



**HAL**  
open science

# Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire dans les fibres musculaires striées squelettiques

Nathalie Couturier

► **To cite this version:**

Nathalie Couturier. Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire dans les fibres musculaires striées squelettiques. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1086 . tel-03365701

**HAL Id: tel-03365701**

**<https://theses.hal.science/tel-03365701>**

Submitted on 5 Oct 2021

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

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



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1086

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

**Ecole Doctorale 340**  
**(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)**

**Spécialité de doctorat** : Biologie

Soutenue publiquement le 09/06/2020, par :  
**Nathalie COUTURIER**

---

**Identification de nouveaux régulateurs  
du positionnement nucléaire dans les  
fibres musculaires striées squelettiques**

---

Devant le jury composé de :

Andréas, MERDES  
Stéphane, VASSILOPOULOS  
Bruno, ALLARD  
Annie, ANDRIEUX  
Bénédicte, CHAZAUD  
Sandrine, HORMAN

Directeur de recherche CNRS  
Chargé de recherche INSERM  
Professeur des Universités  
Directrice de recherche CEA  
Directrice de recherche INSERM  
Professeure

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Examinatrice  
Examinatrice

Vincent, GACHE

Chargé de recherche INSERM

Directeur de thèse



# PRÉAMBULE

Ma thèse s'est déroulée au sein de l'Institut Neuromyogène (CNRS, INSERM) dont la direction est assurée par le Pr Laurent Schaeffer. Ce laboratoire, implanté à Lyon, se compose d'une quinzaine d'équipes qui s'intéressent à l'étude du système nerveux et du système musculaire. C'est en intégrant l'équipe « Architecture du noyau et du cytosquelette musculaire », dirigée par le Dr Vincent Gache, que j'ai pu évoluer dans cet environnement pluridisciplinaire. En parallèle de mon activité de recherche, j'ai eu l'opportunité de réaliser une activité complémentaire d'enseignement au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1. J'ai finalement eu la chance de poursuivre cette activité d'enseignement au cours de ma 4<sup>ème</sup> année de thèse dans le cadre du mi-temps d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche que j'ai obtenu dans l'équipe pédagogique de génétique.

Mes travaux de thèse présentés dans le présent manuscrit ont fait l'objet de publications et ont été présentés à l'occasion de congrès.

## Publications scientifiques :

- **Couturier N.**, Ghasemizadeh A., Christin E., Kebaier A., Osseni A., Thomas J.L., Schaeffer L., Konig S., Brunetti J., Frieden M., Garcia A., Courchet J., Gache V. Cytoplasmic NuMA1 promotes microtubules stabilization and controls myonuclear spreading and neuromuscular junctions integrity of skeletal muscle. (*En attente de soumission*).
- Guiraud A.\* , Christin E.\* , **Couturier N.\***, Kretz-Remy C., Janin A., Ghasemizadeh A., Durieux A.C., Arnould D., Romero N.B., Bui M.T., Bitoun M., Buchman V.L., Gache V. (*en cours de publication*). SH3KBP1-dependant scaffolding of endoplasmic reticulum governs myonuclear organization and control myofibers homeostasis in skeletal muscle. (*En attente de soumission*).
- Ghasemizadeh A., Christin E., Guiraud A., **Couturier N.**, Risson V., Girard E., Jagla C., Soler C., Laddada L., Sanchez C., Jaque F., Garcia A., Lanfranchi M., Jacquemond V., Gondin J., Courchet J., Schaeffer L., Gache V. (*en cours de publication*). Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities. (*En attente de soumission*).
- Doñate Puertas R., Millat G., Ernens I., Gache V., Chauveau S., Morel E., Christin E., **Couturier N.**, Devaux Y., Chevalier P. (2018). Atrial Structural Remodeling Gene Variants in Patients with Atrial Fibrillation. *BioMed research international*
- **Couturier N.**, Gache V. (2017). Myonuclear domain and microtubule proteome during skeletal muscle maturation. *Medecine sciences*

## Communications scientifiques :

- Poster – 17<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Marseille (France) (2019)  
**Couturier N**, Christin E, Thomas JL, Garcia A, Osseni A, Gache V. “Muscle-microtubules proteome and myonuclei positioning during skeletal muscle fibers development: new map in the field”
- Poster – 16<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Brest (France) (2018)  
**Couturier N**, Guiraud A, Christin E, Burny C, Janczarski S, Couté Y, Kraut A, Gache V. “Muscle-microtubules proteome and myonuclei positioning during skeletal muscle fibers development: new map in the field”
- Présentation orale – 16<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Brest (2018)  
“Microtubules proteome and nuclei positioning during skeletal muscle development”
- Poster – EMBOI EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems – Heidelberg (Allemagne) (2018)  
**Couturier N**, Christin E, Burny C, Janczarski S, Couté Y, Kraut A, Gache V.  
“Muscle-microtubules proteome and myonuclei positioning during skeletal muscle fibers development: new map in the field”
- Poster – 15<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Colmar (France) (2017)  
**Couturier N**, Guiraud A, Christin E, Burny C, Janczarski S, Couté Y, Kraut A, Gache V. “Identification d’un nouveau régulateur de l’établissement des domaines nucléaires dans les fibres musculaires striées squelettiques”
- Présentation orale – 15<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Colmar (France) (2017) “Microtubules proteome and nuclei positioning during skeletal muscle development”
- Présentation orale – Microtubule Meeting – Versailles (France) (2017)  
“Microtubules proteome and nuclei positioning during skeletal muscle development”
- Poster – Franche Society for Cell Biology – Lyon (France) (2017)  
**Couturier N**, Guiraud A, Burny C, Janczarski S, Couté Y, Kraut A, Gache V.  
“Molecular mechanisms of microtubule regulation that control myonuclear domains settings in skeletal muscle fibers”
- Poster – 14<sup>ème</sup> Journées de la société française de myologie – Lyon (France) (2016)  
**Couturier N**, Guiraud A, Christin E, Burny C, Janczarski S, Couté Y, Kraut A, Gache V. “Identification d’un nouveau régulateur de l’établissement des domaines nucléaires dans les fibres musculaires striées squelettiques”
- Poster – Myology – Lyon (France) (2017)  
Guiraud A, **Couturier N**, Burny C, Janczarski S, Gache V. “Myonuclear domains establishment in skeletal muscle fibers formation implicates SH3KBP1 activity”

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de soutenance, Pr Bruno Allard, Dr Andréas Merdès, Dr Stéphane Vassilopoulos, Dr Annie Andrieux, Dr Bénédicte Chazaud ainsi que Dr Sandrine Horman, d'avoir accepté de lire, évaluer et discuter de mes travaux.

Je remercie également Dr Marie Delattre et Dr Belinda Cowling pour leur suivi tout au long de ma thèse ainsi que pour les précieux conseils qu'elles ont su me prodiguer à chacun des comités de suivi de thèse.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Vincent, qui dès mon Master 2, m'a encadrée, encouragée et accompagnée tout au long de ces 4 années. Merci aux membres passés et actuels de l'équipe MNCA.

Mes pensées vont à l'Institut Neuromyogène qui m'a fourni un environnement scientifique stimulant et de qualité. Je tiens également à remercier tous les membres de l'Institut pour les échanges que nous avons pu avoir.

Particulièrement, je te remercie, Jean-Luc, pour ton aide, ta patience et ta disponibilité pour les manipulations d'électroporation dont nous avons finalement réussi à voir le bout !

Evelyne, merci pour les discussions, les conseils et le soutien au quotidien.

Je tiens à remercier les équipes pédagogiques de génétique et de biologie cellulaire au sein desquelles j'ai pu évoluer pendant ces 4 années. Grâce à votre aide et votre bienveillance, j'ai pu m'y sentir soutenue. Ce fut une superbe expérience !!

Merci aux membres du PBES et du SCAR qui, chaque jour, apportent les soins nécessaires à nos animaux. Merci également aux membres du PLATIM et du Cicle pour leur aide technique.

Audrey, Dounia, Marine et Sarah : MERCI !! Vous avez été un soutien infailible. Je n'oublierai jamais nos rires et nos moments passés ensemble. Sans vous tout aurait été différent !

Thomas, toujours à l'écoute et de bon conseil, quelle chance de t'avoir rencontré !!

J'exprime ma profonde reconnaissance au groupe de musique Rock Fait l'Air ! Merci Ali, Kader, Ayoub, Clémence et Patricia pour ces répétitions hebdomadaires qui m'ont donné un second souffle !

Enfin et par-dessus tout, une pensée particulière pour ma famille et Samuel. Vous étiez là pour moi au quotidien et vous savez toute la gratitude que j'ai pour vous.



# RESUME

## **Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire dans les fibres musculaires striées squelettiques**

Les fibres musculaires striées squelettiques se forment à partir de cellules musculaires précurseurs, appelées myoblastes. Celles-ci fusionnent entre elles pour permettre la formation d'un syncytium, le myotube. Simultanément à la maturation de ces cellules syncytiales, les centaines de noyaux qui les composent vont subir de nombreux mouvements jusqu'à atteindre leur localisation périphérique caractéristique des fibres musculaires matures (myofibres). Des défauts dans le positionnement des noyaux sont toujours associés à un dysfonctionnement de la fibre musculaire (sarcopénie, myopathie centronucléaire). Le positionnement périphérique des noyaux dans les fibres musculaires matures est apparu comme un élément essentiel à leur fonctionnalité. Étudier les mécanismes sous-jacents aux mouvements de noyaux au cours de la différenciation musculaire s'est ainsi révélé être un aspect primordial à la compréhension de la physiopathologie musculaire.

L'implication des moteurs moléculaires dans l'espacement des noyaux au cours des phases précoces de différenciation musculaire est connue. Toutefois, le rôle des protéines associées aux microtubules dans ce processus reste à être étudié. Par conséquent, identifier de nouvelles protéines associées aux microtubules et impliquées dans le positionnement des noyaux au cours du développement musculaire va permettre 1) d'apporter une meilleure compréhension de la différenciation musculaire et 2) de mettre en évidence de nouvelles cibles potentiellement impliquées dans des pathologies présentant un défaut de positionnement nucléaire.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté en l'identification de protéines associées aux microtubules, directement ou indirectement, et impliquées dans la régulation du positionnement des noyaux au cours de la différenciation des fibres musculaires striées squelettiques. Une approche biochimique, réalisée sur cellules musculaires primaires, couplée à une analyse de spectrométrie de masse, ont permis d'identifier les protéomes différenciellement exprimés au cours de la myogenèse. Sur la base de ces résultats, 239 protéines issues des extraits totaux de myotubes et de myofibres, ainsi que 240 protéines identifiées dans les protéomes associés aux microtubules, ont été sélectionnées. Un criblage ARN interférent utilisant des siRNAs a été réalisé sur myotubes primaires de façon à discriminer l'implication des candidats dans le positionnement des noyaux dans les phases précoces de différenciation musculaire. Le criblage ARN interférent a permis l'identification de trois protéines dont le rôle sur le positionnement des noyaux s'est avéré essentiel.

Nous avons découvert un rôle cytoplasmique de la protéine NuMA1 dans le domaine de la biologie musculaire. Celle-ci s'accumule progressivement dans le cytoplasme, où elle



stabilise le réseau de microtubules dans les fibres musculaires en développement. Cette fraction cytoplasmique de la protéine NuMA1, en association avec la Dynéine, contrôle l'architecture du réseau microtubulaire et l'espacement des noyaux. Elle est également cruciale pour le maintien des noyaux en position périphérique dans les fibres matures ainsi qu'aux jonctions neuromusculaires.

Le criblage ARN interférent a également permis de mettre en exergue le rôle de la protéine Zbtb8a sur le positionnement et la forme des noyaux dans les phases précoces de la différenciation musculaire.

Nous avons finalement identifié la protéine SH3KBP1 comme un nouveau régulateur du positionnement des noyaux dans les phases précoces et tardives de différenciation musculaire en association avec le réticulum sarcoplasmique.

Mots clés : développement musculaire, mouvements nucléaires, microtubules, protéines associées aux microtubules, sarcopénie, myopathie centronucléaire, NuMA1, Zbtb8a, SH3KBP1

Institut Neuromyogène  
CNRS UMR5310 – INSERM U1217 – Université Claude Bernard Lyon I  
8 avenue Rockefeller  
69008 LYON

# ABSTRACT

## **Identification of new regulators of nuclei positioning during skeletal muscle fibers development**

Skeletal muscle fibers are built from fusion of myoblasts allowing the formation of myotubes. Those syncytia contain hundreds of nuclei that undergo many movements, simultaneously with myotubes maturation process, until reaching a final peripheric localization in mature fibers (myofibers). Disorganization of nuclei disposal is always associated with myofibers malfunctioning (i.e.: sarcopenia, centronuclear myopathy). Peripheral nuclei positioning in mature fiber appears to be essential for their functionality. Understanding the process of nuclei positioning turned up as key point.

Involvement of molecular motors are known in spacing myonuclei in the first steps of muscle differentiation, however the role of microtubules associated proteins (Maps) is less described. Consequently, identify new Maps involved in nuclei positioning during muscle formation may 1) provide a better understanding of muscle differentiation; 2) bring to light new targets potentially involved in pathologies presenting nuclei mispositioning.

In this context, my thesis work consisted in identifying proteins linked to microtubules, directly or indirectly, and involved in the regulation of myonuclei positioning throughout skeletal muscle fibers differentiation. Proteomes associated to microtubules and differentially expressed during muscle differentiation were identified using a mass-spectrometry analysis. Based on this identification, 239 proteins from the total cellular extracts of myotubes and myofibers; and 240 proteins identified in proteomes linked to microtubules were selected. A siRNA screen was performed on primary myotubes in order to decipher the involvement of those selected targets in myonuclei positioning during the first steps of muscle differentiation. This siRNA screen allowed the identification of three proteins which roles on myonuclei positioning appeared to be crucial.

Unexpectedly, we identified a cytoplasmic role of the mitotic protein NuMA1 in muscle biology field. This protein progressively accumulates into the cytoplasm where it stabilizes microtubule network in differentiating myofibers. This cytoplasmic fraction of NuMA1 proteins, in association with the dynein, regulates microtubule network architecture and myonuclei spacing. Its role is also crucial in maintaining peripherized myonuclei in mature myofibers and in neuromuscular junction regions.

The siRNA screening also highlighted the role of Zbtb8a protein in positioning myonuclei and in maintaining their shape in the precocious steps of muscle differentiation.

Finally, we identified the SH3KBP1 protein as a new regulator of myonuclei positioning related to sarcoplasmic reticulum in the early and latest phases of muscle differentiation.

Keywords: Skeletal muscle development, nuclei movements, microtubules, MAPs, primary muscle cells, sarcopenia, centronuclear myopathy, NuMA1, Zbtb8a, SH3KBP1

Institut Neuromyogène  
CNRS UMR5310 – INSERM U1217 – Université Claude Bernard Lyon I  
8 avenue Rockefeller  
69008 LYON

# ABRÉVIATIONS

|  |  |
|--|--|
| <b>ACh</b> : Acétylcholine   | <b>LINC</b> : LIInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton         |
| <b>AChR</b> : récepteur à acétylcholine                            | <b>MAPs</b> : Protéine Associée aux Microtubules                 |
| <b>ADP</b> : Adénosine DiPhosphate                                 | <b>MHC</b> : Chaîne Lourde de la Myosine                         |
| <b>AMP-PNP</b> : adenylyl-imidophosphate                           | <b>MLC</b> : Chaîne Légère de la Myosine                         |
| <b>AMPK</b> : AMP-activated protein Kinase                         | <b>MRF</b> : Facteurs de Régulation Myogéniques                  |
| <b>ARN</b> : Acide RiboNucléique                                   | <b>MTOC</b> : Centre Organisateur des Microtubules               |
| <b>ARNm</b> : Acide RiboNucléique messenger                        | <b>MTs</b> : Microtubules  |
| <b>ATP</b> : Adénosine TriPhosphate                                | <b>NLS</b> : Séquence Localisation Nucléaire                     |
| <b>BSA</b> : Bovine serum Albumin                                  | <b>NPC</b> : Nuclear Pore Complex                                |
| <b>cDNA</b> : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire             | <b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline                           |
| <b>CNM</b> : Myopathie CentroNucléaire                             | <b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction                           |
| <b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2 phénylindole                        | <b>PFA</b> : ParaFormAldéhyde                                    |
| <b>DHPR</b> : Récepteurs aux DiHydroPyridines                      | <b>PIPES</b> : 1,4-piperazinediethanesulfonic acid               |
| <b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle Medium                     | <b>PVDF</b> : Polyfluorure de vinylidène                         |
| <b>DTT</b> : DiThioThréitol  | <b>rpm</b> : rotation par minute                                 |
| <b>EDMD</b> : Dystrophie Musculaire Emery Dreifuss                 | <b>RS</b> : Réticulum Sarcoplasmique                             |
| <b>ERES</b> : Endoplasmic Reticulum Exit Site                      | <b>RyR</b> : Récepteur à la Ryanodine                            |
| <b>GDP</b> : Guanosine DiPhosphate                                 | <b>SDS</b> : Sodium DodécylSulfate                               |
| <b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein                             | <b>SEM</b> : Standard Error of the Mean                          |
| <b>GPMCPP</b> : guanylyl 5'- $\alpha,\beta$ methylenediphosphonate | <b>shRNA</b> : short hairpin RNA                                 |
| <b>GTP</b> : Guanosine TriPhosphate                                | <b>siRNA</b> : small interfering RNA                             |
| <b>HRP</b> : HorseRadish Peroxidase                                | <b>SOC</b> : Super Optima broth with Catabolite repression       |
| <b>IMDM</b> : Iscove's Modified Dulbecco's Media                   | <b>SVF</b> : Sérum de Veau fœtal                                 |
| <b>JNM</b> : Jonction NeuroMusculaire                              | <b>TBS</b> : Tris Buffered Saline                                |
| <b>KLC</b> : Chaîne Légère de la Kinésine                          | <b>WT</b> : Wild-Type  |
| <b>KO</b> : Knock Out  | <b><math>\gamma</math>-TURC</b> : $\gamma$ -TUbulin Ring Complex |



# LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Les différents types musculaires.
- **Figure 2** : Origine embryonnaire des muscles striés squelettiques.
- **Figure 3** : Cascade d'expression myogénique.
- **Figure 4** : Représentation schématique d'un muscle strié squelettique et de la niche des cellules satellites qui y sont associées.
- **Figure 5** : Organisation de l'appareil contractile.
- **Figure 6** : Tableau résumant les caractéristiques des différents types de fibres musculaires.
- **Figure 7** : Organisation structurale du muscle strié squelettique.
- **Figure 8** : Représentation schématique d'une jonction neuromusculaire.
- **Figure 9** : Représentation schématique d'une triade.
- **Figure 10** : Représentation schématique du modèle de glissement des filaments d'actine et de myosine à l'origine de la contraction musculaire.
- **Figure 11** : Représentation schématique de la structure des microtubules.
- **Figure 12** : Représentation schématique du modèle de nucléation des microtubules.
- **Figure 13** : Dynamique et assemblage des microtubules.
- **Figure 14** : Modifications post-traductionnelles des microtubules.
- **Figure 15** : Exemple de diverses protéines associées aux microtubules.
- **Figure 16** : Organisation du réseau de microtubules dans les myoblastes prolifératifs non différenciés.

- **Figure 17** : Réorganisation des centres organisateurs des microtubules et de l'architecture du réseau de microtubules dans les myotubes immatures.
- **Figure 18** : Organisation du réseau de microtubules dans les fibres musculaires matures.
- **Figure 19** : Le complexe LINC et son protéome associé.
- **Figure 20** : Mouvements de noyaux dans divers systèmes biologiques
- **Figure 21** : Le muscle pathologique.
- **Figure 22** : Représentation schématique des mouvements de noyaux au cours de la myogenèse.
- **Figure 23** : Transmission de force aux noyaux *via* le complexe LINC.
- **Figure 24** : Réponse du noyau face à l'application mécanique de force.
- **Figure 25** : Méthode de culture de cellules primaires *in vitro*.
- **Figure 26** : Méthode biochimique et identification de protéomes.
- **Figure 27** : Validation des protéomes microtubules-dépendants identifiés par spectrométrie de masse.
- **Figure 28** : Identification de protéines spécifiques de chaque stade de différenciation.
- **Figure 29** : Validation de la condition enrichie en tubuline exogène.
- **Figure 30** : Contrôle interne du criblage ARN interférents, la condition *Kif5b* ARN interférent.
- **Figure 31** : Culture de myotubes primaires, en condition contrôle, obtenue après 3 jours de différenciation *in vitro*.
- **Figure 32** : Analyse d'image de culture de myotubes primaires.
- **Figure 33** : Paramètres obtenus après traitement des images de myotubes en condition contrôle dans l'outil d'analyse bio-informatique.

