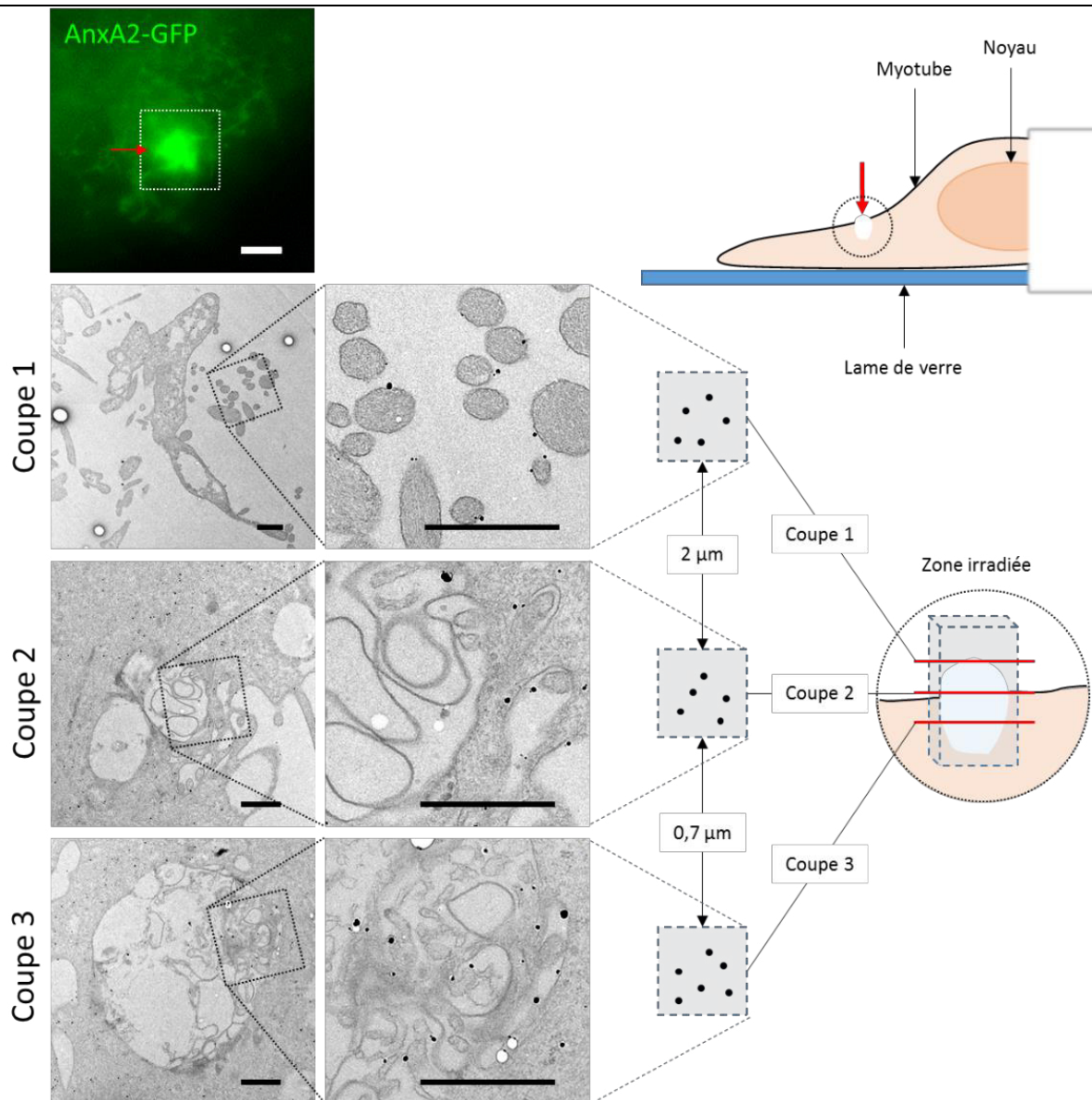


Figure 4.5 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés à la surface exprimant l'AnxA2-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé à la surface des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA2 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET sur trois coupes différentes. Le schéma de droite représente la zone irradiée et la localisation des trois coupes observées. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μm. Barre d'échelle en MET : 1 μm.

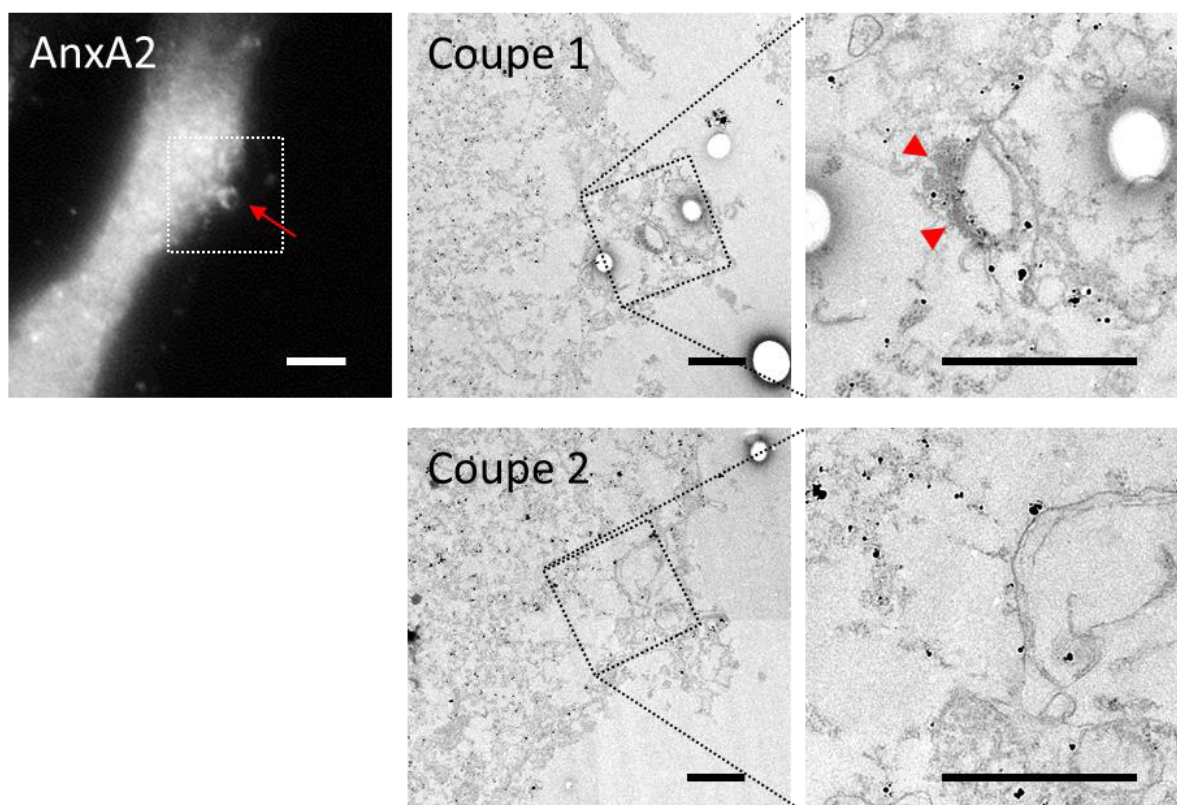


Figure 4.6 : Distribution subcellulaire de l'AnxA2 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés. La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarqués pour l'AnxA2 avec un anticorps secondaire couplé à la fois à un fluorophore et à une bille d'or, et observés en microscopie de fluorescence et en MET. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μm . Barre d'échelle en MET : 1 μm .

D. AnxA4

Concernant l'AnxA4-GFP, celle-ci est particulièrement abondante dans le domaine « cap » comparé à la zone intracellulaire située sous la base du « cap », comme le montrent les images en MET (**Figure 4.7**). De plus, elle est présente à la surface de la plupart des structures membranaires. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'AnxA4 jouerait un rôle dans l'agrégation des membranes au site de rupture (**Figure 3.5**), puis se concentre avec l'excès membranaire dans le domaine « cap » (**Figure 4.7**).

Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de réaliser des expériences en créant des dommages membranaires à la surface des myotubes, et d'étudier la localisation de l'AnxA4 endogène au site de rupture.

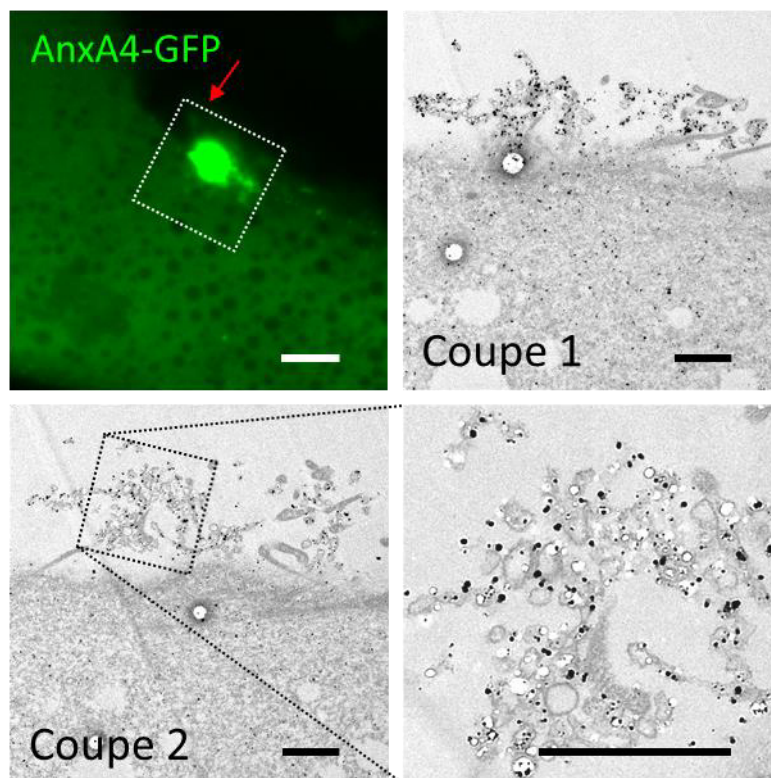


Figure 4.7 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés en périphérie exprimant l'AnxA4-GFP. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA4-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé en périphérie des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA4 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μ m. Barre d'échelle en MET : 1 μ m.

E. AnxA6

Comme l'AnxA4-GFP, l'AnxA6-GFP est bien plus abondante dans le domaine « cap » à l'extérieur du myotube que dans le cytoplasme situé sous la zone endommagée (**Figure 4.8**). Après réparation de la cellule, l'AnxA4 et l'AnxA6 semblent donc être accumulées en dehors de la cellule. Là encore, l'AnxA6 est présente à la surface de la majorité des structures membranaires du « cap ». Une partie de ces structures membranaires apparaît sous forme de « filaments » et non de vésicules, suggérant une élongation de la membrane plasmique. La cinétique de l'AnxA6-GFP ne montrait pas le même type de recrutement que pour l'AnxA4-GFP et montrait que son recrutement était plus rapide que celui de l'AnxA4-GFP (**Figure 3.7**). L'AnxA6 semblant se lier uniquement à la membrane plasmique dès les premières secondes après le dommage, il est peu probable qu'elle puisse jouer un rôle dans le recrutement des vésicules.

Résultats

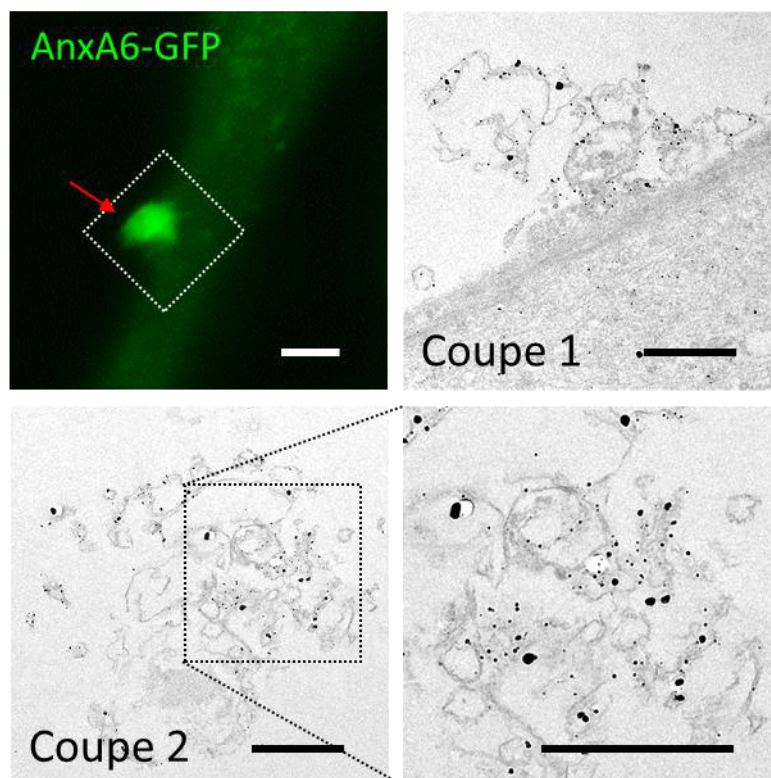


Figure 4.8 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés en périphérie exprimant l'AnxA6-GFP. Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA6-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé en périphérie des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA6 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μ m. Barre d'échelle en MET : 1 μ m.

Nous avons ensuite réalisé le même type d'expérience en irradiant le myotube à sa surface, et en observant en MET trois hauteurs de coupe différentes. Dans la **Figure 4.9**, l'accumulation de structures membranaires au site de rupture est visible sur les trois coupes. La coupe 1, localisée environ 1,4 μ m au-dessus du sarcolemme endommagé, montre un domaine « cap » bien délimité d'un diamètre de 7 à 8 μ m, composé de matériel membranaire. Le diamètre de la zone endommagée sur la coupe 2, proche du sarcolemme, est de 5 μ m (pointillés rouges), ce qui est plus grand que celui observé dans l'autre myotube (1-2 μ m). De plus, sur la coupe 3, située 1,5 μ m en dessous de la membrane plasmique endommagée, le dommage est de 6 μ m de diamètre. Contrairement au myotube de la **Figure 4.5**, le matériel membranaire accumulé recouvre toute la superficie du dommage. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un dommage plus important nécessite une plus grande mobilisation de matériel intracellulaire pour colmater la déchirure. Enfin, l'AnxA6 est retrouvée associée de part et d'autre des membranes du domaine « cap » (coupe 1), mais est peu présente dans les coupes 2 et 3. En d'autres termes,

Résultats

l'AnxA6 s'accumule principalement dans le domaine « cap » situé à l'extérieur de la zone endommagée, ce qui est en corrélation avec les images en fluorescence de l'AnxA6-GFP (**Figure 3.7**). Une hypothèse possible est que le recrutement rapide de l'AnxA6 permettrait de compacter l'excès de matériel membranaire destiné à être éliminé.

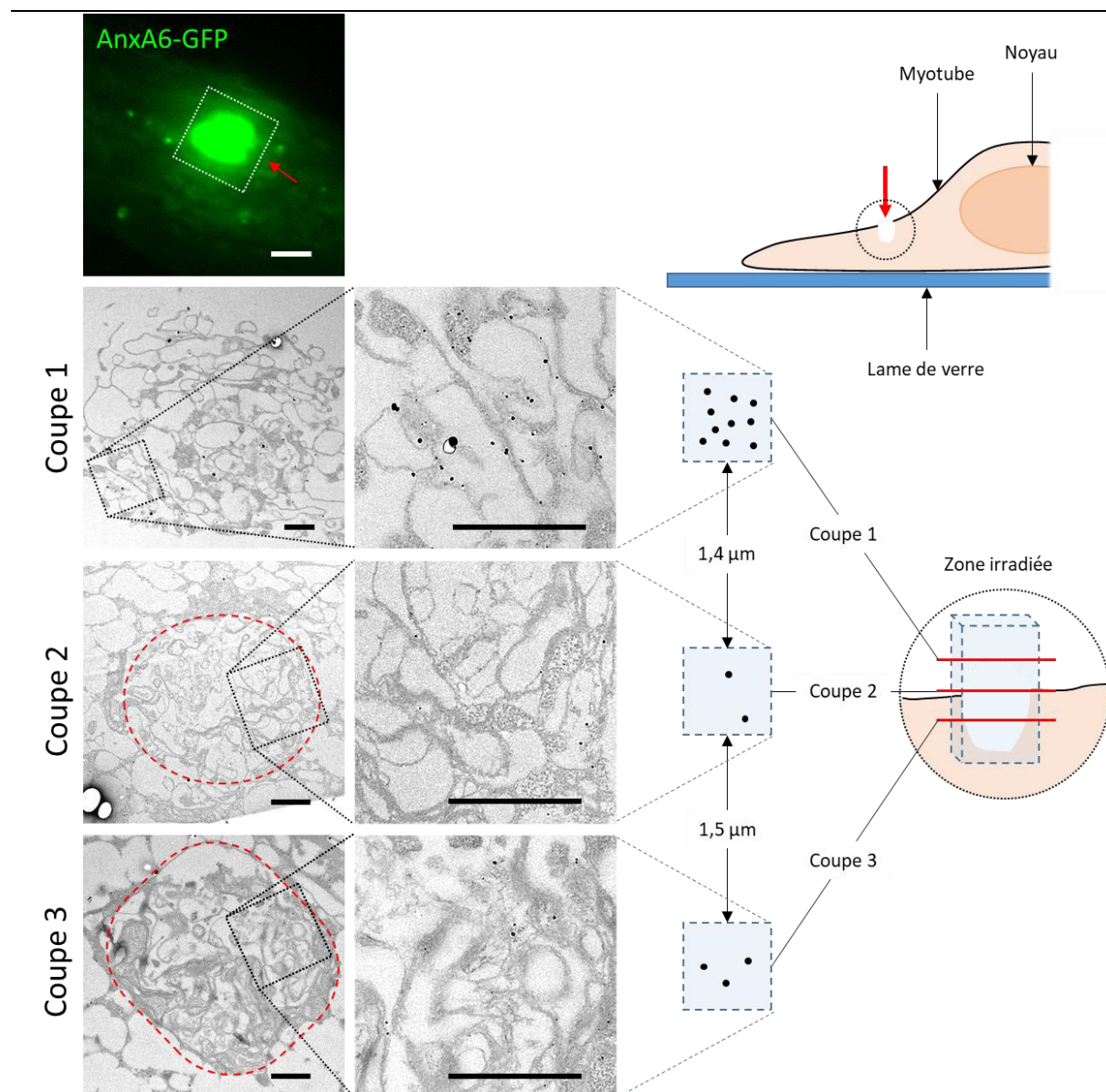


Figure 4.9 : Microscopie corrélative sur les myotubes LHCN-M2 endommagés à la surface exprimant l'AnxA6-GFP.

Les myotubes LHCN-M2 ont été transfectés avec le plasmide pA6-GFP, et un dommage membranaire a été réalisé à la surface des myotubes 2 jours après la dernière transfection. Les myotubes ont ensuite été immunomarqués pour l'AnxA6 avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, et observés en MET sur trois coupes différentes. Le schéma de droite représente la zone irradiée et la localisation des trois coupes observées. Flèche rouge, zone irradiée ; pointillés rouges, limites de la zone endommagée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 μm . Barre d'échelle en MET : 1 μm .

Résultats

Enfin, la **Figure 4.10** montre que l'AnxA6 endogène s'accumule dans le domaine « cap » et est présente à la surface de la membrane endommagée, comme observé avec l'AnxA6-GFP. L'AnxA6 pourrait donc jouer un rôle dans l'élimination de l'excès membranaire dû à l'élongation de la membrane plasmique et la formation du « patch ».

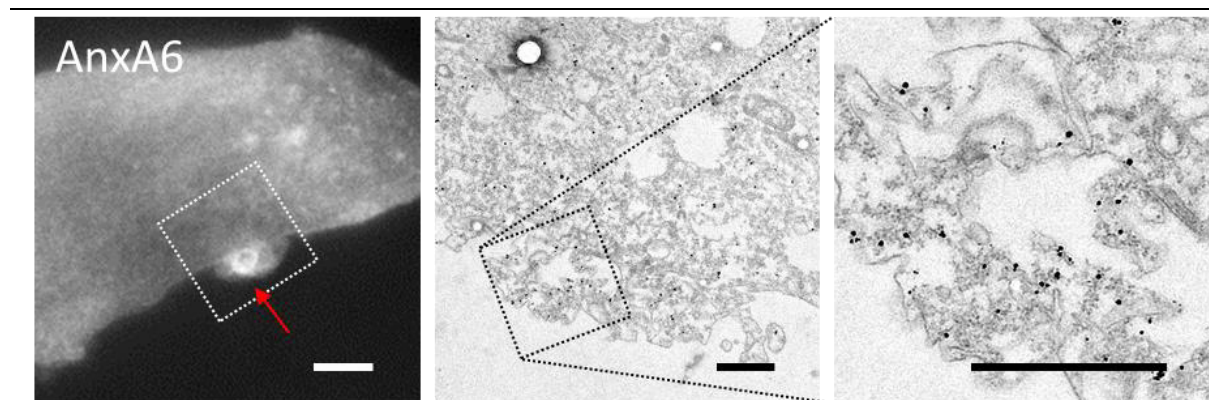


Figure 4.10 : Distribution subcellulaire de l'AnxA6 endogène dans les myotubes LHCN-M2 endommagés. La membrane plasmique des myotubes LHCN-M2 a été endommagée par irradiation laser. Les myotubes ont été immunomarqués pour l'AnxA6 avec un anticorps secondaire couplé à la fois à un fluorophore et à une bille d'or, et observés en microscopie de fluorescence et en MET. Flèche rouge, zone irradiée. Barre d'échelle en fluorescence : 5 µm. Barre d'échelle en MET : 1 µm.

F. Conclusion

La microscopie corrélative a permis d'observer la structure du site de rupture, et la localisation des Anx-GFP et des Anx endogènes à haute résolution. Le premier constat est que le domaine « cap » formé après un dommage membranaire n'a pas une structure homogène et identique d'un myotube à l'autre. Leur taille, leur forme et leur densité peuvent dépendre de l'amplitude et de la localisation du dommage, ou encore de l'état d'avancement du processus de réparation. En revanche, une caractéristique commune des domaines « cap » est de former un ensemble apparemment désorganisé d'amas membranaires. Nos résultats sont en corrélation avec les modèles de « patch » lipidique (McNeil and Steinhardt, 2003) et de la formation d'un « cap » au site de rupture (Demonbreun et al., 2016b). Ces deux modèles pourraient en réalité être deux étapes successives de la réparation d'un dommage. Le « patch » implique le recrutement de vésicules intracellulaires au site de rupture, induisant ainsi un excès de membranes. L'exocytose de lysosomes induite par l'entrée de Ca^{2+} peut également être à l'origine de l'excès membranaire pour réduire la tension exercée par le cytosquelette cortical sur la membrane endommagée (Togo et al., 2000). Retrouver une membrane plasmique intègre et fonctionnelle doit donc passer par

Résultats

l'élimination de cet excès membranaire. Le « cap » ne serait donc pas un échafaudage moléculaire qui participe à la réparation membranaire, mais plutôt l'excès de matériel lipidique et protéique (par exemple les Anx) à éliminer après la réparation. En revanche, nos résultats ne corroborent pas le modèle selon lequel l'AnxA4 induirait une invagination de la membrane endommagée pour permettre à l'AnxA6 de rapprocher les bords de la rupture par constriction (Boye et al., 2017). En effet, nos observations ne révèlent pas de courbures vers l'intérieur de la cellule, mais systématiquement un domaine « cap » situé à l'extérieur du myotube. Ajouté à cela la présence des AnxA4 et A6 exclusivement dans le « cap », il est peu probable que le modèle proposé par Boye et collaborateurs s'applique aux cellules musculaires striées squelettiques humaines.

Concernant la localisation des Anx, les images en MET confirment que, plusieurs minutes après le dommage, les AnxA4 et A6 se retrouvent accumulées exclusivement dans le domaine « cap », en interaction avec des membranes. Au contraire, les AnxA1 et A2 sont retrouvées associées aux membranes du domaine « cap », et dans le cytosol situé sous la membrane plasmique endommagée. Cependant, l'AnxA1 est beaucoup moins abondante que les autres Anx étudiées, ce qui pourrait s'expliquer par une dissociation de la majorité de l'AnxA1 aux membranes pour retrouver une localisation cytosolique. La présence d'AnxA2 sous la zone endommagée pourrait être liée au remodelage du cytosquelette cortical d'actine, comme proposé dans les cellules cancéreuses (Jaiswal et al., 2014). L'association potentielle de l'AnxA2 avec l'actine reste à confirmer, mais pourrait faciliter la réparation membranaire, ce qui expliquerait les résidus d'AnxA2 cytoplasmique observés après la réparation en microscope de fluorescence. L'observation des Anx dans le « cap » soulève l'hypothèse selon laquelle les AnxA1, A2, A4 et A6 jouerait un rôle dans l'élimination de l'excès membranaire par la formation d'un domaine « cap ». De par leur capacité à modifier la morphologie des membranes via des courbures et des repliements (Boye et al., 2018), les Anx pourraient permettre de compacter l'excès de membrane en formant une structure dense plus facile à éliminer, le domaine « cap ». Les AnxA1 et A6 étant les premières recrutées, elles pourraient initier la formation du « cap » en se fixant tout d'abord sur l'excès de membrane induit par l'exocytose de lysosomes. L'AnxA2, la seule à avoir été clairement observée en interaction avec des vésicules par MET, pourrait interagir avec les vésicules intracellulaires et la dysferline pour favoriser le recrutement des vésicules (Lennon et al., 2003), et les agréger au site de rupture, peut-être en coopération avec l'AnxA4, pour colmater la déchirure grâce à leur capacité d'agrégation (Lambert et al., 1997 ; Kaetzel et al., 2001). La présence des AnxA2 et A4 dans le « cap » serait due à l'élimination de l'excès membranaire provenant du « patch ».

5. Etude cinétique de la réparation des LHCN sauvages et déficients en Anx

Pour déterminer si une Anx est nécessaire à la réparation membranaire, nous avons utilisé des myotubes rendus déficients en Anx par la stratégie des shARN et réalisé des tests de réparation membranaire. Comme décrit précédemment, le test de réparation membranaire consiste à irradier le sarcolemme en présence de Ca^{2+} et de la sonde FM1-43, et à mesurer l'intensité de fluorescence moyenne de la cellule endommagée au cours du temps. Une stabilisation de la fluorescence indique la réparation de la cellule, tandis qu'une augmentation continue traduit un défaut de réparation du myotube (voir section **2Bi** pour plus de détails).

Etant donné les difficultés rencontrées à transduire les myotubes LHCN-M2, nous avons à ce stade réalisé des expériences préliminaires uniquement sur des myotubes déficients en AnxA6. Nous avons réalisé trois expériences indépendantes en irradiant des myotubes sauvages (CTL) et des myotubes déficients en AnxA6 (shARNA6-2). Comme montré dans l'exemple de la **Figure 2.11**, un myotube sain est considéré comme réparé à environ 80-90 s après le dommage. Nous avons donc comparé le pourcentage de myotubes réparés 90 s après le dommage membranaire, en nous basant sur l'étendue intracellulaire de la fluorescence due au FM1-43 (**Figure 5.1**). Nos résultats préliminaires montrent que 68 (± 13) % des myotubes CTL se sont réparés contre 38 (± 16) % des myotubes shARNA6-2. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le poisson-zèbre, où l'absence d'AnxA6 conduit à un défaut de réparation des fibres musculaires et le développement d'une forme de myopathie (Roostalu and Strähle, 2012). Ces observations tendent à indiquer que l'AnxA6 interviendrait dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines.

Des expériences similaires devront être réalisées sur des myotubes LHCN-M2 rendus déficients pour les autres Anx, une fois le protocole de transduction optimisé.