- **Figure 34** : Index de répartition nucléaire utilisé pour sélectionner les candidats impliqués dans le positionnement nucléaire.
- **Figure 35** : Image de myotubes C2C12 contrôles après 6 jours de différenciation *in vitro*.
- **Figure 36** : Analyse du positionnement des noyaux dans les cultures de fibres musculaires matures.
- **Figure 37** : Index de répartition nucléaire.
- **Figure 38** : Panel d'images de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* dans différentes conditions ARN interférents (protéome microtubules-dépendant).
- **Figure 39** : Liste des 96 protéines (protéome microtubules-dépendant) impliquées dans la fusion et/ou le positionnement des noyaux dans les myotubes C2C12.
- **Figure 40** : Panel d'images de myotubes primaires après 6 jours de différenciation *in vitro* dans différentes conditions ARN interférents (protéome microtubules-dépendant).
- **Figure 41** : Histogramme représentant les volumes des domaines nucléaires des fibres musculaires matures dans différentes conditions d'ARN interférents (protéome microtubules-dépendant).
- **Figure 42** : Tableau récapitulatif des cibles sélectionnées par analyse par spectrométrie de masse et affectant le positionnement des noyaux dans au moins l'un des trois systèmes *in vitro* utilisés.
- **Figure 43** : Index de répartition nucléaire dans différentes conditions d'ARN interférents (extraits totaux).
- **Figure 44** : Panel d'images de myotubes primaires après 6 jours de différenciation *in vitro* dans différentes conditions ARN interférents (extraits totaux).
- **Figure 45** : Liste des 95 protéines (extraits totaux) impliquées dans la fusion et/ou le positionnement des noyaux dans les myotubes C2C12.
- **Figure 46** : Histogramme représentant les volumes des domaines nucléaires des fibres musculaires matures dans différentes conditions d'ARN interférents (extraits totaux).



- **Figure 47** : Tableau récapitulatif des cibles sélectionnées à partir des extraits totaux et affectant le positionnement des noyaux dans au moins l'un des trois systèmes *in vitro* utilisés.
- **Figure 48** : Effet de l'inhibition d'expression de Zbtb8a sur les myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*.
- **Figure 49** : Effet de l'inhibition d'expression de Zbtb8a dans les myotubes après 6 jours de différenciation de cellules C2C12.
- **Figure 50** : Effet de la protéine Zbtb8a sur la forme des noyaux dans les myotubes primaires.
- **Figure 51** : Effet de la protéine Zbtb8a sur la forme des noyaux dans les myotubes C2C12.
- **Figure 52** : Mesure de la longueur des comètes EB1-GFP dans des myoblastes et des myotubes en condition d'inhibition d'expression de Zbtb8a.
- **Figure 53** : Localisation subcellulaire de la protéine Zbtb8a dans des myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*.
- **Figure 54** : Rôle de Zbtb8a dans les fibres musculaires matures.
- **Figure 55** : Cinétique de transcription et d'expression de Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire des cellules C2C12.
- **Figure 56** : Modèle présentant le complexe protéique cortical requis pour réguler le positionnement du fuseau mitotique au sein des cellules en division.
- **Figure 57** : Expression de NuMA1 dans les noyaux post-mitotiques de neurones.
- **Figure 58** : Sélection de l'ARN interférent ciblant *Numa1*.
- **Figure 59** : Rôle de l'AMPK sur le positionnement des noyaux et le phénotype des myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*.
- **Figure 60** : Effet de la surexpression *hNuMA*-WT phosphomimétique et non phosphorylable sur des fibres musculaires matures *in vitro* après 10 jours de différenciation.

# SOMMAIRE

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCTION</b>  | 22 |
| <b>Chapitre 1 : Le muscle</b>  | 23 |
| I. Généralités   | 23 |
| 1) Le tissu musculaire lisse   | 23 |
| 2) Le tissu musculaire strié   | 23 |
| a. Cardiaque   | 23 |
| b. Squelettique  | 23 |
| II. Le tissu musculaire strié squelettique                                 | 24 |
| 1) Développement embryonnaire et myogenèse                                 | 24 |
| a. Origine embryonnaire  | 24 |
| b. Myogenèse   | 25 |
| c. Régénération musculaire   | 28 |
| 2) L'unité contractile du muscle   | 30 |
| a. L'appareil contractile  | 30 |
| b. La typologie des fibres musculaires, une spécialisation du sarcomère    | 32 |
| 3) Organisation architecturale du muscle strié squelettique                | 34 |
| III. De la transmission de l'information nerveuse à la production de force | 35 |
| 1) Transmission de l'information nerveuse                                  | 35 |
| a. La jonction neuromusculaire   | 35 |
| b. La machinerie du couplage excitation – contraction                      | 36 |
| 2) La production de force  | 38 |
| <b>Chapitre 2 : Les microtubules</b>                                       | 40 |
| I. Généralités   | 40 |
| 1) La structure  | 41 |
| 2) Dynamique des microtubules  | 42 |
| a. Processus de nucléation   | 42 |
| b. Instabilité dynamique des microtubules                                  | 44 |
| 3) Modulations structurelles et/ou fonctionnelles des microtubules         | 46 |
| a. Les isoformes de tubuline   | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| b. Les isotypes de tubuline  | 46        |
| c. Modifications post-traductionnelles   | 47        |
| 4) Les protéines associées aux microtubules  | 50        |
| a. Les MAPs stabilisatrices  | 50        |
| b. Les MAPs déstabilisatrices  | 50        |
| c. Les intégrateurs du cytosquelette   | 53        |
| d. Les moteurs moléculaires  | 53        |
| e. Les protéines des extrémités positives des microtubules                                   | 54        |
| <b>II. Les microtubules dans les cellules musculaires</b>                                    | <b>54</b> |
| 1) Au cours de la myogenèse  | 54        |
| a. Dans les myoblastes en prolifération  | 54        |
| b. Dans les myotubes immatures   | 56        |
| c. Dans les fibres musculaires matures   | 58        |
| 2) Implication des microtubules dans la fonctionnalité musculaire                            | 60        |
| a. Dystrophie musculaire de Duchenne et architecture du réseau de microtubules               | 60        |
| b. Dystrophie musculaire de Duchenne et isotypes de tubuline                                 | 60        |
| c. Modifications post-traductionnelles des microtubules                                      | 60        |
| <b>III. Le complexe LINC, un lien fonctionnel entre noyaux et microtubules</b>               | <b>61</b> |
| 1) Les composants du complexe LINC   | 61        |
| a. Les Nesprines   | 61        |
| b. Les protéines SUNs  | 61        |
| 2) Protéines associées au complexe LINC  | 62        |
| a. Les Lamines   | 62        |
| b. L'émerine   | 62        |
| 3) Rôle du complexe LINC dans les cellules musculaires                                       | 64        |
| 4) Les pathologies associées au noyau  | 64        |
| a. Chez l'homme : les laminopathies  | 64        |
| b. Les modèles murins de laminopathies   | 65        |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre 3 : Les noyaux dans les fibres musculaires</b>                                   | <b>66</b> |
| <br>   |           |
| <b>I. Importance des mouvements de noyaux</b>  | <b>66</b> |
| 1) Dans divers systèmes  | 66        |
| 2) Dans les fibres musculaires : pathologies associées au défaut de positionnement nucléaire | 69        |
| <br>   |           |
| <b>II. Les mouvements de noyaux au cours de la myogenèse</b>                                 | <b>70</b> |
| 1) Centralisation  | 70        |
| 2) Alignement  | 70        |
| 3) Répartition   | 71        |

|   |           |
|---|-----------|
| a. Mécanisme dépendant de Kif5B/MAP7  | 71        |
| b. Mécanisme dépendant du complexe LINC   | 72        |
| c. Implication d'autres protéines   | 72        |
| 4) Périphérisation  | 72        |
| 5) Ancrage  | 73        |
| a. Un mécanisme direct : les filaments intermédiaires de desmine  | 73        |
| b. Un mécanisme indirect : limitation du stress mécanique   | 73        |
| 6) Agrégation des noyaux sous synaptiques et à la jonction myotendineuse                                      | 74        |
| 7) Théorie des domaines nucléaires  | 76        |
| <b>III. Mécanotransduction, des microtubules aux mouvements de noyaux</b>                                     | <b>76</b> |
| 1) Le noyau comme mécanosenseur   | 76        |
| a. Le noyau, un organite mécanosensible   | 77        |
| b. Le complexe LINC   | 77        |
| c. Importance du cytosquelette  | 77        |
| d. Mécanotransduction nucléaire dans le tissu musculaire  | 78        |
| 2) Mécanismes associés à la mécanotransduction nucléaire  | 80        |
| a. Repositionnement génique   | 80        |
| b. Etat transcriptionnel de la chromatine   | 80        |
| c. Déformabilité nucléaire  | 80        |
| d. Changements conformationnels et modifications post traductionnelles des protéines de l'enveloppe nucléaire | 81        |
| e. Perméabilité des pores nucléaires  | 81        |
| f. Réponse transcriptionnelle   | 82        |

## **SYNTHÈSE ET PROBLÉMATIQUE** 84

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES** 87

|  |    |
|--|----|
| I. Culture cellulaire  | 88 |
| 1) Culture des cellules musculaires primaires de souris  | 88 |
| 2) Culture des cellules musculaires immortalisées C2C12  | 88 |
| 3) Culture des cellules musculaires humaines immortalisées   | 89 |
| 4) Transfection de petits ARNs interférents et de plasmides  | 89 |
| II. Identification des protéomes associés aux microtubules au cours de la différenciation musculaire et criblage ARN interférents utilisant des siRNAs | 90 |
| 1) Approche biochimique permettant l'identification des protéomes microtubule-dépendants   | 90 |

|   |           |
|---|-----------|
| a. Purification de protéines associées aux microtubules                             | 90        |
| b. Analyse des protéines sur gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide                | 91        |
| c. Digestion des bandes protéiques  | 91        |
| d. Identification des peptides  | 92        |
| 2) Criblage ARN interférents de type siRNA  | 92        |
| a. Méthodologie   | 92        |
| b. Microscopie  | 92        |
| c. Analyse  | 92        |
| <b>III. Immunomarquage et microscopie</b>   | <b>93</b> |
| 1) Fixation de cultures cellulaires et marquage immunofluorescent                   | 93        |
| 2) Microscopie  | 93        |
| a. Expérience de timelapse pour étudier les mouvements de noyaux et quantifications | 93        |
| b. Acquisition de la dynamique des microtubules                                     | 93        |
| c. Imagerie confocale   | 94        |
| <b>IV. Analyse transcriptomique</b>   | <b>94</b> |
| 1) Extraction ARN   | 94        |
| 2) Réverse transcription et PCR quantitative  | 94        |
| <b>V. Analyse protéomique</b>   | <b>94</b> |
| 1) Préparation des échantillons   | 94        |
| 2) Fractionnement cellulaire  | 95        |
| a. Tampon de lyse cellulaire  | 95        |
| b. Protocole de fractionnement cellulaire   | 95        |
| 3) Sonication et dosage protéique   | 95        |
| 4) Western Blot   | 96        |
| <b>VI. Expériences <i>in vivo</i></b>   | <b>96</b> |
| 1) Modèle de souris   | 96        |
| 2) Expérience d'électroporation de plasmides  | 96        |
| a. Protocole d'électroporation  | 96        |
| b. Plasmides électroporés   | 97        |
| 3) Coupes transversales de muscles <i>Tibialis Anterior</i>                         | 97        |
| a. Inclusion des muscles et coupes au cryostat                                      | 97        |
| b. Immunomarquage   | 97        |
| c. Microscopie et quantifications   | 98        |
| 4) Dissection de fibres isolées   | 98        |
| a. Fixation et dissection de fibres isolées   | 98        |
| b. Immunomarquage   | 98        |
| c. Microscopie  | 98        |
| d. Analyse de l'architecture du réseau microtubulaire                               | 98        |

|   |            |
|---|------------|
| VII. Anticorps  | 99         |
| VIII. Mutagenèse dirigée  | 99         |
| 1) PCR  | 99         |
| 2) Digestion  | 100        |
| 3) Transformation   | 100        |
| 4) Criblage des clones  | 101        |
| 5) Sélection des clones   | 102        |
| 6) Purification et dosage de l'ADN  | 102        |
| <br>  |            |
| <b>RÉSULTATS</b>  | <b>103</b> |
| <br>  |            |
| <b>Chapitre 1 : Stratégie expérimentale</b>   | <b>104</b> |
| <br>  |            |
| I. Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire   | 104        |
| 1) Stratégie et systèmes <i>in vitro</i>  | 104        |
| 2) Approche biochimique   | 106        |
| 3) Critères de sélection des candidats  | 108        |
| 4) Validation de l'approche   | 108        |
| a. Validité des protéomes microtubules-dépendants   | 108        |
| b. Protéomes microtubulaires et musculaires   | 110        |
| c. Protéome issu de la condition enrichie en tubuline exogène   | 112        |
| <br>  |            |
| II. Stratégie de criblage utilisant des petits ARNs interférents  | 113        |
| 1) Méthodologie   | 113        |
| 2) Avantages de la triple approche du criblage  | 114        |
| a. Myotubes et myofibres primaires  | 114        |
| b. Lignées immortalisées C2C12  | 114        |
| <br>  |            |
| III. Méthodes d'analyse des cultures cellulaires issues du criblage<br>ARN interférents   | 115        |
| 1) Myotubes primaires   | 115        |
| a. Développement d'un outil d'analyse bio-informatique  | 115        |
| b. Limite de cet outil d'analyse  | 120        |
| 2) Lignées immortalisées C2C12  | 120        |
| 3) Myofibres primaires  | 121        |
| <br>  |            |
| <u>Publication 1</u> : Prix Master 2016 de la SFM. Domaine nucléaire et protéome<br>microtubulaire au cours de la maturation des fibres musculaires | 122        |

## Chapitre 2 : Criblage ARN interférents, identification de protéomes microtubules-dépendants 127

|  |     |
|--|-----|
| I. Criblage ARN interférents dans des myotubes immatures               | 127 |
| 1) Criblage sur cellules primaires                                     | 127 |
| 2) Criblage sur lignées de cellules musculaires immortalisées C2C12    | 131 |
| II. Criblage ARN interférents dans des fibres musculaires matures      | 133 |
| 1) Résultats du criblage sur fibres matures                            | 133 |
| 2) Limites du criblage ARN interférents sur fibres musculaires matures | 133 |
| III. Conclusions   | 135 |

## Chapitre 3 : Criblage ARN interférents, identification des protéomes totaux 138

|   |     |
|---|-----|
| I. Criblage ARN interférents dans des myotubes immatures          | 138 |
| 1) Criblage sur cellules primaires                                | 138 |
| 2) Criblage sur cellules C2C12                                    | 141 |
| II. Criblage ARN interférents dans des fibres musculaires matures | 142 |
| III. Conclusions  | 142 |

## Chapitre 4 : La protéine Zbtb8a 144

|  |     |
|--|-----|
| I. Rôle de Zbtb8a dans les myotubes immatures                        | 144 |
| 1) Rôle sur le positionnement des noyaux dans les myotubes primaires | 144 |
| 2) Étude du rôle de Zbtb8a dans les cellules C2C12                   | 146 |
| 3) Rôle sur la forme des noyaux                                      | 147 |
| a. Dans les myotubes primaires                                       | 147 |
| b. Dans les myotubes C2C12   | 148 |
| 4) Rôle sur la dynamique microtubulaire                              | 150 |
| a. Approche méthodologique et résultats                              | 150 |
| b. Limite de l'approche  | 150 |
| 5) Localisation subcellulaire de Zbtb8a dans les myotubes immatures  | 152 |
| II. Rôle de Zbtb8a dans les fibres musculaires matures               | 153 |

|   |            |
|---|------------|
| III. Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire   | 155        |
| IV. Conclusions   | 156        |
| <b>Chapitre 5 : La protéine NuMA1</b>   | <b>157</b> |
| I. Découverte historique  | 157        |
| II. Rôle au cours de la division cellulaire   | 158        |
| 1) Relocalisation aux pôles du fuseau mitotique   | 158        |
| 2) Orientation du fuseau mitotique  | 158        |
| III. NuMA1 au cours des divisions asymétriques  | 160        |
| IV. Régulation de la dynamique des microtubules et pathologies  | 160        |
| 1) Régulation de la dynamique des microtubules  | 160        |
| 2) NuMA1 et pathologies associées   | 161        |
| V. Rôle nucléaire de NuMA1  | 161        |
| 1) Composante de la matrice nucléaire   | 161        |
| 2) Rôle dans divers processus nucléaires  | 163        |
| VI. Découverte d'un rôle cytoplasmique de NuMA1 dans les cellules post-mitotiques   | 163        |
| <u>Publication 2</u> : Cytoplasmic NuMA1 promotes microtubules stabilization and controls myonuclear spreading and neuromuscular junctions integrity of skeletal muscle | 164        |
| Annexe à la Publication 2 – Sélection de l'ARN interférent ciblant <i>Numa1</i>   | 204        |
| VII. NuMA1, l'hypothèse AMPK  | 208        |
| 1) Rôle de l'AMPK dans les myotubes primaires   | 208        |
| 2) Étude du rôle de l'AMPK sur la phosphorylation de NuMA1  | 211        |
| <u>Publication 3</u> : SH3KBP1-dependant scaffolding of endoplasmic reticulum governs myonuclear organization and controls myofibers homeostasis in skeletal muscle     | 213        |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>   | <b>252</b> |



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 259

## **AUTRES PUBLICATIONS** 287

Publication 4 : Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities 288

Publication 5 : Atrial structural remodeling gene variants in patient with atrial fibrillation 327

## **ANNEXES** 341

Annexe 1 : Tableau présentant les protéines sélectionnées pour le criblage ARN interférents à l'issue de l'identification des protéomes microtubules-dépendants par spectrométrie de masse 342

Annexe 2 : Tableau présentant les protéines sélectionnées pour le criblage ARN interférents à partir des extraits totaux de myotubes et de myofibres primaires 355

# INTRODUCTION



## CHAPITRE 1 - LE MUSCLE

### **I. Généralités**

Le corps humain se compose de 4 différents types de tissus : épithéliaux, nerveux, conjonctifs et musculaires. Les tissus musculaires possèdent la particularité de pouvoir se contracter afin d'assurer différentes fonctions dans l'organisme telles que la digestion, la contraction cardiaque ou la locomotion. Ces fonctions sont assurées respectivement par trois types de cellules musculaires : les cellules musculaires lisses, striées cardiaques et striées squelettiques (Fig.1). Chacune d'elles a des caractéristiques histologiques et fonctionnelles qui lui sont propres.

#### **1) Le tissu musculaire lisse**

Principalement localisé dans la paroi des organes creux comme l'intestin, ce tissu se compose de cellules musculaires mononuclées qui, collectivement, forment une couche dite musculuse. Leur contraction est indépendante de notre volonté et est régie par le système nerveux autonome, dit système nerveux végétatif.

#### **2) Le tissu musculaire strié**

L'appellation de tissu musculaire strié provient de son apparence striée en histologie (Price, 1963). Cette caractéristique est due à l'organisation particulière des unités contractiles, appelées sarcomères, qui composent ce tissu.

Celui-ci est lui-même divisé en deux sous-types qui sont présentés dans les paragraphes suivants.

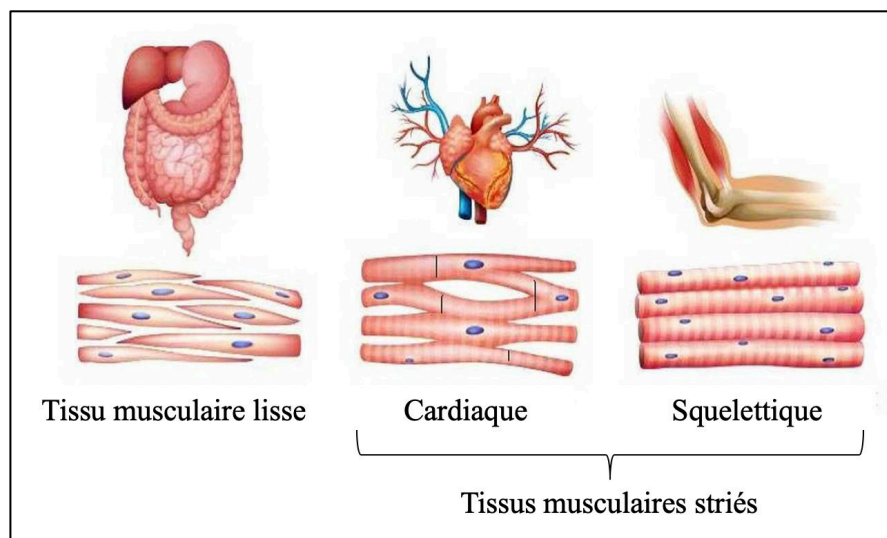
##### **a) Cardiaque**

Le tissu cardiaque forme le myocarde, qui est un organe creux à contraction involontaire ; il est constitué de cellules mono- ou binuclées hautement spécialisées : les cardiomyocytes. La contraction synchrone de ces cellules permet la circulation sanguine dans l'ensemble de l'organisme.

##### **b) Squelettique**

Ce type de tissu musculaire est majoritaire dans notre organisme : il représente environ 50% de la masse corporelle et se compose de plus de 600 muscles. Les fonctions associées à ce tissu sont variées : maintien de la posture, production de mouvements, de force et de chaleur,

ou encore régulation du métabolisme glucidique. La qualification de tissu musculaire squelettique vient du fait que les muscles squelettiques sont attachés de part et d'autre au squelette osseux *via* les tendons, au niveau de zones spécifiques appelées jonctions myotendineuses. Contrairement aux autres types de tissu musculaire, celui-ci est à contraction volontaire. En effet, les motoneurones, provenant du système nerveux somatique, viennent au contact des cellules musculaires pour transmettre l'information nerveuse au niveau de zones spécialisées que sont les jonctions neuromusculaires. Mon travail de thèse se focalisant sur ce tissu, toute mention de « tissu musculaire » impliquera implicitement ce tissu musculaire strié squelettique.



**Figure 1 :** Les différents types musculaires. Schéma présentant la localisation anatomique de chacun des tissus ainsi que les principales caractéristiques des cellules qui les composent.

## II. Le tissu musculaire strié squelettique

### 1) Développement embryonnaire et myogenèse

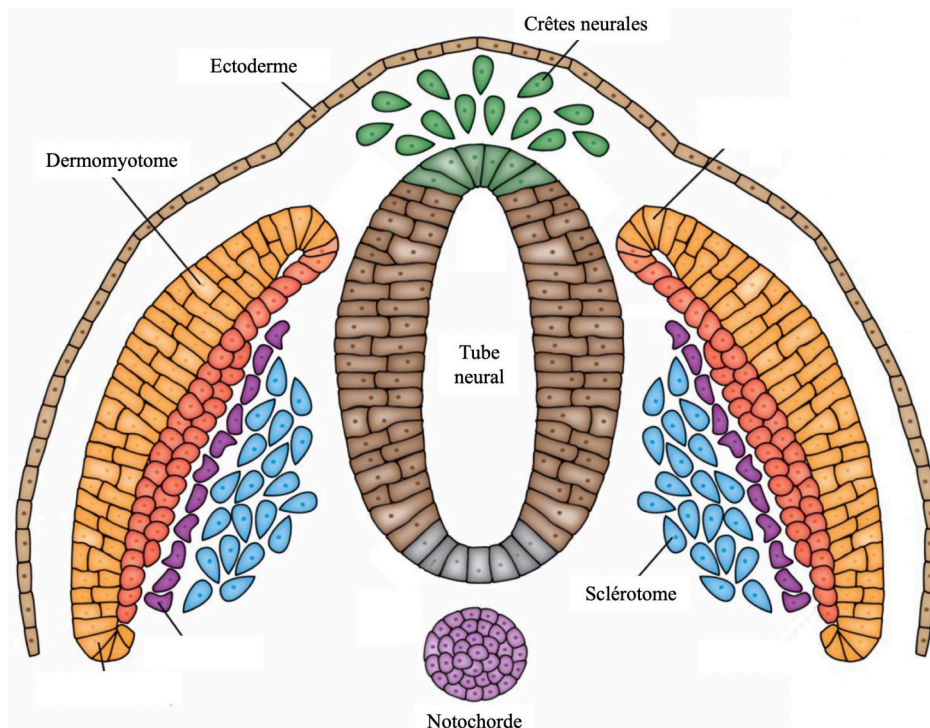
#### a. Origine embryonnaire

Trois feuillets embryonnaires s'organisent au cours du développement : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La position et l'identité des cellules qui vont former chacun de ces feuillets sont déterminées très précocement au cours de la gestation (Arnold and Robertson, 2009).

Les cellules précurseurs qui formeront les muscles striés squelettiques dérivent du mésoderme (Tajbakhsh and Cossu, 1997). En effet, au cours de l'embryogenèse, le mésoderme se segmente et forme les somites. Ces cellules épithéliales se disposent en paires bilatérales de part et d'autre de la notochorde et se divisent en régions aux devenir variés. La région

ventrale, appelée sclérotome, donnera les os et le cartilage alors que la région dorsale, appelée dermomyotome, se spécialisera pour former le derme et la musculature (Fig.2).

Les cellules du dermomyotome vont quitter les somites et coloniser le corps pour former les futurs muscles. La migration de ces cellules précurseurs est contrôlée par des facteurs de transcription tel que Pax3 (Paired box 3) (Birchmeier and Brohmann, 2000). Post-migration, les cellules précurseurs se spécialisent en myoblastes sous l'effet de facteurs de transcription, tels que Six1 (homeobox protein Six1) et Six4 (homeobox protein Six4) (Bentzinger et al., 2012; Grifone et al., 2005).



**Figure 2 :** Origine embryonnaire des muscles striés squelettiques. Schéma adapté de von Maltzahn et al., 2012.

## b. Myogenèse

Les principes de base qui permettent le développement des fibres musculaires, ou myogenèse, sont conservés de la drosophile à l'Homme.

Chez les mammifères, la myogenèse s'effectue en deux étapes :

- une myogenèse primaire, qui permet la formation de fibres embryonnaires dites « primaires » jusqu'au jour embryonnaire 14.5 chez la souris.
- une myogenèse secondaire a ensuite lieu, entre la myogenèse primaire et la naissance, et consiste en la formation de fibres musculaires supplémentaires, appelées fibres fœtales secondaires.

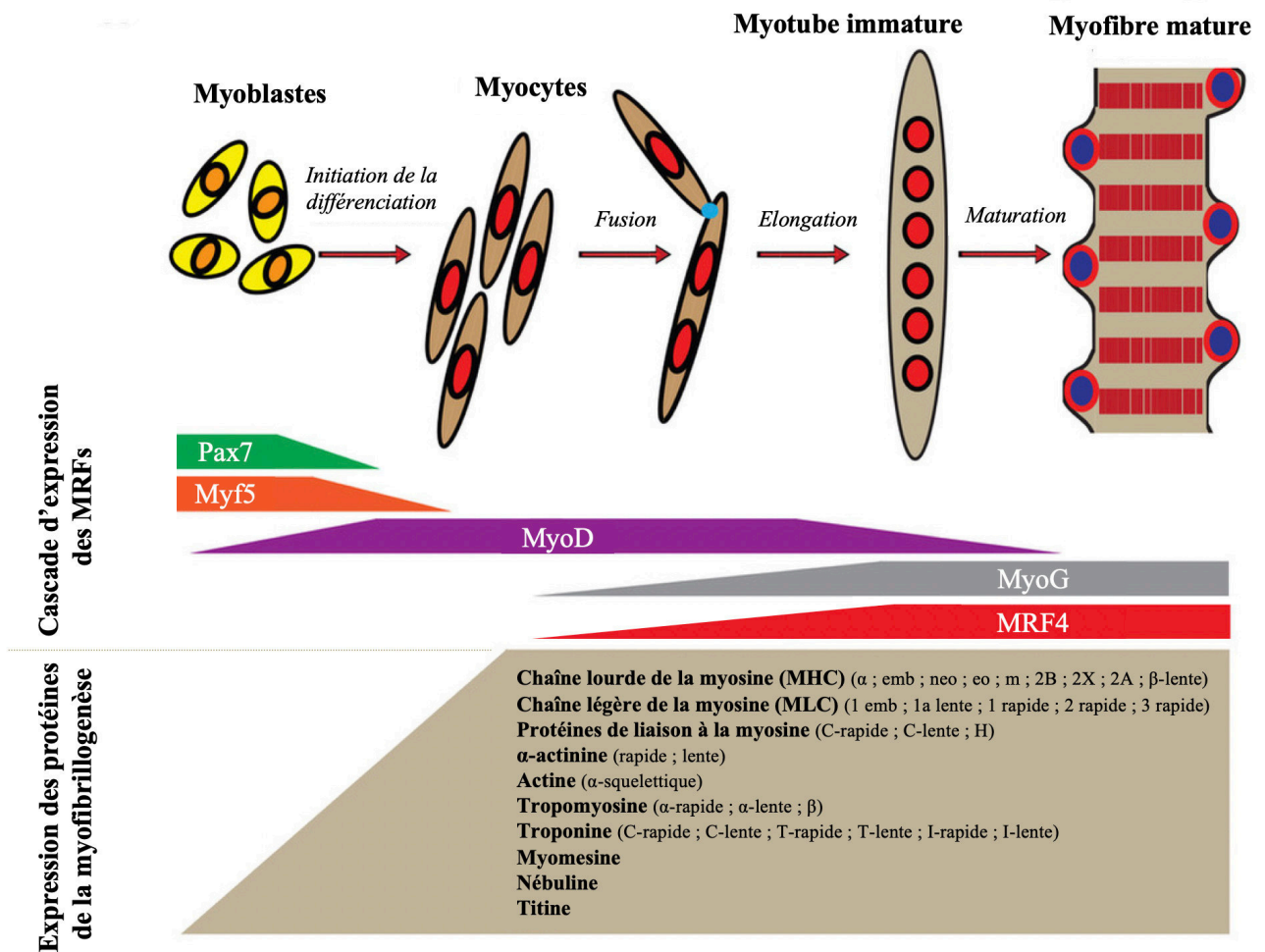
Une fois les cellules précurseurs spécialisées en myoblastes, celles-ci vont quitter le cycle cellulaire et entrer en différenciation. Ce processus a lieu en deux vagues successives qui requièrent l'expression successive de facteurs de transcription spécifiques, appelés Facteurs de Régulation Myogéniques (MRFs) (Bentzinger et al., 2012).

La première vague consiste en l'expression successive de deux facteurs de transcription : le facteur myogénique n°5 (Myf5) et le facteur de détermination myoblastique MyoD. Cette voie de signalisation est régulée temporellement. Les myocytes expriment Myf5 et MyoD. Alors que MyoD persiste au cours de la différenciation, l'expression de Myf5 s'estompe très rapidement (Figure 2).

Les myocytes fusionnent ensemble pour former un syncytium appelé myotube, composé de plusieurs dizaines de noyaux. Ce processus de fusion requiert un processus d'adhésion cellule-cellule impliquant des protéines associées aux membranes et un remodelage du réseau d'actine. L'adhésion des cellules l'une à l'autre met en jeu des protéines d'adhésion de surface nécessaires à la fusion, telles que les membres de la famille des cadhérines et des intégrines (Abmayr et Pavlath, 2012 ; Maartens et Brown, 2015 ; Przewoźniak et al., 2013). Le réseau d'actine est également modifié pour permettre la fusion. En effet, le complexe protéique Arp2/3 va permettre la ramification du réseau d'actine grâce à son activité de nucléation des polymères d'actine (Chhabra et Higgs, 2007 ; Goley et Welch, 2006). Cette modification d'activité du cytosquelette d'actine permet d'augmenter la surface de contact entre les cellules en aplatissant les surfaces des cellules en fusion. On observe aussi des modifications locales des propriétés des membranes plasmiques, notamment grâce aux protéines transmembranaires Annexines (Leikina et al., 2015) et Singles Bar (Estrada et al., 2007). Le processus de fusion en lui-même est permis par des complexes protéiques qui agissent en synergie afin de remodeler les membranes. Les protéines Myomaker et Myomerger sont essentielles à la fusion. Chacune d'elles est responsable d'une étape bien précise. Alors que Myomaker contrôle les étapes précoces de fusion, Myomerger intervient dans un second temps pour achever le processus de fusion en formant un pore entre les membranes en fusion (Leikina et al., 2018 ; Millay et al., 2013). L'ensemble de ces protéines va permettre la fusion des bicouches lipidiques constituant les membranes plasmiques des cellules, ainsi que la formation de pores au sein des membranes fusionnées établissant une continuité cytoplasmique.

S'ensuit l'activation d'une deuxième vague de MRFs qui induisent la différenciation terminale : la Myogénine (MyoG) et le facteur myogénique n°6 (MRF4). Simultanément, des gènes spécifiques au tissu musculaire et, responsables de la myofibrillogenèse s'expriment et assurent la maturation de l'appareil contractile. C'est les cas de la myosine, l'actine, la tropomyosine, la troponine, la myomesine, la nébuline ainsi que de la titine (Fig.3).

Parallèlement à cette cascade d'expression, le cytosquelette de microtubules voit son architecture totalement remodelée au cours de la myogénèse (Tassin et al., 1985).



**Figure 3 :** Cascade d'expression des facteurs de régulation myogénique (MRFs) ainsi que des protéines impliquées dans la myofibrillogenèse régulant la progression de la myogenèse. Myf5 et MyoD initient le programme myogénique. Dans un deuxième temps, MyoG et MRF4 initient la différenciation terminale en permettant la fusion des myocytes en myotubes. De façon concomitante, les protéines permettant la structuration des unités contractiles du muscle s'expriment et régulent la maturation des fibres musculaires.



### c) Régénération musculaire

La régénération est un processus important pour le tissu musculaire squelettique qui s'active lorsque le tissu est lésé, lors d'une blessure par exemple, ou encore dans des cas de pathologies telles que les dystrophies musculaires. La capacité de régénération du muscle est gouvernée par l'interaction entre les cellules satellites, cellules souches unipotentes, précurseurs du muscle, (Scharner and Zammit, 2011) et leur microenvironnement, également appelé niche (Lander et al., 2012).

La régénération est donc un processus très orchestré qui implique l'activation et la migration des cellules satellites jusqu'au point de lésion, puis leur prolifération et enfin leur différenciation.

- Les cellules satellites

Pendant les dernières phases de la myogenèse embryonnaire, une population distincte de cellules précurseurs dérivées des somites reste indifférenciée dans un statut quiescent, et associée à la fibre musculaire (Lepper and Fan, 2010) ; ce sont les cellules satellites adultes.

Les cellules satellites sont une population de cellules souches adultes dérivées des cellules embryonnaires progénitrices exprimant les protéines Pax3 (Paired box 3) et Pax7 (Paired box7) (Buckingham, 2007). Les cellules satellites se retrouvent positionnées entre la lame basale et la membrane plasmique de la fibre musculaire mature (Fig.4). Elles sont ainsi séquestrées dans un microenvironnement particulier de la fibre musculaire adulte appelé « niche » (Yin et al., 2013). Cette niche se compose d'éléments cellulaires et non cellulaires, tels que des facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire, des chémokines et des métalloprotéinases de la matrice. Au-delà de la niche immédiate, les cellules interstitielles locales, les motoneurones, les vaisseaux sanguins, les facteurs sécrétés influencent aussi l'activité des cellules satellites (Dumont et al., 2015).

Les cellules satellites sont normalement inactives d'un point de vue mitotique ; elles sont dites quiescentes et présentent un statut de dormance. Ce statut de quiescence est caractérisé par l'expression de marqueurs moléculaires tels que Pax7 ou encore Pax3 (Seale et al., 2000), et par l'absence d'expression de deux MRFs : MyoD1 (Myoblast determination protein 1) et MyoG (Myogénine).

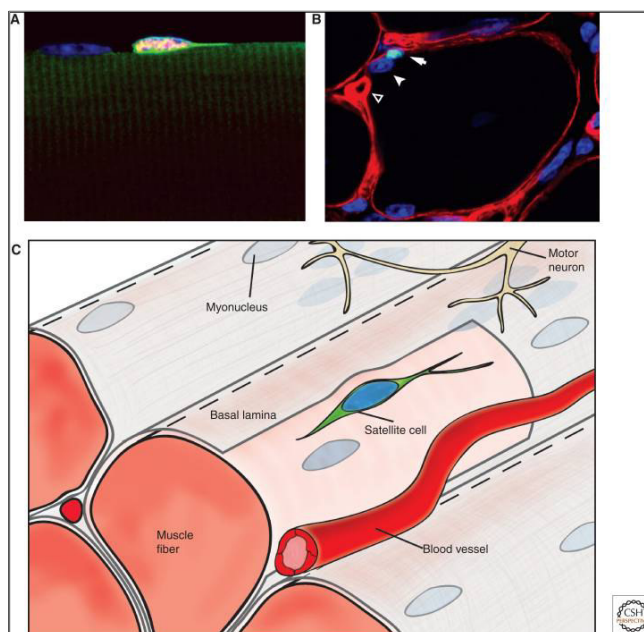
La population de cellules satellites est hétérogène et présente un potentiel de différenciation myogénique (Kuang et al., 2007). Les cellules sont caractérisées par leur rapide capacité à s'activer, proliférer et se différencier en réponse à une lésion musculaire. Les facteurs de transcription et molécules de signalisation qui permettent cette réponse dans le muscle mature sont communs avec ceux de la myogenèse embryonnaire (Tajbakhsh, 2009).

- **Maintien du pool de cellules souches**

Après activation des cellules satellites, une partie d'entre elles va fusionner avec la fibre musculaire lésée de façon à la régénérer. Une autre partie de la population de ces cellules satellites va proliférer par des divisions asymétriques de façon à restaurer la réserve de cellules satellites apposée entre la fibre musculaire et la lame basale (Kuang et al., 2008).

- **Cellules souches et pathologies**

Il a été montré que l'activité des cellules satellites est altérée et s'accompagne d'une sénescence prématurée dans les dystrophies musculaires. Des défauts semblables sont aussi observés au cours de la sarcopénie. En effet, dans cette pathologie, la taille de la population de cellules souches est diminuée ainsi que leur capacité à s'activer lors de la régénération musculaire (Heslop et al., 2000 ; Jiang et al., 2014 ; Kudryashova et al., 2012 ; Yablonka-Reuveni and Anderson, 2006).



**Figure 4 :** Représentation schématique d'un muscle strié squelettique et de la niche des cellules satellites qui y sont associées. Illustration extraite de Bentzinger et al. (2012). **A.** Les cellules satellites sont localisées le long des fibres musculaires. Les cellules satellites expriment spécifiquement PAX7 (en rouge) ; les noyaux sont colorés en bleu et le cytoplasme en vert. **B.** Les cellules satellites (flèche) sont marquées par Pax7 (en vert) et sont retrouvées sous la lame basale (en rouge) qui entoure chaque fibre musculaire. Dans le muscle mature, ces cellules satellites sont toujours associées à un noyau de fibre musculaire (tête de flèche) et sont à proximité de petits capillaires sanguins (tête de flèche vide). **C.** Représentation schématique de fibres musculaires et de la niche des cellules satellites. Les signaux moléculaires au sein de la niche gouvernent la réponse comportementale des cellules satellites, c'est-à-dire leur maintien en quiescence ou leur activation lors d'une blessure.