Résultats

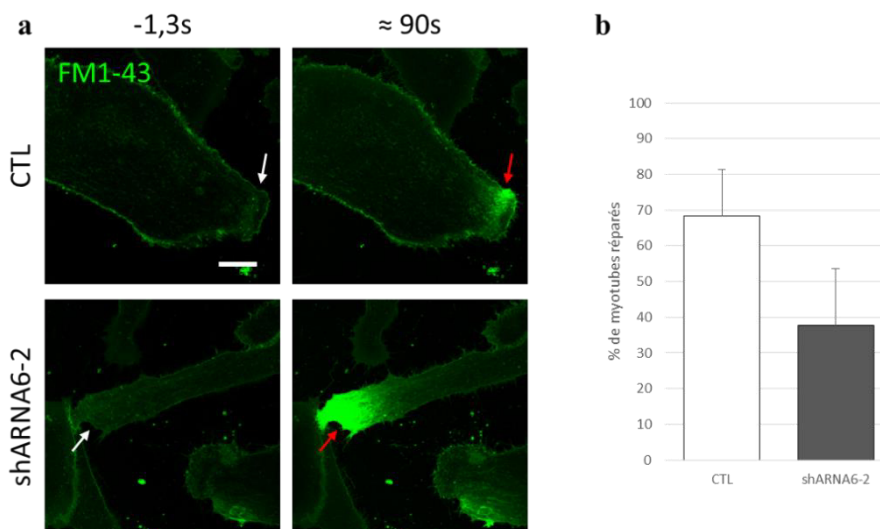


Figure 5.1 : Tests de réparation membranaire sur des myotubes sauvages et déficients en AnxA6.
Les myotubes LHCN-M2 ont été transduits à une MOI de 100 avec la séquence shARNA6-2, puis des tests de réparation membranaire ont été réalisés en présence de 1 mM de Ca^{2+} et de la sonde FM1-43. Des cellules non transduites (CTL) ont servi de contrôle. (a) Images en microscopie confocale d'un myotube CTL qui se répare et d'un myotube shARNA6-2 qui ne se répare pas. Flèche blanche, zone avant irradiation ; flèche rouge, zone après irradiation. Barre d'échelle : 20 μ m. (b) Graphique présentant le pourcentage de myotubes qui se sont réparés.

6. Expression des Anx dans des cellules musculaires dystrophiques

Plusieurs études ont montré que l'expression et la localisation de nombreuses Anx sont modifiées dans les dystrophies musculaires (Selbert et al., 1996 ; Cagliani et al., 2005 ; Waddell et al., 2011 ; Swaggart et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016a). Au laboratoire, nous avons en notre possession des lignées de cellules musculaires dystrophiques établies par le Centre de recherche en Myologie de Paris (Sorbonne Université – Inserm UMRS 974, France) à partir de patients atteints de différentes dystrophies musculaires. La lignée 650 est issue d'un patient atteint d'une cavéolinopathie, l'ex dystrophie des ceintures de type 1C (ex-LGMD1C), due à des mutations de la cavéoline-3 (Minetti et al., 1998). La lignée 578 est issue d'un patient atteint de l'ex-LGMD2B. Cette forme de dystrophie musculaire est causée par des mutations de la dysferline, menant à une expression faible ou nulle de la protéine et un défaut de réparation membranaire (Liu et al., 1998 ; Bansal et al., 2003). L'ex-LGMD2B est une dysferlinopathie. Nous avons donc voulu comparer l'expression des Anx entre des myotubes dystrophiques et des myotubes sains. Nous avons ensuite analysé la variation d'expression des Anx lors du passage de l'état de myoblaste à myotube dans les cellules dystrophiques.

A. Expression comparée des Anx dans les myotubes sains vs les myotubes dystrophiques

Nous avons comparé l'expression des Anx dans des myotubes sains (LHCN) et des myotubes issus de deux types de dystrophie musculaire, l'ex-LGMD2B (lignée 578, déficiente en dysferline) et l'ex-LGMD1C (lignée 650, déficiente en cavéoline-3). Nous avons utilisé un protocole similaire à celui présenté dans le chapitre 1 sur l'étude des Anx entre les myoblastes et les myotubes LHCN-M2. Ces expériences ont été réalisées sur au moins trois extraits cellulaires indépendants. Nous avons déterminé l'intensité de la bande Anx rapportée à celle de la GAPDH, puis normalisé par rapport à l'intensité obtenue pour les myotubes LHCN-M2. La **Figure 6.1** montre que l'AnxA1 est surexprimée (environ 20%) dans la lignée 578 déficiente en dysferline par rapport à la lignée saine, ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus sur des biopsies musculaires de patients atteints de l'ex-LGMD2B (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011). Nous observons que l'expression de l'AnxA1 est également augmentée dans la lignée 650 (30%) déficiente en cavéoline-3. Dans la littérature, cette surexpression n'est pas retrouvée chez tous les patients atteints de l'ex-LGMD1C (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011). L'expression des AnxA2 et A5 sont similaires dans les trois lignées, ce qui est en contradiction avec la surexpression d'AnxA2 observée sur des biopsies musculaires de patients atteints de l'ex-LGMD2B et 1C (Cagliani et al., 2005). Concernant l'AnxA6, son expression tend à diminuer uniquement dans la lignée 578 déficiente en dysferline. Là encore, ce résultat n'est pas en corrélation avec la surexpression d'AnxA6 observée sur des biopsies musculaires de souris déficientes en dysferline (Demonbreun et al., 2016a).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'expression des Anx peut être perturbée dans un contexte pathologique de dystrophie musculaire. La variation de l'expression des Anx dépend du type de dystrophie, mais très probablement aussi de facteurs génétiques et épigénétiques, ce qui expliquerait les différences observées avec d'autres études.

Résultats

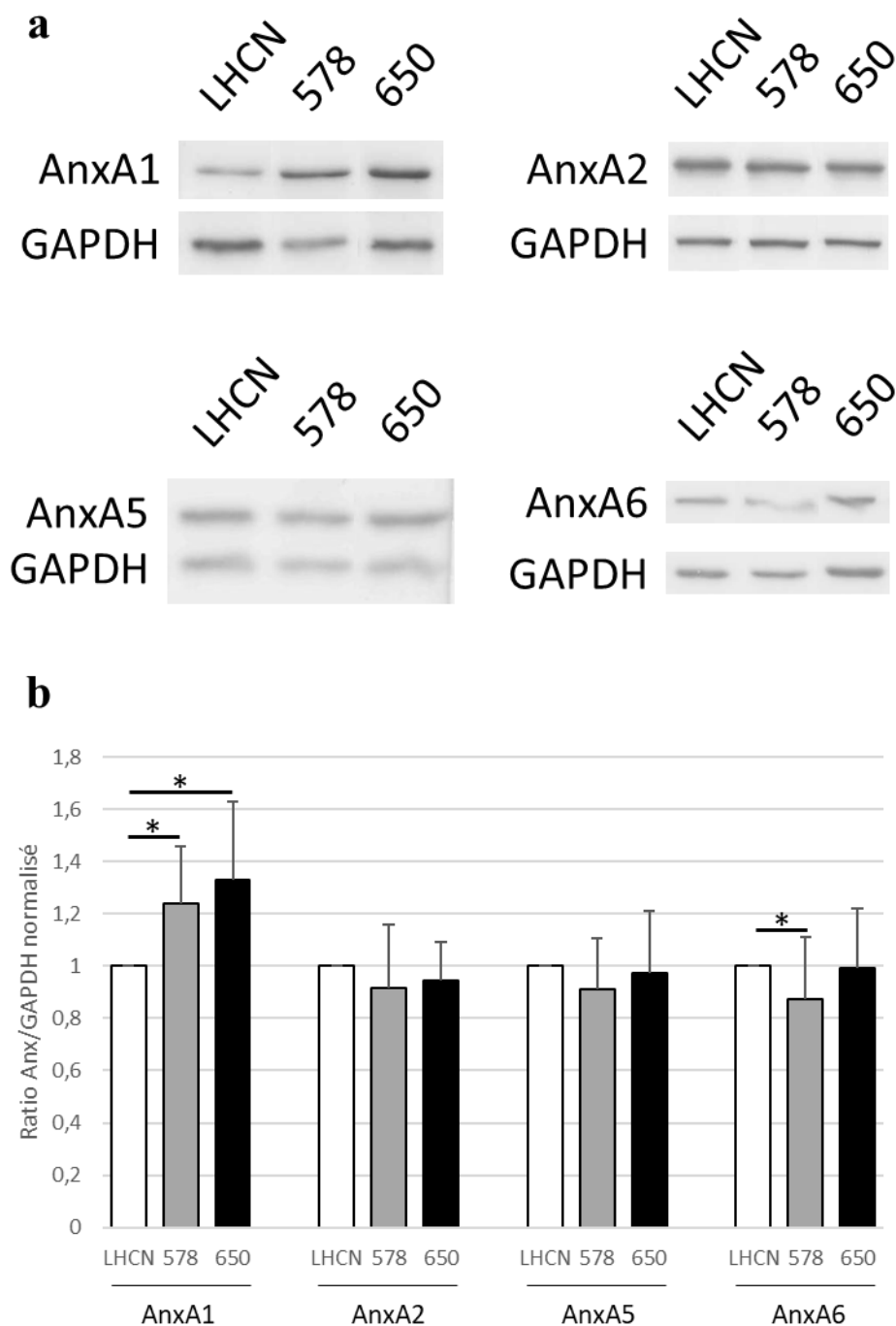


Figure 6.1 : Expression comparée des AnxA1, A2, A5 et A6 dans les myotubes LHCN-M2, 578 et 650.
 Le contenu cellulaire des AnxA1, A2, A5 et A6 dans les myotubes LHCN-M2, 578 et 650 a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 µg d'extraits protéiques a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. Les AnxA1, A2, A5 et A6 ont été détectées comme décrit dans la Figure 1.1. Le ratio de l'intensité de la bande d'Anx sur celle de la GAPDH a été normalisé par rapport à l'intensité obtenue pour les myotubes LHCN-M2. Test de Student, * : $p < 0.05$.

B. Les cellules déficientes en cavéoline-3

Comme décrit pour les LHCN-M2 (paragraphe 1A, **Figure 1.1**), l'expression relative des Anx dans les myoblastes et les myotubes des cellules 650 déficientes en cavéoline-3 a été analysée par Western-Blot, dans un premier temps avec des anticorps primaires monoclonaux de souris. Comme dans les myotubes sains, les AnxA1, A3 et A4 n'ont pas été détectées, contrairement aux AnxA2, A5 et A6. Les AnxA2 et A5 sont exprimées à des niveaux similaires dans les myoblastes et les myotubes 650, et l'AnxA6 est surexprimée dans les myotubes comparés aux myoblastes (**Figure 6.2a-b**). La forme clivée de l'AnxA2 est également détectée dans les myotubes 650. Nous avons ensuite utilisé des anticorps primaires polyclonaux de lapin pour détecter l'AnxA1, A3 et A4 (**Figure 6.2d**). L'AnxA1 est exprimée dans les myoblastes et les myotubes en quantité similaire, tandis que les AnxA3 et A4 n'ont pas été détectées. Ces résultats sont tout à fait similaires à ceux obtenus pour les cellules LHCN-M2.

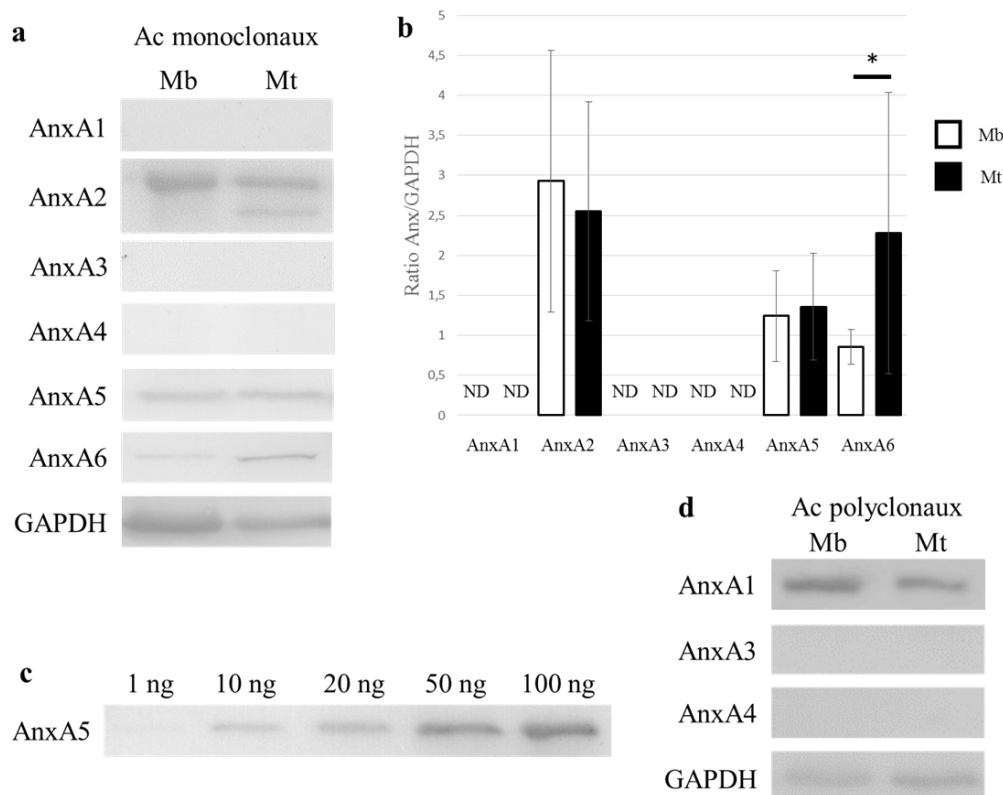


Figure 6.2 : Expression des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes 650.

Le contenu cellulaire des AnxA1, A2, A3, A4, A5 et A6 dans les myoblastes (Mb) et les myotubes (Mt) 650 après 3 jours de différenciation a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 µg d'extraits protéiques a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (a-b) Les AnxA1 (37 kDa), A2 (38 kDa), A3 (36 kDa), A4 (36 kDa), A5 (35 kDa), A6 (68 kDa) et A7 (47 et 51 kDa) ont été détectées avec un anticorps (Ac) primaire monoclonal de souris, et la GAPDH (contrôle de charge) a été détectée avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin. ND : non détectée. Test de Wilcoxon, * : $p < 0.05$. (c) 1, 10, 20, 50 et 100 ng d'AnxA5 pure ont été soumis à un SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (d) Les AnxA1, A3 et A4 ont été détectées avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin.

Résultats

Les expériences d'immunocytofluorescence indiquent que l'AnxA5 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes et des myotubes 650, tandis que les AnxA2 et A6 sont localisées exclusivement dans le cytoplasme, comme observé pour les cellules LHCN-M2 (**Figure 6.3**). L'AnxA1 est localisée dans le cytoplasme des myotubes et dans une région périnucléaire des myoblastes. Contrairement aux myoblastes sains, l'AnxA1 n'est pas retrouvée dans le noyau. Les AnxA3 (données non montrées) et A4 (**Figure 6.3**) n'ont pas été détectées par immunocytofluorescence.

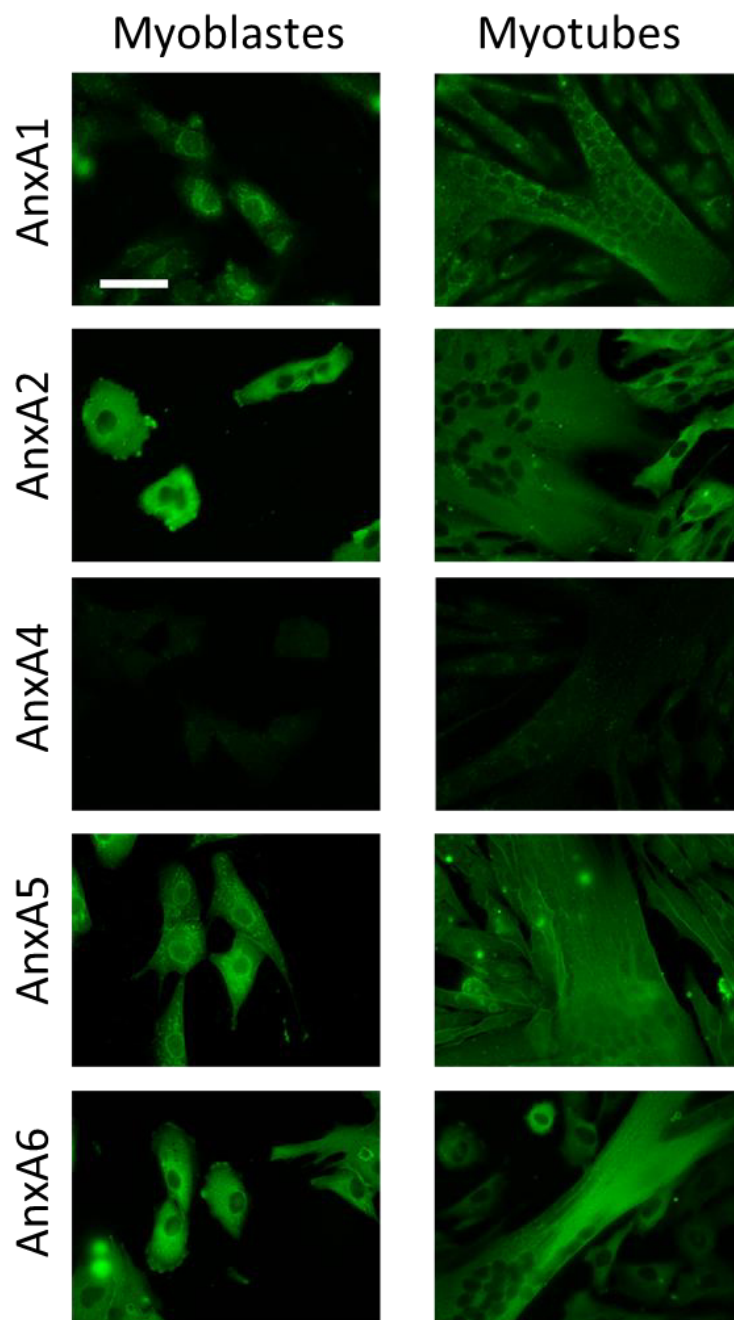


Figure 6.3 : Localisation subcellulaire des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes intacts 650. La localisation subcellulaire des AnxA1, A2, A4, A5 et A6 endogènes dans les myoblastes (colonne gauche) et les myotubes (colonne droite) a été analysée par immunocytofluorescence. Barre d'échelle : 50 μ m.

C. Les cellules déficientes en dysferline

L'expression relative des Anx dans les myoblastes et les myotubes des cellules 578 déficientes en dysferline a été déterminée par Western-Blot, d'abord avec des anticorps primaires monoclonaux de souris. Comme observé pour les cellules saines (paragraphe 1A, **Figure 1.1a-b**), les AnxA1, A3 et A4 n'ont pas été détectées, contrairement aux AnxA2, A5 et A6. Les AnxA2 et A5 sont exprimées à des niveaux similaires dans les myoblastes et les myotubes 578 (**Figure 6.4a-b**). La forme clivée de l'AnxA2 est également détectée dans les myotubes. Contrairement aux cellules LHCN-M2 et 650, l'AnxA6 n'est pas surexprimée dans les myotubes 578 comparés aux myoblastes (**Figure 6.4a-b**), ce qui est en corrélation avec la baisse d'expression d'AnxA6 observée dans les myotubes 578 comparés aux myotubes LHCN-M2 (**Figure 6.1**). Nous avons ensuite utilisé des anticorps primaires polyclonaux de lapin pour détecter les AnxA1, A3 et A4 (**Figure 6.4d**). L'AnxA1 est exprimée dans les myoblastes et les myotubes en quantité similaire, tandis que les AnxA3 et A4 n'ont pas été détectées. Cependant, les expériences d'immunocytofluorescence révèlent la présence d'AnxA4 dans le cytoplasme des myoblastes et des myotubes 578 à une très faible concentration (**Figure 6.5**). Ces résultats sont similaires à ceux des LHCN-M2.

Comme les cellules LHCN-M2 et 650, nous avons observé par immunocytofluorescence que l'AnxA5 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes et des myotubes 578, alors que les AnxA2 et A6 sont localisées exclusivement dans le cytoplasme (**Figure 6.5**). L'AnxA1 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes, mais exclusivement dans le cytoplasme des myotubes. L'AnxA3 n'a pas été détectée par immunocytofluorescence (données non montrées).

Résultats

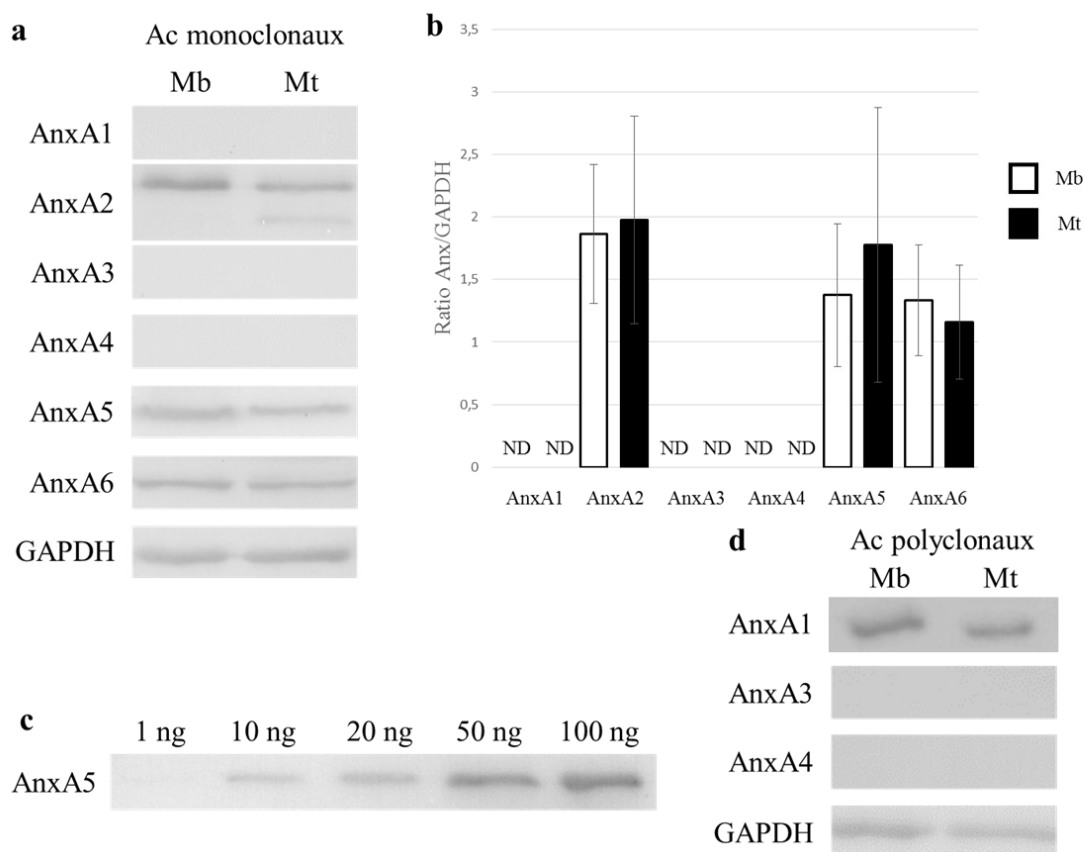


Figure 6.4 : Expression des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes 578.

Le contenu cellulaire des AnxA1, A2, A3, A4, A5 et A6 dans les myoblastes (Mb) et les myotubes (Mt) 578 après 3 jours de différenciation a été quantifié par Western-Blot. L'équivalent de 10 μ g d'extraits protéiques a été séparé par SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (a-b) Les AnxA1 (37 kDa), A2 (38 kDa), A3 (36 kDa), A4 (36 kDa), A5 (35 kDa), A6 (68 kDa) et A7 (47 et 51 kDa) ont été détectées avec un anticorps (Ac) primaire monoclonal de souris, et la GAPDH (contrôle de charge) a été détectée avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin. ND : non détectée. Test de Wilcoxon. (c) 1, 10, 20, 50 et 100 ng d'AnxA5 pure ont été soumis à un SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. (d) Les AnxA1, A3 et A4 ont été détectées avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin.

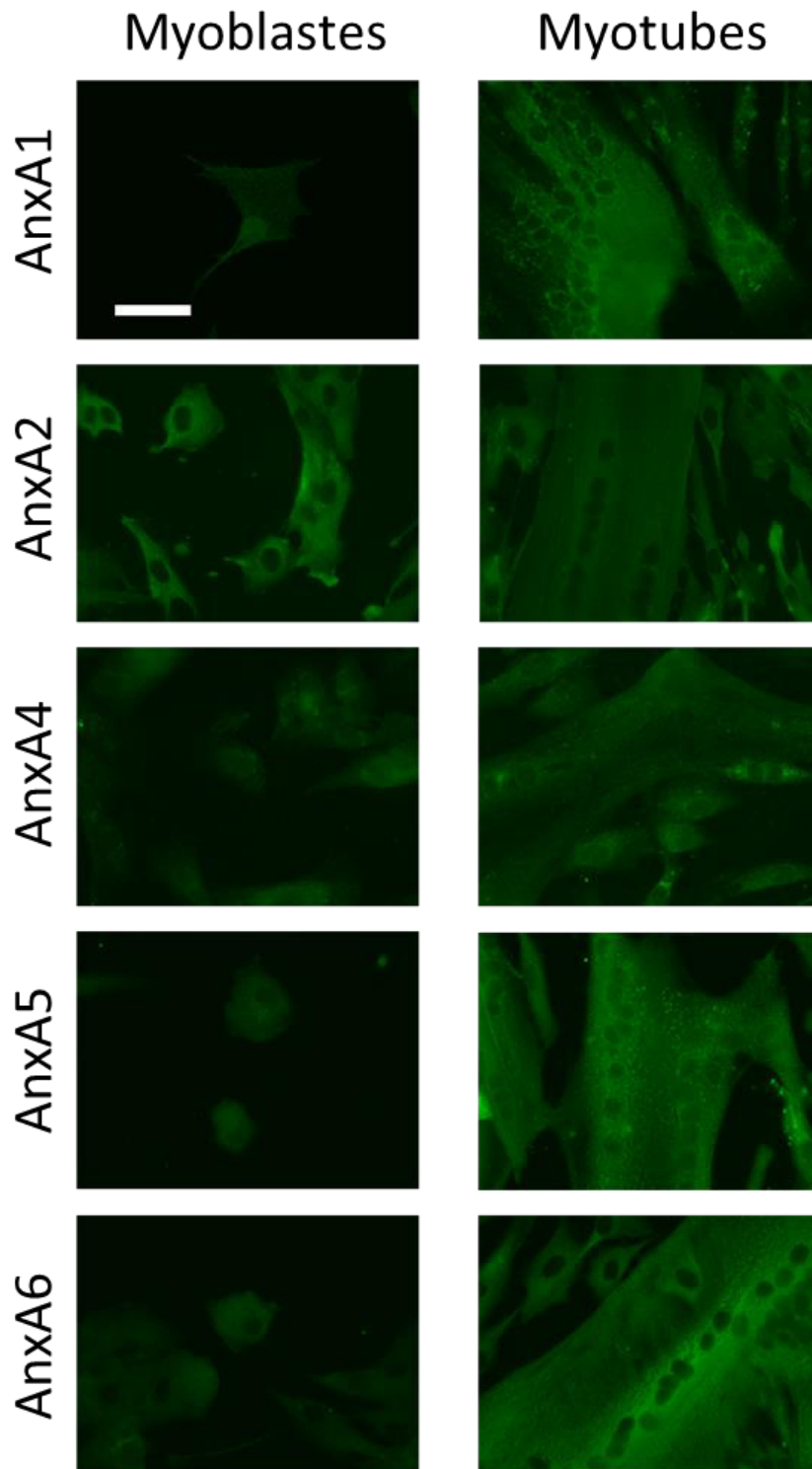


Figure 6.5 : Localisation subcellulaire des Anx endogènes dans les myoblastes et les myotubes intacts 578. La localisation subcellulaire des AnxA1, A2, A4, A5 et A6 endogènes dans les myoblastes (colonne gauche) et les myotubes (colonne droite) a été analysée par immunocytofluorescence. Barre d'échelle : 50 μ m.

D. Conclusion

Nos résultats ont montré que l'expression des Anx peut être modifiée dans le contexte pathologique de dystrophie musculaire. Dans notre cas, l'AnxA1 est surexprimée dans les myotubes de lignées cellulaires issues de patients atteints de l'ex-LGMD2B et 1C, tandis que l'AnxA6 est moins exprimée dans le cas de l'ex-LGMD2B. Cependant, il faut noter que ces variations d'expression d'une ou plusieurs Anx dépendent très probablement des mutations touchant le gène défectueux, ce qui signifie que le niveau d'expression d'une Anx donnée pour une dystrophie donnée peut varier d'un patient à l'autre. Nos résultats ont également montré que l'AnxA6 est exprimée en quantité similaire dans les myoblastes et les myotubes déficients en dysferline, alors qu'elle est surexprimée dans les myotubes sains. En revanche, la distribution subcellulaire des Anx ne semble pas être perturbée entre les cellules de la lignée saine et celles des deux lignées dystrophiques, indiquant que la déficience en dysferline et cavéoline-3 n'affecte pas la localisation des Anx. L'unique différence observée concerne la localisation de l'AnxA1 dans les myoblastes déficients en cavéoline-3, absente du noyau contrairement aux myoblastes sains.