## 2) L'unité contractile du muscle

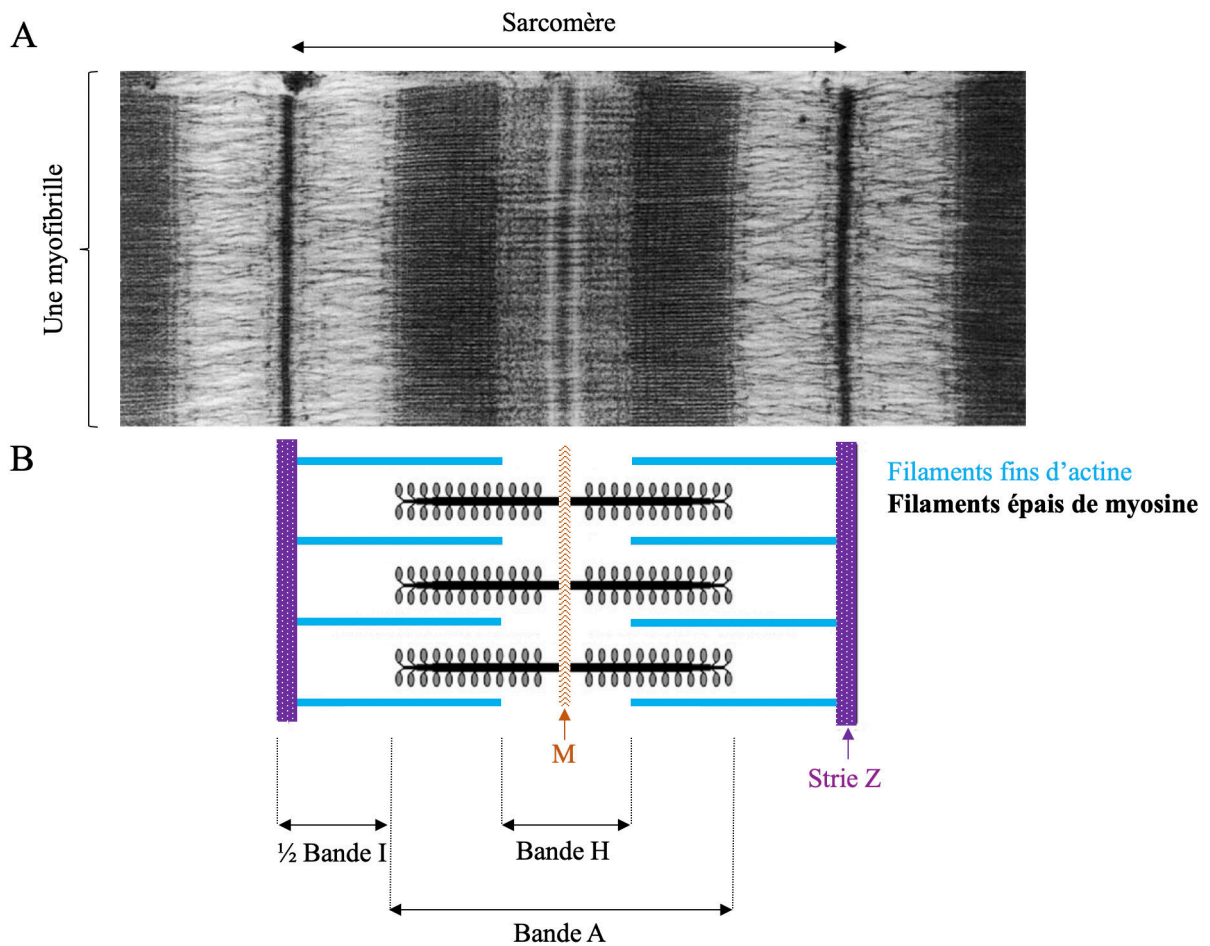
La cascade d'expression qui s'opère durant la myogenèse permet d'aboutir à la formation de fibres musculaires matures. Ces cellules à la forme effilée présentent une organisation intracellulaire répétitive. Cette structuration s'illustre par un dense réseau de myofibrilles qui occupe 80% du volume des fibres musculaires. Le restant des organites se retrouve alors comprimé entre les myofibrilles et la membrane plasmique. Les myofibrilles présentent, dans leur longueur, une succession de sarcomères, unités contractiles du muscle.

### a. L'appareil contractile

Une des caractéristiques du muscle est de pouvoir générer de la force. Cette propriété est permise par la contraction de ses sarcomères. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission a permis l'étude de l'organisation des sarcomères, composés de deux protéines principales : les filaments fins d' $\alpha$ -actine (et les protéines associées) et les filaments épais de myosine (et les protéines associées).

Un sarcomère est délimité par deux bandes sombres appelées stries Z. Chacune d'elles est entourée de deux demi-bandes I (isotrope) qui apparaissent peu denses aux électrons en microscopie électronique à transmission. Au centre de chaque sarcomère est disposé une bande dense et sombre : la bande A (anisotrope), qui ne contient que des filaments épais de myosine. Celle-ci contient une bande plus claire qui correspond à la bande H, elle-même centrée sur la ligne M (Fig.5). Cette différence de densité aux électrons provient de la composition en filaments de chacune des bandes. En effet, les filaments fins d'actine sont ancrés latéralement à la strie Z alors que les filaments épais de myosine s'ancrent à la ligne M (Huxley, 1957). Cette succession de bandes claires et sombres des sarcomères est due à l'organisation tridimensionnelle des filaments fins et épais. Ce sont donc les sarcomères mis bout à bout le long des myofibrilles ainsi que l'empilement des myofibrilles dans le cytoplasme des fibres musculaires qui donnent un aspect strié aux fibres musculaires (Price, 1963).

Les protéines qui composent les sarcomères sont essentielles. Des mutations dans les gènes codant pour différentes protéines du sarcomère sont causales de pathologies musculaires. Ainsi, des mutations dans les gènes codant pour l'actine musculaire, la tropomyosine, la titine ou encore la nébuline peuvent causer des myopathies congénitales (Jungbluth et al., 2018 ; Nance et al., 2012). Des mutations dans des gènes codant pour les protéines des stries Z, telle que la titine, entraînent des dystrophies musculaires des ceintures (Mercuri et al., 2019).



**Figure 5 :** Organisation de l'appareil contractile. **A.** Cliché de microscopie électronique à transmission d'un sarcomère en coupe longitudinale. **B.** Représentation schématique d'un sarcomère de fibres musculaires striées squelettiques illustrant les deux principaux éléments du sarcomère : les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. Les stries *Z* délimitent latéralement le sarcomère. La bande *A* contient les filaments d'actine et de myosine. La ligne *M* se centre sur la bande *H* qui est une zone où les filaments d'actine ne sont pas présents.

## b. La typologie des fibres musculaires, une spécialisation du sarcomère

La production de force dépend de la taille et de la composition en types de fibres du muscle considéré.

Il existe 4 types de fibres musculaire (dont deux majoritaires) (Fig.6) :

- fibres lentes (type I)
- fibres rapides (type II) subdivisées en sous-types IIA, IIX et IIB.

- **Fibres lentes de type I**

Les muscles constitués de fibres lentes de type I sont hautement vascularisés. Étant donné leur richesse en mitochondries, le métabolisme énergétique de ces fibres musculaires est majoritairement oxydatif et donc peu coûteux en ATP. Bien que ces fibres musculaires soient résistantes à la fatigue, leur contraction lente génère moins de force. Cette typologie est principalement retrouvée chez les athlètes d'endurance.

- **Fibres rapides de type II**

Bien que plus fatigables que les fibres lentes de type I, les fibres musculaires rapides de type II permettent de produire une force plus importante. Cette activité explosive est rendue possible par des pics d'activité anaérobie. Ces fortes capacités glycolytiques assurent une production d'ATP optimale qui permet de compenser une intense hydrolyse d'ATP au cours de l'exercice. Ce type de fibres musculaires est principalement retrouvé chez les athlètes de force.

Une spécialisation des fibres musculaires rapides de type II se produit en fonction de l'isoforme de la chaîne lourde de myosine exprimée dans les sarcomères (Schiaffino, 2018).

Parmi les 3 sous-types de fibres rapides, IIA, IIB, IIX, il existe une variation dans la vitesse de contraction et dans la production de force des fibres musculaires.

Avec son métabolisme davantage oxydatif comparés aux fibres IIX et IIB, les fibres de type IIA expriment la myosine-2a (MyHC-2a). Ces fibres présentent des propriétés de contraction se rapprochant de celles des fibres lentes. A l'inverse, les fibres de type IIB ont une vitesse de contraction des sarcomères très rapide associée à une puissance mécanique élevée. Ces fibres expriment la myosine-2b (MyHC-2b). A mi-chemin entre les fibres IIA et IIB, les fibres de type IIX, expriment la myosine-2x (MyHC-2x) et sont intermédiaires par rapport aux fibres IIA et IIB.

- **Plasticité musculaire**

Le muscle est un tissu plastique capable de modifier la typologie de ses fibres musculaires en fonction du type d'exercice auquel il est soumis. Cette propriété des fibres musculaires est

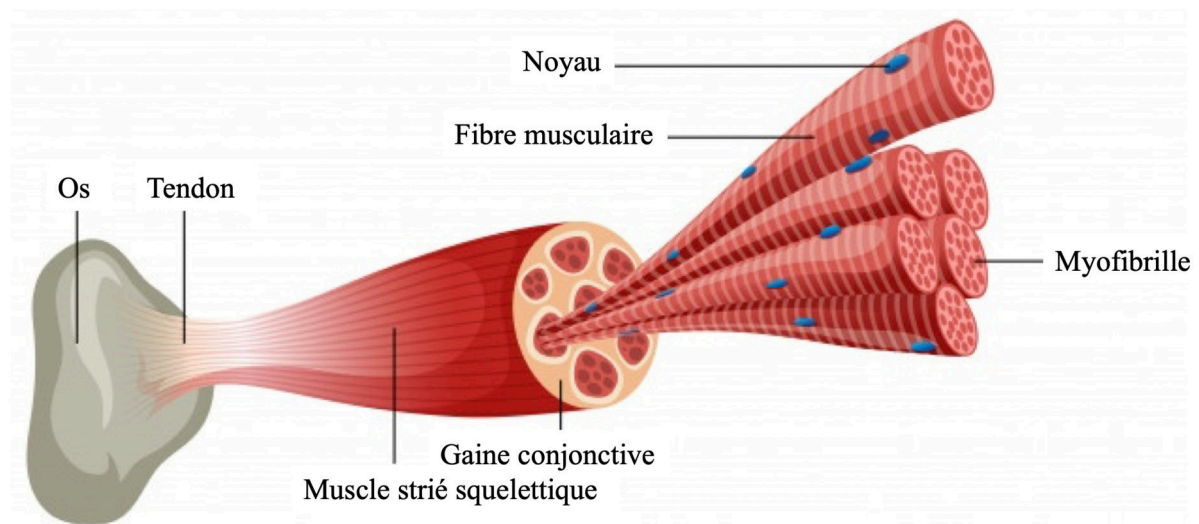
notamment illustrée par la théorie d'Howald émise en 1984 selon laquelle la transformation des fibres rapides en fibres lentes est facilitée, alors que la transformation inverse des fibres musculaires est moins favorable. Finalement, cette adaptation de typologie des fibres musculaires peut avoir lieu dans les deux sens ; devenir davantage oxydatif en prenant un phénotype similaire aux fibres lentes ou à l'inverse davantage glycolytique associé à un phénotype des fibres rapides (Pette et Staron, 2000).

| <b>Types de fibres</b>         | <b>I</b> | <b>IIA</b>         | <b>IIX</b> | <b>IIB</b>   |
|--------------------------------|----------|--------------------|------------|--------------|
| <b>Contraction</b>             | Lente    | Rapide             |            |              |
| <b>MyHC</b>                    | I        | Ila                | Ilx        | Ilb          |
| <b>Métabolisme</b>             | Oxydatif | Oxydo-glycolytique |            | Glycolytique |
| <b>Nombre de mitochondries</b> | +++      | ++                 | +          | +            |
| <b>Résistance à la fatigue</b> | +++      | ++                 | +          | +            |
| <b>Force de contraction</b>    | +        | ++                 | ++         | +++          |

**Figure 6 :** Tableau résumant les caractéristiques des différents types de fibres musculaires.

### 3) Organisation architecturale du muscle strié squelettique

D'un point de vue structural, le tissu conjonctif joue un rôle important de maintien pour le muscle. En effet, des gaines de tissu conjonctif sont retrouvées à différents niveaux. Chacune des fibres musculaires est entourée par une gaine de tissu conjonctif : l'endomysium. Ces fibres musculaires se regroupent par milliers sous forme de faisceaux et sont soutenues par une nouvelle gaine conjonctive appelée périmysium. Finalement, ces faisceaux musculaires sont maintenus ensemble par l'épimysium et forment ainsi le muscle dans sa globalité (Lieber, 2009, Mukund and Subramaniam, 2019) (Fig.7). Dans la continuité du muscle, ces fascias conjonctifs se réunissent et forment le tendon qui rattache le muscle à l'os. Cette zone spécifique est appelée jonction myotendineuse ; elle permet de transmettre la force générée par la contraction musculaire au tissu osseux pour *in fine* produire un mouvement.



**Figure 7 :** Organisation structurale du muscle strié squelettique.

### III. De la transmission de l'information nerveuse à la production de force

#### 1) Transmission de l'information nerveuse

##### a. La jonction neuromusculaire

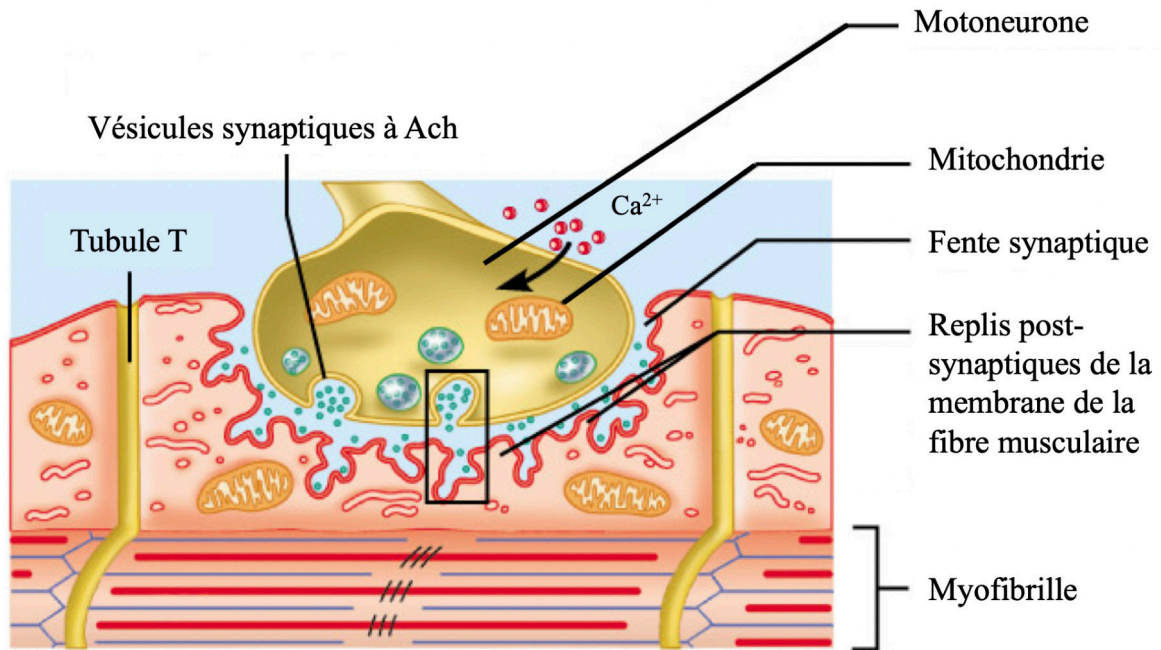
Comme mentionné précédemment, le muscle strié squelettique est un muscle à contraction volontaire innervé par le système nerveux somatique. En effet, l'information de contraction est transmise au muscle par le motoneurone (Sherrington, 1906) qui émane de la corne antérieure grise de la moelle épinière. Chaque fibre musculaire reçoit l'information d'un unique motoneurone. L'ensemble de ces deux entités, le motoneurone et la fibre musculaire, constituent l'unité motrice.

L'interaction neurone-muscle se fait au niveau de zones spécialisées, appelées jonctions neuromusculaires (Fig.8). Elles sont le lieu de la transmission de l'information nerveuse au muscle. En effet, ces synapses chimiques sont responsables de la transmission des impulsions électriques du motoneurone à la fibre musculaire qu'il innerve. Elles sont constituées de trois parties distinctes : le motoneurone qui constitue l'élément pré-synaptique, une fente synaptique et la fibre musculaire qui correspond à l'élément post-synaptique.

Les terminaisons nerveuses des motoneurones contiennent les vésicules synaptiques qui stockent et relâchent le neurotransmetteur : l'acétylcholine (ACh) (Denker and Rizzoli, 2010 ; Rizzoli and Betz, 2005). Les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane pré-synaptique du motoneurone. L'acétylcholine contenue dans ces vésicules est alors libérée dans la fente synaptique où elle diffuse jusqu'aux récepteurs nicotiques à acétylcholine (AChR) localisés sur des replis post-synaptiques au niveau de la fibre musculaire. En se fixant sur ses récepteurs, l'acétylcholine transmet à la fibre musculaire l'information générée par le motoneurone. La cascade de signalisation qui s'ensuit crée un potentiel de dépolarisation locale qui entraîne l'ouverture de canaux ioniques  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Cela produit un potentiel d'action (Li et al., 2018) qui va se propager en surface le long de la membrane plasmique de la fibre musculaire, mais aussi en profondeur grâce aux invaginations de la membrane plasmique au niveau des tubules transverses (ou tubules T).

Cette organisation de la jonction neuromusculaire peut être altérée dans certains cas pathologiques (Hall and Sanes, 1993 ; Hughes et al., 2006 ; Sanes and Lichtman, 1999). C'est le cas par exemple des myasthénies. Ces pathologies à évolution progressive sont causées par des perturbations des protéines de la membrane post-synaptique (Tsujino et al., 2003). Ces altérations entraînent une transmission incorrecte du signal entre le motoneurone et la membrane post-synaptique de la fibre musculaire.





**Figure 8 :** Représentation schématique d'une jonction neuromusculaire.

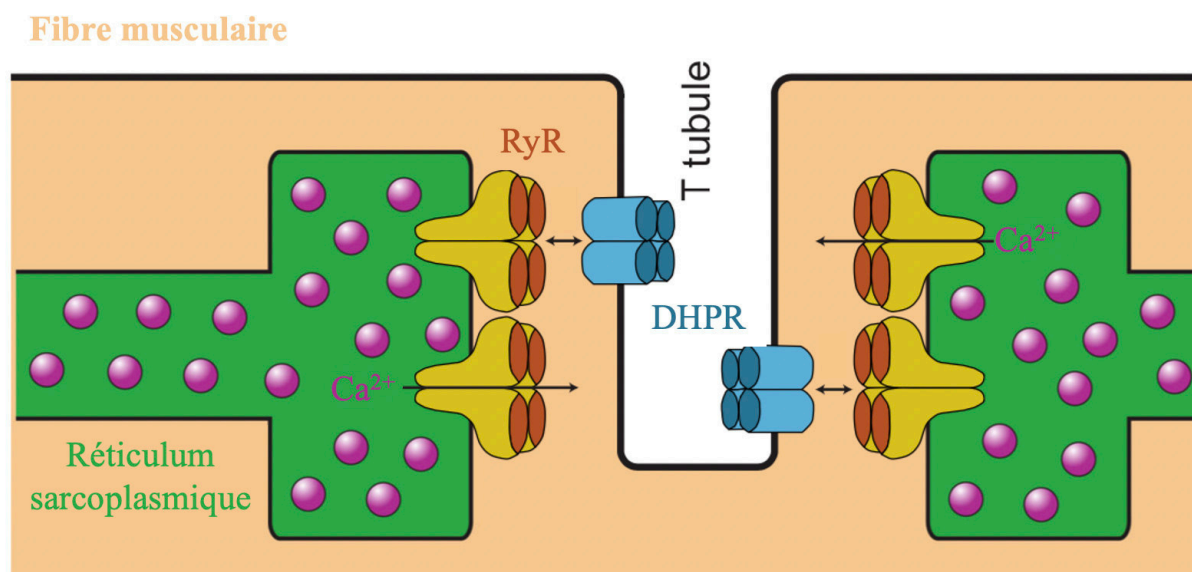
### b. La machinerie du couplage excitation-contraction

Le muscle présente un système membranaire excitable très spécifique qui se compose de la membrane plasmique ou sarcolemme, et des membranes du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique.

La contraction musculaire débute avec l'activation de canaux sodiques rapides, activation générée par un potentiel d'action propagé le long de la fibre musculaire. Ce processus est appelé couplage excitation – contraction. Cet événement nécessaire à la contraction musculaire a lieu à la jonction de deux structures membranaires spécialisées : le tubule T et le réticulum sarcoplasmique (RS). L'association de deux citernes terminales du RS et un tubule T forment la triade, zone spécifique du couple excitation – contraction. Le potentiel d'action généré au niveau de la jonction neuromusculaire se propage le long du sarcolemme jusqu'au niveau des tubules T qui contiennent les récepteurs aux dihydropyridines (DHPR). Le potentiel d'action dépolarise ces canaux calciques voltage dépendants, ce qui entraîne un changement de leur conformation (Adams et al., 1990 ; Rios et Brum, 1987 ; Tanabe et al., 1988). Les DHPR font face à d'autres récepteurs spécialisés localisés dans la membrane du RS : les récepteurs à la ryanodine (RyR) (Meissner et Lu, 1995 ; Takeshima et al., 1994) (Fig.5). Sous l'effet du potentiel d'action, le changement conformationnel du DHPR permet la libération intracellulaire massive de  $Ca^{2+}$  depuis les citernes terminales du RS *via* les RyR (Rebeck et al., 2014). Le calcium ainsi libéré dans le cytoplasme ira se lier à des protéines sarcomériques, les Troponines, pour générer la contraction musculaire. Ce processus sera détaillé dans le paragraphe suivant. Ainsi le DHPR agit comme un senseur du voltage dans le

muscle squelettique et contrôle l'ouverture des RyR *via* des interactions moléculaires directes (Franzini-Armonstrong, 2004).

Des défauts héréditaires ou acquis de protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction peuvent altérer le développement et/ou la fonctionnalité musculaire. Ces perturbations peuvent être associées à des conditions pathologiques telles que les myopathies congénitales (Jungbluth et al., 2018 ; Pancaroglu et Van Petegem, 2018). Par exemple, certaines mutations dans le gène codant pour le RyR sont associées à l'hyperthermie maligne, aux myopathies à cores centraux caractérisées par des lésions rondes au centre des fibres ou encore aux myopathies à multi-minicores (Jungbluth et al., 2018).

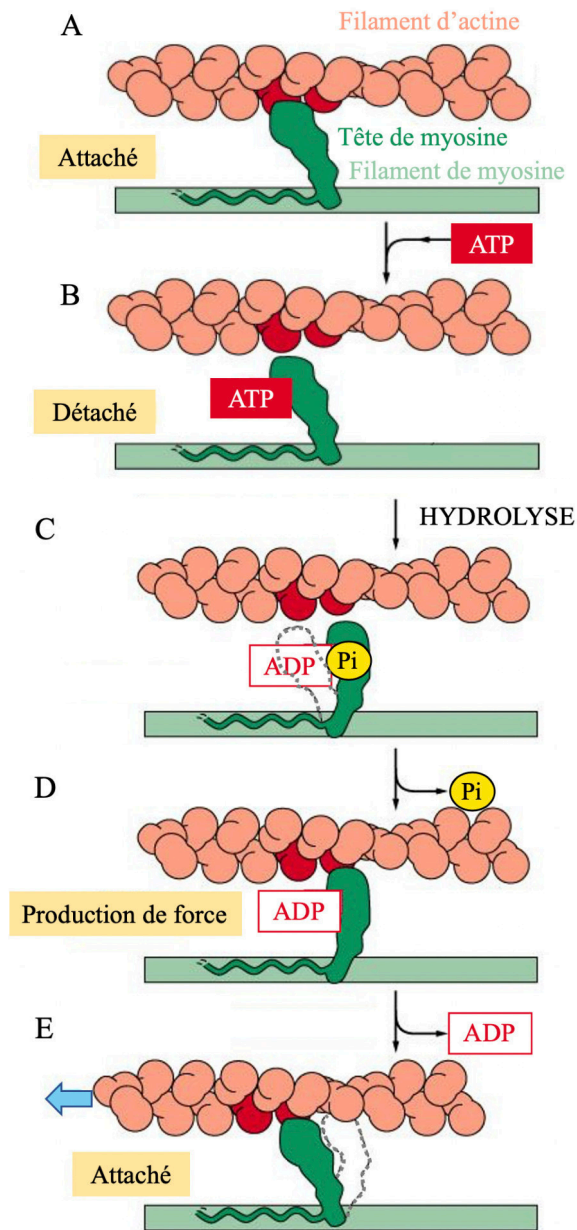


**Figure 9 :** Représentation schématique d'une triade de fibre musculaire. L'interaction entre le DHPR et le RyR est centrale au mécanisme moléculaire du couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique. D'une manière architecturale, un tétramère de RyR, ancré dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, fait face à un canal intégré dans la membrane plasmique de la fibre musculaire : le DHPR. Schéma extrait de Shishmarev (2020).

## 2) La production de force

Les connaissances concernant l'organisation structurale des sarcomères a permis d'aboutir, en 1954, au modèle de glissement des filaments d'actine et de myosine à l'origine de la contraction musculaire (Huxley and Hanson, 1954 ; Huxley and Niedergerke, 1954).

Le calcium libéré depuis le réticulum sarcoplasmique à l'issue du couplage excitation-contraction permet d'initier la contraction musculaire. En effet, le calcium se lie à la Troponine (protéine sarcomérique) ce qui entraîne un changement de conformation du complexe Troponine – Tropomyosine. Cette modification expose les sites de liaison de la myosine sur les filaments d'actine et permet leur interaction : c'est le début de la contraction musculaire (Fig.10A). L'ATP cytoplasmique disponible interagit avec les têtes de myosine et entraîne la dissociation actine - myosine (Fig.10B). L'activité ATPasique de la myosine hydrolyse l'ATP en ADP et phosphate inorganique libre (Pi). Ceci entraîne un changement de conformation de la tête de myosine qui se déplace le long du filament d'actine (Fig.10C). L'actine et la myosine se lient faiblement avec un angle de 90° (Fig.10D). La libération du phosphate inorganique génère la force de contraction. La tête de myosine tourne sur sa charnière en poussant le filament d'actine vers la bande M du sarcomère. A la fin de la contraction, le calcium est repompé dans le réticulum sarcoplasmique et le complexe Troponine – Tropomyosine retrouve sa conformation de relâchement musculaire. Puis, la tête de myosine libère l'ADP et retrouve son état de rigidité (Fig.10E) (Huxley, 1969 ; Huxley and Kress, 1985 ; Fitts, 2008).



**Figure 10 :** Représentation schématique du modèle de glissement des filaments d'actine et de myosine décrit par Huxley and Hanson (1954) et Huxley and Niedergerke (1954) permettant la contraction musculaire.

## CHAPITRE 2 - LES MICROTUBULES

### **I. Généralités**

Le cytosquelette des cellules eucaryotes se compose de trois éléments essentiels : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les MTs. Ces réseaux sont interconnectés, notamment *via* des protéines adaptatrices, et agissent en synergie pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Au cours du développement musculaire, chacun des éléments du cytosquelette gouverne des mécanismes cellulaires spécifiques.

Les filaments d'actine sont essentiels à la fusion des myoblastes (Martin, 2016). Leur rôle n'est toutefois pas limité aux étapes précoces de la différenciation musculaire. En effet, l'actine permet également la contraction des fibres musculaire matures, en collaboration avec la myosine (Huxley and Hanson, 1954 ; Huxley and Niedergerke, 1954).

Les filaments intermédiaires constituent une famille protéique aux fonctions variées. Le muscle exprime des filaments intermédiaires spécifiques comme la desmine. Les filaments qu'elle constitue sont nécessaires à la fusion des myoblastes (Schultheiss et al., 1991), alors que plus tardivement dans la différenciation musculaire, la desmine a un rôle davantage structural en connectant les myofibrilles superficielles *via* leurs stries Z à la membrane plasmique (Capetanaki et al., 2007).

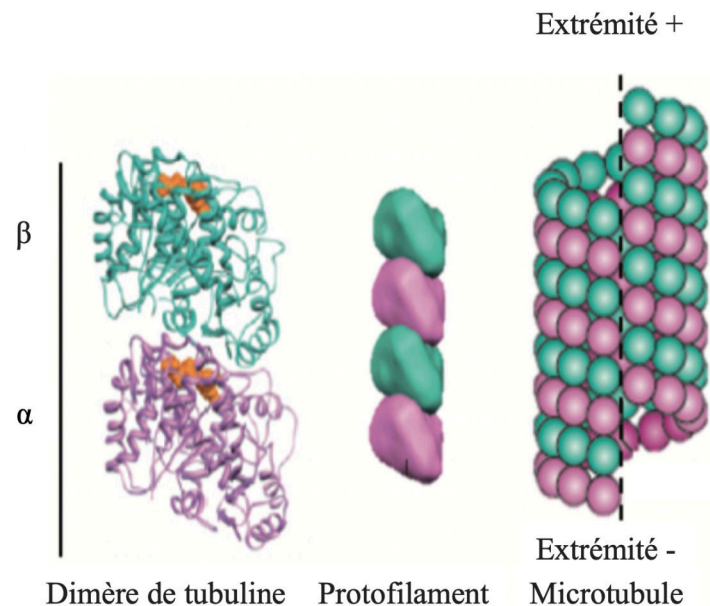
Les microtubules sont des éléments conservés retrouvés dans tous les organismes eucaryotes. En effet, les MTs sont fondamentaux à la prolifération cellulaire. Ils forment le fuseau mitotique qui permet de séparer les chromosomes pendant la mitose (McIntosh, 2016). Les structures longilignes, que forment les MTs, participent à l'organisation subcellulaire en coopération avec les moteurs moléculaires. En effet, les MTs forment des rails sur lesquels les moteurs moléculaires se déplacent et catalysent le déplacement d'éléments intracellulaires. Du fait de ces propriétés, les MTs régulent le positionnement des organites au sein du cytoplasme. Ce transport intracellulaire MT-dépendant contribue aux fonctions biologiques de nombreux types cellulaires comme dans les neurones où les vésicules contenant les neurotransmetteurs sont acheminées jusqu'à la synapse par les moteurs moléculaires qui se déplacent le long des MTs (Barlan et Gelfand, 2017).

Les MTs et les moteurs moléculaires associés sont également impliqués dans la structure des cils et des flagelles (Viswanadha et al., 2017), ce qui fait des MTs des éléments essentiels à la motilité de nombreux organismes.

## 1) La structure

Les MTs sont composés d'une protéine globulaire : la tubuline. Deux isoformes de tubuline sont nécessaires à la formation d'un microtubule : l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline. Ces deux sous-unités s'assemblent sous la forme d'hétérodimères d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline également connus sous les noms d' $\alpha\beta$ -tubuline ou encore de dimères de tubuline. Assemblés les uns à la suite des autres, ces hétérodimères constituent un protofilament. La structure des MTs comprend majoritairement 13 protofilaments associés latéralement. Le repliement de ces protofilaments est régulé par des protéines chaperonnes et permet de générer le polymère creux de 25nm d'épaisseur qu'est le microtubule (Tian et Cowan, 2013) (Fig.11). La structure qui résulte de cet assemblage est polaire :

- une extrémité à croissance rapide, dite extrémité positive, expose la  $\beta$ -tubuline,
- une extrémité négative à croissance lente qui expose l' $\alpha$ -tubuline.



**Figure 11 :** Représentation schématique de la structure des microtubules. Illustration issue de la revue de Goodson et Jonasson (2018).

La surface des MTs est chargée négativement. En effet, l'extrémité C-terminale d' $\alpha\beta$ -tubuline contient des résidus acides localisés en surface du polymère. Ces extrémités riches en glutamate sont des sites clés d'interaction protéique (Roll-Mecak, 2015), notamment avec les protéines associées aux microtubules (MAPs) qui permettent de maintenir la stabilité des MTs et de réguler leur dynamique.

Des images de cryotomographie électronique et de microscopie cryoélectronique de MTs ont montré des densités dans la région interne des MTs (Garvalov et al., 2006). Des travaux publiés en 2012 ont suggéré que ces densités pourraient être de potentiels complexes enzymatiques à l'origine de modifications post-traductionnelles des MTs (Soppina et al., 2012). Des travaux menés par Coombes et al. (2016) ont permis de confirmer cette hypothèse. L'enzyme responsable de l'acétylation des MTs, l' $\alpha$ -tubuline acétyltransférase, accède aux sites d'acétylation en entrant dans la lumière des MTs par leurs extrémités ou encore par des cassures dans leur structure. Ces complexes enzymatiques ne sont pas les seuls retrouvés dans la lumière des MTs. Des segments d'actine peuvent également y être trouvés (Paul et al., 2019) mais leur rôle n'a pas été démontré.

Les MTs observés *in vivo* et *in vitro* ne sont pas rectilignes. L'interaction des MTs avec des protéines, tels que les moteurs moléculaires, les MAPs ou encore les réseaux d'actine ou de filaments intermédiaires, permet de réguler leur stabilité et de modifier les forces exercées sur les MTs, générant ainsi leur sinuosité (Hawkins et al., 2010). Toutefois, une autre hypothèse pourrait également être avancée, puisque la courbure des MTs pourrait aussi être induite par des défauts dans la structure même des MTs. En effet, des dimères de tubuline peuvent spontanément se désassembler de la structure du MT et laisser une cavité, qui sera comblée par la suite par d'autres dimères (Schaedel et al., 2019).

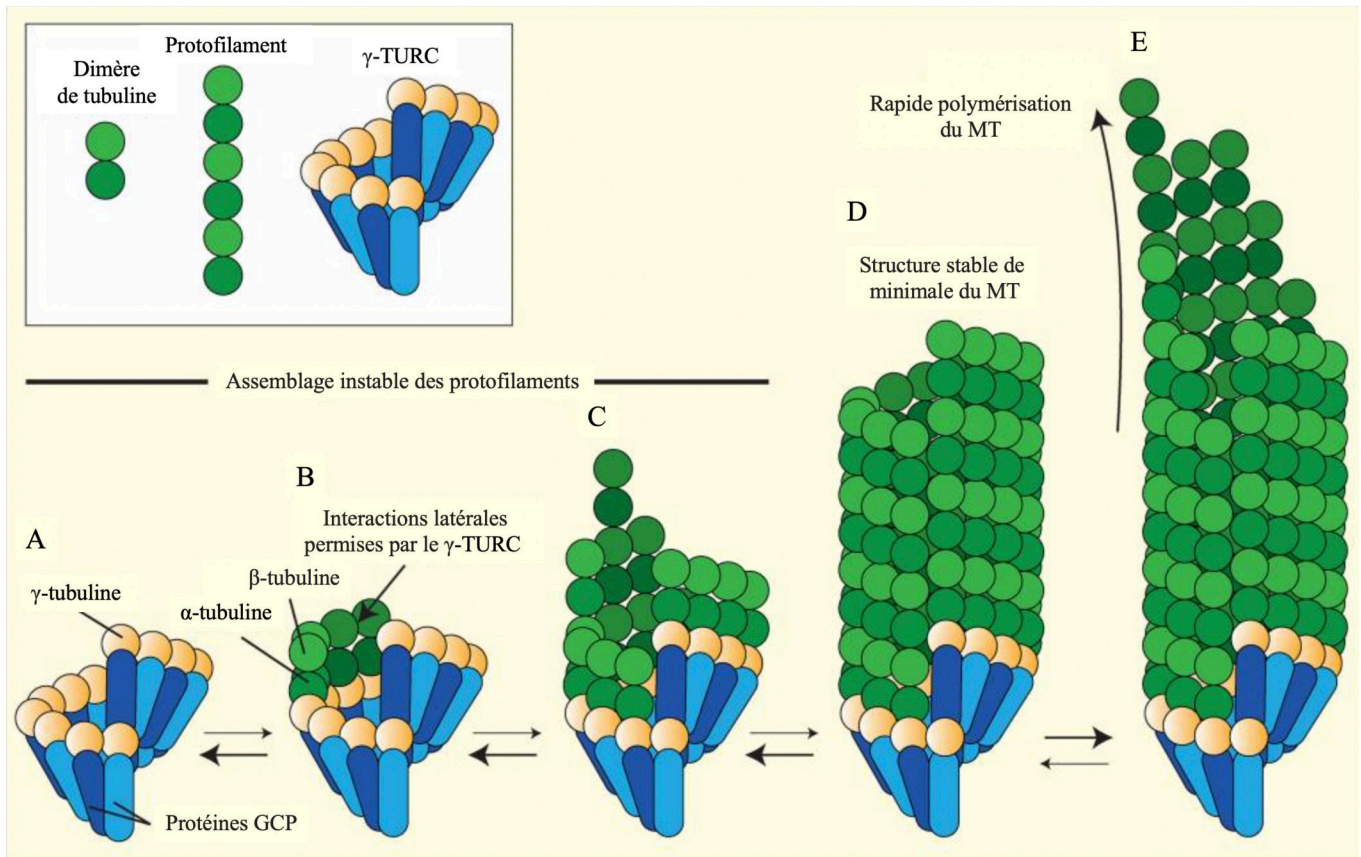
## 2) Dynamique des microtubules

### a. Processus de nucléation

Au vu de la structure complexe des MTs, leur formation *de novo* est un processus qui nécessite des conditions particulières. En effet, la nucléation d'hétérodimères d' $\alpha\beta$ -tubuline purs en solution est un processus défavorable, dépendant d'une forte concentration de tubuline (Caudron et al., 2002).

La genèse de MTs est facilitée par le recrutement d'une machinerie de nucléation spécialisée associée à la  $\gamma$ -tubuline. Le complexe protéique de nucléation est le  $\gamma$ -TURC ( $\gamma$ -TUbulin Ring Complex). C'est une structure protéique annulaire constituée de  $\gamma$ -tubuline et protéines associées à la  $\gamma$ -tubuline : les GCPs (Fig.12) (Tovey et Conduit, 2018 ; Kollman et al., 2011). L'activité de nucléation du complexe  $\gamma$ -TURC dépend de protéines adaptatrices telles que la péricentrine ou encore Akap9 (Tovey et Conduit, 2018).

Cette organisation protéique agit comme un modèle pour l'assemblage des MTs mais également comme un ancrage pour l'extrémité négative des MTs. C'est le Centre Organisateur des MTs (MTOC).



**Figure 12 :** Représentation schématique du modèle de nucléation des MTs, adaptée de Tovey et Conduit (2018). **A.** La structure du  $\gamma$ -TURC est constituée de protéines  $\gamma$ -tubuline (en jaune) qui reposent sur les GCPs (en bleues). Ces protéines se structurent sous la forme d'une hélice à simple tour. **B.** Les dimères cytosoliques d' $\alpha\beta$ -tubulines se lient à la  $\gamma$ -tubuline. Cette polymérisation permet la croissance du protofilament et favorise les interactions latérales entre dimères. **C.** L'assemblage des premiers dimères de tubuline s'effectue à vitesse réduite et résulte en l'ébauche d'un MT dont l'équilibre est instable. Comme indiqué par le fléchage sur ce schéma, l'assemblage protéique initié est davantage en faveur de leur dépolymérisation. **D.** Davantage de dimères assemblés permettent au polymère d'acquérir sa stabilité. **E.** Une fois le noyau stable de tubuline assemblé, la polymérisation du MT devient favorable et progresse plus rapidement.