Discussion

Ce travail de thèse comptait quatre objectifs :

1. Déterminer quelles Anx interviennent dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.
2. Développer et optimiser une stratégie de microscopie corrélative pour étudier à haute résolution la structure du site de rupture et la localisation des Anx après un dommage du sarcolemme.
3. Proposer un mode d'action pour chaque Anx impliquée dans la réparation membranaire.
4. Déterminer si le contexte pathologique de cellules dystrophiques (dysferlinopathie et cavéolinopathie) influe sur l'expression des Anx.

Bien que certains points nécessitent plus d'investigation, nos résultats ont permis de répondre à certaines questions.

1. Intervention et localisation des Anx au site de rupture

Déterminer quelles Anx sont nécessaires à la réparation membranaire implique dans un premier temps d'analyser leur expression dans les cellules étudiées. Dans la lignée musculaire humaine saine, nous avons montré que les AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7 sont présentes dans les myoblastes et les myotubes, parfois en faible quantité (AnxA4, A1 et A7), tandis que l'AnxA3 ne semble pas être exprimée. Il est donc peu probable que l'AnxA3 participe à la réparation membranaire. En revanche, les Anx exprimées ont toutes été montrées comme impliquées dans la réparation membranaire dans différents types cellulaires (Lennon et al., 2003 ; McNeil et al., 2006 ; Jaiswal et al., 2014 ; Demonbreun et al., 2016 ; Boye et al., 2017 ; Sønder et al., 2019). A partir de ce constat, nous avons focalisé notre étude sur les AnxA1, A2, A4, A5, A6 et A7.

Nous avons cherché à appliquer deux méthodes pour déterminer l'implication des Anx dans la réparation membranaire. La première est l'analyse de la capacité de réparation de myotubes rendus déficients en Anx. L'utilisation de la stratégie des shARN sur les myoblastes a permis de diminuer l'expression des AnxA1, A2 et A6 d'environ 90%, 50%, et 60%, respectivement. La génération de myotubes déficients en Anx est plus difficile du fait de l'implication des Anx dans le processus de différenciation et de fusion des myoblastes en myotubes (Bizzarro et al., 2010). Jusqu'à présent, nous sommes parvenus à générer uniquement des myotubes déficients en AnxA6. Les expériences préliminaires de test de réparation tendent à montrer une baisse de la capacité de réparation des

Discussion

myotubes déficients en AnxA6. Ces résultats sont en corrélation avec la littérature, notamment dans les fibres musculaires de poisson-zèbre (Roostalu and Strähle, 2012). Ces expériences devront être reproduites et le protocole de transduction optimisé pour confirmer ces premiers résultats. De plus, d'autres stratégies sont actuellement étudiées au laboratoire pour générer des myotubes déficients en Anx, telles que la CRISPR-Cas9 et des shARN inductibles.

La seconde méthode est l'expression d'Anx recombinantes couplées à un fluorophore dans les myotubes. L'utilisation d'un laser infrarouge à 820 nm et d'un microscope confocal a permis d'endommager la membrane plasmique et de suivre en temps réel le comportement des Anx recombinantes pendant la réparation membranaire. Nos résultats ont montré que les AnxA1, A2, A4, A5 et A6 fluorescentes sont toutes recrutées au site de rupture quelques secondes après l'induction du dommage. Environ 90 s après le dommage, ces Anx recombinantes sont retrouvées dans une structure très dense à l'extérieur du myotube, déjà observée et appelée domaine « cap » par Demonbreun et collaborateurs (Demonbreun et al., 2016b). De plus, l'AnxA2 est également présente dans la zone intracellulaire située sous le « cap ». Les AnxA1, A4, A5 et A6 semblent principalement interagir avec la membrane plasmique, tandis que l'AnxA2 pourrait être associée à des vésicules, comme proposé dans les fibres musculaires de souris (Lennon et al., 2003). Elle est la seule que nous ayons observé interagissant avec des vésicules en microscopie électronique. Elle pourrait également interagir avec l'actine pour faciliter la repolymérisation et favoriser la formation de la nouvelle membrane, comme proposé dans les cellules cancéreuses (Jaiswal et al., 2014). De plus, nous avons confirmé que la dysferline est présente à la base du « cap », dans le domaine appelé « shoulder » par Demonbreun et collaborateurs (Demonbreun et al., 2016b). L'AnxA2 associée aux vésicules pourrait interagir avec la dysferline pour faciliter le recrutement et l'attachement du « patch » au site de rupture, comme proposé dans les fibres musculaires de souris (Lennon et al., 2003). Des immunomarquages sur des myotubes non modifiés endommagés ont confirmé l'accumulation des AnxA1, A2, A4 et A6 endogènes au site de rupture plusieurs minutes après le dommage.

Nous avons également pu déterminer la vitesse de recrutement relative au site de rupture des différentes Anx en exprimant deux Anx recombinantes simultanément. Nous avons ainsi observé que les premières Anx à être présentes au site de rupture sont l'AnxA1, suivies des AnxA5 et A6. Les deux dernières Anx à être recrutées sont les AnxA4 et A2. Étonnamment, cet ordre est inversement corrélé avec l'ordre de translocation de ces Anx à la membrane plasmique de cellules traitées avec un ionophore calcique, qui traduit la sensibilité calcique des Anx (Skrahina et al., 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que la sensibilité calcique détermine, au moins en partie, l'ordre de recrutement des Anx au site de rupture, les Anx les moins sensibles étant

recrutées en premier et les Anx les plus sensibles en dernier. Dans la littérature, l'ordre de recrutement observé peut être différent. Par exemple, il a été observé qu'un dommage des fibres musculaires de poisson-zèbre entraînait l'accumulation au site de rupture des AnxA6 et A2 avant l'AnxA1 (Roostalu and Strähle, 2012), alors que leur cinétique est similaire dans les fibres musculaires de souris (Demonbreun et al., 2016b). Ces différences peuvent s'expliquer par l'utilisation d'espèces différentes, mais il est fort probable que d'autres paramètres entrent en jeu, tels que l'état de phosphorylation des Anx ou encore leur interaction avec d'autres partenaires protéiques. En effet, il a été montré que l'état de phosphorylation des AnxA1, A2 et A4 influait sur leur capacité à agréger des liposomes (Wang and Creutz, 1992 ; Johnstone et al., 1992 ; Kaetzel et al., 2001). De plus, il a récemment été montré dans les cellules de chromaffine que la phosphorylation et la déphosphorylation de l'AnxA2 jouaient un rôle important pendant l'exocytose (Gabel et al., 2019). Si l'AnxA2 intervient dans la réparation membranaire en agrégeant les vésicules intracellulaires et en favorisant l'exocytose, l'état de phosphorylation de l'AnxA2 pourrait être cruciale pour son activité et la réparation du dommage.

2. Structure du site de rupture et localisation des Anx à haute résolution

Une structure semblable à un domaine « cap » enrichi en Anx a été observée dans de nombreuses études (Demonbreun et al., 2016 ; Carmeille et al., 2016 ; Koerdt and Gerke, 2017), et également dans nos expériences impliquant les Anx recombinantes et les Anx endogènes. Cependant, sa structure, son origine et sa fonction nous sont encore inconnues. Demonbreun et collaborateurs ont proposé que le « cap » corresponde à un échafaudage moléculaire nécessaire à la réparation membranaire mis en place par les Anx (voir **Figure 4.3** de l'introduction) (Demonbreun et al., 2016b). Nous avons donc étudié l'ultrastructure du site de rupture de myotubes en microscopie électronique à transmission (MET). Nos résultats ont montré d'une part l'accumulation de matériel membranaire au site de rupture pouvant laisser penser à un « patch » lipidique, et d'autre part la présence d'une structure membranaire dense et désorganisée à l'extérieur du myotube correspondant au domaine « cap ». Nous avons donc émis l'hypothèse que le modèle du « patch » lipidique (McNeil and Steinhardt, 2003) et celui du « cap » (Demonbreun et al., 2016b) pouvait en réalité correspondre à deux étapes successives du processus de réparation membranaire. En effet, le domaine « cap » pourrait être le résultat de l'excès de membranes dû à l'exocytose de lysosomes

Discussion

pour réduire la tension exercée par le cytosquelette (Togo et al., 2000) et le recrutement de vésicules intracellulaires pour colmater la déchirure. Le « cap » ne serait donc pas un échafaudage moléculaire qui participerait à la réparation membranaire, mais plutôt l'excès de matériel lipidique et protéique à éliminer après la réparation.

Concernant la localisation des Anx, les AnxA4 et A6 sont exclusivement retrouvées dans le domaine « cap ». Les AnxA1 et A2 semblent présentes à la fois dans le « cap » et sous la zone endommagée, bien que l'AnxA1 soit peu abondante. Plus précisément, les AnxA1, A2, A4 et A6 présentes dans le « cap » interagiraient avec les membranes accumulées dans le « cap ». Il a très récemment été proposé que les Anx, en particulier l'AnxA6, contribueraient à la formation de « blebs » à l'extérieur du site de rupture pour éliminer la lésion et séquestrer le Ca^{2+} , diminuant ainsi la concentration calcique intracellulaire (Demonbreun et al., 2019). Il est donc possible que le matériel membranaire du domaine « cap » que nous avons observé en MET corresponde à ces « blebs » et permette de limiter l'influx de Ca^{2+} en le séquestrant à l'intérieur du « cap ». Il a également été montré que la famille des Anx était capable de modifier la morphologie des membranes en induisant des courbures et des repliements (Boye et al., 2018). Ajouté à cela la capacité de certaines d'entre elles à agréger des membranes adjacentes (Lambert et al., 1997 ; Kaetzel et al., 2001), les Anx pourraient permettre la compaction des membranes en excès présentes au site de rupture pour faciliter leur élimination. De plus, il a été montré dans les fibres musculaires de poisson-zèbre que le « patch » était éliminé par des macrophages (Middel et al., 2016). Ceci expliquerait pourquoi, dans nos expériences, le domaine « cap » persiste plusieurs minutes après le dommage et la réparation des myotubes. Son élimination pourrait nécessiter la présence d'autres types cellulaires, absents dans nos cultures. L'AnxA1 présente sous le site de rupture semble localisée dans le cytosol. Sa localisation cytosolique pourrait être le résultat de sa dissociation aux membranes suite à la réparation du dommage, ce qui expliquerait également la diminution de la concentration en AnxA1-GFP observée dans le « cap » au cours de la réparation membranaire. Quant à l'AnxA2 située sous la membrane plasmique endommagée, elle pourrait être associée aux membranes et aux vésicules en coopération avec la dysferline pour l'attachement du « patch » au site de rupture (Lennon et al., 2003), ou encore interagir avec l'actine corticale pour favoriser la réparation membranaire (Jaiswal et al., 2014) (voir **Figure 3.1**). Pour proposer un modèle de réparation membranaire, il faut également ajouter à ces observations la présence d'AnxA5 à la surface des vésicules intracellulaires recrutées et la formation d'un réseau 2D autour de la zone endommagée pour empêcher l'expansion de la rupture, déjà observées au laboratoire précédemment (Carmeille et al., 2016).

3. Mode d'action des Anx dans la réparation membranaire

En s'appuyant sur la littérature et l'ensemble de nos résultats, nous pouvons proposer un modèle de réparation membranaire impliquant les Anx dans les cellules musculaires striées squelettiques humaines (**Figure 3.1**).

- (a) Dans un premier temps, l'entrée de Ca^{2+} induit la liaison des Anx aux membranes environnantes (**Figure 3.1a-a'**). Le fort gradient de Ca^{2+} entraîne le recrutement des Anx les moins sensibles au Ca^{2+} à la membrane plasmique proche du site de rupture, et le recrutement des Anx les plus sensibles au Ca^{2+} à des membranes plus éloignées (plasmique ou vésiculaire). La localisation des Anx, du site de rupture vers l'intérieur de la cellule, est alors le suivant : A1 – A6/A5 – A4 – A2. L'AnxA2, et peut-être les AnxA1 et A4, interagissent également avec les vésicules intracellulaires. Il est probable que l'AnxA2 agisse sous sa forme tétramérique, avec une protéine S100, pendant toutes les étapes de la réparation membranaire (Jaiswal et al., 2014 ; Koerdt and Gerke, 2017).
- (b) Dans un deuxième temps, la dépolymérisation de l'actine corticale et l'exocytose de lysosome induite par l'augmentation massive de la concentration calcique intracellulaire entraînent une réduction de la tension exercée par le cytosquelette cortical. L'augmentation de la surface membranaire a pour résultat un excès de membrane au niveau du site de rupture, sur lesquelles les AnxA1 et A6 sont fixées (**Figure 3.1b-b'**). Dans le même temps, l'AnxA5 forme un réseau 2D pour empêcher l'expansion de la déchirure. La capacité d'agrégation des AnxA2 et A4 permet le recrutement des vésicules, tandis que l'interaction entre la dysferline (non représentée sur le schéma) et l'AnxA2 associée aux vésicules permet leur attachement au site de rupture.
- (c) L'agrégation des vésicules recrutées au site de rupture forment alors un « patch » pour colmater la déchirure et limiter les échanges entre les milieux intra- et extracellulaire (**Figure 3.1c-c'**). Les AnxA1, A6 et probablement A5, induisent le repliement et la courbure des excès de membranes, initiant ainsi la formation d'une structure membranaire dense. L'AnxA5 est également retrouvée à la surface des vésicules.
- (d) L'excès de membrane dû à l'exocytose et au « patch » lipidique forme une structure où les Anx s'accumulent (**Figure 3.1d-d'**). La capacité des Anx à induire des agrégations et des courbures au niveau des membranes permet le compactage de cet excès membranaire pour former le domaine « cap ». Sous la zone endommagée, l'AnxA2 favorise la repolymérisation de l'actine corticale pour la formation d'une nouvelle membrane.

Discussion

(e) La membrane néoformée et l'élimination du domaine « cap » par les macrophages (non représentés sur le schéma) permettent de retrouver l'intégrité membranaire de la cellule (**Figure 3.1e-e'**).

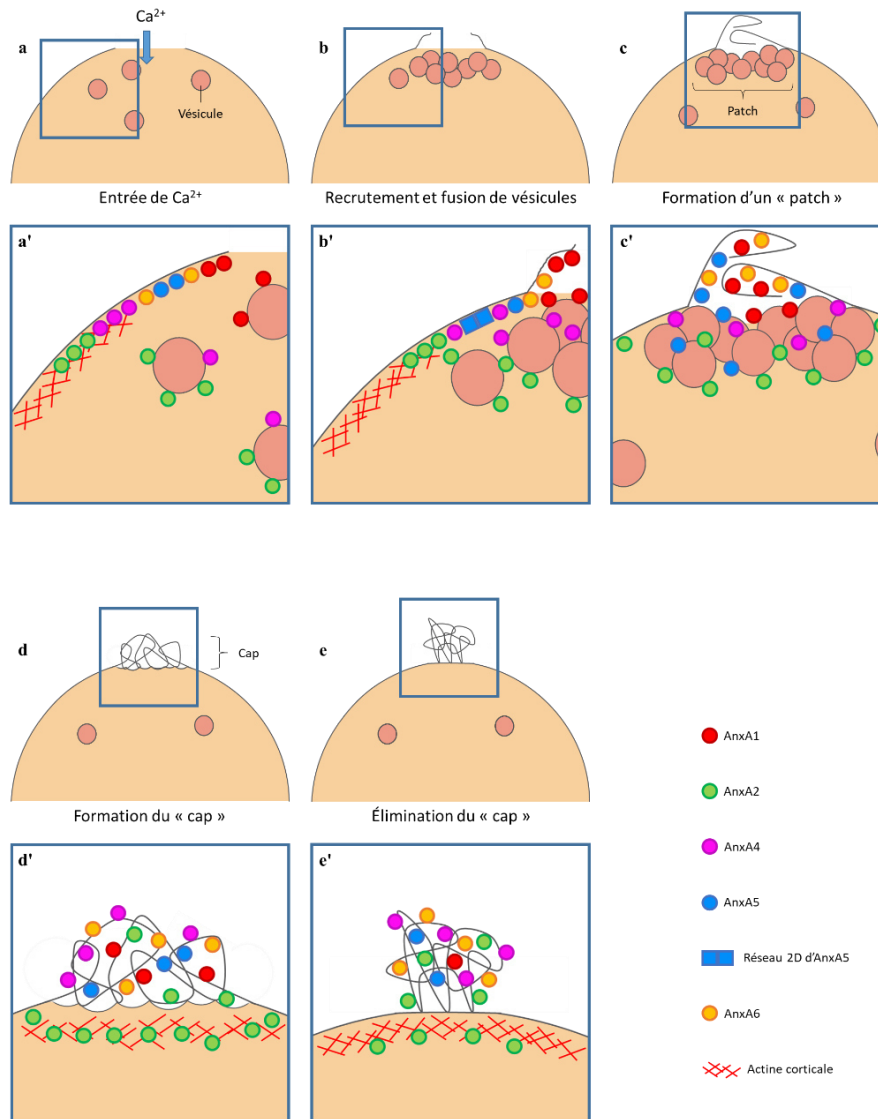


Figure 3.1 : Modèle de réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines.

(a-a') L'entrée de Ca^{2+} induit le recrutement des Anx à la membrane plasmique. Le gradient de Ca^{2+} entraîne le recrutement des Anx selon l'ordre suivant : A1 – A6/A5 – A4 – A2. L'AnxA2, probablement sous sa forme tétramérique, et l'AnxA1 et l'AnxA4 s'associent aux vésicules intracellulaires. (b-b') La tension membranaire est réduite par la dépolymérisation de l'actine et l'exocytose de lysosomes. L'augmentation de la surface membranaire induit un excès de membrane au site de rupture sur lesquelles les AnxA1 et A6 sont fixées. L'AnxA5 forme un réseau 2D pour limiter l'expansion de la déchirure. Les AnxA2 et A4 agrègent les vésicules intracellulaires, et l'AnxA2 permet leur recrutement au site de rupture via son interaction avec la dysferline (non représentée). (c-c') L'agrégation des vésicules intracellulaires forme un « patch » qui colmate la rupture. Les AnxA1, A6 et probablement A5, induisent le repliement des excès membranaires pour former une structure dense. (d-d') L'accumulation des Anx à l'excès de membranes entraîne leur repliement et forme le domaine « cap » à l'extérieur de la cellule. L'AnxA2 présente sous la zone endommagée favorise la repolymérisation de l'actine corticale pour faciliter la formation d'une nouvelle membrane. (e-e') L'intégrité du sarcolemme est retrouvée par la membrane néoformée et l'élimination du « cap » par des macrophages (non représentés).

4. Anx et dystrophies musculaires

En combinant nos résultats sur l'expression des Anx dans les cellules musculaires dystrophiques et ceux de la littérature, nous pouvons noter deux points. Le premier est que l'expression des Anx, telles que les AnxA1, A2 et A6, peut être perturbée dans le contexte pathologique des dystrophies musculaires (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011; Demonbreun et al., 2016a). Ainsi, l'AnxA1 semble être surexprimée dans les cellules musculaires de patients atteints de l'ex-LGMD2B. Le deuxième point est que ces modifications varient selon le type de dystrophie musculaire (ex-LGMD2B, ex-LGMD1C, dystrophie musculaire de Duchenne...), mais également selon les patients atteints d'une même myopathie (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011). Cela indique que, dans le cadre des dystrophies musculaires, le gène muté n'est pas le seul facteur pouvant modifier l'expression d'une ou plusieurs Anx. Concernant la localisation des Anx, celle-ci ne semble pas être modifiée dans les cellules musculaires dystrophiques comparées aux cellules saines.

5. Perspectives

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de proposer un modèle impliquant les Anx. Ce modèle revisite les modèles proposées du « patch » lipidique (McNeil and Steinhardt, 2003), du domaine « cap » (Demonbreun et al., 2016b), et des remaniements membranaires associés aux Anx (Boye et al., 2018) dans la réparation membranaire des cellules musculaires striées squelettiques humaines. Il reste cependant encore plusieurs questions en suspens. Parmi les prochaines étapes du laboratoire, il faut optimiser le protocole de transduction pour générer des myotubes déficients en AnxA1, A2, A6 et A7, afin de vérifier si ces Anx sont essentielles dans la réparation membranaire des myotubes humains, et afin d'identifier les processus défectueux. Pour déterminer plus précisément les fonctions des Anx, nous pourrions également faire exprimer dans les myotubes déficients des Anx mutées. Par exemple, si l'AnxA4 intervient dans la réparation membranaire sous forme de trimère, ou si l'AnxA2 doit être phosphorylée pour être active, des mutations inhibant ces conformations permettraient d'élucider leur mode d'action. Il serait également intéressant de suivre la dynamique de l'actine corticale en microscopie confocale lors d'un dommage membranaire grâce à un marqueur tel que LifeAct,

Discussion

et ce dans des myotubes non modifiés et déficients en AnxA2 pour déterminer l'implication de cette Anx dans ce processus. Concernant la formation du domaine « cap », nous ignorons toujours l'origine exacte de cet excès membranaire. Nous pourrions envisager d'utiliser des marqueurs membranaires pour déterminer plus précisément l'origine membranaire du « cap ». Par exemple, nous pourrions marquer uniquement la membrane plasmique avec une sonde telle que le FM1-43, créer un dommage membranaire, et réaliser un immunomarquage contre LAMP-1, marqueur spécifique des lysosomes. L'observation en microscopie de fluorescence et microscopie électronique à transmission déterminerait la présence ou non de ces marqueurs au « cap ». Finalement, peu d'expériences ont été consacrées à l'AnxA7. Une attention particulière devra être portée à cette Anx dans les mois à venir.

Dans un contexte pathologique tel que les dystrophies musculaires, comprendre le mécanisme de réparation membranaire et le rôle joué par la famille des Anx dans ce processus peut se révéler important pour envisager des traitements permettant d'améliorer les conditions de vie des patients. De la même manière, le laboratoire s'intéresse également aux Anx dans la réparation membranaire des cellules cancéreuses et des cellules placentaires. En effet, la réparation des cellules cancéreuses peut être corrélée à leur capacité d'invasion, et inhiber la fonction de certaines Anx permettrait de limiter leur migration. Concernant les cellules placentaires, cellules particulièrement riches en Anx, un défaut de réparation membranaire pourrait être responsable d'une pathologie liée à la grossesse, appelée pré-éclampsie, pouvant entraîner une fausse couche. Là encore, l'étude des Anx permettrait d'ouvrir la voie à de futures thérapies pour traiter de nombreuses pathologies.

Bibliographie

Bibliographie

- Anderson, L. V., Davison, K., Moss, J. A., Young, C., Cullen, M. J., Walsh, J., Johnson, M. A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., et al. 1999. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1999 Jun;8(6):1141]. *Hum Mol Genet* 8:855–861. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010196375%5Cnhttp://www.oup.co.uk/hmg/Volume_08/Issue_05/ddc087_gml.abs.html.
- Ayala-Sanmartin, J., Zibouche, M., Illien, F., Vincent, M., and Gally, J. 2008. Insight into the location and dynamics of the annexin A2 N-terminal domain during Ca²⁺-induced membrane bridging. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1778:472–482.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S., and Draeger, A. 2002. Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:1177–1184. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12153985.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. 2011. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation* 18:80–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.81>.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. 2009. Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation* 16:1126–1134. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2009.30> [Accessed September 25, 2017].
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P. L., and Campbell, K. P. 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168–172. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01573> [Accessed July 10, 2017].
- Bastiani, M., and Parton, R. G. 2010. Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science* 123:3831–3836.
- Bitto, E., and Cho, W. 1999. Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38:14094–14100.

Bibliographie

- Bizzarro, V., Fontanella, B., Franceschelli, S., Pirozzi, M., Christian, H., Parente, L., and Petrella, A. 2010. Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 224:757–765. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.22178> [Accessed July 31, 2017].
- Blackwood, R. A., and Ernst, J. D. 1990. Characterization of Ca²⁺(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *The Biochemical journal* 266:195–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138016> [Accessed July 10, 2017].
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., and Davies, K. E. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews* 82:291–329.
- Blazek, A. D., Paleo, B. J., and Weisleder, N. 2015. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)* 30:438–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26525343> [Accessed October 9, 2017].
- Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K. M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., Itakura, M., Robitaille, Y., Parent, L., Baas, F., et al. 2010. Recessive Mutations in the Putative Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 5 Cause Proximal LGMD2L and Distal MMD3 Muscular Dystrophies. *American Journal of Human Genetics* 86:213–221.
- Borgonovo, B., Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Bachi, A., and Meldolesi, J. 2002. Regulated exocytosis: A novel, widely expressed system. *Nature Cell Biology* 4:955–962.
- Bouter, A., Gounou, C., Bérat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., D’Estaintot, B. L., Pöschl, E., Brachvogel, B., and Brisson, A. R. 2011. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature communications* 2:270. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468022> [Accessed July 10, 2017].
- Boye, T. L., Jeppesen, J. C., Maeda, K., Pezeshkian, W., Solovyeva, V., Nylandsted, J., and Simonsen, A. C. 2018. Annexins induce curvature on free-edge membranes displaying distinct morphologies. *Scientific Reports*:1–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28481-z>.
- Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., Simonsen, A. C., and Nylandsted, J. 2017. Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications* 8:1623. Available at:

Bibliographie

- <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01743-6> [Accessed November 23, 2017].
- Brown, D. A., and Rose, J. K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533–544.
- Buzhynskyy, N., Golczak, M., Lai-Kee-Him, J., Lambert, O., Tessier, B., Gounou, C., Bérat, R., Simon, A., Granier, T., Chevalier, J. M., et al. 2009. Annexin-A6 presents two modes of association with phospholipid membranes. A combined QCM-D, AFM and cryo-TEM study. *Journal of Structural Biology* 168:107–116. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.007>.
- Cagliani, R., Magri, F., Toscano, A., Merlini, L., Fortunato, F., Lamperti, C., Rodolico, C., Prella, A., Sironi, M., Aguenouz, M., et al. 2005. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Human mutation* 26:283.
- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J.-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., et al. 2009a. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature cell biology* 11:56–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043407> [Accessed July 10, 2017].
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.-K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Ma, J. 2009b. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *The Journal of biological chemistry* 284:15894–902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380584> [Accessed July 10, 2017].
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., and Reeves, W. J. 1974. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions<xref ref-type="fn" rid="FN2">2</xref>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 53:661–674. Available at: <https://academic.oup.com/jnci/article/53/3/661/908749/Breast-Tumor-Cell-Lines-From-Pleural-Effusions2>.
- Caohuy, H., and Pollard, H. B. 2001. Activation of Annexin 7 by Protein Kinase C in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 276:12813–12821.
- Carmeille, R., Bouvet, F., Tan, S., Croissant, C., Gounou, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Brisson, A. R., and Bouter, A. 2016. Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*

Bibliographie

1863:2267–2279.

Carmeille, R., Croissant, C., Bouvet, F., and Bouter, A. 2017. Membrane Repair Assay for Human Skeletal Muscle Cells. *In* *Methods in Molecular Biology* pp. 195–207. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7283-8_14.

Castro-Gomes, T., Corrotte, M., Tam, C., and Andrews, N. W. 2016. Plasma Membrane Repair Is Regulated Extracellularly by Proteases Released from Lysosomes. *PLoS one* 11:e0152583. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028538> [Accessed July 10, 2017].

Choi, C. H., Chung, J. Y., Chung, E. J., Sears, J. D., Lee, J. W., Bae, D. S., and Hewitt, S. M. 2016. Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer. *BMC Cancer* 16:1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2459-y>.

Clarke, M. S. F., Caldwell, R. W., Chiao, H., Miyake, K., and McNeil, P. L. 1995. Contraction-Induced Cell Wounding and Release of Fibroblast Growth Factor in Heart. *Circulation research* 76:927–34. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.76.6.927>.

Codding, S. J., Marty, N., Abdullah, N., and Johnson, C. P. 2016. Dysferlin binds SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) and stimulates membrane fusion in a calcium-sensitive manner. *Journal of Biological Chemistry* 291:14575–14584.

Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Maugel, T. K., et al. 2013. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *eLife* 2:e00926. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24052812> [Accessed July 10, 2017].

Corrotte, M., Fernandes, M. C., Tam, C., and Andrews, N. W. 2012. Toxin Pores Endocytosed During Plasma Membrane Repair Traffic into the Lumen of MVBs for Degradation. *Traffic* 13:483–494.

Creutz, C. E., Pazoles, C. J., and Pollard, H. B. 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry* 253:2858–2866.