## b. Instabilité dynamique des microtubules

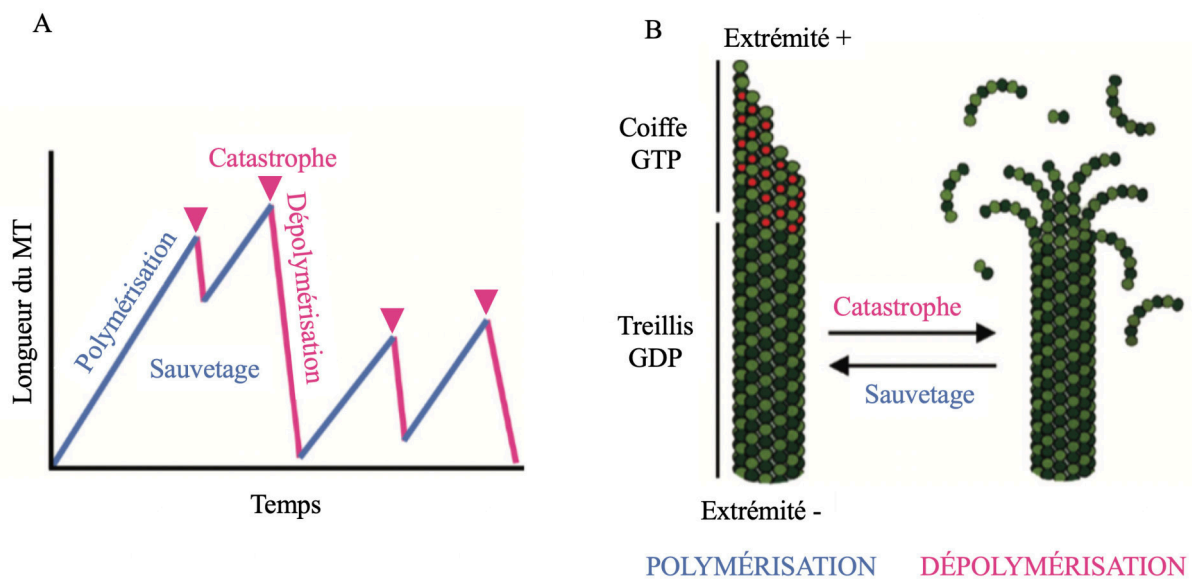
Bien que le terme de « cytosquelette » suggère une structure statique, les MTs sont hautement dynamiques. Ce comportement des MTs est connu sous le nom d'instabilité dynamique. Comme mentionné précédemment, l'extrémité négative des MTs est enchâssée dans le MTOC. Ainsi ce processus d'instabilité dynamique est plus spécifique des extrémités positives des MTs. Décrit en 1984 par Mitchison et Kirschner, ce phénomène consiste en un passage aléatoire entre un état de polymérisation lente des extrémités positives des polymères de tubuline et un état de dépolymérisation rapide. La transition de la polymérisation vers la dépolymérisation est appelée catastrophe, alors que l'évènement inverse est appelé sauvetage (Fig.13A).

La transition entre ces deux états est régulée par le nucléotide GTP. En effet, l'instabilité dynamique nécessite de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP sur le site échangeable de la  $\beta$ -tubuline (Carlier et al., 1989 ; Valiron et al., 2001). Alors que l' $\alpha$ -tubuline ne peut lier que le GTP, le site de la  $\beta$ -tubuline, dit échangeable, peut lier le GTP ou le GDP. Lors des phases de polymérisation, les dimères de tubuline solubles lient le GTP sur l' $\alpha$ -tubuline. L'extrémité en croissance du MT est donc une région riche en GTP. C'est la  $\beta$ -tubuline qui, en hydrolysant le nucléotide, génère l'accumulation de tubuline-GDP caractéristique des zones plus anciennement polymérisées (Fig.13B).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'énergie du GTP n'est pas utilisée pour polymériser les MTs mais plutôt pour les désassembler. Cette propriété du GTP a été démontrée dans une expérience où le GTP est remplacé par un analogue à hydrolyse lente : le guanylyl 5'- $\alpha,\beta$ -methylenediphosphonate (GPMCPP). Dans ces conditions expérimentales, les MTs polymérisent sans difficulté alors que leur vitesse de dépolymérisation est fortement réduite (Hyman et al., 1992). L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne un changement conformationnel des sous-unités de tubuline qui génère un affaiblissement des liaisons entre les dimères. Ces modifications favorisent *in fine* la dépolymérisation du MT.

La rapide dépolymérisation des MTs entraîne une augmentation de la concentration de tubuline cytosolique libre. Cela permet aux dimères d' $\alpha\beta$ tubulines d'échanger le GDP en GTP. Les dimères libres associés au GTP sont ainsi à nouveau prêts à être incorporés dans les MTs.

Bien que maintenir une telle dynamique des MTs soit très demandeur en énergie, ce mécanisme garantit aux cellules une grande capacité d'adaptation et s'avère nécessaire pour de nombreux aspects cellulaires. En effet, la nature dynamique des MTs fournit un mécanisme d'adaptation morphologique des cellules en réponse aux signaux intra- et extra-cellulaires (Kirschner et Mitchison, 1986). L'aspect aléatoire de l'instabilité dynamique des MTs favorise la prise en charge d'éléments cytoplasmiques trop volumineux (vésicules, organites ou encore chromosomes) pour diffuser efficacement dans l'environnement cytoplasmique. De plus, la combinaison entre exploration spatiale et stabilisation sélective des MTs joue un rôle important pour l'assemblage de structures spécifiques tels que les fuseaux mitotiques au cours de la division cellulaire (Mogilner et al., 2006).



**Figure 13 :** Dynamique et assemblage des MTs. Schéma adapté de Goodson et Jonasson (2018). **A.** Représentation schématique de la longueur des MTs au cours du temps, également appelé cycle de vie d'un MT, subissant l'instabilité dynamique. Les étapes clés de la dynamique des MTs sont indiquées sur le schéma. **B.** Modélisation standard de l'instabilité dynamique des MTs. La coiffe GTP est associée à un processus de polymérisation des MTs alors que l'absence de coiffe GTP initie la dépolymérisation rapide des MTs, appelée catastrophe.

### 3) Modulations structurelles et/ou fonctionnelles des microtubules

#### a. Les isoformes de tubuline

La structure des MTs sous forme d'hétérodimères d' $\alpha\beta$ -tubuline est ubiquitaire dans les cellules eucaryotes (Pollard et Goldman, 2018). Cependant de multiples isoformes de tubuline existent et jouent un rôle fondamental dans la fonction des MTs qu'ils constituent.

La  $\gamma$ -tubulin fait partie de la machinerie de nucléation des MTs. Cette isoforme fait partie des tubulines essentielles aux cellules eucaryote, tout comme l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubulines (Findeisen et al., 2014 ; Gull, 2001).

Retrouvés dans les cils, les flagelles et le corps basal, les  $\delta$ -,  $\epsilon$ - et  $\xi$ -tubulines sont spécifiques des organismes qui possèdent ces structures.

D'autres isoformes de tubuline existent. C'est le cas de l'isoforme  $\eta$  dont l'expression est limitée à des lignées spécifiques, principalement les protistes (Findeisen et al., 2014).

#### b. Les isotypes de tubuline

L'existence d'isotypes de tubuline engendre un niveau de complexité supplémentaire. Le clonage du premier gène de la tubuline, en 1978, (Cleveland et al., 1978) a montré l'existence de plusieurs gènes codants pour l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline (Ludueña et Banerjee, 2008). En effet, chez les mammifères, 9 gènes codent pour l' $\alpha$ -tubuline et 9 codent pour la  $\beta$ -tubuline. Ces gènes codent pour différentes tubulines dont les variations sont localisées majoritairement au niveau des extrémités C-terminale.

Des travaux, menés par Lewis et al. en 1987, ont montré que les isotypes de tubuline co-polymérisent librement pour former un MT hétérogène.

Toutefois, la fonctionnalité de certains MTs dépend d'isotypes spécifiques de  $\beta$ -tubuline. C'est le cas des MTs des axonèmes ciliaires qui expriment la tubuline- $\beta 4$  (codée par *TUBB4*) (Renthal et al., 1993 ; Raff et al., 2008) ou encore des MTs des cellules plaquettaires qui expriment la tubuline- $\beta 1$  (codée par *TUBB1*) (Wang et al., 1986 ; Schwer et al., 2001). Le muscle strié squelettique exprime, lui, les isotypes tubuline- $\beta 6$  (codé par *TUBB6*) et tubuline- $\beta 5$  (codé par *TUBB5*) (Randazzo et al., 2019).

### c) Modifications post-traductionnelles

Outre les isotypes, un second niveau de variabilité est généralement apporté aux extrémités C-terminales des tubulines par les modifications post-traductionnelles. Celles-ci créent des marques locales aux extrémités des tubulines qui sont exposées en surface des MTs (Fig.14). Cette région est un site d'interaction majeur pour MAPs. Les modifications post-traductionnelles peuvent donc influencer les interactions entre les MTs et les MAPs.

- Tyrosination et détyrosination

Les gènes codant pour l' $\alpha$ -tubuline génèrent un résidu tyrosine en C-terminal des tubulines nouvellement traduites (Valenzuela et al., 1981).

Cette tyrosine peut être retirée enzymatiquement (Hallak et al., 1977) puis ré-ajoutée ultérieurement (Arce et al., 1975) ; c'est un phénomène réversible.

La réaction de détyrosination est catalysée par un complexe enzymatique composé de protéines Vasohibin (VASH) (Aillaud et al., 2017 ; Nieuwenhuis et al., 2017) associées à de petites protéines se liant à la Vasohibin (SVBP) (Adamopoulos et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Liao et al., 2019 ; Wang et al., 2019). La Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) (Ersfeld et al., 1993) est responsable de la tyrosination. Elle modifie spécifiquement les dimères libres de tubuline (Prota et al., 2013 ; Szyk et al., 2011 ; Szyk et al., 2013).

La détyrosination est principalement retrouvée sur les microtubules stables et à longue durée de vie ; par exemple, dans les neurones (Cambray-Deakin et Burgoyne, 1987 ; Robson et Burgoyne, 1989 ; Brown et al., 1993). En protégeant les MTs de l'activité de dépolymérisation des protéines motrices de type kinésine-13, la détyrosination stabilise le réseau et augmente la longévité des MTs (Peris et al., 2009 ; Sirajuddin et al., 2014).

Toutefois, une augmentation de la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline a été montrée pour être une source de pathologie des muscles striés squelettiques et cardiaques (Khairallah et al., 2012 ; Kerr et al., 2015 ; Robison et al., 2016).

- Acétylation

L'acétylation de la tubuline a été découverte en 1985 sur la lysine 40 (K40) de l' $\alpha$ -tubuline flagellaire de *Chlamydomonas reinhardtii* (L'Hernault and Rosenbaum, 1985). Contrairement aux autres modifications post-traductionnelles, l'acétylation K40 se localise dans la lumière des MTs et n'affecte pas leur ultrastructure (Howes et al., 2014).

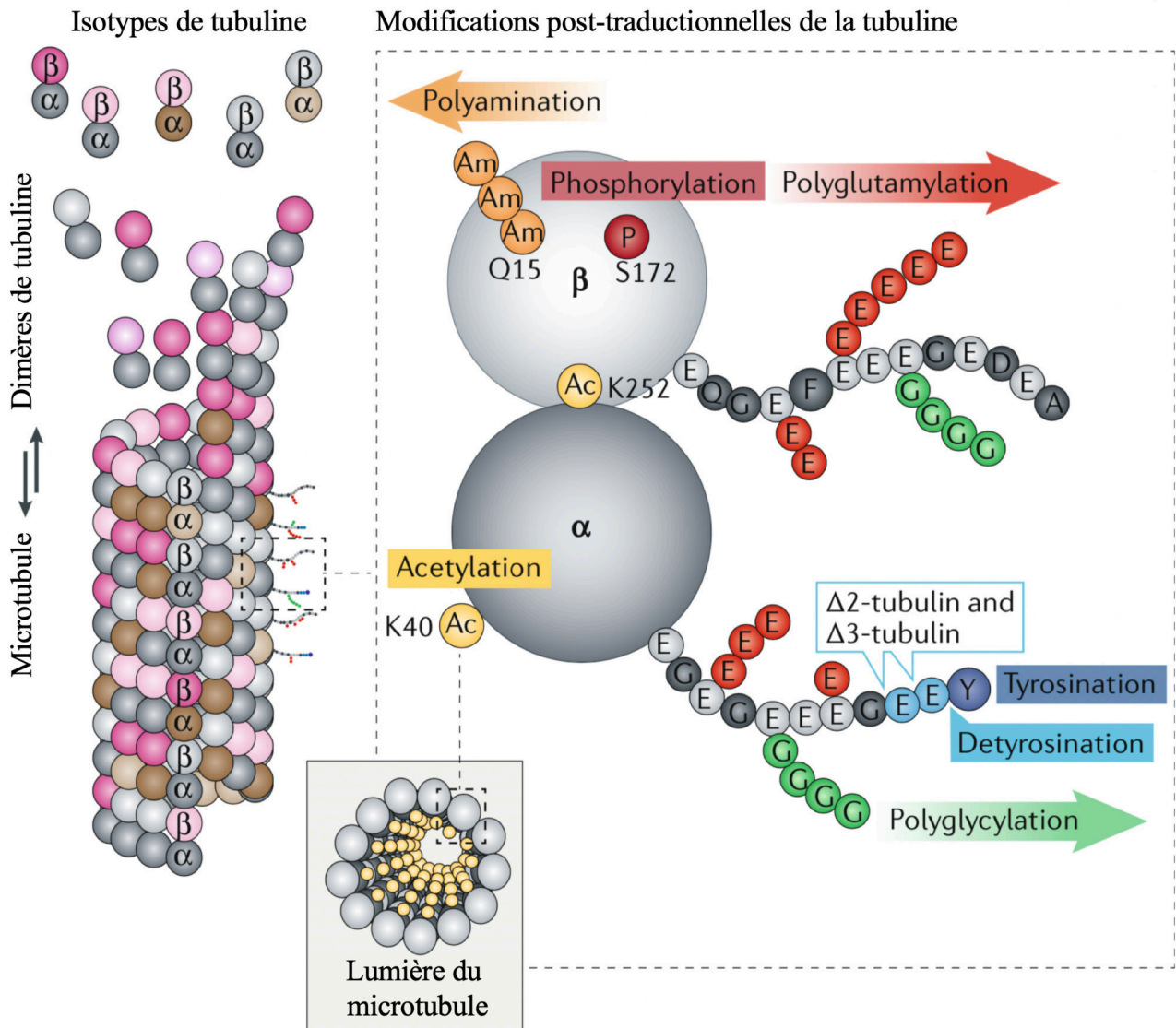
L'acétylation K40 est catalysée par la tubuline acétyl-transférase  $\alpha$ TAT1 (codée par *ATAT1* chez les mammifères) (Akella et al., 2010) qui acétyle spécifiquement l' $\alpha$ -tubuline K40. La réaction inverse est régulée par des enzymes non spécifiques qui possèdent d'autres

substrats (Valenzuela-Fernández et al., 2008) : l'histone déacétylase 6 (codée par *HDAC6*) (Hubbert et al., 2002) et la sirtuine-2 (codée par *SIRT2*) (North et al., 2003).

Cette modification des MTs se trouve généralement enrichie sur les MTs stables et à longue durée de vie (Szyk et al., 2014 – 24906155).

- **Autres modifications post-traductionnelles**

D'autres modifications post-traductionnelles de la tubuline existent (Janke et Magiera, 2020) : la phosphorylation (Eipper, 1974), la polyamination (Song et al., 2013), la polyglutamylation (Eddé et al., 1990), polyglycylation (Redeker et al., 1994) ou encore les tubulines  $-\Delta 2$  (Paturle et al., 1989) et  $-\Delta 3$  (Aillaud et al., 2016) pour lesquelles respectivement deux et trois acides aminés sont manquants en C-terminal de la tubuline. Tout comme l'acétylation et les tyrosination/détyrosination, ces modifications sur la tubuline peuvent moduler les interactions protéiques avec les MTs. Elles peuvent également affecter la dynamique ainsi que les propriétés mécaniques des MTs concernés.



**Figure 14 :** Modifications post-traductionnelles des MTs. Représentation schématique adaptée de Janke et Magiera (2020). Les MTs s’assemblent de façon dynamique à partir de dimères de tubuline α et β. Les extrémités C-terminales libres des dimères de tubulines émanent depuis la surface des MTs et sont sujettes à différentes modifications post-traductionnelles qui sont présentées dans ce schéma.

#### 4) Les protéines associées aux microtubules

Le terme de protéines associées aux MTs s'applique à toutes les protéines capables de se lier aux MTs. Du fait de leur interaction avec les MTs, ces protéines influent sur la dynamique du réseau. De manière générale, les protéines associées aux MTs sont classifiées selon leur activité.

##### a. Les MAPs stabilisatrices

Que ce soit en facilitant la polymérisation des MTs ou en ralentissant leur dépolymérisation, les protéines stabilisatrices favorisent le maintien des MTs. Les MAPs se lient latéralement et/ou longitudinalement aux protofilaments et ont différents effets sur la polymérisation des MTs, leur stabilité ou encore leur fasciculation (Vallee et Borisy, 1978). La plupart des MAPs contiennent des sites de phosphorylation qui permettent de moduler leur effet sur la dynamique des MTs (Fig.15). Ainsi, des modifications dans la phosphorylation des MAPs s'accompagnent de réarrangements majeurs dans l'architecture du réseau microtubulaire dans les neurones (Ikegami et al., 2000 ; Biernat et al., 2002 ; Szébenyi et al., 2005).

Les MAPs sont également essentielles dans le système musculaire. Par exemple, la protéine MAP4 permet d'organiser les MTs sous la forme d'un réseau longitudinal. Cette architecture est nécessaire à la différenciation musculaire (Mogessie et al., 2015). La protéine MAP7, en lien avec la kinésine Kif5B, est également requise pour le développement musculaire (Metzger et al., 2012). Le mécanisme sous-jacent sera détaillé ultérieurement. Enfin, MAP6 est essentielle à l'organisation du réseau de MTs et contribue ainsi à un fonctionnement musculaire optimal (Sébastien et al., 2018).

Un autre exemple de protéine stabilisatrice des MTs est la protéine NuMA1 (Du et al., 2002). En synergie avec la dynéine, elle structure et stabilise les MTs du fuseau mitotique (Hueschen et al., 2019). Son rôle lors de la différenciation musculaire sera présenté dans la partie de résultats.

##### b. Les MAPs déstabilisatrices

A l'inverse, les protéines déstabilisatrices dissocient les MTs en dimères de tubulines libres. Cette fonction peut être régulée par différents modes d'action.

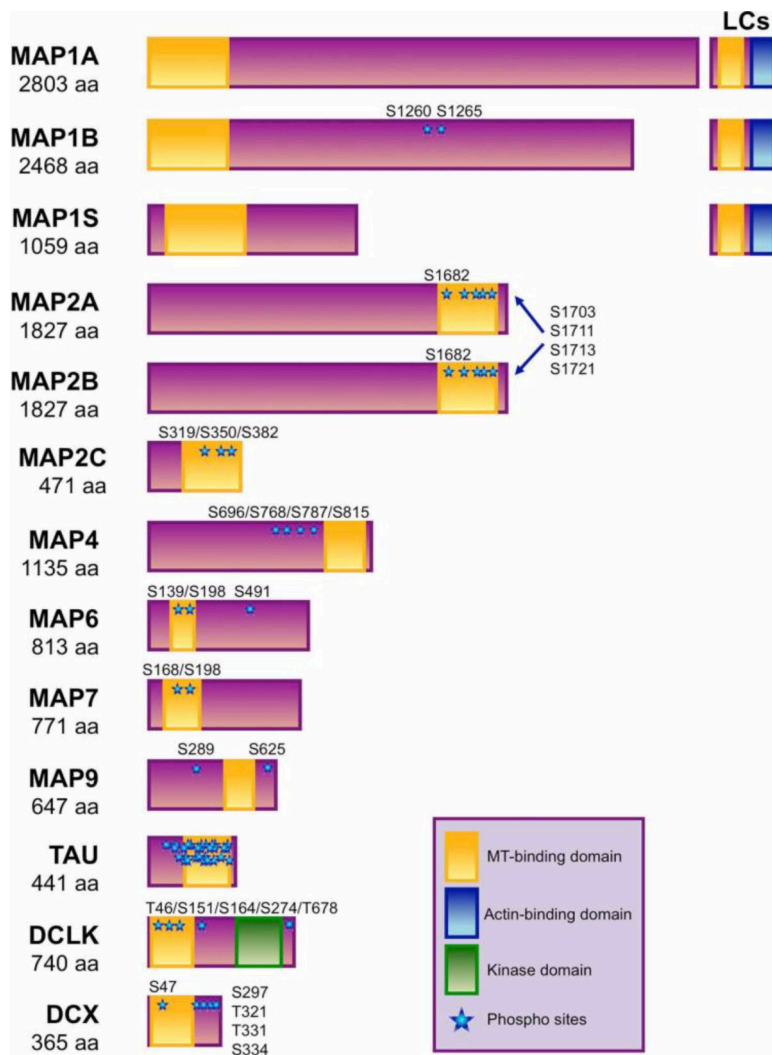
- Les protéines de séquestration

En liant les sous-unités libres de tubuline, ces protéines empêchent leur incorporation dans les MTs et inhibent ainsi la polymérisation des MTs. C'est le cas par exemple de la Stathmine (Cassimeris, 2002). Plus récemment, en 2013, Gupta et al. ont montré un mode d'action alternatif de cette protéine. En effet, la Stathmine peut aussi déstabiliser les MTs par action directe sur les protofilaments de tubuline non liés et exposés latéralement aux extrémités des MTs.

- Les protéines de coupure des MTs

Ces protéines de type ATPases utilisent l'énergie de l'ATP pour morceler les MTs (Roll-Mecak et McNally, 2010). C'est le cas de la protéine Spastine qui utilise ce mode d'action pour désassembler les MTs dans le muscle strié squelettique (Lee et al., 2009). Les katanines et d'autres membres de cette famille fonctionnent en utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour extraire les dimères de tubuline du treillis de MT et déstabiliser ainsi le polymère. La nouvelle extrémité créée par la coupure n'a pas la coiffe habituelle de GTP, ce qui induira la dépolymérisation rapide du MT (Sharp et Ross, 2012).





**Figure 15 :** Exemple de diverses MAPs. Les domaines de liaison aux MTs (jaune), à l'actine (vert), les domaines kinase (vert) et les sites de phosphorylation (étoiles bleues) sont représentés pour chaque MAP. Les domaines LCs sont des domaines de liaison au marqueur d'autophagie LC3. Schéma tiré de Ramkumar et al., 2018.

### c. Les intégrateurs du cytosquelette

Les trois éléments qui constituent le cytosquelette agissent en synergie pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Huber et al., 2015 ; Dogterom et Koenderink, 2019). Ce lien est assuré par des protéines adaptatrices qui lient plusieurs éléments du cytosquelette. Ainsi, certaines protéines modulent la dynamique des MTs en lien avec au moins un autre élément du cytosquelette.

En effet, la protéine Microtubule-Actin Cross-linking Factor 1 (MACF1) se compose de multiples domaines qui lui permettent de lier à la fois les MTs et l'actine, permettant ainsi de stabiliser ces éléments du cytosquelette (Kodama et al., 2003 ; Sanchez-Soriano et al., 2009). Des orthologues de MACF1, VAB-10 chez *C.elegans* et Shot chez la drosophile, sont essentiels pour la migration des noyaux respectivement dans les gonades somatiques et pour la formation de la jonction myotendineuse (Lee et Kolodziej, 2002 ; Bottenberg et al., 2009). De récents travaux menés au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine sur la dynamique du réseau microtubulaire en lien avec le maintien de l'intégrité des fibres musculaires (Ghasemizadeh et al., 2019).

Un autre exemple de protéine qui lie plusieurs éléments du cytosquelette est la dystrophine. Cette protéine se trouve à l'interface entre les réseaux d'actine et de microtubules (Prins et al., 2009 ; Belanto et al., 2014). La dystrophine fait partie d'un complexe protéique essentiel, le complexe dystrophine-glycoprotéine, qui se localise sous la membrane plasmique et est exprimé dans de nombreux tissus (Ervasti et Campbell, 1991). Cette protéine régule l'organisation du réseau de MTs dans les fibres musculaires matures (Oddoux et al., 2019). L'intégrité du complexe dystrophine-glycoprotéine est essentielle dans le tissu musculaire ; en effet des anomalies de ce complexe sont associées à différentes formes de dystrophies musculaires et cardiomyopathies (Barresi et al., 2000 ; Wheeler et al., 2004 ; Hack et al., 1999 ; Durbeej et al., 2000 ; Wheeler et al., 2004).

### d. Les moteurs moléculaires

Les protéines de type moteur moléculaire se déplacent le long des MTs. En effet, les moteurs moléculaires de type kinésine vont en direction des extrémités positives des MTs alors que les moteurs de type dynéine se déplacent vers les extrémités négatives. Cette capacité à se mouvoir sur les MTs leur permet de régir de nombreux processus cellulaires tels que le positionnement d'organites ou encore le transport vésiculaire.

Par exemple, les kinésines et les dynéines régulent les mouvements de noyaux dans divers systèmes (Gundersen and Worman, 2013). C'est notamment le cas dans le système musculaire. En effet, les travaux de Gache et al. (2017) ont permis d'identifier une vingtaine de kinésines et de dynéines impliquées dans le processus de mouvement de noyaux qui a lieu au cours de la différenciation musculaire.

L'activité des moteurs moléculaires peut être modulée par d'autres protéines. En effet, pendant la myogenèse, la kinésine-1 Kif5B interagit avec les MTs mais également avec la protéine MAP7 pour réguler l'espacement des noyaux (Metzger et al., 2012).

#### **e. Les protéines des extrémités positives des microtubules**

Certaines protéines lient spécifiquement les extrémités positives des MTs et permettent ainsi un suivi dynamique des extrémités en croissance.

Par exemple, la protéine End Binding 1 (EB1) possède cette caractéristique et est requise pour la différenciation musculaire (Zhang et al., 2009). La protéine CLIP-170 (CAP-Gly domain containing linker protein 1) possède les mêmes caractéristiques (D'Alessandro et al., 2015). Ces protéines favorisent généralement la polymérisation des MTs. En effet, la plupart des protéines des extrémités positives des MTs interagissent ensemble et forment un réseau protéique qui stabilise l'extrémité des MTs et favorisent leur polymérisation (Gupta et al., 2014).

Il existe toutefois des exceptions, c'est le cas de la Kinésine-13 qui favorise leur dépolymérisation (Akhmanova et Steinmetz, 2008 et 2015).

## **II. Les microtubules dans les cellules musculaires**

### **1) Au cours de la myogenèse**

Le réseau de MTs est totalement remanié au cours de la myogenèse (Tassin et al., 1985). Ces modulations architecturales sont en grande partie dues à la relocalisation des centres organisateurs des MTs au niveau des noyaux dans les fibres musculaires.

#### **a. Dans les myoblastes en prolifération**

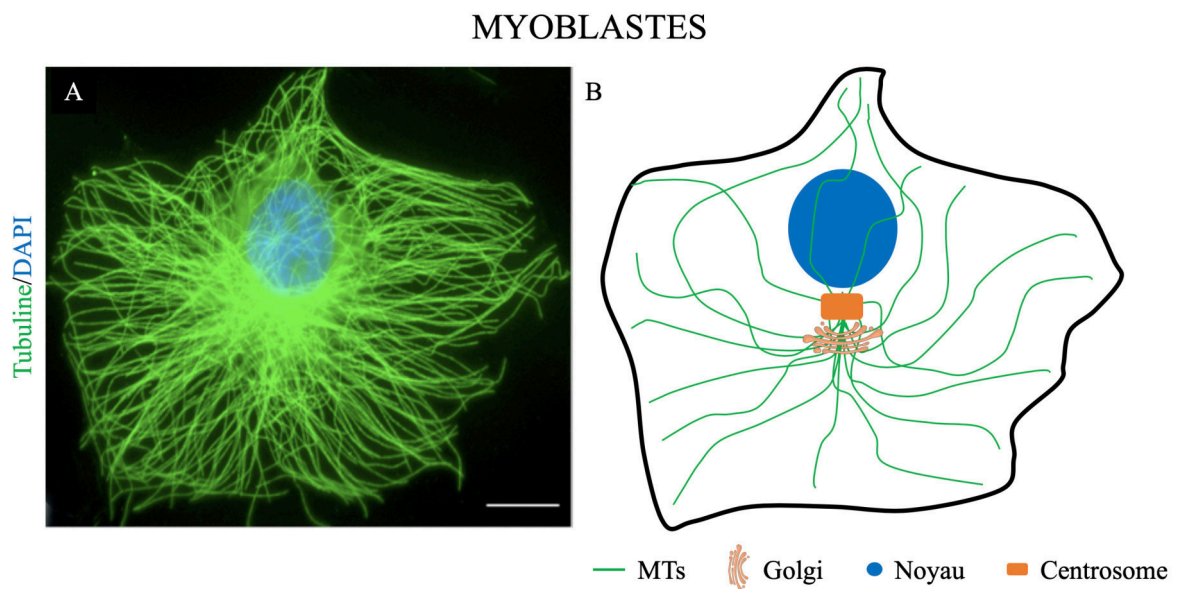
Le mécanisme de nucléation des MTs n'est pas spécifique aux myoblastes prolifératifs. En effet, le mécanisme sous-jacent est identique dans toutes les cellules somatiques mononuclées de mammifères.

Un unique centrosome juxtanucléaire appelé Centre Organisateur des MTs (MTOC) ancre les MTs par leur extrémité négative et permet leur nucléation (Gould et Borisy, 1977 ; Berns et al., 1977 ; Kirschner, 1978 ; Brinkley et al., 1981). Cette structure consiste en une paire de centrioles enchâssés dans une matrice péricentriolaire qui comprend la  $\gamma$ -tubuline (Oakley et Oakley, 1989 ; Wiese et Zheng, 1999). Des protéines additionnelles (Moritz et al., 1998), telle que la péricentrine (Doxsey et al., 1994 ; Flory et Davis, 2003), permettent l'assemblage de la  $\gamma$ -tubuline sous la forme du complexe  $\gamma$ -TURC décrit précédemment (Moritz et al., 1995 ; Schnackenberg et al., 1998). Celui-ci est recruté au niveau de la

matrice péracentriolaire par la dynéine pour former *in fine* un assemblage compétent pour la nucléation des MTs (Young et al., 2000).

Après la nucléation et l'élongation, la plupart des MTs restent ancrés au centrosome et forment un réseau qui irradie dans la totalité du cytoplasme (Fig.16).

Positionné à côté du centrosome par des moteurs moléculaires de type dynéine (Corthésy-Theulaz et al., 1992), l'appareil de Golgi est intimement lié aux MTs. En effet, Tassin et al. ont montré que les MTs sont nécessaires au maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi dans les myoblastes (1985). Puis, d'autres travaux ont précisé que l'appareil de Golgi participe également à la nucléation des MTs (Infante et al., 1999 ; Efimov et al., 2007).



**Figure 16 :** Organisation du réseau de MTs dans les myoblastes prolifératifs non différenciés. La nucléation des MTs dans les myoblastes s'effectue majoritairement à partir du centrosome juxtanucléaire mais également à partir de l'appareil de Golgi. Cette organisation entraîne la formation d'un réseau de MTs qui rayonne dans le cytoplasme depuis le centrosome. **A.** Myoblaste immunomarqué pour la tubuline (en vert) et pour le noyau (DAPI en bleu). La barre d'échelle représente 5 $\mu$ m. **B.** Représentation schématique du MTOC dans une cellule myoblastique.

## b. Dans les myotubes immatures

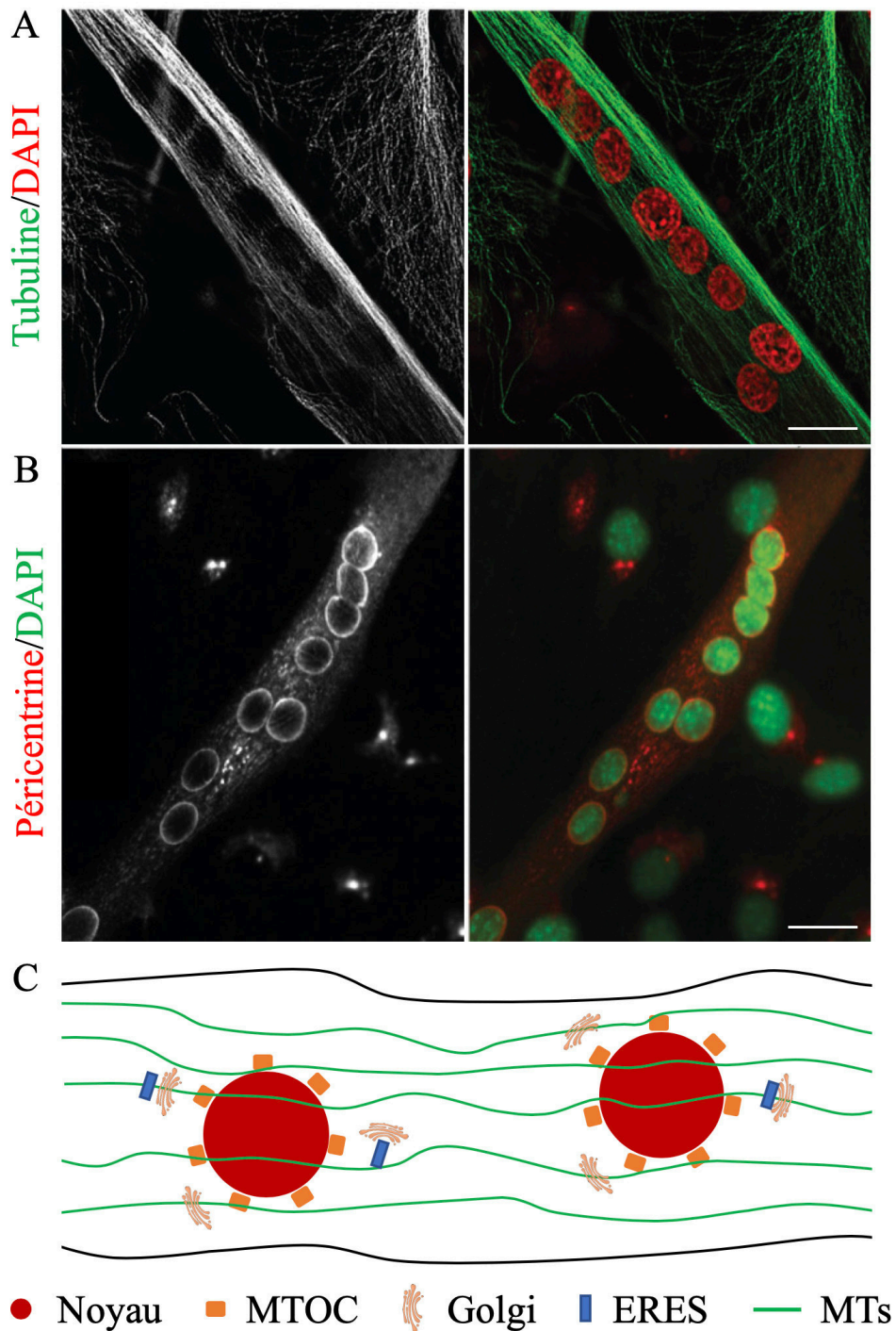
Tassin et al. ont été les premiers à décrire la réorganisation du réseau microtubulaire au cours de la myogenèse (1985). Le réseau radial de MTs des myoblastes est remplacé par un réseau de MTs parallèles qui contribuent à l'élongation du myotube (Zaal et al., 2011) (Fig.17A).

En effet, après l'évènement de fusion des myoblastes, les centrosomes sont dissociés. Le matériel péricentriolaire ainsi que la  $\gamma$ -tubuline sont redistribués autour de l'enveloppe nucléaire (Tassin et al., 1985) (Fig.17B) ainsi qu'en moindre quantité au niveau de l'appareil de Golgi (Ralston et al., 2001). Cette réorganisation, décrite initialement *in vitro*, a été confirmée dans des muscles squelettiques *in vivo* (Ralston, 1993 ; Rahkila et al., 1997 ; Ralston et al., 2001).

La réorganisation du MTOC s'accompagne également d'une restructuration de l'appareil de Golgi (Tassin et al., 1985 ; Ralston, 1993). Classiquement compact et juxtanucléaire dans les myoblastes indifférenciés, l'appareil de Golgi se disperse en petits éléments apposés autour des noyaux du myotube, au niveau de régions spécifiques du réticulum endoplasmique (ERES), positionnées le long des MTs *via* la dynactine (Watson et al., 2005). Ainsi, dans les cellules musculaires en différenciation, l'appareil de Golgi peut interagir directement avec les MTs ou indirectement *via* les ERES (Fig.17C).

Outre le remodelage organisationnel du réseau durant la myogenèse, les MTs commencent à accumuler certaines modifications post-traductionnelles qui influencent leur dynamique. En effet, le niveau d'acétylation des MTs augmente au cours de la différenciation musculaire (Bulinski et Gundersen, 1991 ; Gundersen et al., 1989).

## MYOTUBES



**Figure 17 :** Réorganisation des MTOC et de l'architecture du réseau de MTs dans les myotubes immatures. **A.** Marquages immunofluorescents des MTs (en vert) et des noyaux (en rouge) illustrant le réseau parallèle de MTs dans les myotubes immatures. **B.** Relocalisation du matériel péricentriolaire (péricentrine en rouge) à l'enveloppe nucléaire (noyaux en vert). Les barres d'échelle représentent 20 $\mu$ m. **C.** Représentation schématique de l'organisation des MTOCs et du réseau de MTs dans les myotubes immatures.

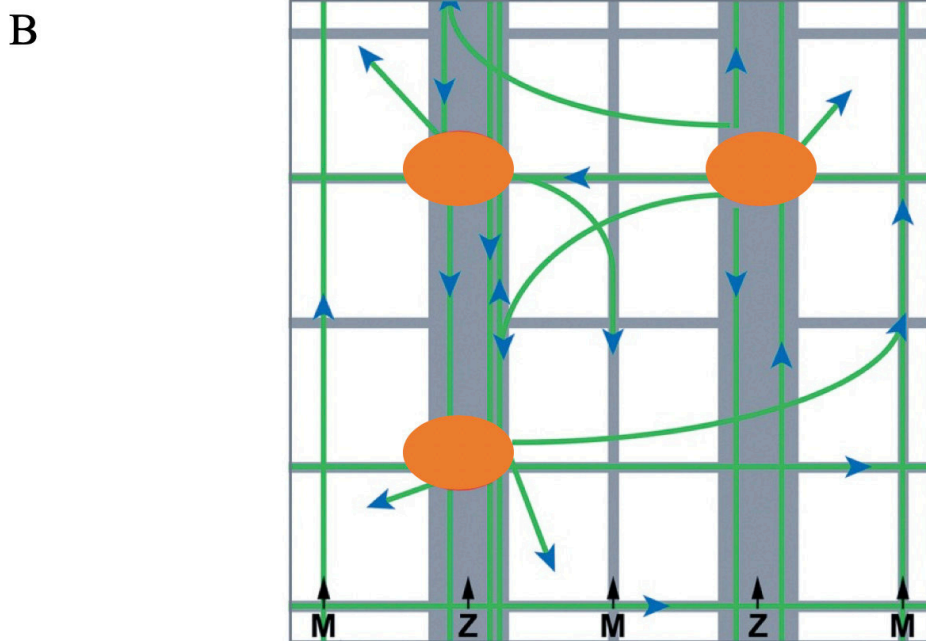
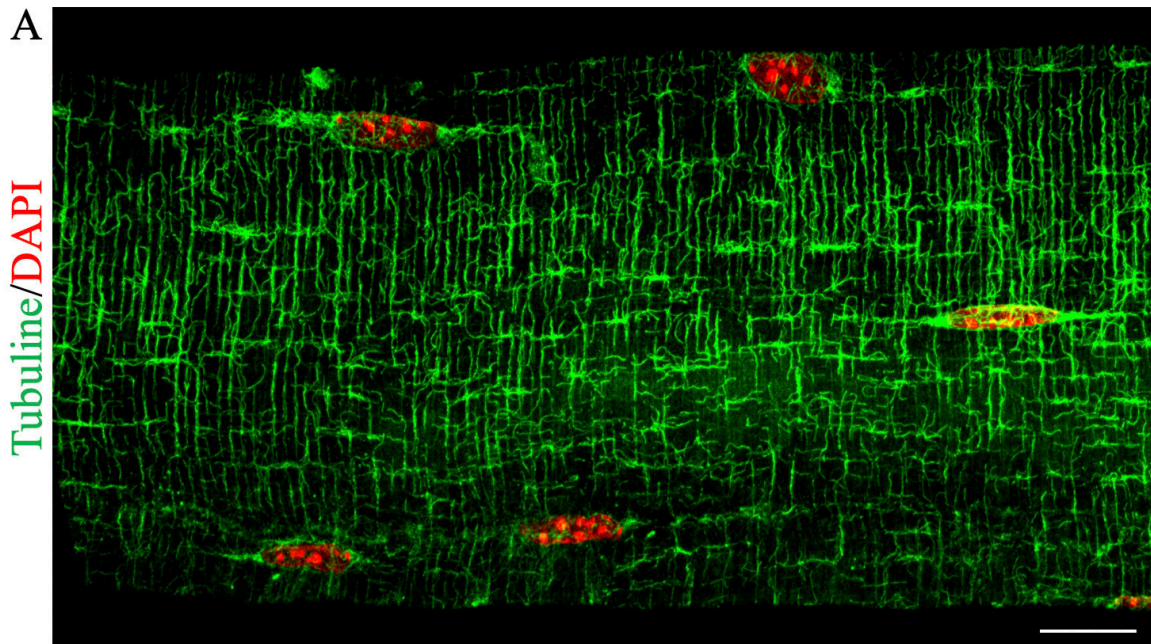
### c. Dans les fibres musculaires matures

*In vivo*, dans les fibres musculaires matures, chaque enveloppe nucléaire et chaque appareil de Golgi servent de MTOCs. Les fibres musculaires matures étant multinucléées, les MTs émanent ainsi de nombreux points de nucléation (Oddoux et al., 2013). L'appareil de Golgi forme un réseau de centaines de petites citernes associées aux ERES et positionnées le long de la fibre musculaire (Ralston, 1993 ; Ralston et al., 1999). Ces complexes d'appareil de Golgi sont associés au réseau tridimensionnel des MTs (Ralston et al., 1999 ; Rakkila et al., 1997) et contiennent de la péricentrine et de la  $\gamma$ -tubuline (Oddoux et al., 2013).