Bibliographie

- Croissant, C., Bouvet, F., Tan, S., and Bouter, A. 2018. Imaging Membrane Repair in Single Cells Using Correlative Light and Electron Microscopy. *Current Protocols in Cell Biology* 81:1–19.
- Crosby, K. C., Postma, M., Hink, M. A., Zeelenberg, C. H. C., Adjobo-Hermans, M. J. W., and Gadella, T. W. J. 2013. Quantitative analysis of self-association and mobility of Annexin A4 at the plasma membrane. *Biophysical Journal* 104:1875–1885. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.057>.
- Davenport, N. R., Sonnemann, K. J., Eliceiri, K. W., and Bement, W. M. 2016. Membrane dynamics during cellular wound repair. *Molecular biology of the cell* 27:2272–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27226483> [Accessed September 4, 2017].
- Demonbreun, A. R., Allen, M. V., Warner, J. L., Barefield, D. Y., Krishnan, S., Swanson, K. E., Earley, J. U., and McNally, E. M. 2016a. Enhanced Muscular Dystrophy from Loss of Dysferlin Is Accompanied by Impaired Annexin A6 Translocation after Sarcolemmal Disruption. *American Journal of Pathology* 186:1610–1622.
- Demonbreun, A. R., Fallon, K. S., Oosterbaan, C. C., Bogdanovic, E., Warner, J. L., Sell, J. J., Page, P. G., Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., and McNally, E. M. 2019. Recombinant annexin A6 promotes membrane repair and protects against muscle injury. *Journal of Clinical Investigation* 129:4657–4670.
- Demonbreun, A. R., Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., Allen, M. V., Swanson, K. E., and McNally, E. M. 2016b. An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *The Journal of cell biology* 213:705–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298325> [Accessed July 10, 2017].
- Deng, S., Wang, J., Hou, L., Li, J., Chen, G., Jing, B., Zhang, X., and Yang, Z. 2013. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncology Letters* 5:107–112.
- DePina, A. S., and Langford, G. M. 1999. Vesicle transport: The role of actin filaments and myosin motors. *Microscopy Research and Technique* 47:93–106.
- Draeger, A., Monastyrskaya, K., and Babiychuk, E. B. 2011. Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit. *Biochemical Pharmacology* 81:703–712. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295211000141>

Bibliographie

[Accessed July 10, 2017].

- Draeger, A., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wobus, A. M., Moss, S. E., and Babiychuk, E. B. 2003. Membrane segregation and downregulation of raft markers during sarcolemmal differentiation in skeletal muscle cells. *Developmental Biology* 262:324–334.
- Draeger, A., Schoenauer, R., Atanassoff, A. P., Wolfmeier, H., and Babiychuk, E. B. 2014. Dealing with damage: Plasma membrane repair mechanisms. *Biochimie* 107:66–72. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414002260> [Accessed July 10, 2017].
- Eddleman, C. S., Ballinger, M. L., Smyers, M. E., Fishman, H. M., and Bittner, G. D. 1998. Endocytotic Formation of Vesicles and Other Membranous Structures Induced by Ca²⁺ and Axolemmal Injury. *The Journal of Neuroscience* 18:4029–4041.
- Gabel, M., Delavoie, F., Demais, V., Royer, C., Bailly, Y., Vitale, N., Bader, M. F., and Chasserot-Golaz, S. 2015. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *Journal of Cell Biology* 210:785–800.
- Gabel, M., Delavoie, F., Royer, C., Tahouly, T., Gasman, S., Bader, M. F., Vitale, N., and Chasserot-Golaz, S. 2019. Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1866:1207–1217. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.013>.
- Geissbuehler, M., and Lasser, T. 2013. How to display data by color schemes compatible with red-green color perception deficiencies. *Optics Express* 21:9862.
- Gerke, V., Creutz, C. E., and Moss, S. E. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:449–461. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1661> [Accessed July 10, 2017].
- Gerke, V., and Moss, S. E. 2002. Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 82. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/82/2/331.long> [Accessed July 10, 2017].
- Gerke, V., and Weber, K. 1984. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to

Bibliographie

- non-erythroid spectrin and F-actin. *The EMBO journal* 3:227–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323166> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC557325>.
- Giordani, L., He, G. J., Negroni, E., Sakai, H., Law, J. Y. C., Siu, M. M., Wan, R., Corneau, A., Tajbakhsh, S., Cheung, T. H., et al. 2019. High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. *Molecular Cell* 74:609-621.e6.
- Godin, L. M., Vergen, J., Prakash, Y. S., Pagano, R. E., and Hubmayr, R. D. 2011. Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type I cell wound healing. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300:L615–L623.
- Gotow, T., Sakata, M., Funakoshi, T., and Uchiyama, Y. 1996. Preferential localization of annexin V to the axon terminal. *Neuroscience* 75:507–521.
- Govorukhina, N., Bergsma-schutter, W., Mazères-dubut, C., Mazères, S., Drakopoulou, E., Bystrykh, L., Oling, F., Mukhopadhyay, A., Reviakine, I., Lai, J., et al. 2003. Self-Assembly of Annexin A5 on Lipid Membranes.
- Griffin, D. A., Johnson, R. W., Whitlock, J. M., Pozsgai, E. R., Heller, K. N., Grose, W. E., Arnold, W. D., Sahenk, Z., Hartzell, H. C., and Rodino-Klapac, L. R. 2016. Defective membrane fusion and repair in Anoctamin5-deficient muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 25:1900–1911.
- Grindheim, A. K., Saraste, J., and Vedeler, A. 2017. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861:2515–2529. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>.
- Hayes, M. J., Shao, D., Bailly, M., and Moss, S. E. 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO journal* 25:1816–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601677> [Accessed July 10, 2017].
- Hernández-Deviez, D. J., Howes, M. T., Laval, S. H., Bushby, K., Hancock, J. F., and Parton, R. G. 2008. Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *Journal of Biological Chemistry* 283:6476–6488.
- Hernández-Deviez, D. J., Martin, S., Laval, S. H., Lo, H. P., Cooper, S. T., North, K. N., Bushby, K., and Parton, R. G. 2006. Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin

Bibliographie

- or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Human Molecular Genetics* 15:129–142.
- Hoffman, J. F. 1992. On Red Blood Cells, Hemolysis and Resealed Ghosts. *Advances in experimental medicine and biology* 326:1–15.
- Holopainen, J. M., Angelova, M. I., and Kinnunen, P. K. J. 2000. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical Journal* 78:830–838.
- Horn, A., Van der Meulen, J. H., Defour, A., Hogarth, M., Sreetama, S. C., Reed, A., Scheffer, L., Chandel, N. S., and Jaiswal, J. K. 2017. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Science signaling* 10:eaaj1978. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28874604> [Accessed October 2, 2017].
- Huber, R., Römisch, J., and Paques, E. P. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *The EMBO Journal* 9:3867–3874.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N. W. 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺ dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology* 180:905–914.
- Jaiswal, J. K., Andrews, N. W., and Simon, S. M. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *Journal of Cell Biology* 159:625–635.
- Jaiswal, J. K., Lauritzen, S. P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S. M., Kallunki, T., Jäättelä, M., and Nylandsted, J. 2014. S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nature communications* 5:3795. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24806074> [Accessed July 10, 2017].
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. 2014. ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science* 343. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/343/6174/1247136.long> [Accessed July 10, 2017].
- Johnstone, S. A., Hubaishy, I., and Waisman, D. M. 1992. Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *Journal of Biological Chemistry* 267:25976–25981.

Bibliographie

- Kaetzel, M. A., Mo, Y. D., Mealy, T. R., Campos, B., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Dedman, J. R., and Seaton, B. A. 2001. Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* 40:4192–4199.
- Koerdt, S. N., and Gerke, V. 2017. Annexin A2 is involved in Ca²⁺-dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864:1046–1053. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916303329> [Accessed July 10, 2017].
- de la Fuente, M., and Parra, A. V. 1995. Vesicle Aggregation by Annexin I: Role of a Secondary Membrane Binding Site. *Biochemistry* 34:10393–10399.
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F., and Brisson, A. 1997. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* 272:42–55.
- Lek, A., Evesson, F. J., Lemckert, F. A., Redpath, G. M. I., Lueders, A.-K., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., North, K. N., and Cooper, S. T. 2013. Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type Channels Underpin Calcium-Dependent Muscle Membrane Repair. *Journal of Neuroscience* 33. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/33/12/5085.long> [Accessed July 10, 2017].
- Lennon, N. J., Kho, A., Bacskai, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., and Brown, R. H. 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *The Journal of biological chemistry* 278:50466–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506282> [Accessed July 10, 2017].
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Andoni Urtizberea, J., Hentati, F., Hamida, M. Ben, et al. 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 20:31–36.
- Lo, H. P., Nixon, S. J., Hall, T. E., Cowling, B. S., Ferguson, C., Morgan, G. P., Schieber, N. L., Fernandez-Rojo, M. A., Bastiani, M., Floetenmeyer, M., et al. 2015. The caveolin-Cavin system plays a conserved and critical role in mechanoprotection of skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 210:833–849.
- Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I.,

Bibliographie

- Arahata, K., and Jr, R. H. B. 2001. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* 10:1761–1766. Available at: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/10.17.1761> [Accessed July 10, 2017].
- McDade, J. R., Archambeau, A., and Michele, D. E. 2014. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28:3660–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784578> [Accessed September 4, 2017].
- McNeil, A. K., Rescher, U., Gerke, V., and McNeil, P. L. 2006. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *The Journal of biological chemistry* 281:35202–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984915> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., and Baker, M. M. 2001. Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 304:141–146. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s004410000286> [Accessed September 25, 2017].
- McNeil, P. L., and Ito, S. 1989. Gastrointestinal Cell Plasma Membrane Wounding and Resealing In Vivo. *Gastroenterology* 96:1238–1248. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(89\)80010-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(89)80010-1).
- McNeil, P. L., and Khakee, R. 1992. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *The American journal of pathology* 140:1097–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374591> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1886518>.
- McNeil, P. L., and Kirchhausen, T. 2005. An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:499–505. Available at: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?EbscoContent=dGJyMMv17ESep644yOvqOLCmr0%2Bep65Ss6%2B4SLKWxWXS&ContentCustomer=dGJyMOzpsE2xqK5JuePfgeyx9Yvf5ucA&T=P&P=AN&S=R&D=mnh&K=15928713> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., Miyake, K., and Vogel, S. S. 2003. The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4592–4597.

Bibliographie

Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0736739100>.

- McNeil, P. L., and Steinhardt, R. A. 2003. PLASMA MEMBRANE DISRUPTION: Repair, Prevention, Adaptation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 19:697–731. Available at: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?EbscoContent=dGJyMMv17ESep644yOvqOLCmr0%2Bep69Srqm4SbWWxWXS&ContentCustomer=dGJyMOzpsE2xqK5JuePfgex9Yvf5ucA&T=P&P=AN&S=R&D=mnh&K=14570587> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., and Terasaki, M. 2000. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science* 113.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:112–124.
- Middel, V., Zhou, L., Takamiya, M., Beil, T., Shahid, M., Roostalu, U., Grabher, C., Rastegar, S., Reischl, M., Nienhaus, G. U., et al. 2016. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nature communications* 7:12875. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27641898> [Accessed July 10, 2017].
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., et al. 1998. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18:365–368.
- Miyake, K., and McNeil, P. L. 1995. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *The Journal of cell biology* 131:1737–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557741> [Accessed July 10, 2017].
- Miyake, K., McNeil, P. L., Suzuki, K., Tsunoda, R., and Sugai, N. 2001. An actin barrier to resealing. *Journal of cell science* 114:3487–3494.
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Rescher, U., and Draeger, A. 2007. Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium* 41:207–219. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416006001291> [Accessed July 10, 2017].
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Wood, P., Grewal, T., and Draeger, A. 2009. Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 284:17227–17242.
- de Muga, S. V., Timpson, P., Cubells, L., Evans, R., Hayes, T. E., Rentero, C., Hegemann, A.,

Bibliographie

- Reverter, M., Leschner, J., Pol, A., et al. 2009. Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells. *Oncogene* 28:363–377. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2008.386> [Accessed July 10, 2017].
- Parton, R. G., and Del Pozo, M. A. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:98–112. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3512>.
- Philippi, S., Bigot, A., Marg, A., Mouly, V., Spuler, S., and Zacharias, U. 2012. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS currents* 4:RRN1298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367358> [Accessed July 10, 2017].
- Piljić, A., and Schultz, C. 2006. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells. *Molecular biology of the cell* 17:3318–3328.
- Pollard, H. B., Lee Burns, A., and Rojas, E. 1990. Synexin (Annexin VII): A Cytosolic Calcium-Binding Protein which Promotes Membrane Fusion and Forms Calcium Channels in Artificial Bilayer and Natural Membranes. *The journal of membrane biology* 117:101–112.
- Pollard, H. B., Rojas, E., Pastor, R. W., Rojas, E. M., Robert Guy, H., and Lee Burns, A. 1991. Synexin: Molecular Mechanism of Calcium-Dependent Membrane Fusion and Voltage-Dependent Calcium-Channel Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 635:328–51.
- Pollard, T. D., and Cooper, J. A. 2009. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208–1212.
- Potez, S., Luginbühl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., and Babiychuk, E. B. 2011. Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *The Journal of biological chemistry* 286:17982–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454475> [Accessed July 10, 2017].
- Reddy, A., Caler, E. V., and Andrews, N. W. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157–169.
- Redpath, G. M. I., Woolger, N., Piper, A. K., Lemckert, F. A., Lek, A., Greer, P. A., North, K. N., and Cooper, S. T. 2014. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a

Bibliographie

- synaptotagmin-like module for membrane repair. *Molecular biology of the cell* 25:3037–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143396> [Accessed September 13, 2017].
- Rintala-Dempsey, A. C., Rezvanpour, A., and Shaw, G. S. 2008. S100-annexin complexes - Structural insights. *FEBS Journal* 275:4956–4966.
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., and Andrews, N. W. 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 137:93–104.
- Roostalu, U., and Strähle, U. 2012. In Vivo Imaging of Molecular Interactions at Damaged Sarcolemma. *Developmental Cell* 22:515–529. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580711005740> [Accessed July 10, 2017].
- Sanjana, N. E., Shalem, O., and Zhang, F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* 11:783–784.
- Scheffer, L. L., Sreetama, S. C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K. J., Defour, A., and Jaiswal, J. K. 2014. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications* 5:5646. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534348> [Accessed July 11, 2017].
- Selbert, S., Fischer, P., Menke, A., Jockusch, H., Pongratz, D., and Noegel, A. A. 1996. Annexin VII Relocalization as a Result of Dystrophin Deficiency. *Experimental Cell Research* 222:199–208. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482796900257> [Accessed July 10, 2017].
- Selbert, S., Fischer, P., Pongratz, D., Stewart, M., and Noegel, A. A. 1995. Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *Journal of Cell Science* 108. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/108/1/85.long> [Accessed September 13, 2017].
- Sharma, N., Medikayala, S., Defour, A., Rayavarapu, S., Brown, K. J., Hathout, Y., and Jaiswal, J. K. 2012. Use of quantitative membrane proteomics identifies a novel role of mitochondria in healing injured muscles. *Journal of Biological Chemistry* 287:30455–30467.

Bibliographie

- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., et al. 2011. Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell* 144:402–413.
- Skrahina, T., Piljić, A., and Schultz, C. 2008. Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins. *Experimental Cell Research* 314:1039–1047. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482707005514> [Accessed July 10, 2017].
- Sønder, S. L., Boye, T. L., Tölle, R., Dengjel, J., Maeda, K., Jäätelä, M., Simonsen, A. C., Jaiswal, J. K., and Nylandsted, J. 2019. Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane repair. *Scientific reports* 9:1–32.
- Straub, V., Murphy, A., and Udd, B. 2018. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscular Disorders* 28:702–710.
- Swaggart, K. A., Demonbreun, A. R., Vo, A. H., Swanson, K. E., Kim, E. Y., Fahrenbach, J. P., Holley-Cuthrell, J., Eskin, A., Chen, Z., Squire, K., et al. 2014. Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:6004–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717843> [Accessed July 10, 2017].
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N. W. 2010. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *The Journal of cell biology* 189:1027–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530211> [Accessed July 10, 2017].
- Terasaki, M., Miyake, K., and McNeil, P. L. 1997. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *The Journal of cell biology* 139:63–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314529> [Accessed July 10, 2017].
- Timmel, T., Kunz, S., Seifert, F., Schuelke, M., and Spuler, S. 2015. Cavin 1 function does not follow caveolar morphology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 308. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/content/308/12/C1023.long> [Accessed July 11,

Bibliographie

- 2017].
- Togo, T., Krasieva, T. B., and Steinhardt, R. A. 2000. A Decrease in Membrane Tension Precedes Successful Cell-Membrane Repair. *Molecular Biology of the Cell* 11:4339–4346.
- Waddell, L. B., Lemckert, F. A., Zheng, X. F., Tran, J., Evesson, F. J., Hawkes, J. M., Lek, A., Street, N. E., Lin, P., Clarke, N. F., et al. 2011. Dysferlin, Annexin A1, and Mitsugumin 53 Are Upregulated in Muscular Dystrophy and Localize to Longitudinal Tubules of the T-System With Stretch. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70:302–313. Available at: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e31821350b0> [Accessed July 10, 2017].
- Walev, I., Tappe, D., Gulbins, E., and Bhakdi, S. 2000. Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *Journal of Leukocyte Biology* 68:865–872.
- Wang, C. Y., and Lin, C. F. 2014. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Disease Markers* 2014.
- Wang, W., and Creutz, C. E. 1992. Regulation of the Chromaffin Granule Aggregating Activity of Annexin I by Phosphorylation. *Biochemistry* 31:9934–9939.
- Wang, X., Campos, B., Kaetzel, M. A., and Dedman, J. R. 2001. Secretion of Annexin V from Cultured Cells Requires a Signal Peptide. *Placenta* 22:837–845. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400401907246> [Accessed July 10, 2017].
- Yu, Q. C., and McNeil, P. L. 1992. Transient disruptions of aortic endothelial cell plasma membranes. *The American journal of pathology* 141:1349–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1466399> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1886756>.
- Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R. N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J. W., Di Santo, J. P., Butler-Browne, G. S., and Wright, W. E. 2007. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6:515–523. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x> [Accessed July 10, 2017].

Bibliographie

- Anderson, L. V., Davison, K., Moss, J. A., Young, C., Cullen, M. J., Walsh, J., Johnson, M. A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., et al. 1999. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1999 Jun;8(6):1141]. *Hum Mol Genet* 8:855–861. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010196375%5Cnhttp://www.oup.co.uk/hmg/Volume_08/Issue_05/ddc087_gml.abs.html.
- Ayala-Sanmartin, J., Zibouche, M., Illien, F., Vincent, M., and Gally, J. 2008. Insight into the location and dynamics of the annexin A2 N-terminal domain during Ca²⁺-induced membrane bridging. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1778:472–482.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S., and Draeger, A. 2002. Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:1177–1184. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12153985.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. 2011. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation* 18:80–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.81>.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. 2009. Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation* 16:1126–1134. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2009.30> [Accessed September 25, 2017].
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P. L., and Campbell, K. P. 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168–172. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01573> [Accessed July 10, 2017].
- Bastiani, M., and Parton, R. G. 2010. Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science* 123:3831–3836.
- Bitto, E., and Cho, W. 1999. Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38:14094–14100.

Bibliographie

- Bizzarro, V., Fontanella, B., Franceschelli, S., Pirozzi, M., Christian, H., Parente, L., and Petrella, A. 2010. Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 224:757–765. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.22178> [Accessed July 31, 2017].
- Blackwood, R. A., and Ernst, J. D. 1990. Characterization of Ca²⁺(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *The Biochemical journal* 266:195–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138016> [Accessed July 10, 2017].
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., and Davies, K. E. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews* 82:291–329.
- Blazek, A. D., Paleo, B. J., and Weisleder, N. 2015. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)* 30:438–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26525343> [Accessed October 9, 2017].
- Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K. M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., Itakura, M., Robitaille, Y., Parent, L., Baas, F., et al. 2010. Recessive Mutations in the Putative Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 5 Cause Proximal LGMD2L and Distal MMD3 Muscular Dystrophies. *American Journal of Human Genetics* 86:213–221.
- Borgonovo, B., Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Bachi, A., and Meldolesi, J. 2002. Regulated exocytosis: A novel, widely expressed system. *Nature Cell Biology* 4:955–962.
- Bouter, A., Gounou, C., Bérat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., D’Estaintot, B. L., Pöschl, E., Brachvogel, B., and Brisson, A. R. 2011. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature communications* 2:270. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468022> [Accessed July 10, 2017].
- Boye, T. L., Jeppesen, J. C., Maeda, K., Pezeshkian, W., Solovyeva, V., Nylandsted, J., and Simonsen, A. C. 2018. Annexins induce curvature on free-edge membranes displaying distinct morphologies. *Scientific Reports*:1–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28481-z>.
- Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., Simonsen, A. C., and Nylandsted, J. 2017. Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications* 8:1623. Available at:

Bibliographie

- <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01743-6> [Accessed November 23, 2017].
- Brown, D. A., and Rose, J. K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533–544.
- Buzhynskyy, N., Golczak, M., Lai-Kee-Him, J., Lambert, O., Tessier, B., Gounou, C., Bérat, R., Simon, A., Granier, T., Chevalier, J. M., et al. 2009. Annexin-A6 presents two modes of association with phospholipid membranes. A combined QCM-D, AFM and cryo-TEM study. *Journal of Structural Biology* 168:107–116. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.007>.
- Cagliani, R., Magri, F., Toscano, A., Merlini, L., Fortunato, F., Lamperti, C., Rodolico, C., Prella, A., Sironi, M., Aguenouz, M., et al. 2005. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Human mutation* 26:283.
- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J.-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., et al. 2009a. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature cell biology* 11:56–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043407> [Accessed July 10, 2017].
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.-K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Ma, J. 2009b. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *The Journal of biological chemistry* 284:15894–902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380584> [Accessed July 10, 2017].
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., and Reeves, W. J. 1974. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions<xref ref-type="fn" rid="FN2">2</xref>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 53:661–674. Available at: <https://academic.oup.com/jnci/article/53/3/661/908749/Breast-Tumor-Cell-Lines-From-Pleural-Effusions2>.
- Caohuy, H., and Pollard, H. B. 2001. Activation of Annexin 7 by Protein Kinase C in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 276:12813–12821.
- Carmeille, R., Bouvet, F., Tan, S., Croissant, C., Gounou, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Brisson, A. R., and Bouter, A. 2016. Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*

Bibliographie

1863:2267–2279.

Carmeille, R., Croissant, C., Bouvet, F., and Bouter, A. 2017. Membrane Repair Assay for Human Skeletal Muscle Cells. *In* *Methods in Molecular Biology* pp. 195–207. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7283-8_14.

Castro-Gomes, T., Corrotte, M., Tam, C., and Andrews, N. W. 2016. Plasma Membrane Repair Is Regulated Extracellularly by Proteases Released from Lysosomes. *PLoS one* 11:e0152583. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028538> [Accessed July 10, 2017].

Choi, C. H., Chung, J. Y., Chung, E. J., Sears, J. D., Lee, J. W., Bae, D. S., and Hewitt, S. M. 2016. Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer. *BMC Cancer* 16:1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2459-y>.

Clarke, M. S. F., Caldwell, R. W., Chiao, H., Miyake, K., and McNeil, P. L. 1995. Contraction-Induced Cell Wounding and Release of Fibroblast Growth Factor in Heart. *Circulation research* 76:927–34. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.76.6.927>.

Codding, S. J., Marty, N., Abdullah, N., and Johnson, C. P. 2016. Dysferlin binds SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) and stimulates membrane fusion in a calcium-sensitive manner. *Journal of Biological Chemistry* 291:14575–14584.

Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Maugel, T. K., et al. 2013. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *eLife* 2:e00926. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24052812> [Accessed July 10, 2017].

Corrotte, M., Fernandes, M. C., Tam, C., and Andrews, N. W. 2012. Toxin Pores Endocytosed During Plasma Membrane Repair Traffic into the Lumen of MVBs for Degradation. *Traffic* 13:483–494.

Creutz, C. E., Pazoles, C. J., and Pollard, H. B. 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry* 253:2858–2866.

Bibliographie

- Croissant, C., Bouvet, F., Tan, S., and Bouter, A. 2018. Imaging Membrane Repair in Single Cells Using Correlative Light and Electron Microscopy. *Current Protocols in Cell Biology* 81:1–19.
- Crosby, K. C., Postma, M., Hink, M. A., Zeelenberg, C. H. C., Adjobo-Hermans, M. J. W., and Gadella, T. W. J. 2013. Quantitative analysis of self-association and mobility of Annexin A4 at the plasma membrane. *Biophysical Journal* 104:1875–1885. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.057>.
- Davenport, N. R., Sonnemann, K. J., Eliceiri, K. W., and Bement, W. M. 2016. Membrane dynamics during cellular wound repair. *Molecular biology of the cell* 27:2272–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27226483> [Accessed September 4, 2017].
- Demonbreun, A. R., Allen, M. V., Warner, J. L., Barefield, D. Y., Krishnan, S., Swanson, K. E., Earley, J. U., and McNally, E. M. 2016a. Enhanced Muscular Dystrophy from Loss of Dysferlin Is Accompanied by Impaired Annexin A6 Translocation after Sarcolemmal Disruption. *American Journal of Pathology* 186:1610–1622.
- Demonbreun, A. R., Fallon, K. S., Oosterbaan, C. C., Bogdanovic, E., Warner, J. L., Sell, J. J., Page, P. G., Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., and McNally, E. M. 2019. Recombinant annexin A6 promotes membrane repair and protects against muscle injury. *Journal of Clinical Investigation* 129:4657–4670.
- Demonbreun, A. R., Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., Allen, M. V., Swanson, K. E., and McNally, E. M. 2016b. An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *The Journal of cell biology* 213:705–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298325> [Accessed July 10, 2017].
- Deng, S., Wang, J., Hou, L., Li, J., Chen, G., Jing, B., Zhang, X., and Yang, Z. 2013. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncology Letters* 5:107–112.
- DePina, A. S., and Langford, G. M. 1999. Vesicle transport: The role of actin filaments and myosin motors. *Microscopy Research and Technique* 47:93–106.
- Draeger, A., Monastyrskaya, K., and Babiychuk, E. B. 2011. Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit. *Biochemical Pharmacology* 81:703–712. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295211000141>

Bibliographie

[Accessed July 10, 2017].

- Draeger, A., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wobus, A. M., Moss, S. E., and Babiychuk, E. B. 2003. Membrane segregation and downregulation of raft markers during sarcolemmal differentiation in skeletal muscle cells. *Developmental Biology* 262:324–334.
- Draeger, A., Schoenauer, R., Atanassoff, A. P., Wolfmeier, H., and Babiychuk, E. B. 2014. Dealing with damage: Plasma membrane repair mechanisms. *Biochimie* 107:66–72. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414002260> [Accessed July 10, 2017].
- Eddleman, C. S., Ballinger, M. L., Smyers, M. E., Fishman, H. M., and Bittner, G. D. 1998. Endocytotic Formation of Vesicles and Other Membranous Structures Induced by Ca²⁺ and Axolemmal Injury. *The Journal of Neuroscience* 18:4029–4041.
- Gabel, M., Delavoie, F., Demais, V., Royer, C., Bailly, Y., Vitale, N., Bader, M. F., and Chasserot-Golaz, S. 2015. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *Journal of Cell Biology* 210:785–800.
- Gabel, M., Delavoie, F., Royer, C., Tahouly, T., Gasman, S., Bader, M. F., Vitale, N., and Chasserot-Golaz, S. 2019. Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1866:1207–1217. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.013>.
- Geissbuehler, M., and Lasser, T. 2013. How to display data by color schemes compatible with red-green color perception deficiencies. *Optics Express* 21:9862.
- Gerke, V., Creutz, C. E., and Moss, S. E. 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:449–461. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1661> [Accessed July 10, 2017].
- Gerke, V., and Moss, S. E. 2002. Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 82. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/82/2/331.long> [Accessed July 10, 2017].
- Gerke, V., and Weber, K. 1984. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to

Bibliographie

- non-erythroid spectrin and F-actin. *The EMBO journal* 3:227–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323166> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC557325>.
- Giordani, L., He, G. J., Negroni, E., Sakai, H., Law, J. Y. C., Siu, M. M., Wan, R., Corneau, A., Tajbakhsh, S., Cheung, T. H., et al. 2019. High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. *Molecular Cell* 74:609-621.e6.
- Godin, L. M., Vergen, J., Prakash, Y. S., Pagano, R. E., and Hubmayr, R. D. 2011. Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type I cell wound healing. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300:L615–L623.
- Gotow, T., Sakata, M., Funakoshi, T., and Uchiyama, Y. 1996. Preferential localization of annexin V to the axon terminal. *Neuroscience* 75:507–521.
- Govorukhina, N., Bergsma-schutter, W., Mazères-dubut, C., Mazères, S., Drakopoulou, E., Bystrykh, L., Oling, F., Mukhopadhyay, A., Reviakine, I., Lai, J., et al. 2003. Self-Assembly of Annexin A5 on Lipid Membranes.
- Griffin, D. A., Johnson, R. W., Whitlock, J. M., Pozsgai, E. R., Heller, K. N., Grose, W. E., Arnold, W. D., Sahenk, Z., Hartzell, H. C., and Rodino-Klapac, L. R. 2016. Defective membrane fusion and repair in Anoctamin5-deficient muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 25:1900–1911.
- Grindheim, A. K., Saraste, J., and Vedeler, A. 2017. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861:2515–2529. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>.
- Hayes, M. J., Shao, D., Bailly, M., and Moss, S. E. 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO journal* 25:1816–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601677> [Accessed July 10, 2017].
- Hernández-Deviez, D. J., Howes, M. T., Laval, S. H., Bushby, K., Hancock, J. F., and Parton, R. G. 2008. Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *Journal of Biological Chemistry* 283:6476–6488.
- Hernández-Deviez, D. J., Martin, S., Laval, S. H., Lo, H. P., Cooper, S. T., North, K. N., Bushby, K., and Parton, R. G. 2006. Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin

Bibliographie

- or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Human Molecular Genetics* 15:129–142.
- Hoffman, J. F. 1992. On Red Blood Cells, Hemolysis and Resealed Ghosts. *Advances in experimental medicine and biology* 326:1–15.
- Holopainen, J. M., Angelova, M. I., and Kinnunen, P. K. J. 2000. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical Journal* 78:830–838.
- Horn, A., Van der Meulen, J. H., Defour, A., Hogarth, M., Sreetama, S. C., Reed, A., Scheffer, L., Chandel, N. S., and Jaiswal, J. K. 2017. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Science signaling* 10:eaaj1978. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28874604> [Accessed October 2, 2017].
- Huber, R., Römisch, J., and Paques, E. P. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *The EMBO Journal* 9:3867–3874.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N. W. 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺ dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology* 180:905–914.
- Jaiswal, J. K., Andrews, N. W., and Simon, S. M. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *Journal of Cell Biology* 159:625–635.
- Jaiswal, J. K., Lauritzen, S. P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S. M., Kallunki, T., Jäättelä, M., and Nylandsted, J. 2014. S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nature communications* 5:3795. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24806074> [Accessed July 10, 2017].
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. 2014. ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science* 343. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/343/6174/1247136.long> [Accessed July 10, 2017].
- Johnstone, S. A., Hubaishy, I., and Waisman, D. M. 1992. Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *Journal of Biological Chemistry* 267:25976–25981.

Bibliographie

- Kaetzel, M. A., Mo, Y. D., Mealy, T. R., Campos, B., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Dedman, J. R., and Seaton, B. A. 2001. Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* 40:4192–4199.
- Koerdt, S. N., and Gerke, V. 2017. Annexin A2 is involved in Ca²⁺-dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864:1046–1053. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916303329> [Accessed July 10, 2017].
- de la Fuente, M., and Parra, A. V. 1995. Vesicle Aggregation by Annexin I: Role of a Secondary Membrane Binding Site. *Biochemistry* 34:10393–10399.
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F., and Brisson, A. 1997. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* 272:42–55.
- Lek, A., Evesson, F. J., Lemckert, F. A., Redpath, G. M. I., Lueders, A.-K., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., North, K. N., and Cooper, S. T. 2013. Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type Channels Underpin Calcium-Dependent Muscle Membrane Repair. *Journal of Neuroscience* 33. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/33/12/5085.long> [Accessed July 10, 2017].
- Lennon, N. J., Kho, A., Bacskai, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., and Brown, R. H. 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *The Journal of biological chemistry* 278:50466–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506282> [Accessed July 10, 2017].
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Andoni Urtizberea, J., Hentati, F., Hamida, M. Ben, et al. 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 20:31–36.
- Lo, H. P., Nixon, S. J., Hall, T. E., Cowling, B. S., Ferguson, C., Morgan, G. P., Schieber, N. L., Fernandez-Rojo, M. A., Bastiani, M., Floetenmeyer, M., et al. 2015. The caveolin-Cavin system plays a conserved and critical role in mechanoprotection of skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 210:833–849.
- Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I.,

Bibliographie

- Arahata, K., and Jr, R. H. B. 2001. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* 10:1761–1766. Available at: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/10.17.1761> [Accessed July 10, 2017].
- McDade, J. R., Archambeau, A., and Michele, D. E. 2014. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28:3660–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784578> [Accessed September 4, 2017].
- McNeil, A. K., Rescher, U., Gerke, V., and McNeil, P. L. 2006. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *The Journal of biological chemistry* 281:35202–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984915> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., and Baker, M. M. 2001. Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 304:141–146. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s004410000286> [Accessed September 25, 2017].
- McNeil, P. L., and Ito, S. 1989. Gastrointestinal Cell Plasma Membrane Wounding and Resealing In Vivo. *Gastroenterology* 96:1238–1248. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(89\)80010-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(89)80010-1).
- McNeil, P. L., and Khakee, R. 1992. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *The American journal of pathology* 140:1097–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374591> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1886518>.
- McNeil, P. L., and Kirchhausen, T. 2005. An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:499–505. Available at: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?EbscoContent=dGJyMMv17ESep644yOvqOLCmr0%2Bep65Ss6%2B4SLKWxWXS&ContentCustomer=dGJyMOzpsE2xqK5JuePfgeyx9Yvf5ucA&T=P&P=AN&S=R&D=mnh&K=15928713> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., Miyake, K., and Vogel, S. S. 2003. The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4592–4597.

Bibliographie

Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0736739100>.

- McNeil, P. L., and Steinhardt, R. A. 2003. PLASMA MEMBRANE DISRUPTION: Repair, Prevention, Adaptation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 19:697–731. Available at: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?EbscoContent=dGJyMMv17ESep644yOvqOLCmr0%2Bep69Srqm4SbWWxWXS&ContentCustomer=dGJyMOzpsE2xqK5JuePfgex9Yvf5ucA&T=P&P=AN&S=R&D=mnh&K=14570587> [Accessed July 10, 2017].
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., and Terasaki, M. 2000. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science* 113.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:112–124.
- Middel, V., Zhou, L., Takamiya, M., Beil, T., Shahid, M., Roostalu, U., Grabher, C., Rastegar, S., Reischl, M., Nienhaus, G. U., et al. 2016. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nature communications* 7:12875. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27641898> [Accessed July 10, 2017].
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., et al. 1998. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18:365–368.
- Miyake, K., and McNeil, P. L. 1995. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *The Journal of cell biology* 131:1737–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557741> [Accessed July 10, 2017].
- Miyake, K., McNeil, P. L., Suzuki, K., Tsunoda, R., and Sugai, N. 2001. An actin barrier to resealing. *Journal of cell science* 114:3487–3494.
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Rescher, U., and Draeger, A. 2007. Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium* 41:207–219. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416006001291> [Accessed July 10, 2017].
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Wood, P., Grewal, T., and Draeger, A. 2009. Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 284:17227–17242.
- de Muga, S. V., Timpson, P., Cubells, L., Evans, R., Hayes, T. E., Rentero, C., Hegemann, A.,

Bibliographie

- Reverter, M., Leschner, J., Pol, A., et al. 2009. Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells. *Oncogene* 28:363–377. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2008.386> [Accessed July 10, 2017].
- Parton, R. G., and Del Pozo, M. A. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:98–112. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3512>.
- Philippi, S., Bigot, A., Marg, A., Mouly, V., Spuler, S., and Zacharias, U. 2012. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS currents* 4:RRN1298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367358> [Accessed July 10, 2017].
- Piljić, A., and Schultz, C. 2006. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells. *Molecular biology of the cell* 17:3318–3328.
- Pollard, H. B., Lee Burns, A., and Rojas, E. 1990. Synexin (Annexin VII): A Cytosolic Calcium-Binding Protein which Promotes Membrane Fusion and Forms Calcium Channels in Artificial Bilayer and Natural Membranes. *The journal of membrane biology* 117:101–112.
- Pollard, H. B., Rojas, E., Pastor, R. W., Rojas, E. M., Robert Guy, H., and Lee Burns, A. 1991. Synexin: Molecular Mechanism of Calcium-Dependent Membrane Fusion and Voltage-Dependent Calcium-Channel Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 635:328–51.
- Pollard, T. D., and Cooper, J. A. 2009. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208–1212.
- Potez, S., Luginbühl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., and Babiychuk, E. B. 2011. Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *The Journal of biological chemistry* 286:17982–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454475> [Accessed July 10, 2017].
- Reddy, A., Caler, E. V., and Andrews, N. W. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157–169.
- Redpath, G. M. I., Woolger, N., Piper, A. K., Lemckert, F. A., Lek, A., Greer, P. A., North, K. N., and Cooper, S. T. 2014. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a

Bibliographie

- synaptotagmin-like module for membrane repair. *Molecular biology of the cell* 25:3037–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143396> [Accessed September 13, 2017].
- Rintala-Dempsey, A. C., Rezvanpour, A., and Shaw, G. S. 2008. S100-annexin complexes - Structural insights. *FEBS Journal* 275:4956–4966.
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., and Andrews, N. W. 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 137:93–104.
- Roostalu, U., and Strähle, U. 2012. In Vivo Imaging of Molecular Interactions at Damaged Sarcolemma. *Developmental Cell* 22:515–529. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580711005740> [Accessed July 10, 2017].
- Sanjana, N. E., Shalem, O., and Zhang, F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* 11:783–784.
- Scheffer, L. L., Sreetama, S. C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K. J., Defour, A., and Jaiswal, J. K. 2014. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications* 5:5646. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534348> [Accessed July 11, 2017].
- Selbert, S., Fischer, P., Menke, A., Jockusch, H., Pongratz, D., and Noegel, A. A. 1996. Annexin VII Relocalization as a Result of Dystrophin Deficiency. *Experimental Cell Research* 222:199–208. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482796900257> [Accessed July 10, 2017].
- Selbert, S., Fischer, P., Pongratz, D., Stewart, M., and Noegel, A. A. 1995. Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *Journal of Cell Science* 108. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/108/1/85.long> [Accessed September 13, 2017].
- Sharma, N., Medikayala, S., Defour, A., Rayavarapu, S., Brown, K. J., Hathout, Y., and Jaiswal, J. K. 2012. Use of quantitative membrane proteomics identifies a novel role of mitochondria in healing injured muscles. *Journal of Biological Chemistry* 287:30455–30467.

Bibliographie

- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., et al. 2011. Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell* 144:402–413.
- Skrahina, T., Piljić, A., and Schultz, C. 2008. Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins. *Experimental Cell Research* 314:1039–1047. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482707005514> [Accessed July 10, 2017].
- Sønder, S. L., Boye, T. L., Tölle, R., Dengjel, J., Maeda, K., Jäätelä, M., Simonsen, A. C., Jaiswal, J. K., and Nylandsted, J. 2019. Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane repair. *Scientific reports* 9:1–32.
- Straub, V., Murphy, A., and Udd, B. 2018. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscular Disorders* 28:702–710.
- Swaggart, K. A., Demonbreun, A. R., Vo, A. H., Swanson, K. E., Kim, E. Y., Fahrenbach, J. P., Holley-Cuthrell, J., Eskin, A., Chen, Z., Squire, K., et al. 2014. Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:6004–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717843> [Accessed July 10, 2017].
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N. W. 2010. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *The Journal of cell biology* 189:1027–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530211> [Accessed July 10, 2017].
- Terasaki, M., Miyake, K., and McNeil, P. L. 1997. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *The Journal of cell biology* 139:63–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314529> [Accessed July 10, 2017].
- Timmel, T., Kunz, S., Seifert, F., Schuelke, M., and Spuler, S. 2015. Cavin 1 function does not follow caveolar morphology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 308. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/content/308/12/C1023.long> [Accessed July 11,

Bibliographie

- 2017].
- Togo, T., Krasieva, T. B., and Steinhardt, R. A. 2000. A Decrease in Membrane Tension Precedes Successful Cell-Membrane Repair. *Molecular Biology of the Cell* 11:4339–4346.
- Waddell, L. B., Lemckert, F. A., Zheng, X. F., Tran, J., Evesson, F. J., Hawkes, J. M., Lek, A., Street, N. E., Lin, P., Clarke, N. F., et al. 2011. Dysferlin, Annexin A1, and Mitsugumin 53 Are Upregulated in Muscular Dystrophy and Localize to Longitudinal Tubules of the T-System With Stretch. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70:302–313. Available at: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e31821350b0> [Accessed July 10, 2017].
- Walev, I., Tappe, D., Gulbins, E., and Bhakdi, S. 2000. Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *Journal of Leukocyte Biology* 68:865–872.
- Wang, C. Y., and Lin, C. F. 2014. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Disease Markers* 2014.
- Wang, W., and Creutz, C. E. 1992. Regulation of the Chromaffin Granule Aggregating Activity of Annexin I by Phosphorylation. *Biochemistry* 31:9934–9939.
- Wang, X., Campos, B., Kaetzel, M. A., and Dedman, J. R. 2001. Secretion of Annexin V from Cultured Cells Requires a Signal Peptide. *Placenta* 22:837–845. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400401907246> [Accessed July 10, 2017].
- Yu, Q. C., and McNeil, P. L. 1992. Transient disruptions of aortic endothelial cell plasma membranes. *The American journal of pathology* 141:1349–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1466399> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1886756>.
- Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R. N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J. W., Di Santo, J. P., Butler-Browne, G. S., and Wright, W. E. 2007. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6:515–523. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x> [Accessed July 10, 2017].

Annexes

Annexe 1

Membrane Repair Assay for Human Skeletal Muscle Cells

Carmeille R., Croissant C., Bouvet F., Bouter A

Humana Press Inc., (2017), 195-207

DOI: 10.1007/978-1-4939-7283-8_14

Chapter 14

Membrane Repair Assay for Human Skeletal Muscle Cells

Romain Carmeille, Coralie Croissant, Flora Bouvet, and Anthony Bouter

Abstract

The characterization of the membrane repair machinery in human skeletal muscle has become crucial, since it has been shown that some muscular dystrophies result from a defect of this fundamental physiological process. Deciphering membrane repair mechanism requires the development of methodologies allowing studying the response of skeletal muscle cells to sarcolemma damage and identifying candidate proteins playing a role in the membrane repair machinery. Here, we describe a protocol that is based on the creation of cell membrane disruption by infrared laser irradiation in human myotubes. Membrane disruption and repair are assayed by monitoring the incorporation into myotubes of the membrane probe FM1-43. This methodology has recently enabled us to show that Annexin-A5 is required for membrane repair in human skeletal muscle cells (Carmeille et al., *Biochim Biophys Acta* 1863:2267–2279, 2016).

Key words Membrane repair, Human skeletal muscle, Time-lapse fluorescence microscopy, FM1-43, Laser injury

1 Introduction

Skeletal muscle cells are physiologically exposed to mechanical stresses, which can result in the formation of tears in sarcolemma [1, 2]. Whereas normal cells are able to repair membrane ruptures rapidly, the absence or failure of membrane resealing leads to cell death and may contribute to the development of degenerative diseases, such as muscular dystrophies. Muscular dystrophy encompasses a group of genetic disorders that cause progressive weakness and wasting of skeletal muscle. Among these, limb girdle muscular dystrophy type 2B (LMGD2B) and Miyoshi myopathy type 1 are the result of deleterious mutations in the dysferlin gene, which lead to several dysfunctions including a failure in the cell membrane repair process [3]. It is challenging to develop in vitro methods for (1) identifying proteins that belong to the membrane repair machinery, (2) deciphering the healing mechanisms in healthy muscle cells, and (3) determining defective processes in pathological muscle cells.

Several methods have been described to investigate cell membrane repair, among which two main approaches can be distinguished, namely chemical treatment and mechanical injury. Membrane permeabilization using detergent [4, 5] or pore-forming toxins (PFTs) [6, 7] is often performed to study cell response to (bio)chemical damage. On the other hand, wounding with a needle [8–12], mechanical shearing [13], or stretching [14] and laser irradiation [3, 15, 16] constitute the main techniques to create mechanical injury. Major differences are expected with regards to molecular consequences induced by chemical treatment vs. mechanical injury, which may result in various mechanisms of membrane repair. It is noteworthy that the emerging model of membrane repair, based on the lysosomal enzyme-induced endocytosis, relies mostly on the study of PFTs-treated cells [17, 18], while most works that led to the “classical” model, namely the “lipid patch” hypothesis, have been conducted on cells submitted to mechanical tears [4, 15, 19]. Creating membrane damage through chemical treatment is thus a method poorly adapted for deciphering membrane repair machinery in skeletal muscle, which is mainly submitted to mechanical constraints. Membrane damages induced by a needle or a mechanical shearing or stretching lack reproducibility, due to the variation in physical forces applied on cells from one experiment to another. This explains why laser irradiation has been the preferred method in most recent studies dealing with membrane repair. Membrane disruption can be created by laser irradiation with wavelengths in UV [20, 21] or infrared (IR) [16, 19, 22] spectra. IR lasers offer the strongest irradiation powers, giving the system the ability to create ruptures of varying sizes in a tunable fashion, so that it has currently become the standard technique.

Here, we describe a protocol for studying sarcolemma repair based on membrane disruption using near-IR laser irradiation. By focusing the laser on cell membrane of myotubes for a few seconds, a μm^2 -size membrane rupture can be created in a controlled and highly reproducible way. To assess membrane disruption and repair, myotubes are irradiated in the presence of FM1-43, a water-soluble dye that becomes fluorescent upon inserting into lipid membranes, yet is unable to cross membranes. Therefore, muscle cells with damaged sarcolemma exhibit an increase in fluorescence intensity due to the passive entrance of FM1-43 molecules into the cytosol and their incorporation into intracellular membranes. The process of membrane repair is monitored by time-lapse imaging of the sarcoplasmic FM1-43 fluorescence intensity after irradiation. Membrane resealing stops the entrance of FM1-43 molecules into the sarcoplasm and therefore leads to a stop in the increase of the intracellular fluorescence intensity. Instead, the absence of membrane resealing leads to a continuous entry of FM1-43 molecules into the cytosol and a continuous and large increase in the intracellular fluorescence intensity.

2 Materials

All media and solutions must be sterile and manipulated in a biosafety cabinet.

2.1 Cell Culture

1. LHCN-M2 cell line: This cell line, which was obtained from the platform for immortalization of human cells from the Center of Research in Myology (Paris, France), has been established from skeletal muscle satellite cells of a 41-year-old Caucasian subject [23] (*see Note 1*). The membrane repair assay can be implemented for other cell types (*see Note 2*).
2. Growth medium: skeletal muscle medium (Promocell) supplemented with 20% fetal bovine serum, 50 µg/mL fetuin, 10 ng/mL epidermal growth factor, 1 ng/mL basic fibroblast growth factor, 10 µg/mL insulin, 0.4 µg/mL dexamethasone, and 50 µg/mL gentamycin (Promocell). Home-made medium can also be used (*see Note 3*).
3. Differentiation medium: skeletal muscle medium supplemented only with 10 µg/mL human recombinant insulin.
4. Trypsin-EDTA, 0.25%, pH 8.0.
5. Dulbecco's PBS (DPBS).
6. DMSO, cell culture grade.
7. 25 cm² tissue culture-treated flasks.
8. 8-well Lab-Tek™ chambered coverglass (Nunc).

2.2 Membrane Repair Assay

1. TCS SP2 AOBS two-photon confocal scanning microscope (Leica) equipped with an HCX PL APO CS 63.0 × 1.40 oil-objective lens (*see Note 4*).
2. Chameleon-Vision™ mode-locked Titanium:Sapphire laser (Coherent).
3. Fieldmate laser power meter equipped with a OP-2 VIS sensor (Coherent).
4. DPBS.
5. Ice.
6. FM1-43FX (ThermoFisher Scientific, referred to hereafter as FM1-43): 100 µg of the lyophilized dye is dissolved in 500 µL of ultrapure water. This stock solution must be stored at ≤ -20 °C and discarded after 2 weeks. Prepare extemporarily the working solution at 5 µg/mL in ice-cold DPBS containing or not 1 mM calcium (Ca²⁺); keep this staining solution on ice.
7. ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij>).

3 Methods

Carry out all the procedures at room temperature unless otherwise specified.

3.1 Cell Maintenance

1. For cell maintenance, place 5×10^5 LHCN-M2 myoblasts in 25 cm^2 tissue culture treated flasks containing 10 mL growth medium.
2. Incubate the flask at 37°C , 5% CO_2 and high humidity.
3. When cell confluence reaches 80% (about 3 days), rinse the cell culture with DPBS.
4. Add 1.5 mL of trypsin and incubate the culture at 37°C , 5% CO_2 for 5 min.
5. Add 10 mL of growth medium and collect the cells.
6. Centrifuge the cells at $200 \times g$ for 5 min at room temperature.
7. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 1 mL of growth medium.
8. Count the cells by using trypan blue to assess their viability.
9. Place 5×10^5 cells in a new 25 cm^2 tissue culture treated flask with fresh growth medium. The cell excess is used for membrane repair assay.
10. For long-term storage, 5×10^5 LHCN-M2 myoblasts are resuspended in growth medium supplemented with 10% DMSO and placed in a cryovial, which is stored in a freezing container at -80°C overnight. Subsequently, the cryovial is transferred into a liquid nitrogen storage tank.

3.2 Myotube Formation

1. Place 2×10^4 LHCN-M2 myoblasts in one well of a 8-well Lab-Tek™ chambered coverglass and culture them in 250 μL growth medium until cell confluence reaches 80% (about 3 days).
2. Wash the cells with 250 μL DPBS per well.
3. Replace growth medium by differentiation medium and culture the cells for 3 days.
4. Control the presence of myotubes each day through observation in bright-field microscopy (Fig. 1). After 24 h differentiation cells must be elongated and tightly associated with a common orientation (Fig. 1, +24 h).
5. LHCN-M2 myotubes have to be assayed for membrane repair from 3 to 5 days after the addition of the differentiation medium (Fig. 1, +72 h to +144 h).

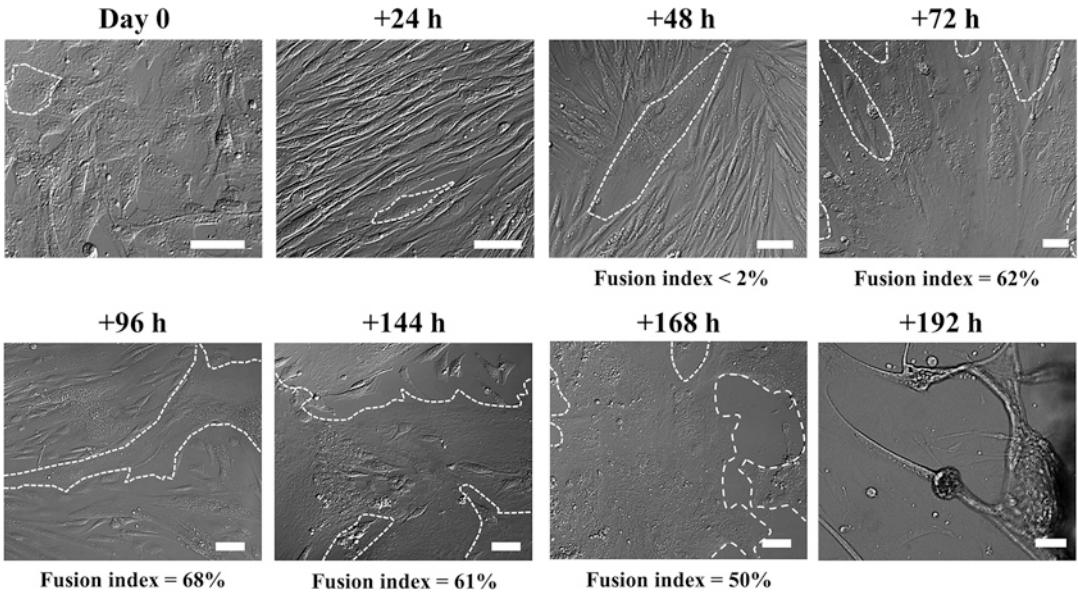


Fig. 1 Typical images of LHCN-M2 myoblasts and myotubes in the course of differentiation. 80%-confluence LHCN-M2 myoblasts (Day 0) are cultivated in the differentiation medium, fixed in methanol solution (5 min, at -20°C) every 24 h and observed by differential interference contrast microscopy. The sarcolemma of one cell is drawn on each panel (*white dashed line*). When appropriate, fusion index was calculated by dividing the number of nuclei in myotubes by the total number of nuclei (12 random images in 3 independent experiments). The best period for handling myotubes is from 72 to 144 h after differentiation. For longer time we observe the detachment of senescent myotubes. Scale bars = $50\ \mu\text{m}$

3.3 Membrane Repair Assay

1. Let the lasers warm up until stabilization.
2. Start the FRAP application in the LCS application wizard.
3. Via the “Beam Path Settings” window define parameters for Prebleach and Postbleach conditions using the following settings:
Resolution: 8-bits; Dimensions: 512×512 pixels; Zoom: 2; Physical dimensions: $119 \times 119\ \mu\text{m}$; Scan speed: 400 Hz; Mode: unidirectional; Pinhole: 1 airy; Beam expander: Beam Exp1; AOTF (488 nm): 30%; SP mirror (left): 520 nm; SP mirror (right): 650 nm.
4. Incubate the myotubes with $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ FM1-43 in DPBS supplemented or not with $1\ \text{mM}\ \text{Ca}^{2+}$ and maintain over ice for at least 5 min. Subsequently, place the cells on stage.
5. Click on continuous for acquiring images of FM1-43 stained myotubes and adjust gain and offset parameters of the 488 nm laser line.
6. Define 2 Prebleach, 3 Bleach, and 100 Postbleach frames. The delay (time/frame) is automatically calculated as 1.635 s. Proceed with the next step.

7. Set parameters for the “bleaching” step, which actually will correspond to IR laser irradiation inducing cell membrane damage. Click to IR button opening the “MP Laser Configuration” window and set the wavelength at 820 nm.
8. Open the MP shutter and return to the “Setting Parameters for Bleaching” window.
9. Adjust gain and offset values to obtain IR laser power equal to 110 (± 5) mW at the entry of the microscope or to 10 (± 1) mW at the exit of the objective (*see* **Notes 5** and **6**).
10. Turn the power control of the Argon 488 nm laser line at 0%.
11. Activate the check box “Zoom In.”
12. Define the ROI for “bleaching” by choosing rectangular selection. Draw a square of $1 \times 1 \mu\text{m}$ on sarcolemma of a myotube.
13. Click Run to start experiment. Save the experiment as a .lei file.

3.4 Image Analysis

1. Through the “Bio-Formats Importer” plugging of ImageJ software, open the .lei file.
2. In “Bio-Formats Import Options” window, activate the check box “Split channels into separate windows.”
3. In “Bio-Formats Series Options” window, select the series to be analyzed. The series opens as a stack file (Fig. 2a).
4. Open the first Prebleach frame (Fig. 2b).
5. Subtract the Prebleach frame to all images of the stack (Process/Image calculator; operation: subtract). Click YES to process all 105 images from the stack (Fig. 2c).
6. Within the resulting stack, display the frame corresponding to the last image from the experiment (frame 105/105) and draw the cell following the cell membrane by means of polygon selection (Fig. 2d).
7. Measure mean intracellular fluorescence intensity throughout the stack (Image/Stack/Plot z-axis profile) and save the plot values, which is displayed by clicking on “List” from the “Result of Data” window (Fig. 2e).

3.5 Data Analysis

1. Open plot values in spreadsheet software and delete values from frame 2–5, which correspond to the second Prebleach image and the three images acquired during laser irradiation (Fig. 3a).
2. Add time corresponding to each frame: 0 s for frame 0, 1.635 s for frame 6, 3.27 s for frame 7 etc. (Fig. 3b).
3. Plot fluorescence intensity values versus time (Fig. 3c).
4. The presence of a plateau means that cell membrane has resealed. In contrary, a continuous and large increase of the

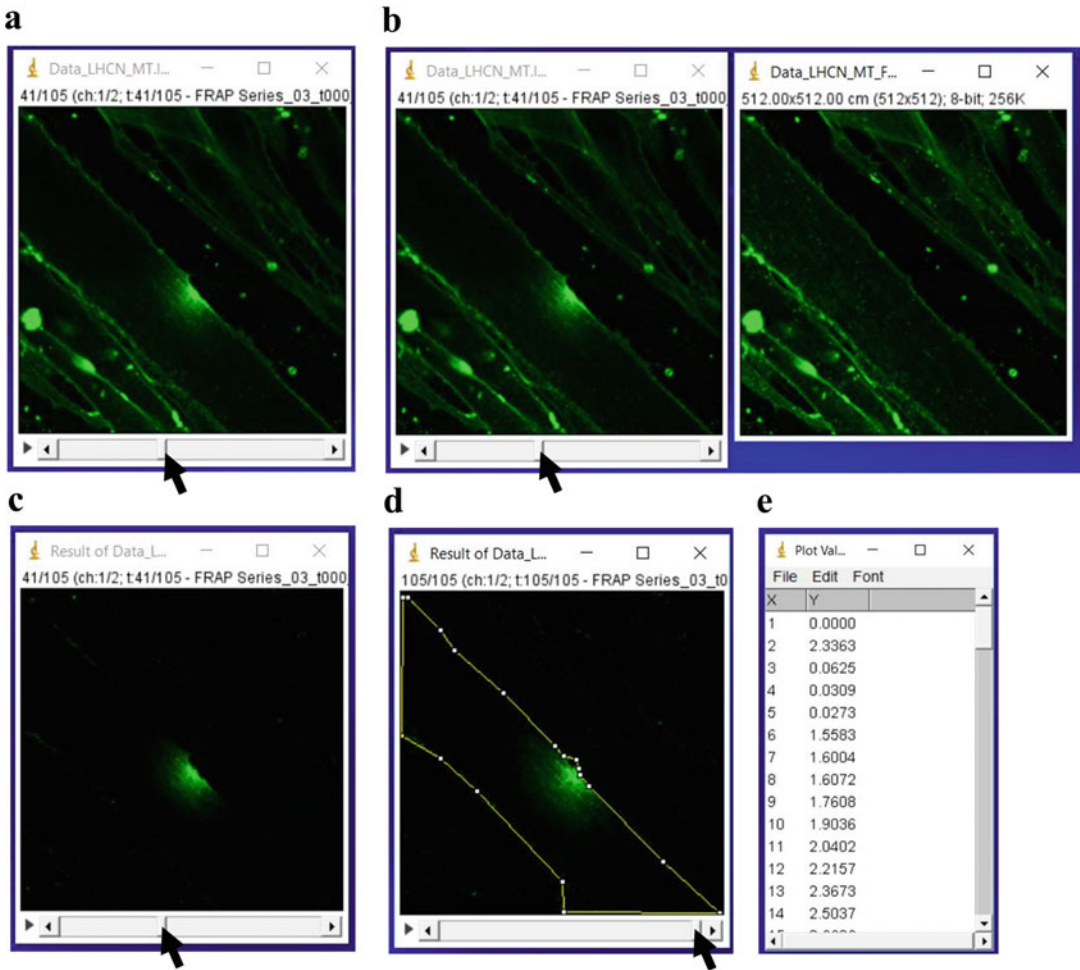


Fig. 2 Image analysis. (a) Series of images containing 2 Prebleach, 3 Bleach and 100 Postbleach frames is opened as a stack file using ImageJ software from the .lei file. (b) Fluorescence intensity of all images from the stack (*left-hand panel*) is corrected for the fluorescence value recorded before irradiation (*right-hand panel*). (c) The stack displaying the corrected fluorescence intensity. (d) For quantitative analysis, the whole cell surface of the myotube—at least that is displayed on the image—is selected. (e) Mean fluorescence intensity is plotted versus slice number using the “Plot z-axis Profile” plugging. *Black arrows* point to the cursor enabling us to scroll through images within the stack

fluorescence intensity indicates the absence of membrane resealing. The experiment in the absence of Ca^{2+} must be performed as a negative control (Fig. 4).

5. Reproduce the experiment about 100 times in at least five independent experiments and calculate mean and standard deviation values for each time.
6. To characterize in further detail the magnitude and the rate of FM1-43 uptake, the mean fluorescence intensity changes can be fitted according to the following “mono-exponential rise to

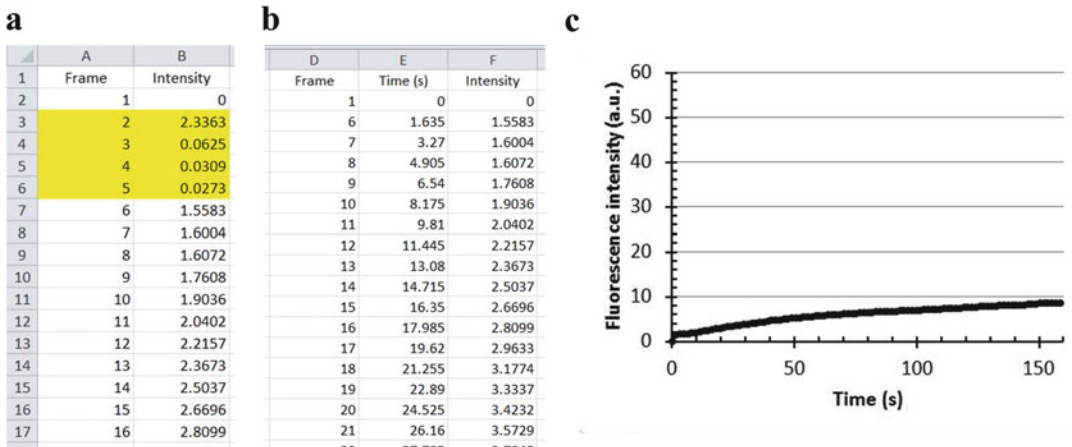


Fig. 3 Data analysis. **(a)** Mean fluorescence intensity values and respective slice numbers are entered in a spreadsheet file. Values of the second Prebleach image and the three Bleach images (highlighted in *yellow*) are deleted. **(b)** Time in seconds is attributed to each fluorescence intensity value, knowing that the interval between each acquisition is 1.635 s. **(c)** Mean fluorescence intensity, which is expressed in arbitrary unit (a. u.), is plotted versus time

maximum” equation [24] available in the Sigmaplot software (Systat Software): Fluorescence Intensity = $(1 - \exp(-B * t)) * A$, where A corresponds to the maximal intracellular fluorescence intensity and B is equal to $\text{Ln}2/\tau^{1/2}$. This model implying the existence of a plateau, only repairing cells can be therefore analyzed.

4 Notes

1. The LHCN-M2 cell line has been established from the satellite cells of the pectoralis major muscle of a 41-year-old subject [23]. LHCN is an acronym meaning: *Lox-Hygro-hTERT* and *Cdk4-Neo*, which correspond to the two plasmids that were used for myoblast immortalization. M2 names a well-characterized subclone of differentiated LHCN myoblasts. LHCN-M2 myoblasts present a rapid and efficient differentiation into myotubes, which express specific proteins from striated skeletal muscle, like heavy chain of myosin for example [23].
2. In our hands, the protocol has been already successfully tested with the following cells:
 - (a) Cell lines: mouse perivascular cells PVC [16], mouse skeletal muscle cells C2C12, human trophoblasts BeWo [25], human dysferlin-deficient muscle cells 578 [19], human caveolin3-deficient muscle cells 650, human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7.
 - (b) Primary cells: human trophoblasts [25].

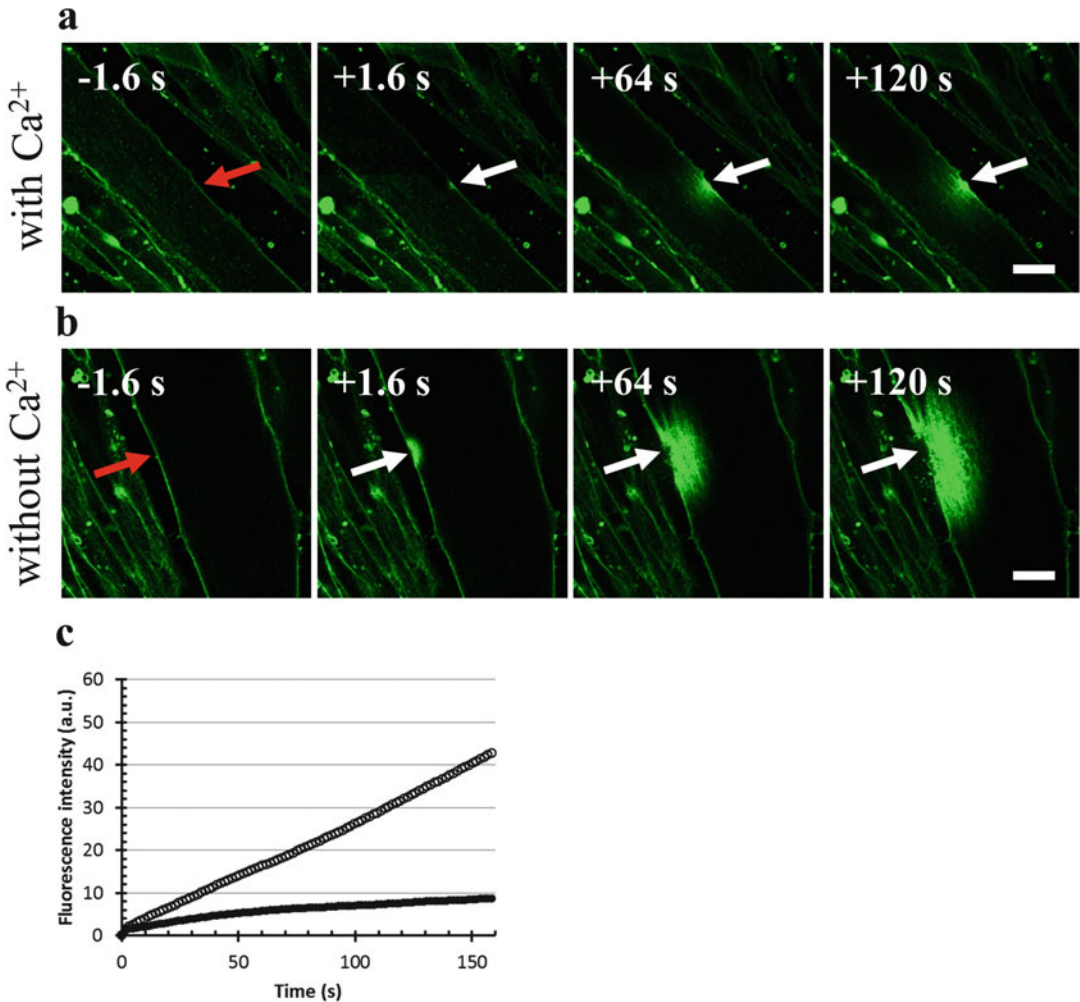


Fig. 4 Responses of LHCN-M2 myotubes to 110-mW IR laser irradiation in the presence or absence of Ca^{2+} . Sequences of images showing the response of a LHCN-M2 myotube to 110-mW IR laser irradiation in the presence of 1 mM Ca^{2+} (**a**) or without Ca^{2+} (**b**). In these panels, the area of membrane irradiation is marked with a *red arrow* before irradiation and a *white arrow* after irradiation. Image frames 1 and 2 were recorded 1.635 s before and 1.635 s after irradiation, respectively; frames 3–4 were recorded 63.765 and 120.99 s after irradiation, respectively. (**c**) Data represent the fluorescence intensity integrated over whole cell sections, which is plotted versus time. FM1-43 fluorescence intensity increases in the presence (*filled circles*) and absence (*empty circles*) of Ca^{2+} after membrane damage through 110-mW IR laser irradiation. In the presence of Ca^{2+} , the fluorescence intensity reaches a plateau after ~120 s. In the absence of Ca^{2+} , the fluorescence intensity increases continuously and is significantly larger than that measured in the presence of Ca^{2+} . Scale bars = 20 μm

- LHCN-M2 culture can be performed in a non-commercial KMEM medium. KMEM is composed by mixing one volume of medium 199, Glutamax™ with four volumes of DMEM, high glucose, Glutamax™, without pyruvate and 20% (final

concentration) of fetal bovine serum. Skeletal muscle cell growth medium supplement mix (Promocell), which contains the different supplements required for growth of human skeletal muscle cells, is added to the medium according to the manufacturer's instructions. The KMEM medium supplemented only with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ human recombinant insulin can be used as a differentiation medium.

4. Other confocal microscopes can be used, provided that they are inverted microscope (otherwise Lab-Tek™ chambered coverglass cannot be used), they possess a FRAP application and are coupled to an IR laser. Note that UV laser can also be used for laser injury [20, 21], provided it is sufficiently powerful.
5. Figure 5 presents membrane damage associated with different laser power. Regular measurement of the IR laser power is a key element for reproducibility of results. The power delivered by IR laser must be measured before and regularly during the experiment and set at 110 mW by adjusting gain and offset parameters. We often observe that the power increases during the experiment due to laser heating. When appropriate, a manual shutter can be added in the optical path of the IR laser beam. The closure of the shutter during the acquisition of Prebleach and Postbleach images ensures the absence of cell irradiation by IR laser outside the Bleach time. Opening of the shutter during the Bleach period is controlled remotely by the operator.
6. To ensure reproducible membrane damage, irradiated membrane area is systematically imaged (Fig. 6). The image of the first scan enables us to check that cell membrane is correctly centered in the field (Fig. 6a). Optimal setup of laser focalization on the membrane results in the systematic observation of FM1-43 photobleaching (Fig. 6b). Laser emits wavelengths centered on 820 nm and FM1-43 exhibits maximal absorption around 490 nm; therefore, the excitation of the dye is only permitted when two photons are quasi-simultaneously absorbed, according to a two-photon mode. Under these conditions, photobleaching of FM1-43 is achieved only for a perfect focusing of the IR laser. We also systematically check the onset of a little bubble (diameter around 200 nm), which indicates a localized heating of cell membrane leading to rupture (Fig. 6c). During the third scan fluorescence recovery is observed subsequently to the entry into cell of FM1-43. Only experiments that meet these criteria are selected.

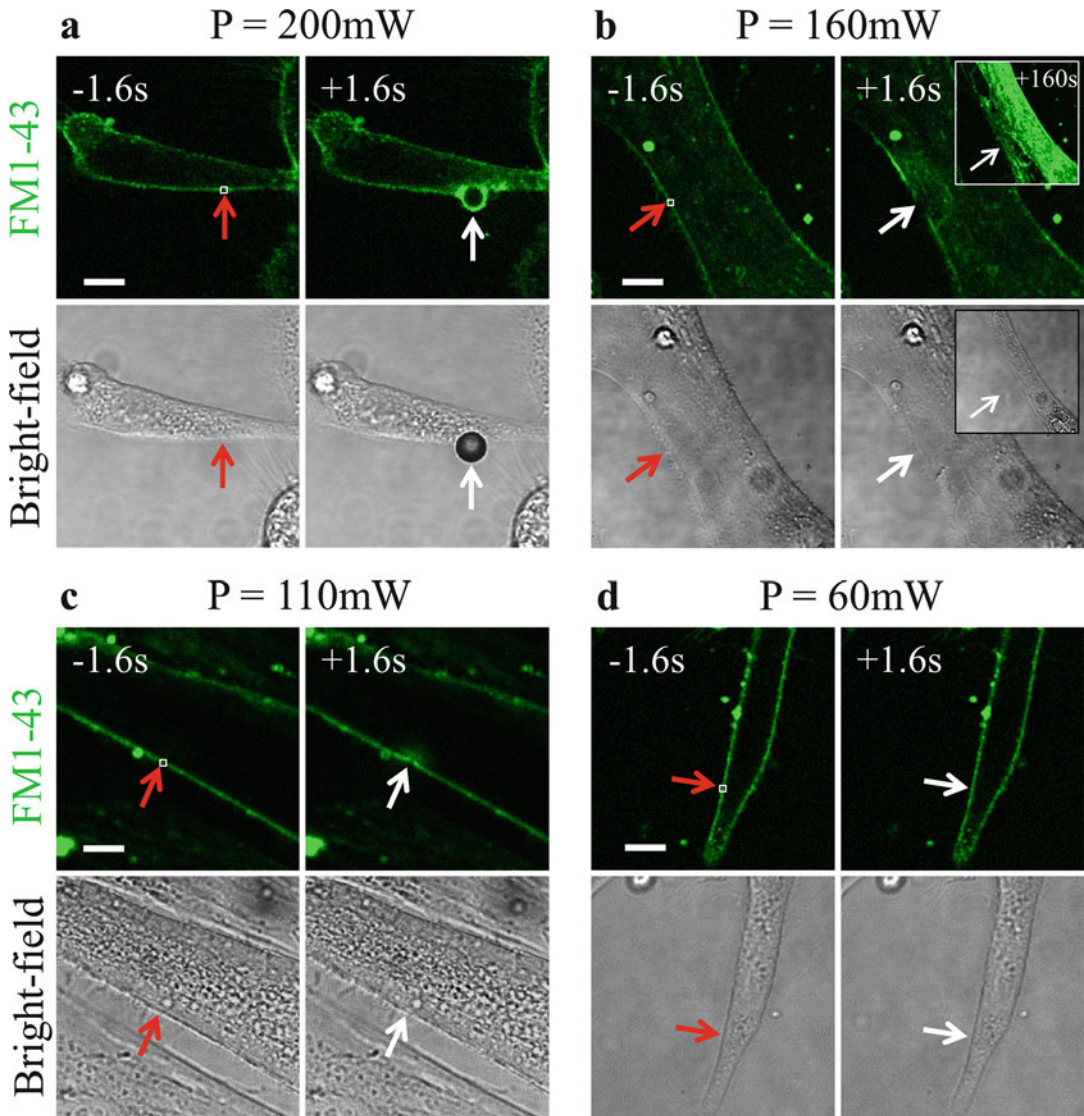


Fig. 5 Influence of IR laser power on membrane damage of LHCN-M2 myotubes. A $1 \times 1 \mu\text{m}$ area (*white square*) of sarcolemma was irradiated with a laser (820 nm) tuned to the power of 200 mW (**a**), 160 mW (**b**), 110 mW (**c**), and 60 mW (**d**). Laser power was measured at the entry of the microscope. Before irradiation, cells were incubated in cold DPBS containing 1 mM Ca^{2+} and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FM1-43 (*green*) and then maintained over ice for at least 5 min. In all images, the area of membrane irradiation is marked with a *red arrow* before irradiation and a *white arrow* after irradiation. *Left-hand and right-hand images* were recorded 1.635 s before and 1.635 s after irradiation, respectively. (**a**) At 200 mW, laser irradiation produces a strong heating of the scanned area and the formation of a large bubble, which results in a major damage of the sarcolemma. (**b**) At 160 mW, rupture spreads over several μm leading to a massive entry of Ca^{2+} into the cell, which often triggers myotube contraction and results in tear of the sarcolemma (*top right inset*). (**c**) At 110 mW, size of rupture is about 1 μm and leads to an immediate entry of FM1-43 into the cell. (**d**) For laser power lower than 110 mW, we randomly observe the presence of membrane disruption. Below 60 mW, laser irradiation has no effect on cell membrane. Scale bars = 10 μm

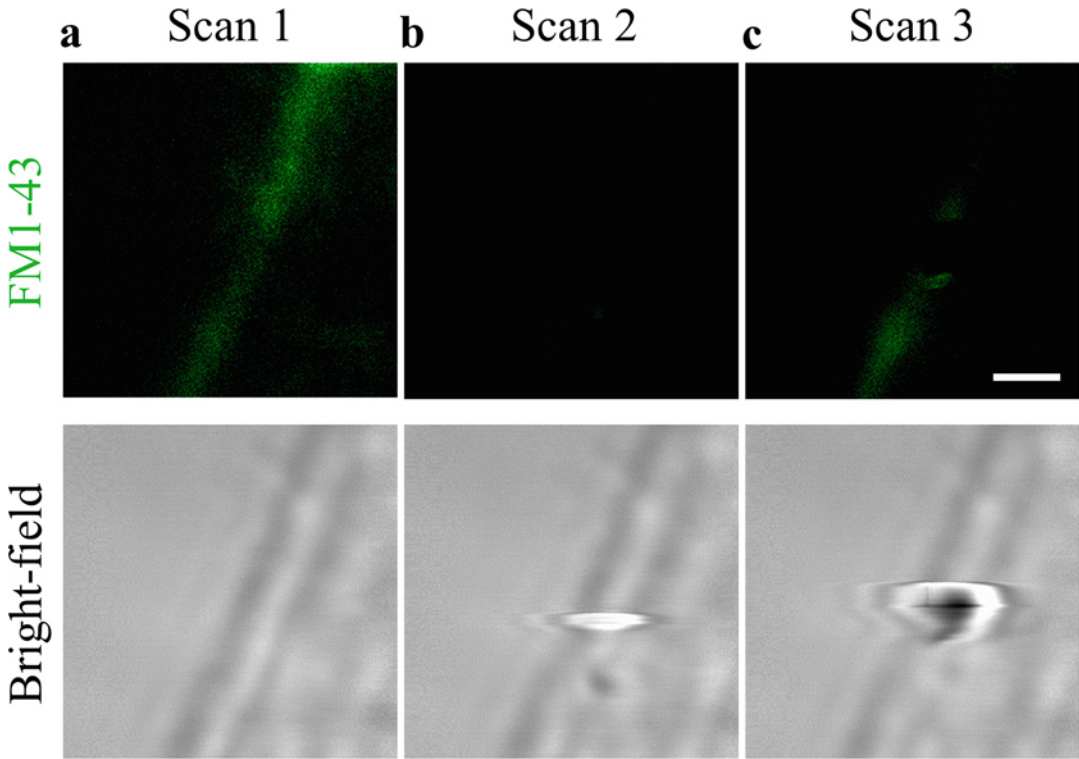


Fig. 6 Sequence of events during laser-induced sarcolemmal injury. Membrane disruption is ensured by scanning three times (scan 1–3) a 1 μm side area with the IR laser tuned at 110 mW in the presence of FM1–43 (*green*). The area is successively observed through fluorescence microscopy (*upper panels*) and bright-field microscopy (*lower panels*) during scanings. (**a**) Scan 1: cell membrane has to be centered within the image. (**b**) Scan 2: Photobleaching of FM1–43 ensures optimal focalization of the IR laser. (**c**) Scan 3: The formation of a bubble reflects the local heating that triggers membrane disruption. Scale bars = 200 nm

Acknowledgment

This work was supported by the AFM-Telethon (Research program 17140 to A.B.). The platform for immortalization of human cells of the Center of Research in Myology (Paris, France) is acknowledged for the gift of human immortalized LHCN-M2 myoblasts. The expert help of Christel Poujol, Philippe Legros, Laure Malicieux, Sébastien Marais, and Fabrice Cordelières at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging, is acknowledged.

References

1. McNeil PL, Khakee R (1992) Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol* 140:1097–1109
2. Clarke MS, Caldwell RW, Chiao H, Miyake K, McNeil PL (1995) Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* 76:927–934

3. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen C-C, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168–172
4. McNeil PL, Vogel SS, Miyake K, Terasaki M (2000) Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci* 113(Pt 1):1891–1902
5. Zhao P, Xu L, Ait-Mou Y, de Tombe PP, Han R (2011) Equal force recovery in dysferlin-deficient and wild-type muscles following saponin exposure. *J Biomed Biotechnol* 2011:235216
6. Thiery J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J (2010) Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115:1582–1593
7. Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A (2009) Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death Differ* 16:1126–1134
8. Terasaki M, Miyake K, McNeil PL (1997) Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca2+-dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol* 139:63–74
9. Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, Tsunoda R, Sugai N (2001) An actin barrier to resealing. *J Cell Sci* 114:3487–3494
10. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH (2003) Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 278:50466–50473
11. Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM (1994) Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263:390–393
12. Togo T, Alderton JM, Bi GQ, Steinhardt RA (1999) The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J Cell Sci* 112:719–731
13. McNeil PL, Baker MM (2001) Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell Tissue Res* 304:141–146
14. Yasuda S, Townsend D, Michele DE, Favre EG, Day SM, Metzger JM (2005) Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 436:1025–1029
15. McNeil PL, Kirchhausen T (2005) An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:499–505
16. Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, d'Estaintot BL, Pöschl E, Brachvogel B, Brisson AR (2011) Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* 2:270
17. Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW (2008) Repair of injured plasma membrane by rapid Ca2+-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 180:905–914
18. Tam C, Idone V, Devlin C, Fernandes MC, Flannery A, He X, Schuchman E, Tabas I, Andrews NW (2010) Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 189:1027–1038
19. Carmeille R, Bouvet F, Tan S, Croissant C, Gounou C, Mamchaoui K, Mouly V, Brisson AR, Bouter A (2016) Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochim Biophys Acta* 1863:2267–2279
20. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, Ko J-K, Lin P, Thornton A, Zhao X, Pan Z, Komazaki S, Brotto M, Takeshima H, Ma J (2009) MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 11:56–64
21. Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F (2014) ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 343:1247136
22. McNeil PL, Miyake K, Vogel SS (2003) The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4592–4597
23. Zhu C-H, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Wright WE (2007) Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6:515–523
24. Humphrey GW, Mekhedov E, Blank PS, de Morree A, Pekkurnaz G, Nagaraju K, Zimmerberg J (2012) GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line. *Exp Cell Res* 318:127–135
25. Carmeille R, Degrelle SA, Plawinski L, Bouvet F, Gounou C, Evain-Brion D, Brisson AR, Bouter A (2015) Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1853(9):2033–2044

Annexe 2

Imaging Membrane Repair in Single Cells Using Correlative Light and Electron Microscopy

Croissant C., Bouvet F., Tan S., Bouter A

Current Protocols in Cell Biology (2018) 81(1)

DOI: 10.1002/cpcb.55

Imaging Membrane Repair in Single Cells Using Correlative Light and Electron Microscopy

Coralie Croissant,¹ Flora Bouvet,¹ Sisareuth Tan,¹ and Anthony Bouter^{1,2}

¹Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects, UMR 5248, CNRS, University of Bordeaux, Pessac, France

²Corresponding author: a.bouter@cbmn.u-bordeaux.fr

Many cells possess the ability to repair plasma membrane disruption in physiological conditions. Growing evidence indicates a correlation between membrane repair and many human diseases. For example, a negative correlation is observed in muscle where failure to reseal sarcolemma may contribute to the development of muscular dystrophies. Instead, a positive correlation is observed in cancer cells where membrane repair may be exacerbated during metastasis. Here we describe a protocol that combines laser technology for membrane damage, immunostaining with gold nanoparticles and imaging by fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM), which allows the characterization of the molecular machinery involved in membrane repair. Fluorescence microscopy enables to determine the subcellular localization of candidate proteins in damaged cells while TEM offers high-resolution ultrastructural analysis of the μm^2 -disruption site, which enables to decipher the membrane repair mechanism. Here we focus on the study of human skeletal muscle cells, for obvious clinical interest, but this protocol is also suitable for other cell types. © 2018 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: correlative light and electron microscopy • gold nanoparticles • laser • membrane repair • human skeletal muscle

How to cite this article:

Croissant, C., Bouvet, F., Tan, S., & Bouter, A. (2018). Imaging membrane repair in single cells using correlative light and electron microscopy. *Current Protocols in Cell Biology*, 81, e55. doi: 10.1002/cpcb.55

INTRODUCTION

Plasma membrane disruption is a physiological event occurring in cells exposed to mechanical stress, such as epithelial or muscle cells. Healthy cells are able to cope with membrane injury, yet the absence or failure in membrane repair lead to cell death and tissue degeneration. For instance, a defect of sarcolemma repair in muscle cells contributes to the development of muscular dystrophies such as Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2B or Miyoshi Myopathy (Bansal et al., 2003). Instead, an exacerbation of membrane repair may explain cancer cell survival during metastasis (Jaiswal et al., 2014; Lauritzen, Boye, & Nylandsted, 2015; Leung, Yu, Lin, Tognon, & Bernatchez, 2013). Unravelling mechanisms of membrane repair requires the identification of proteins involved in the resealing machinery and the elucidation of their function.

While it is possible to highlight a damage of cell membrane *in vivo* (McNeil & Khakee, 1992), the characterization of repair process requires the development of specific methods *in vitro*. Investigating membrane repair raises two technical issues: (1) how to induce plasma membrane injury? and (2) how to observe the repair process? (1) Laser irradiation

Croissant et al.

1 of 19

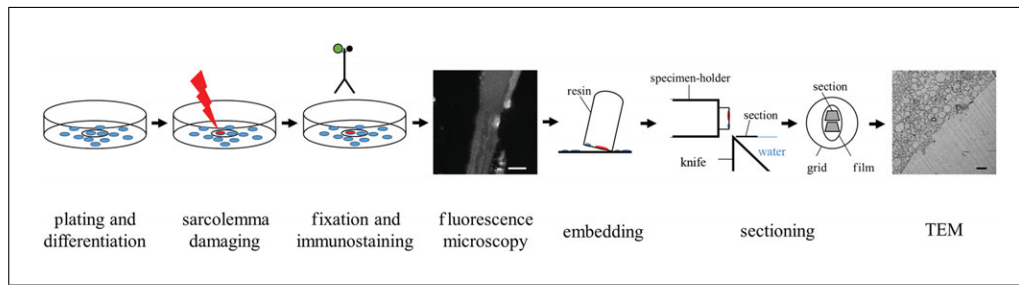


Figure 1 Overview of the protocol. Myoblasts are plated in a MatTek dish and differentiated into myotubes by serum depletion for three days. Sarcolemma is damaged by laser irradiation. Cells are fixed and immunostained for the protein of interest with a secondary antibody conjugated with a fluorophore and a gold nanoparticle, and observed in fluorescence microscopy. Cells are embedded, sectioned, contrast stained, and observed in TEM.

of cell membrane creates ruptures of varying sizes in a tunable fashion and high reproducibility. This method is particularly adapted for studying membrane repair process in muscle cells, which undergo mainly mechanical stresses. (2) Studies on membrane repair were mostly conducted using fluorescence microscopy (Bansal et al., 2003; Bouter et al., 2011; Cai et al., 2009; Jaiswal et al., 2014; Koerdts & Gerke, 2017; Lek et al., 2013; Roostalu & Strähle, 2012). Standard membrane repair assay is based on the use of fluorescent membrane impermeant probes such as FM dyes (Bansal et al., 2003; Carmeille, Croissant, Bouvet, & Bouter, 2017; Miyake & McNeil, 1995) or fluorophore-coupled dextran (McNeil, 2001; Terasaki, Miyake, & McNeil, 1997). Fluorescence imaging enables also to determine the subcellular localization of candidate proteins and/or their dynamics at the damage site during membrane resealing. However, the limited resolution of fluorescence microscopy prevents the ultrastructural analysis of the membrane wound. Instead, TEM enables the study of the membrane disruption site at a nanoscale, but is poorly suited to analyze the dynamics of cellular processes. Thus, we developed a strategy that combines laser-induced injury and correlative light and electron microscopy. Both the subcellular localization of candidate proteins and the ultrastructure of the disruption site can be investigated with this methodology.

Here, we describe how to obtain myotubes, create a plasma membrane disruption, and image a candidate protein in a damaged myotube using fluorescence microscopy and TEM. Figure 1 shows an overview of the procedure, from myoblast plating to TEM imaging. The method consists in cultivating and differentiating myoblasts into myotubes; damaging the sarcolemma by laser irradiation; performing an immunostaining with a secondary antibody conjugated to a fluorophore and a gold nanoparticle; observing the wounded site in fluorescence microscopy; post-fixing, dehydrating and embedding cells; sectioning the resin block containing cells of interest; contrast staining the sections; and observing the membrane disruption site in TEM. This method was successfully applied to demonstrate that Annexin-A5 (AnxA5) binds to the edges of the torn membrane and is present on the surface of lipid vesicles accumulating at the site of membrane injury in human skeletal muscle cells (Carmeille et al., 2016).

INDUCTION OF PLASMA MEMBRANE INJURY

Plasma membrane damage and repair can be respectively performed and studied in any adherent cell type. Here, we used human skeletal myotubes, which need a differentiation step after plating. For other cell types, plate cells in the appropriate medium in order to obtain a confluence of 50% the day when membrane damage is induced by laser irradiation. Cells have to be sufficiently far from the others in order to enable accurate irradiation of single cells. The cells are plated in 35-mm glass-bottom dish equipped with a square-patterned coverslip to find easily the damaged cells in subsequent steps.

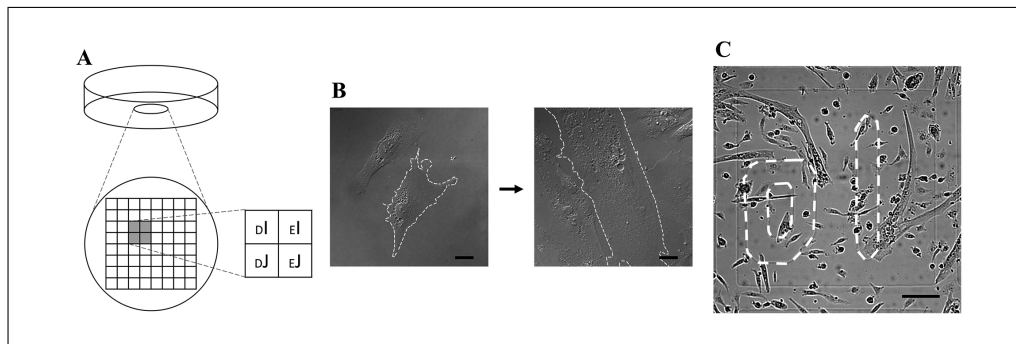


Figure 2 Plating and differentiation of muscle cells. **(A)** Schematic representation of a MatTek dish and the square-patterned coverslip. **(B)** Characteristic images of a myoblast and a myotube observed with an interference contrast microscope. Plasma membrane of one cell is drawn for sake of clarity. **(C)** Muscle cells on the square DI. The letters are drawn with white dashed lines for sake of clarity. Scale bars = 20 μm for **(B)**; scale bar = 100 μm for **(C)**.

Laser irradiation induces membrane injury of varying sizes in a highly controlled and reproducible way, depending mainly on the laser power (Bouter et al., 2011; Carmeille et al., 2017). The maximum size of the membrane rupture that can be repaired is likely to depend on the cell type.

Materials

Appropriate muscle cell line: LHCN-M2 human muscle cells. 650 and 578 human dystrophic cell lines have been also used successfully (Centre of Research in Myology, Paris, France)

Trypsin-EDTA (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 15400-054)

Growth medium (see recipe)

Differentiation medium (see recipe)

Dulbecco's PBS, no calcium, no magnesium (DPBS -/-) (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 14190-094)

2 mM calcium (Ca^{2+}) solution (see recipe)

Thoma cell counting chamber (or any hemocytometer or chamber designed for cell counting)

35-mm glass-bottom dish equipped with a square-patterned coverslip thereafter referred as MatTek dish (MatTek, cat. no. P35G-1.5-14-C-GRID) (Fig. 2A)

Culture incubator at 37°C, 5% CO_2

Two-photon confocal scanning microscope (TCS SP2 AOBS, Leica) equipped with HC PL APO CS 10 \times /0.40 and HCX PL APO CS 63 \times /1.40 oil-objective lenses and a Chameleon-Vision mode-locked titanium-sapphire laser (Coherent) (or an equivalent powerful, pulsed laser and microscopy system)

ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij>) with Bio-Formats plugin

Plating and differentiation of cells

1. Trypsinize growing cells using trypsin-EDTA (60 μl per cm^2) for 5 min at 37°C. Add growth medium (400 μl per cm^2) to stop the trypsinization.
2. Count the cells using a Thoma cell counting chamber.
3. Plate 8×10^5 cells in a total volume of 2 ml growth medium in a MatTek dish.
4. Incubate the dish for 24 hr at 37°C, 5% CO_2 to allow the cells to adhere.
5. Remove growth medium and incubate the cells for 3 days at 37°C, 5% CO_2 with 2 ml differentiation medium for to obtain myotubes (Fig. 2B).

At this step, myoblasts have to be at 80% confluent in order to obtain myotubes sufficiently far from the others, thus enabling accurate irradiation of single myotubes (Fig. 2C).

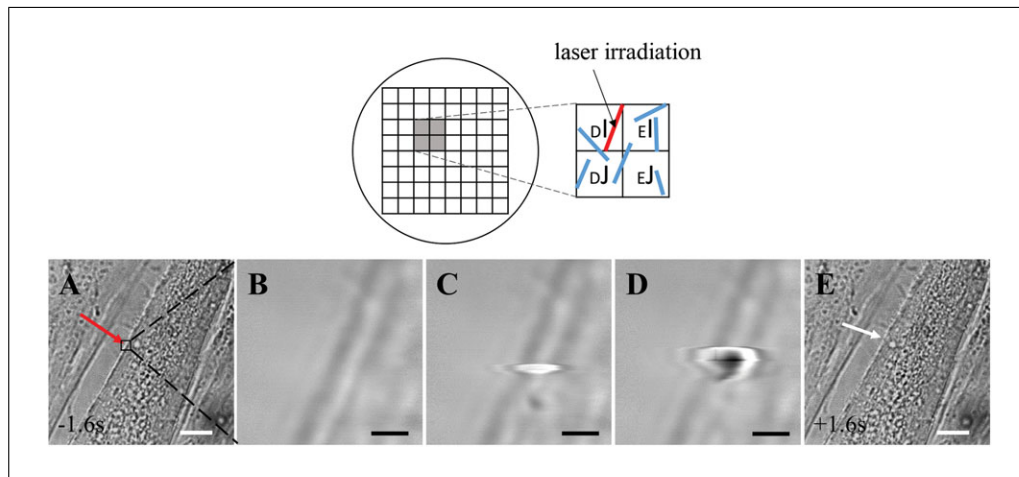


Figure 3 Laser irradiation. **(A)** The myotube before irradiation as observed in bright-field microscopy. The red arrow indicates the site of irradiation (ROI, black square). **(B-D)** Images displaying the ROI during the three successive scans. Irradiation leads to a local warming. The formation of a bubble confirms the membrane rupture. **(E)** The myotube 1.6 sec after irradiation. The white arrow indicates the irradiated site. Scale bars = 10 μm for **(A)** and **(E)**; scale bars = 200 nm for **(B-D)**.

Irradiation

6. Switch on the two-photon confocal scanning microscope.
7. Wash the cells twice, each time with DPBS —/—.
8. Incubate the cells with 2 mM Ca^{2+} solution.
9. Place the MatTek dish on the stage and examine the coverslip at low magnification (physical dimensions of image: 750 \times 750 μm) for locating myotubes.
10. Acquire and save the image displaying the myotubes to be irradiated. Pay particular attention to clearly visualize the alphanumeric code (Fig. 2C).
11. Zoom on a myotube (physical dimensions of image: 119 \times 119 μm) and select the region of interest (ROI) by drawing a square of 1 \times 1 μm on sarcolemma (Fig. 3A). Take a screenshot, displaying the ROI on the sarcolemma of the selected myotube, in order to find easily the wounded site in subsequent steps.
12. Irradiate the cell with the Chameleon-VisionTM mode-locked titanium-sapphire laser working at 820 nm at room temperature (RT). Irradiation consists of three successive scans (1.6 sec per scan) of the ROI with a power of 110 mW (Fig. 3B-D, see also Video 1), as previously described (Carneille et al., 2017).
13. Repeat steps 11 and 12 in order to irradiate 4 to 6 cells.
14. Images acquired with the two-photon confocal scanning SP2 microscope can be opened through the Bio-Formats plugin from the ImageJ software.

Irradiated cells have to be in close proximity to each other in order to be embedded and sectioned together in subsequent steps.

Irradiation has to be done on cell edge and far from nuclei to avoid cell death.

Cell membrane rupture is confirmed when a bubble forms during irradiation (Fig. 3C-D).

See Table 1 for resolving potential issues with laser irradiation.

Table 1 Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Solution
Irradiation does not work	The laser power is too low The focus is not correct	Increase the laser power Adjust the focus
All the cells of the field are irradiated without running the experiment	The laser power is not at 0% outside the step of membrane irradiation	Adjust the power of the titanium:sapphire laser at 0% during <i>pre</i> -irradiation and <i>post</i> -irradiation steps
Some pieces of coverslip remain on the resin block	The coverslip was weakened by cracks	At the ultramicrotome, fix the resin block like in steps 21-22 of Sectioning. Separate the remained coverslip from the resin block with a razor blade, without touching the square of interest
Resin sections are too thin and irregular	The resin is not enough cured	Increase the speed and the feed to 2.5 mm/sec and 80 nm
The sections are cut in their width	The diamond knife is cracked	Try to reassembly the pieces of the section for the collect. Sharpen the diamond knife

INDUCTION OF PLASMA MEMBRANE INJURY IN NON-MUSCLE CELLS BY UV LASER

ALTERNATE PROTOCOL 1

Although this protocol was developed using muscle cells, it is also suitable for other adherent cell types. We have successfully tested Basic Protocol 1 with the following cells:

Cell lines: mouse perivascular cells PVC (Bouter et al., 2011), human trophoblasts BeWo (Carneille et al., 2015), human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7.

Primary cells: human trophoblasts (Carneille et al., 2015).

Most confocal microscopes are suitable for inducing membrane injury, regardless the manufacturer. Provided it is sufficiently powerful, a pulsed UV laser can replace the near-infrared titanium-sapphire laser (Jimenez et al., 2014).

IMMUNOSTAINING AND FLUORESCENCE IMAGING

BASIC PROTOCOL 2

Immunostaining and fluorescence imaging provide information on the cellular localization of the candidate protein after plasma membrane injury. The use of secondary antibody conjugated with both a fluorochrome and a gold nanoparticle allows to correlate fluorescence with TEM imaging.

Materials

- Damaged myotubes in MatTek dish
- 1% (v/v) glutaraldehyde solution (see recipe)
- Dulbecco's PBS with calcium and magnesium (DPBS +/+; Gibco® by Life Technologies, cat. no. 14040-091)
- 25 mM ammonium chloride (NH₄Cl) solution (see recipe)
- Permeabilization solution (see recipe)
- Blocking solution (see recipe)
- Mouse primary antibody

Croissant et al.

5 of 19

Secondary antibody: Alexa Fluor 488- and 1.4-nm gold nanoparticles-conjugated anti-mouse goat antibody (FluoroNanogold, Nanoprobes™, cat. no. 7202)

Olympus IX81 microscope equipped with U-MINIBA2 fluorescence cube (470- to 490-nm bandpass excitation filter, 505-nm dichroic mirror, 510- to 550-nm bandpass emission filter) and with UPlan FLN 10×/0.30 objective and UPlan FLN 60×/1.25 oil-objective lenses (or an equivalent fluorescence microscopy system)

CellSens® software (<https://www.olympus-lifescience.com/en/software/cellsens>) (or an equivalent imaging software)

Immunostaining of cells

1. Immediately after laser irradiation, fix the cells by incubation with 1 ml of 1% glutaraldehyde for 20 min at room temperature.
2. Wash the cells twice, each time with DPBS +/+.
3. Incubate the cells for 15 min with 1 ml of 25 mM NH₄Cl at room temperature in order to neutralize free aldehyde functions.
4. Wash the cells twice, each time with DPBS +/+.
5. Permeabilize and saturate the cells by dispensing 1 ml permeabilization solution for 10 min at room temperature.
6. Wash the cells twice, each time with blocking solution.
7. Incubate the cells with appropriate mouse primary antibody for 1 hr at room temperature.
8. Wash the cells for 7 min with blocking solution. Repeat wash twice more.
9. Incubate the cells with secondary Alexa Fluor 488- and 1.4-nm gold nanoparticles-conjugated anti-mouse goat antibody, 1:100, for 1 hr at room temperature.
10. Wash the cells for 7 min with blocking solution. Repeat wash twice more.
11. Wash the cells three times, each time with DPBS +/+.

Fluorescence microscopy

12. Switch on the microscope, the fluorescence lamp and the computer.
13. Launch CellSens® software.
14. Depose an oil drop on the 60× oil-objective lens and switch to the 10× objective lens.
15. In bright-field microscopy, find the area containing the irradiated myotubes.
16. Switch to 60× oil-objective lens, and select the optimal focus. Image the irradiated myotubes in both bright-field and fluorescence microscopy (Fig. 6A-B). Save images in TIFF format.
17. Clean the 60× oil-objective lens and the MatTek dish, and switch back to the 10× objective lens.
18. In bright-field microscopy, find back the area containing the irradiated myotubes. By means of the light beam, mark the position on the external side of the coverslip of the MatTek dish with a dot drawn by a permanent fine-tipped black ink laboratory marker.

The mark has to be easily visible to embed cells of interest in the subsequent step. As the mark is on the external side of the coverslip of the MatTek, the successive incubations with ethanol will not wash it away.

SAMPLE PREPARATION FOR TEM IMAGING

After fluorescence observation, cells are prepared for TEM imaging. The treatments include post-fixation, dehydration, embedding, sectioning, and contrast staining. The step of silver enhancement after post-fixation allows the increase of gold bead size for optimal TEM observation.

Materials

Damaged and immunostained cells in MatTek dish (see Basic Protocol 2)
Karnovsky fixative (see recipe)
Deionized water
Silver enhancement kit (Nanoprobes, cat. no. 2012)
Sodium cacodylate buffer (see recipe)
Osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, cat. no. 75633)
30%, 50%, 70%, 90%, and 100% ethanol (EtOH) (Sigma-Aldrich)
Epon-Araldite resin (see recipe)
Liquid nitrogen (Cryo-Distribution)
Butvar solution (see recipe)
Uranyl acetate solution (see recipe)
Sodium hydroxide (NaOH) pellets (Sigma-Aldrich, cat. no. 71687)
Lead citrate solution (see recipe)

Razor blade
Plastic cup
Gelatin capsule, size 0 (Agar Scientific, cat. no. G29200)
60°C oven
1 × 2 mm slot copper grids (Pelco[®], Ted Pella, Inc, 1GC12H)
UV light
Crystallizing dish
Transfer pipets
Parafilm
EM UC7 ultramicrotome (Leica)
Ultra 35° diamond knife (Diatome)
Human eyelash mounted on a stick
Syringes (Terumo)
0.22- μ m filter (Millex[®])
65-mm glass petri dish
150-mm glass petri dish

Post-fixation, dehydration and embedding

1. Post-fix the cells by dispensing 1 ml of Karnovsky fixative overnight at 4°C.
2. Wash five times, each time with deionized water.
3. Incubate the cells with the silver enhancement kit for 6 min at room temperature according to manufacturer's instructions.
4. Wash five times, each time with deionized water.
5. Wash twice, each time with sodium cacodylate buffer.

6. Incubate the cells with freshly prepared 1% (v/v) osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer for 1 hr at room temperature.

CAUTION: Osmium tetroxide is highly toxic upon swallowing, on inhalation, and on contact with the skin. Use gloves, laboratory coat and mask. Handling osmium tetroxide in a fume hood.

7. Wash three times, each time with sodium cacodylate buffer.
8. Dehydrate the cells with successive EtOH incubations at room temperature: 30% EtOH for 5 min, 50% EtOH for 5 min, 70% EtOH for 10 min, 90% EtOH for 10 min, and twice 100% EtOH for 15 min.

9. Incubate the cells with 1/3 Epon-Araldite resin and 2/3 EtOH for 1 hr at room temperature.

CAUTION: Epon-Araldite resin is harmful. Use gloves and laboratory coat. Resin blocks are harmless after curing.

10. Incubate the cells with 2/3 Epon-Araldite resin and 1/3 EtOH for 1 hr at room temperature.
11. Wash the cells on the glass coverslip with pure Epon-Araldite resin.
12. Carefully separate the glass coverslip from the plastic dish using a razor blade and place the coverslip in a plastic cup cell side up.
13. Fill to the brim a half of a gelatin capsule with Epon-Araldite resin and embed the cells of interest by inverting the capsule over the marked area. Incubate overnight at 37°C.

After curing, the result will be a capsule-shaped peg of polymerized Epon with its base on the marked cell region.

14. Transfer the coverslip-capsule assembly for 24 hr in an oven heated to 60°C.
15. To separate the resin block from the coverslip, realize a thermal shock by diving the assembly in liquid nitrogen for few seconds, and then in water warmed to ebullition for few seconds and carefully remove the coverslip.

The coverslip has to be removed in one piece to avoid cracks on the resin surface.

Once cured and separated from the coverslip, resin blocks may be stored at RT indefinitely.

CAUTION: Liquid nitrogen is a cryogen. Use gloves, goggles, laboratory coat, and closed-toed shoes. Handling liquid nitrogen in a well-ventilated area.

Preparation of butvar-coated grids

16. Incubate the grids, matt side up, under UV for 5 min.
17. Fill a crystallizing dish with deionized water. Using a transfer pipet positioned 10-cm above the water surface, place a drop of 1% butvar solution.
18. Depose the matt side of the grids on the white butvar film.

According to its thickness, the butvar film varies in color. Yellow and blue butvar films are thicker than the white one. The film has to be as thin as possible for optimal TEM observation.

19. Collect the grids with Parafilm and dry them overnight at 37°C.

Store them at room temperature in a petri dish.

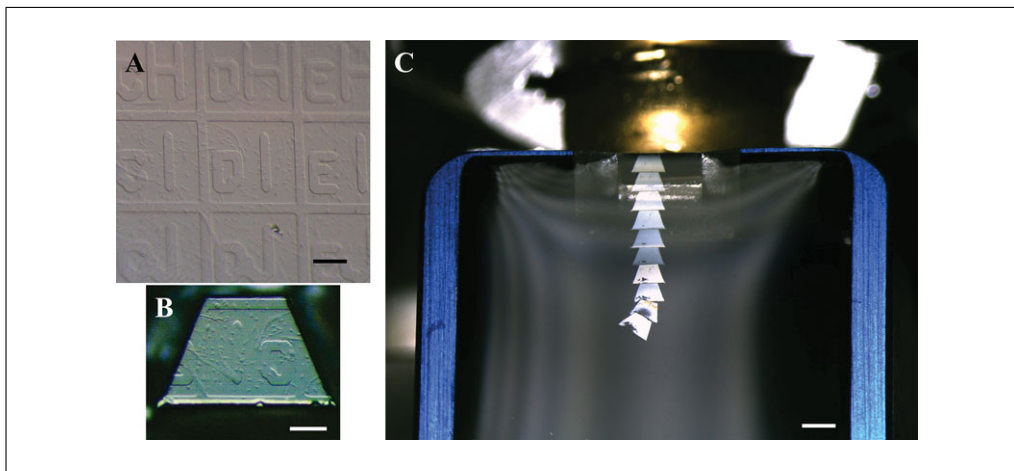


Figure 4 Sectioning. **(A)** Embedded cells with pattern print. **(B)** Trapezium displaying the square DI. **(C)** 10 sections on the water surface. Scale bar = 200 μm in **(A)** and **(B)**; scale bar = 1 mm in **(C)**.

Sectioning

20. Switch on the ultramicrotome.
21. Fix the resin block in the specimen holder of the segment arc and lock the assembly in the trimming block using the trimming adaptor.
See Table 1 for resolving potential issues with sectioning.
22. Switch on the toplight and/or the spotlights to see the pattern printed on the resin surface (Fig. 4A).
23. Cut the resin block surface in a trapezoidal shape using a razor blade to isolate the square containing the cells of interest. Take a snapshot of the trapezium to find the cells of interest easily in subsequent steps (Fig. 4B).

Do not crack the resin surface to avoid sections falling apart during sectioning.

24. Install the segment arc in the specimen arm.
25. Fix the knife in the knife block and lock the assembly in the trimming block.
26. Switch off the toplight and switch on the backlight.
27. Carefully approach the knife edge of the trapezium surface by N-S coarse and step movements.
28. Align the knife with the trapezium surface (Fig. 5).

The larger side of the trapezium has to be the lower one to allow correct sections. It must be parallel to the knife edge.

The backlight reflecting on the knife edge creates a light band on the trapezoidal surface. This light band must be equidistant from the knife all along the larger side of the trapezium (Fig. 5A).

When moving the resin block with the hand wheel, the light band on the trapezium must maintain the same width (Fig. 5B).

The alignment has to be as perfect as possible in order to collect sections representing 80% or more of trapezium area during the beginning of sectioning (see bottom sections of Fig. 4C).

29. **Define the cutting window:** Turn the hand wheel so the lower side of the trapezium is approximately 1-mm above the knife edge. Press START on the screen. Move the

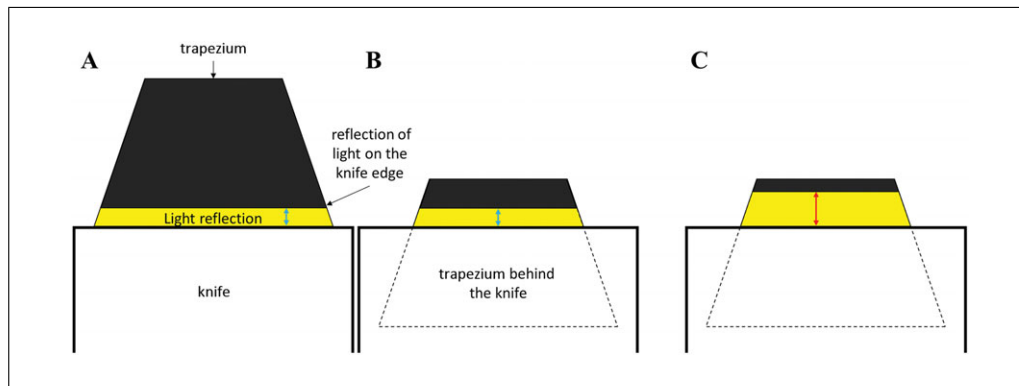


Figure 5 Alignment of the trapezium with the knife. The width of the light band (blue arrow in **A** and **B**) has to be constant when moving the resin block with the hand wheel. (**C**) shows an incorrect alignment: the width of the light band (red arrow) is superior to the one of the light band in (**A**) (blue arrow).

resin block down until the upper side is below the knife edge. Press END on the screen.

30. Select 2 mm/sec speed and 65 nm feed on the screen.
31. Fill the whole knife cistern with deionized water. The water surface has to be as flat as possible. To check it, switch on the toplight, the water surface has to reflect the light (Fig. 4C).
32. Press the button START to start sectioning. Remove resin remains from the knife edge with a lash during the return stroke.
33. Press the button STOP when there are approximately 10 sections on the water surface (Fig. 4C). Carefully separate groups of 1 to 3 sections by disrupting the water surface with a lash and collect each group of 1 to 3 sections with the matt side of the butvar-coated grids. Note the height of each section (the first one corresponds to 0 nm, the second one to 65 nm, etc.).

If the alignment was not perfect, start collecting sections when the first one represents at least 50% of the trapezium area.

Do not touch the sections with the lash to avoid breaking them.

See Table 1 for resolving potential issues with sectioning.

34. Repeat steps 32 to 33 to collect between 15 and 20 sections (corresponding to approximately 1.3 μm of total sectioning).

Contrast staining

35. On Parafilm, place a drop of 2.5% uranyl acetate per grid using a syringe equipped with a 0.22- μm filter, and incubate the grids for 10 min at room temperature in the dark.
36. Wash the grids four times for 5 min with drops of deionized water and dry for 10 min at room temperature.
37. Place a 65-mm glass petri dish filled of NaOH pellets in a 150-mm glass petri dish. Place a drop per grid of 1% lead citrate on a piece of Parafilm in the larger dish using a syringe equipped with a 0.22- μm filter. Remove the lid of the small dish and close the lid of the large one. Incubate the grids for 5 min at room temperature. NaOH traps CO_2 and prevents the precipitation of lead citrate.

CAUTION: *Sodium hydroxide is corrosive. Use gloves and lab coat.*

38. Wash the grids four times for 5 min with drops of deionized water and dry for 10 min at room temperature before storage.

Grids may be observed in TEM immediately after contrast staining, provided that they are well dried.

After contrast staining, grids may be stored indefinitely at room temperature.

TEM IMAGING

The damaged area of irradiated cells is imaged at low magnifications to observe the general structure of the disruption site, and at high magnifications to observe the ultrastructure and the distribution of the candidate protein labelled with gold nanoparticles-conjugated antibody.

Materials

Grids with contrast-stained sections (see Basic Protocol 3)

Liquid nitrogen

120 kV CM120 (FEI) transmission electron microscope equipped with a USC1000 slow scan CCD camera (Gatan, CA, USA) (or an equivalent electron microscope)

DigitalMicrograph[®] software (or an equivalent software)

1. Switch on the CM120 TEM and install a grid.
2. Launch DigitalMicrograph[®] software.
3. Switch to 35 \times magnification to see the trapezium, and center the zone including irradiated cells. Use images taken with the bright-field microscope (Fig. 2C) and the ultramicrotome (Fig. 4B) as benchmarks.
4. Switch to 100 \times magnification to find and center the wounded site of the irradiated myotube.
5. Switch to 5000 \times magnification to adjust the eucentricity.
6. Select 5 sec exposure time and the optimal focus and take images of the wounded site at 100 \times , 600 \times , 1000 \times , 3000 \times , and 5000 \times magnification (Fig. 6C-F). Save images in dm3 format.
7. Repeat steps 3 to 6 for imaging the other irradiated myotubes.

REAGENTS AND SOLUTIONS

Blocking solution

2% (w/v) BSA in DPBS +/-

Store up to 1 month at 4°C

Butvar solution

1% (w/v) butvar (Electron Microscopy Sciences, cat. no. 11850) in pure chloroform (Sigma-Aldrich, cat. no. 437581)

Store up to 12 months at room temperature

CAUTION: Chloroform is a fire hazard and toxic upon swallowing and on inhalation. Use gloves, laboratory coat and mask. Handling chloroform in a fume hood.

Ca²⁺ solution

2 mM Ca²⁺ (Sigma-Aldrich) in Dulbecco's PBS, no calcium, no magnesium (DPBS -/-) (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 14190-094)

Store up to 6 months at 4°C

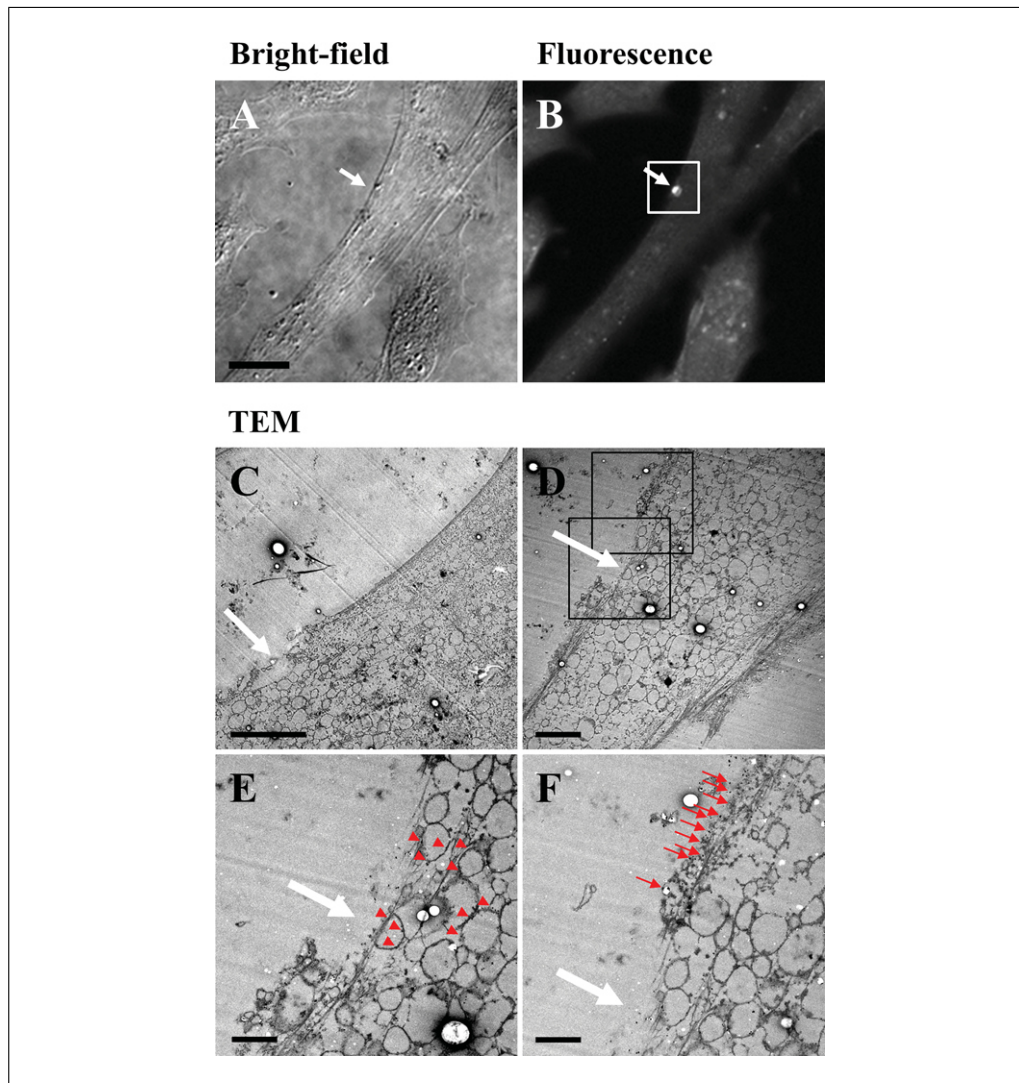


Figure 6 Correlative Light and Electron Microscopy. The injured and immunostained myotube observed in interference contrast (**A**) and fluorescence (**B**) microscopy. The white arrow indicates the wounded site, where the candidate protein accumulated. Scale bar = 20 μm . The same myotube is observed in TEM at low (**C** and **D**) and high (**E** and **F**) magnifications. The white arrow indicates the wounded site. Red arrowheads and arrows indicate gold particles that correspond to AnxA5, which interacts with intracellular vesicles and the edges of the torn membrane, respectively. Scale bars = 5 μm for (**A**) and (**B**); scale bars = 1 μm for (**C**) and (**D**).

Differentiation medium

Four volumes of DMEM high-glucose + GlutamaxTM without pyruvate (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 61965-026)

One volume of 199 medium + GlutamaxTM (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 41150-020)

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin solution human (Sigma-Aldrich, cat. no. I9278)

Store up to 2 months at 4°C

Epon-Araldite resin

11.6 g agar 100 (Agar Scientific, cat. no. R1044)

24.8 g dodecenylsuccinic anhydride (DDSA; Agar Scientific, cat. no. R1051)

9.4 g Araldite CY212-TAAB (Agar Scientific, cat. no. R1041)

1.5 ml of 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30; Agar Scientific, cat. no. R1064)

Store up to 3 months at -20°C

CAUTION: *Agar 100 and araldite are harmful. DDSA and DMP30 are corrosive. Use gloves and laboratory coat. Handling DMP30 in a fume hood.*

Glutaraldehyde solution

1% (v/v) glutaraldehyde (Agar Scientific, cat. no. R1020) in Dulbecco's PBS with calcium and magnesium (DPBS +/+) (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 14040-091)

Store up to 6 months at 4°C

CAUTION: *Glutaraldehyde is toxic upon swallowing, on inhalation, and on contact with the skin. Use gloves and laboratory coat. Handling glutaraldehyde in a fume hood.*

Growth medium

Four volumes of DMEM high glucose + Glutamax[™] without pyruvate

One volume of 199 medium + Glutamax[™]

20% (final concentration) fetal bovine serum (FBS; Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 10500-064)

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin (Gibco[®] by Life Technologies, cat. no. 15750-037)

Skeletal muscle cell growth medium supplement mix (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fetuin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dexamethasone) (Promocell, cat. no. C-39365) according to manufacturer's instructions

Store up to 2 months at 4°C

Karnovsky fixative

4% (v/v) paraformaldehyde (Agar Scientific, cat. no. R1026)

2.5% (v/v) glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer

Store up to 6 months at 4°C

CAUTION: *All of these products are toxic. Use gloves and laboratory coat. Handling Karnovsky fixative in a fume hood.*

Lead citrate solution

1% (w/v) lead citrate (Electron Microscopy Sciences, cat. no. 17800) in deionized water

Store up to 6 months at room temperature

CAUTION: *Lead citrate is toxic upon swallowing, on inhalation, and on contact with the skin. Use gloves and laboratory coat. Handling lead citrate in a fume hood.*

NH_4Cl solution

25 mM NH_4Cl (Sigma-Aldrich, cat. no. A9434) in DPBS +/+

Store up to 6 months at 4°C

Permeabilization solution

0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, cat. no. X100)

2% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, cat. no. A3912) in DPBS +/+

Store up to 2 months at 4°C

Sodium cacodylate buffer

0.1 M sodium cacodylate (Agar Scientific, cat. no. R1104) in deionized water, pH 7.4

Store up to 6 months at 4°C

CAUTION: *Sodium cacodylate is toxic upon swallowing, on inhalation, and on contact with the skin. Use gloves, laboratory coat and mask. Handling sodium cacodylate in a fume hood.*

Uranyl acetate solution

2.5% (w/v) uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, cat. no. 22400) in deionized water

Store up to 6 months at room temperature in the dark.

CAUTION: *Dehydrated uranyl acetate is toxic upon swallowing, on inhalation, and on contact with the skin. Use gloves, laboratory coat and mask.*

COMMENTARY

Background Information

Cell membrane repair

In physiological conditions, plasma membrane disruption is frequently observed in cells from many tissues, such as skeletal or cardiac muscle, skin, gut epithelium or vascular endothelium, which are exposed to mechanical stress (McNeil & Steinhardt, 2003). In pathological conditions, the absence of membrane repair leads to cell death and may contribute to the development of diseases such as muscular dystrophies (Glover & Brown, 2007).

Although small disruptions may reseal spontaneously in pure liposomes and erythrocyte membranes, the presence of a cortical cytoskeleton in cells creates considerable membrane tension, which prevents passive resealing (Sheetz & Dai, 1996). In eukaryotic cells, membrane resealing is an active process that requires extracellular Ca^{2+} , intracellular vesicles and a step of Ca^{2+} -dependent exocytosis (Steinhardt, Bi, & Alderton, 1994). Indeed, plasma membrane disruption leads to a rapid increase in the intracellular Ca^{2+} concentration, which is in the μM range in cell resting state while the extracellular Ca^{2+} concentration is in the mM range. In the classical model, which has been proposed by Paul McNeil in the late 1990's, increasing concentration of intracellular Ca^{2+} activates the fusion of cytoplasmic vesicles and the formation of a lipid patch, which allows the resealing of the membrane rupture through an exocytosis-like process (McNeil, Vogel, Miyake, & Terasaki, 2000; Miyake & McNeil, 1995). Paul McNeil hypothesized that several fusion pores can be created between the edge of the patch and the cell membrane surrounding the disruption site, similarly to the "vertex" fusion process that is observed when two yeast vacuoles fuse (Wang, Seeley, Wickner, & Merz, 2002). The complete connection between the lipid patch and the cell membrane may occur by lateral expansion of the fusion pores. While the main part of the lipid patch, as well as the area from the

damaged cell membrane, is released into the extracellular milieu, the inner part of the lipid patch may restore the cell membrane at the damaged site (McNeil & Kirchhausen, 2005). Actually, other mechanisms of membrane repair have been described. It has been observed that the entry of Ca^{2+} into injured cells induces the secretion of lysosomal acid sphingomyelinase (Idone et al., 2008; Tam et al., 2010), which activates hydrolysis of the phosphorylcholine head groups of sphingomyelin and subsequently ceramide-driven membrane invagination, giving rise to the lesion removal by endocytosis (Andrews, Almeida, & Corrotte, 2014; Idone et al., 2008; Tam et al., 2010). In addition, the processes of membrane resealing and lesion removal can also be achieved by microvesicle shedding (Babiychuk, Monastyrskaya, Potez, & Draeger, 2009, 2011) involving the ESCRT machinery (Jimenez et al., 2014) or neutral sphingomyelinase that triggers ceramide production in the inner leaflet of plasma membrane, giving rise to an outward curvature (Draeger, Monastyrskaya, & Babiychuk, 2011).

The implementation of one or a combination of membrane repair mechanisms depends probably on the size and the type of injury. Nevertheless, the existence of these mechanisms and the molecular processes they imply still remain the topic of intense debate. Deciphering the membrane repair processes requires to develop specific methods enabling high-resolution analysis of the wounded membrane. The methodology that we describe in this Unit contributes to this purpose.

Annexins in membrane repair

Besides Ca^{2+} and cytoplasmic vesicles, the repair machinery is composed by several proteins such as MG53 or dysferlin, a protein the gene mutations of which are responsible for LGMD type-2B and Miyoshi myopathy (Liu et al., 1998). Dysferlin participates in the membrane fusion step of the repair process (Bansal & Campbell, 2004; Bansal et al., 2003; Lennon

et al., 2003). MG53 is a muscle-specific protein that becomes crosslinked when oxidants enter the cell through a plasma membrane disruption (Cai et al., 2009; Cai et al., 2009). MG53 interacts with caveolin-3 and dysferlin, and a defective caveolin-3 is strongly suspected to be the main protagonist in the development of LGMD type-1C (Minetti et al., 1998). Several members of the annexins (Anx) family may also belong to the membrane repair machinery.

Anx (12 members in humans) are proteins that share the property of binding to negatively charged lipid membranes, principally those containing phosphatidylserine (PS) in a Ca^{2+} -dependent manner (Gerke, Creutz, & Moss, 2005). In primary murine muscle cells, AnxA1 and AnxA2 have been shown to aggregate cytoplasmic vesicles, forming the lipid patch that reseals the cell membrane disruption (Lennon et al., 2003). In zebrafish, sarcolemma repair may be based on the formation of a scaffold involving dysferlin, AnxA6, AnxA2 and AnxA1 (Roostalu & Strähle, 2012). Moreover, an atypical isoform of AnxA7 has been reported in mdx mouse, a genetic model for Duchenne muscular dystrophy (Selbert et al., 1996).

We have shown that AnxA5 participates in membrane repair of murine perivascular cells, human trophoblasts and human muscle fibers, through its property of forming 2D-ordered arrays when interacting with biological membranes (Bouter et al., 2011). We have proposed that Anx family forms an emergency team that orchestrates the cell membrane repair machinery and protects cells against the direct and collateral effects of plasma membrane disruption.

If components of the repair machinery start being identified, the exhaustive list of proteins involved in this fundamental process remains to be established. Moreover, the specific function associated to each protein remains to be elucidated. Immuno-TEM experiment is a suitable technique for addressing these issues.

Induction of plasma membrane injury

Two main approaches exist to induce membrane damage: chemical treatment and mechanical injury. Chemical treatment is based on the use of detergent (McNeil et al., 2000) or pore-forming toxins such as streptolysin-O (Babychuk et al., 2009). These treatments form small pores (<100 nm) on the overall plasma membrane surface, whereas mechanical injury leads to larger (from 100 nm to few μm) and less numerous or unique

wounds (Jimenez & Perez, 2017). Mechanical injury methods include the use of a needle (Terasaki et al., 1997), mechanical shearing (McNeil & Baker, 2001) or stretching (Yasuda et al., 2005), or laser irradiation (Bansal et al., 2003; Bouter et al., 2011; Clarke, Caldwell, Chiao, Miyake, & McNeil, 1995; Koerdts & Gerke, 2017; McNeil, Miyake, & Vogel, 2003). Membrane damages induced by a needle or a mechanical shearing or stretching lack of reproducibility, due to the variation of physical forces applied on cells from one experiment to another. Instead, laser irradiation offers the system the ability to create ruptures of varying sizes in a tunable fashion and high reproducibility.

Cell imaging for studying membrane repair

Cell imaging is the most suitable approach for studying plasma membrane repair. Fluorescence microscopy, whether confocal or super-resolution techniques (Lek et al., 2013; Middel et al., 2016), electron microscopy (Carneille et al., 2016; Miyake & McNeil, 1995) and atomic force microscopy (Boye et al., 2017; Miyagi, Chipot, Rangl, & Scheuring, 2016) have been successfully used in this context. Cellular structures that are involved in membrane resealing and have to be spatially resolved are plasma membrane (5- to 10-nm thick), cytoplasmic vesicles (diameter range from 50 to 500 nm), organelles (μm -size), microfilaments (6 nm in diameter) and microtubules (20 to 25 nm in diameter). The limit of lateral resolution in fluorescence microscopy depends on the emission wavelength (λ) of the fluorophore and the numerical aperture (NA) of the microscope objective. Resolution limits (r) in wide-field and confocal microscopy are given by: $r = (0.61 * \lambda) / \text{NA}$ and $r = (0.4 * \lambda) / \text{NA}$, respectively. For standard objectives (NA from 1 to 1.4) and fluorophores emitting around 520 nm (Fluorescein, GFP, Alexa488TM or Fluoprobe488TM), the limit of lateral resolution is about 180 nm with confocal microscopy. With super-resolution techniques, such as STED, PALM or STORM, the resolution limit decreases to 20 to 50 nm.

While the lateral resolution of transmission electron microscopy is limited mainly by spherical aberration to about 1 angström, the practical resolution of biological sample images is close to 2 to 4 nm with conventional preparation techniques such as thin sectioning or negative staining. Recently, Cryo-TEM studies of isolated macromolecules performed with the help of last generation

cameras have reported the determination of molecular structures in the 3-ångström range (Fischer et al., 2015; Haselbach et al., 2018). Electron microscopy represents therefore the most powerful approach for cell imaging at (sub-)nanometer resolution.

In this unit, we describe a protocol enabling to study the subcellular localization of an endogenous protein by immunostaining. The expression of a fluorescent fusion protein instead of a staining by immunocytofluorescence might be also envisioned since many studies dealing with the dynamics of chimeric fluorescent proteins during cell membrane rupture and repair have been reported (Cai et al., 2009; Jimenez et al., 2014; Roostalu & Strähle, 2012). In this case, an immuno-TEM experiment using a secondary antibody coupled only to a gold nanoparticle may be sufficient, in order to correlate observation in fluorescence microscopy with electron microscopy. This approach might benefit from the resolution of electron microscopy and the suitability of fluorescence microscopy for cell live imaging.

Critical Parameters

The most critical steps are plating, irradiation, and sectioning.

During plating, myoblasts have to be at 80% confluence in order to obtain myotubes sufficiently far from the others. For other cell types, plate cells in order to obtain a confluence of 50% the day when plasma membrane damage is induced. Cells have to be sufficiently far from the others in order to enable accurate irradiation of single cells.

Damaged cells have to be in close proximity to each other in order to be embedded and sectioned together in subsequent steps. Irradiation has to be done on cell edge and far from nuclei to avoid cell death. Cell membrane disruption is confirmed when a bubble forms during irradiation (Fig. 3C-D).

Before sectioning, the coverslip has to be removed in one piece to avoid cracks on the resin surface. The alignment of the knife with the trapezium surface has to be as perfect as possible in order to collect sections representing 80% or more of trapezium area during the beginning of sectioning (Fig. 4C). Sections are fragile; do not touch them with the lash during the collection with the butvar-coated grids.

Troubleshooting

Issues that may be encountered during irradiation or sectioning steps and troubleshooting are summarized in Table 1.

Anticipated Results

Our approach combines laser-induced injury and correlative light and electron microscopy in order to determine the subcellular localization of candidate proteins in both fluorescence and electron microscopy at the wounded site. Although the protocol was developed on muscle cells, it may be suitable for other adherent cell types. Transmission electron microscopy approach enables to study the ultrastructure of the site of injury at a nanoscale.

By the means of this strategy, we have demonstrated that AnxA5 binds to the edges of the torn membrane and is also present on the surface of lipid vesicles accumulating at the site of injury in human skeletal muscle cells (Carmeille et al., 2016) (Fig. 6). It is likely that AnxA5 molecules binding to PS exposed at the edges of the torn membrane self-assemble into 2D arrays. The formation of 2D arrays strengthens the damaged sarcolemma, counteracts the tensions exerted by the cortical cytoskeleton and thus prevents the expansion of the tear. In addition, we have observed that the accumulation of lipid vesicles forms a lipid patch, which ensures membrane resealing. AnxA5 may participate in the formation of this lipid patch by clustering intracellular vesicles, as reported for synaptic vesicles in rat central nervous tissue (Gotow, Sakata, Funakoshi, & Uchiyama, 1996).

Finally, we have also shown that vesicle accumulation is absent at the wounded site in dystrophic muscle cells (Carmeille et al., 2016). This absence may explain the origin of the failure of repair, contributing to the development of the disease (Carmeille et al., 2016). The application of this methodology to other cell types, such as cancer cells, may participate in a better understanding of membrane repair mechanisms and in finding therapeutic targets against pathologies like myopathies or cancers.

Time Considerations

A complete session from myoblast plating to collection of images in TEM takes 8 to 15 days. Plating of cells and differentiation requires 4 days. If cells do not need differentiation, irradiation may be realized the day after plating. A session of irradiation lasts 1 hr to induce plasma membrane damage of 4 to 6 cells. Cells have to be fixed immediately at the end of the irradiation session. Fixing cells and immunostaining requires 4 hr, followed by 1 hr of fluorescence microscopy. Post-fixation has to last at least overnight, but may last several

days. Dehydration and embedding take 1 day, followed by 1 day of curing. Once separated from the coverslip, resin blocks may be stored indefinitely at room temperature. Sectioning lasts 2 hr, followed by 1 hr 30 min of contrast staining. The grids may be stored carefully at RT indefinitely before observation. Finally, TEM imaging takes between 2 and 3 hr per section.

Supporting Information

The supporting Information text file discussed in this article can only be accessed from the online version of this article.

Acknowledgements

This work was supported by the AFM-Telethon (Research program 17140 to A.B. and PhD fellowship 20491 to C.C.). The platform for immortalization of human cells of the Center of Research in Myology (Paris, France) is acknowledged for the gift of human immortalized LHCN-M2 myoblasts. The electron microscopy facility of the UMS 3033/US001 from the Bordeaux University is acknowledged for TEM imaging. The expert help of Christel Poujol, Laure Malicieux, Sébastien Marais, and Fabrice Cordelières at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging, is also acknowledged.

Literature Cited

- Andrews, N. W., Almeida, P. E., & Corrotte, M. (2014). Damage control: Cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends in Cell Biology*, *24*, 734–742. doi: 10.1016/j.tcb.2014.07.008.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation*, *18*, 80–89. doi: 10.1038/cdd.2010.81.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2009). Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation*, *16*, 1126–1134. doi: 10.1038/cdd.2009.30.
- Bansal, D., & Campbell, K. P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in Cell Biology*, *14*, 206–213. doi: 10.1016/j.tcb.2004.03.001.
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., ... Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, *423*, 168–172. doi: 10.1038/nature01573.
- Bouter, A., Gounou, C., Bérat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., ... Brisson, A. R. (2011). Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature Communications*, *2*, 270. doi:10.1038/ncomms1270.
- Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., ... Nylandsted, J. (2017). Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications*, *8*, 1623. doi:10.1038/s41467-017-01743-6.
- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., ... Ma, J. (2009). MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature Cell Biology*, *11*, 56–64. doi: 10.1038/ncb1812.
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.-K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., ... Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*, 15894–15902. doi: 10.1074/jbc.M109.009589.
- Carmeille, R., Bouvet, F., Tan, S., Croissant, C., Gounou, C., Mamchaoui, K., ... Bouter, A. (2016). Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1863*, 2267–2279. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.06.003.
- Carmeille, R., Croissant, C., Bouvet, F., & Bouter, A. (2017). Membrane repair assay for human skeletal muscle cells. *Methods in Molecular Biology*, *1668*, 195–207. doi: 10.1007/978-1-4939-7283-8_14.
- Carmeille, R., Degrelle, S. A., Plawinski, L., Bouvet, F., Gounou, C., Evain-Brion, D., ... Bouter, A. (2015). Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1853*, 2033–2044. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.038.
- Clarke, M. S., Caldwell, R. W., Chiao, H., Miyake, K., & McNeil, P. L. (1995). Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circulation Research*, *76*, 927–934. doi: 10.1161/01.RES.76.6.927.
- Draeger, A., Monastyrskaya, K., & Babiychuk, E. B. (2011). Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit. *Biochemical Pharmacology*, *81*, 703–712. doi: 10.1016/j.bcp.2010.12.027.
- Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., & Stark, H. (2015). Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at < 3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, *520*, 567–570. doi: 10.1038/nature14275.
- Gerke, V., Creutz, C. E., & Moss, S. E. (2005). Annexins: Linking Ca²⁺ signaling to membrane dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*, 449–461.
- Glover, L., & Brown, R. H. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *8*, 785–794. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00573.x.
- Gotow, T., Sakata, M., Funakoshi, T., & Uchiyama, Y. (1996). Preferential localization of annexin

- V to the axon terminal. *Neuroscience*, 75, 507–521. doi: 10.1016/0306-4522(96)00295-3.
- Haselbach, D., Komarov, I., Agafonov, D. E., Hartmuth, K., Graf, B., Dybkov, O., ... Stark, H. (2018). Structure and Conformational Dynamics of the Human Spliceosomal B act Complex. *Cell*, 172, 454–464. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.010.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 180, 905–914. doi: 10.1083/jcb.200708010.
- Jaiswal, J. K., Lauritzen, S. P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S. M., ... Nylandsted, J. (2014). S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nature Communications*, 5, 3795. doi: 10.1038/ncomms4795.
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science (New York, N.Y.)*, 343, 1247136. doi: 10.1126/science.1247136.
- Jimenez, A. J., & Perez, F. (2017). Plasma membrane repair: The adaptable cell life-insurance. *Current Opinion in Cell Biology*, 47, 99–107. doi: 10.1016/j.ccb.2017.03.011.
- Koerdt, S. N., & Gerke, V. (2017). Annexin A2 is involved in Ca²⁺-dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864, 1046–1053. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.12.007.
- Lauritzen, S. P., Boye, T. L., & Nylandsted, J. (2015). Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, 32–38. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.028.
- Lek, A., Evesson, F. J., Lemckert, F. A., Redpath, G. M. I., Lueders, A.-K., Turnbull, L., ... Cooper, S. T. (2013). Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type Channels Underpin Calcium-Dependent Muscle Membrane Repair. *Journal of Neuroscience*, 33, 5085–5094. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3560-12.2013.
- Lennon, N. J., Kho, A., Bacskai, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., & Brown, R. H. (2003). Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 50466–50473. doi: 10.1074/jbc.M307247200.
- Leung, C., Yu, C., Lin, M. I., Tognon, C., & Bernatchez, P. (2013). Expression of myoferlin in human and murine carcinoma tumors: Role in membrane repair, cell proliferation, and tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 182, 1900–1909. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.041.
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., ... Brown, R. H. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 20, 31–36. doi: 10.1038/1682.
- McNeil, P. L. (2001). *Direct introduction of Molecules into Cells. In Current Protocols in Cell Biology* (Vol. Chapter 20, p. UNIT 20.1). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- McNeil, P. L., & Baker, M. M. (2001). Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, 304, 141–146. doi: 10.1007/s004410000286.
- McNeil, P. L., & Khakee, R. (1992). Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *The American Journal of Pathology*, 140, 1097–1109.
- McNeil, P. L., & Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6, 499–505.
- McNeil, P. L., Miyake, K., & Vogel, S. S. (2003). The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4592–4597. doi: 10.1073/pnas.0736739100.
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., & Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science*, 113, 1891–1902.
- McNeil, P. L., & Steinhardt R. A. (2003). Plasma membrane disruption: Repair, prevention, adaptation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 697–731. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101.
- Middel, V., Zhou, L., Takamiya, M., Beil, T., Shahid, M., Roostalu, U., ... Strähle, U. (2016). ARTICLE Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nature Communications*, 7, doi:10.1038/ncomms12875.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., ... Zara, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature genetics*, 18, 365–368. doi: 10.1038/ng0498-365.
- Miyagi, A., Chipot, C., Rangl, M., & Scheuring, S. (2016). High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nature Nanotechnology*, 11, 783–790. doi: 10.1038/nnano.2016.89.
- Miyake, K., & McNeil, P. L. (1995). Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *The Journal of Cell Biology*, 131, 1737–1745. doi: 10.1083/jcb.131.6.1737.
- Roostalu, U., & Strähle, U. (2012). In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. *Developmental Cell*, 22, 515–529. doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.008.
- Selbert, S., Fischer, P., Menke, A., Jockusch, H., Pongratz, D., & Noegel, A. A. (1996). Annexin VII relocalization as a result of dystrophin deficiency. *Experimental Cell Research*, 222, 199–208. doi: 10.1006/excr.1996.0025.

- Sheetz, M. P., & Dai, J. (1996). Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends in cell biology*, *6*, 85–89. doi: 10.1016/0962-8924(96)80993-7.
- Steinhardt, R. A., Bi, G., & Alderton, J. M. (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science (New York, N.Y.)*, *263*, 390–393. doi: 10.1126/science.7904084.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., . . . Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *The Journal of Cell Biology*, *189*, 1027–1038. doi: 10.1083/jcb.201003053.
- Terasaki, M., Miyake, K., & McNeil, P. L. (1997). Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *The Journal of Cell Biology*, *139*, 63–74. doi: 10.1083/jcb.139.1.63.
- Wang, L., Seeley, E. S., Wickner, W., & Merz, A. J. (2002). Vacuole fusion at a ring of vertex docking sites leaves membrane fragments within the organelle. *Cell*, *108*, 357–369. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00632-3.
- Yasuda, S., Townsend, D., Michele, D. E., Favre, E. G., Day, S. M., & Metzger, J. M. (2005). Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature*, *436*, 1025–1029. doi: 10.1038/nature03844.