L'appareil de Golgi et les MTs forment une grille orthogonale (Fig.18). La périodicité du grillage des MTs correspond à celle des protéines contractiles : les MTs longitudinaux sont alignés avec l'axe de la fibre musculaire et les MTs transverses sont alignés avec les stries Z (Kaisto et Metsikkö et al., 2003). Les MTs polymérisent en suivant les MTs stables préalablement polymérisés. La dystrophine joue un rôle crucial dans la polymérisation des MTs dans les fibres musculaires matures. Le lien périodique qu'elle forme entre la membrane plasmique et les stries Z des myofibrilles fait qu'elle est idéalement positionnée pour interagir avec les MTs. En effet, la dystrophine se positionne le long des MTs et forme des domaines suivant lesquels les MTs polymérisent préférentiellement (Prins et al., 2009). Ainsi, l'appareil de Golgi et les MTs forment une grille permanente superposée au réseau orthogonal formé par la dystrophine (Prins et al., 2009).

Les MTs ont une organisation périnucléaire spécifique puisqu'ils forment une cage autour des noyaux périphériques. Cette architecture est réalisée par la Nesprine qui recrute les MTs autour des noyaux périphériques (Wang et al., 2015).

## FIBRES MUSCULAIRES MATURES



● Golgi    ► EB1    — Dystrophine    — MTs

**Figure 18 :** Organisation du réseau de MTs dans les fibres musculaires matures. **A.** Immunomarquage des MTs (en vert) et des noyaux (en rouge) d'une fibre musculaire isolée de souris. La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m. **B.** Représentation schématique du modèle de polymérisation des MTs proposé par Oddoux et al. (2019).



## 2) Implication des microtubules dans la fonctionnalité musculaire

Les propriétés des MTs peuvent être modifiées à différents niveaux : architecture du réseau, protéines régulatrices associées aux MTs, isoformes et isotypes de tubuline ou encore modifications post-traductionnelles. Étant donné l'importance des MTs dans l'homéostasie cellulaire, toute modification des MTs peut affecter le fonctionnement musculaire.

### a. Dystrophie musculaire de Duchenne et architecture du réseau de microtubules

L'exemple le plus éloquent est la dystrophie musculaire de Duchenne (Khairallah et al., 2012). Cette pathologie musculaire, liée au chromosome X, est caractérisée par l'absence d'expression de dystrophine. Le modèle murin de cette pathologie est la souris *mdx* (Bulfield et al., 1984 ; Hoffman et al., 1987). L'absence d'expression de dystrophine dans ce modèle entraîne des défauts dans l'organisation du réseau de MTs. En effet, les MTs ne parviennent plus à former une grille orthogonale et s'organisent alors en longs filaments (Prins et al., 2009 ; Percival et al., 2007). L'organisation de l'appareil de Golgi se trouve également altérée (Percival et Froehner, 2007 ; Percival et al., 2007).

### b. Dystrophie musculaire de Duchenne et isotypes de tubuline

Un autre défaut des MTs peut être observé dans le modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne. Les défauts d'organisation des MTs de l'appareil du Golgi sont associés à une surexpression de la  $\beta$ -tubuline Tubb6. Il semblerait que la surexpression de cet isotype de tubuline participe également à la désorganisation du réseau de MTs. En effet, la surexpression de l'isotype Tubb6 dans des fibres musculaires contrôle entraîne une altération de l'organisation grillagée des MTs. A l'inverse, une diminution d'expression de Tubb6 dans les fibres musculaires de souris *mdx* permet d'améliorer l'organisation des MTs (Randazzo et al., 2019).

### c. Modifications post-traductionnelles des microtubules

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline peuvent affecter les propriétés mécaniques du cytosquelette ainsi que la mécanotransduction des cellules musculaires. Une réduction des niveaux de détyrosination des MTs génère une diminution de leur rigidité et une augmentation de la vitesse de contraction/relaxation des fibres musculaires sans modification de densité du réseau de MTs. Ces résultats indiquent un rôle spécifique de la détyrosination sur la fonctionnalité musculaire (Kerr et al., 2015). En effet, une augmentation de la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline a été montrée pour être une source de pathologie des muscles striés squelettiques et cardiaques. En effet, la détyrosination de l' $\alpha$ -tubuline induit une augmentation de la rigidité des MTs qui influence la production d'espèces réactives de l'oxygène et la vitesse de contraction. Chez la souris *mdx*, la diminution pharmacologique de la détyrosination *in vitro* diminue la production aberrante d'espèces réactives de l'oxygène

ainsi que la signalisation calcique ; *in vivo*, la détyrosination protège des arythmies cardiaques et des blessures induites par la contraction du muscle strié squelettique (Khairallah et al., 2012 ; Kerr et al., 2015 ; Robison et al., 2016).

### **III. Le complexe LINC, un lien fonctionnel entre noyaux et microtubules**

Maniotis *et al.* ont été les premiers à montrer que les forces exercées en surface de la cellule sont transmises au noyau *via* le cytosquelette (Maniotis et al., 1997). Plus récemment, des travaux ont permis de montrer que ces forces sont transmises à travers l'enveloppe nucléaire grâce à un complexe protéique spécifique : le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) (Alam et al., 2015 ; Crisp et Burke, 2008). Ce complexe crée un lien fonctionnel entre les éléments du cytosquelette et les noyaux (Fig.19).

#### **1) Les composants du complexe LINC**

##### **a. Les Nesprines**

Les Nesprines sont des protéines enchâssées dans la membrane nucléaire externe et sont présentes sous de nombreuses isoformes. En effet, chez les mammifères, il existe au moins 4 gènes codant pour les Nesprines : *SYNE-1*, *SYNE-2*, *SYNE-3* et *SYNE-4*. Chacun d'entre eux peut subir un épissage alternatif pouvant générer de multiples variants de la protéine.

Grâce à leur domaine cytoplasmique, les Nesprines peuvent interagir entre elles mais aussi avec la majorité des éléments du cytosquelette. Les isoformes longues, telles que les Nesprine-1 et -2, lient le noyau au cytosquelette d'actine (Rajgor et al., 2013) ainsi qu'aux dynéines (Fridolfsson et al., 2010). La Nesprine-3 lie indirectement les filaments intermédiaires *via* la plectine (Wilhelmsen et al., 2005). La Nesprine-4 interagit avec la kinésine-1 Kif5B (Roux et al., 2009). Les isoformes plus courtes des Nesprines, telle que la Nesprine-1 $\alpha$ , interagissent avec les MTs *via* Akap9 (Gimpel et al., 2017) et la chaîne légère de kinésine KLC-1/2 (Wilson et Holzbaur, 2015).

##### **b. Les protéines SUNs**

Contrairement aux protéines Nesprines, les protéines SUN (SUN domain-containing protein) sont intégrées dans la membrane nucléaire interne. Elles sont codées par deux gènes différents : *SUN1* et *SUN2*.

Les protéines SUN interagissent d'une part avec les Nesprines, et d'autre part avec le nucléosquelette. En effet, les SUN lient les lamines nucléaires, les pores nucléaires ainsi que la chromatine (Chang et al., 2015). Elles font donc le lien entre le nucléoplasme et les éléments du cytosquelette *via* les Nesprines.

## 2) Protéines associées au complexe LINC

### a. Les Lamines

A l'origine identifiées par Gerace et al. en 1978, les Lamines existent sous forme de trois protéines :

- les lamines de type B, qui proviennent de deux gènes *LMNB1* et *LMNB2*
- les lamines de type A : Lamine A et Lamine C qui sont respectivement la forme immature et la forme mature du gène *LMNA*.

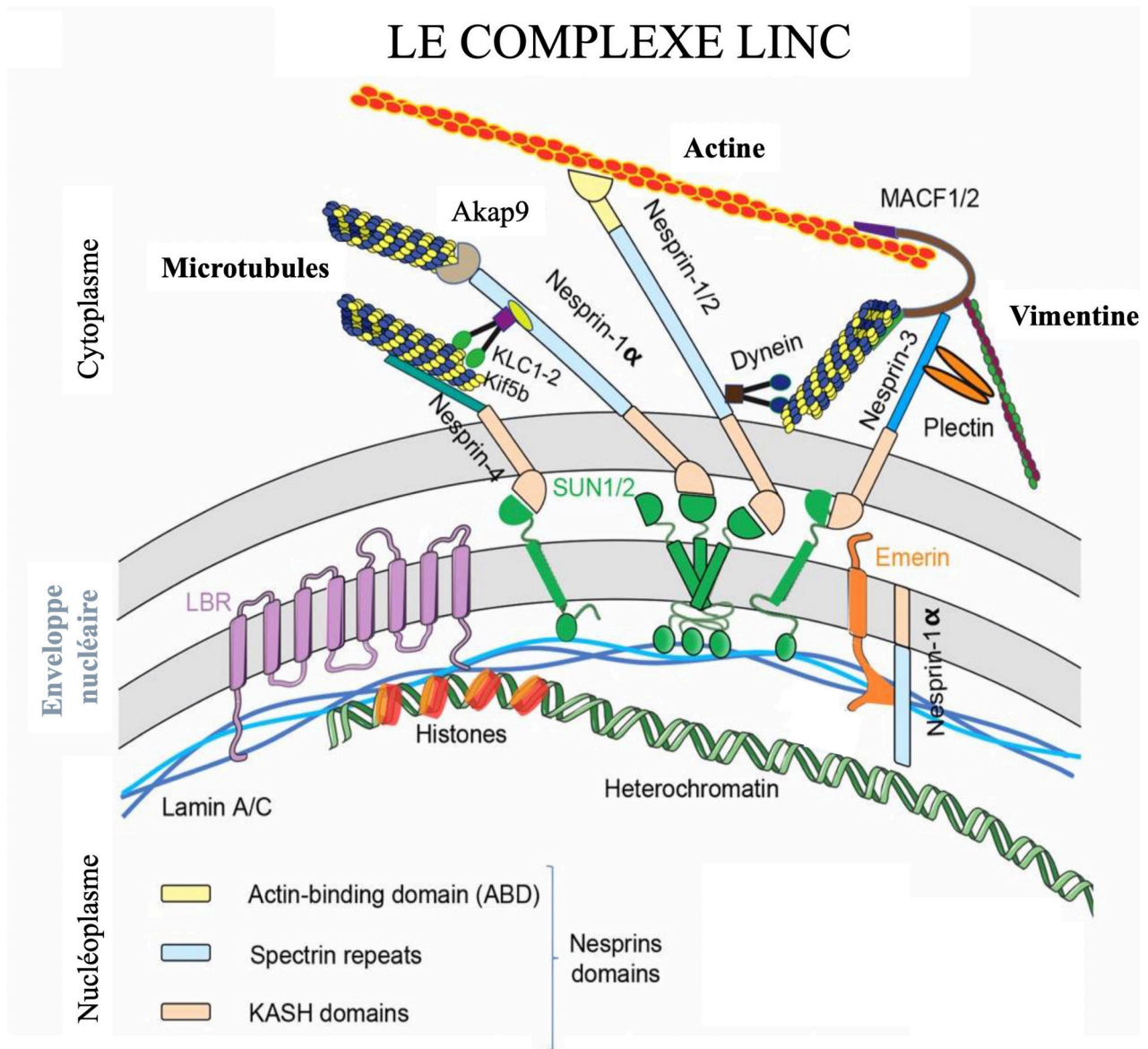
Les Lamines constituent un maillage protéique nucléaire apposé contre la membrane nucléaire interne. Elles gouvernent de nombreuses fonctions biologiques telles que :

- la rigidité et la taille du noyau (Lammerding et al., 2006 ; Zwerger et al., 2015 ; Broers et al., 2004 ; Dahl et al., 2004 ; Lammerding et al., 2004) ;
- la translocation et l'activité de facteurs de transcription (Ivorra et al., 2006 ; Osmanagic-Myers et al., 2015 ; Dorner et al., 2006 ; Ho et al., 2013) ;
- l'interaction avec la chromatine et la régulation de son épigénétique (Harr et al., 2015 ; Solovei et al., 2013) ;
- le contrôle de la polarisation et de la migration cellulaire (Harada et al., 2014 ; Lee et al., 2007 ; Davidson et al., 2014),
- la régulation de la prolifération cellulaire et la réponse aux dommages de l'ADN : deux éléments liés à la progression cancéreuse (Redwood, 2011).

### b. L'émerine

La protéine Émerine est codée par le gène *EMD* et se localise au niveau de la membrane nucléaire interne. Elle est en interaction directe avec les Lamines.

L'Émerine est impliquée dans la régulation de la structure nucléaire, l'expression génique ainsi que le positionnement des noyaux (Zhong et al., 2010).



**Figure 19 :** Le complexe LINC et les protéines qui y sont associées. Représentation schématique issue de Janin et Gache (2018).

### 3) Rôle du complexe LINC dans les cellules musculaires

Le complexe LINC est essentiel à la fonctionnalité du tissu musculaire, et plus particulièrement à la différenciation musculaire.

Ce complexe permet de lier le cytosquelette aux noyaux. Ainsi, la dynamique des MTs permet de générer des forces qui sont transmises aux noyaux grâce au complexe LINC. Ce complexe protéique a une fonction importante dans le muscle. Il est nécessaire aux mouvements de noyaux (Stroud et al., 2017 ; Bone et Starr, 2016 ; Collins et al., 2017 ; Roman et al., 2017) et à leur espacement optimal le long de la fibre musculaires. La perte des fonctions du complexe LINC entraîne des dystrophies musculaires (Zhang et al., 2007 ; Puckelwartz et al., 2009 ; Stroud et al., 2014). Les mécanismes sous-jacents sont détaillés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

### 4) Les pathologies associées au noyau

Des mutations dans les gènes codant pour diverses protéines du complexe LINC ont été identifiées chez des patients présentant des pathologies musculaires.

#### a. Chez l'homme : les laminopathies

Les pathologies dont les mutations touchent les gènes codant pour les protéines du complexe LINC sont communément appelées laminopathies. Des mutations dans les gènes *LMNA* (codant pour la Lamine A/C), *EMD* (codant pour l'Émerine), *SYNE1* et *SYNE2* (codant pour les Nesprines -1 et -2) sont associées à des dystrophies musculaires de type Emery-Dreifuss (EDMD). Le tissu musculaire strié squelettique n'est pas le seul tissu atteint lorsque ces gènes sont mutés. En effet, ces mutations sont également associées à des cardiomyopathies dilatées (Puckelwartz and McNally, 2011).

Certaines protéines impliquées dans ces laminopathies sont localisées dans la membrane nucléaire interne et interagissent directement avec le génome (Maraldi et al., 2002 ; Tsukahara et al., 2002). Cela suggère donc une régulation génique aberrante dans ces types de laminopathies.

Cependant, d'autres protéines du complexe LINC impliquées dans les laminopathies se localisent dans la membrane nucléaire externe et régulent donc les interactions entre les noyaux et le cytosquelette (Wheeler et al., 2007 ; Zhang et al., 2007 ; Puckelwartz et al., 2009).

Puisque ces gènes n'interagissent pas directement avec le génome, l'implication de ces protéines dans les laminopathies suggère un rôle de l'interaction noyaux – cytosquelette dans le développement musculaire et dans la pathogenèse des laminopathies.

## b. Les modèles murins des laminopathies

Différents modèles animaux ont été générés de façon à reproduire les phénotypes dystrophiques observés chez les patients humains.

En 1999, la première lignée de souris invalidée pour le gène *LMNA* est générée. Ces souris *Lmna*<sup>-/-</sup> naissent sans défauts visibles. Elles développent rapidement un phénotype dystrophique sévère associé à une cardiomyopathie dilatée et meurent prématurément entre 2 et 8 semaines (Sullivan et al., 1999 ; Kubben et al., 2011). Le tableau clinique est similaire à celui observé chez les patients humains atteints d'EDMD causé par une mutation dans le gène *LMNA* (Bonne et al., 2000). Au niveau cellulaire, ces souris *Lmna*<sup>-/-</sup> présentent des altérations dans la structure et la localisation des noyaux des fibres musculaires.

De façon similaire, les muscles des larves de drosophiles dont l'expression de Lamine C (unique Lamine de type A chez la drosophile) est inhibée présentent des noyaux avec des structures déformées et un positionnement altéré (Dialynas et al., 2010 ; Zwerger et al., 2013).

La lignée de souris invalidée pour le gène *EMD* codant pour l'Émerine est moins caractérisée. Bien que ces souris ne présentent pas de phénotype musculaire, leur processus de régénération est ralenti (Melcon et al., 2006 ; Ozawa et al., 2006).

## CHAPITRE 3 – LES NOYAUX DANS LES FIBRES MUSCULAIRES

Le noyau est un grand organite rigide dans la cellule (Lammerding, 2011). Élément très spécialisé, le nucléoplasme héberge la chromatine et les corps nucléaires. Ce nucléoplasme est délimité par l'enveloppe nucléaire qui comprend les membranes nucléaires interne et externe. Les pores nucléaires, enchâssés dans l'enveloppe nucléaire, permettent de contrôler l'entrée de grandes molécules dans le noyau (Jovanovic-Talisman et Zilman, 2017). L'enveloppe nucléaire et les protéines membranaires qui la composent forment un support architectural au noyau mais également un lien entre le nucléosquelette et le cytosquelette *via* le complexe LINC.

### **I. Importance des mouvements de noyaux**

#### **1) Dans divers systèmes**

La position du noyau au sein de la cellule n'est pas figée ; elle varie drastiquement selon le contexte biologique : étape du cycle cellulaire, statut migratoire ou encore état de différenciation. Ce positionnement du noyau au sein d'une cellule est souvent essentiel à sa fonction. Dans la plupart des cas, le noyau est positionné grâce au cytosquelette, et principalement grâce aux microtubules émanant des MTOCs. Ainsi, l'intégrité des protéines du complexe LINC est fondamentale pour créer un lien fonctionnel entre le cytosquelette et le noyau.

Au cours de la division des levures, les noyaux sont positionnés à l'interface avec le bourgeon de façon à ce que chaque cellule fille reçoive un noyau. En revanche les noyaux sont activement positionnés au centre de la levure en fission ; ce positionnement central permet d'assurer une division équitable, générant ainsi deux cellules filles similaires (Fig.20A) (Gundersen et Worman, 2013).

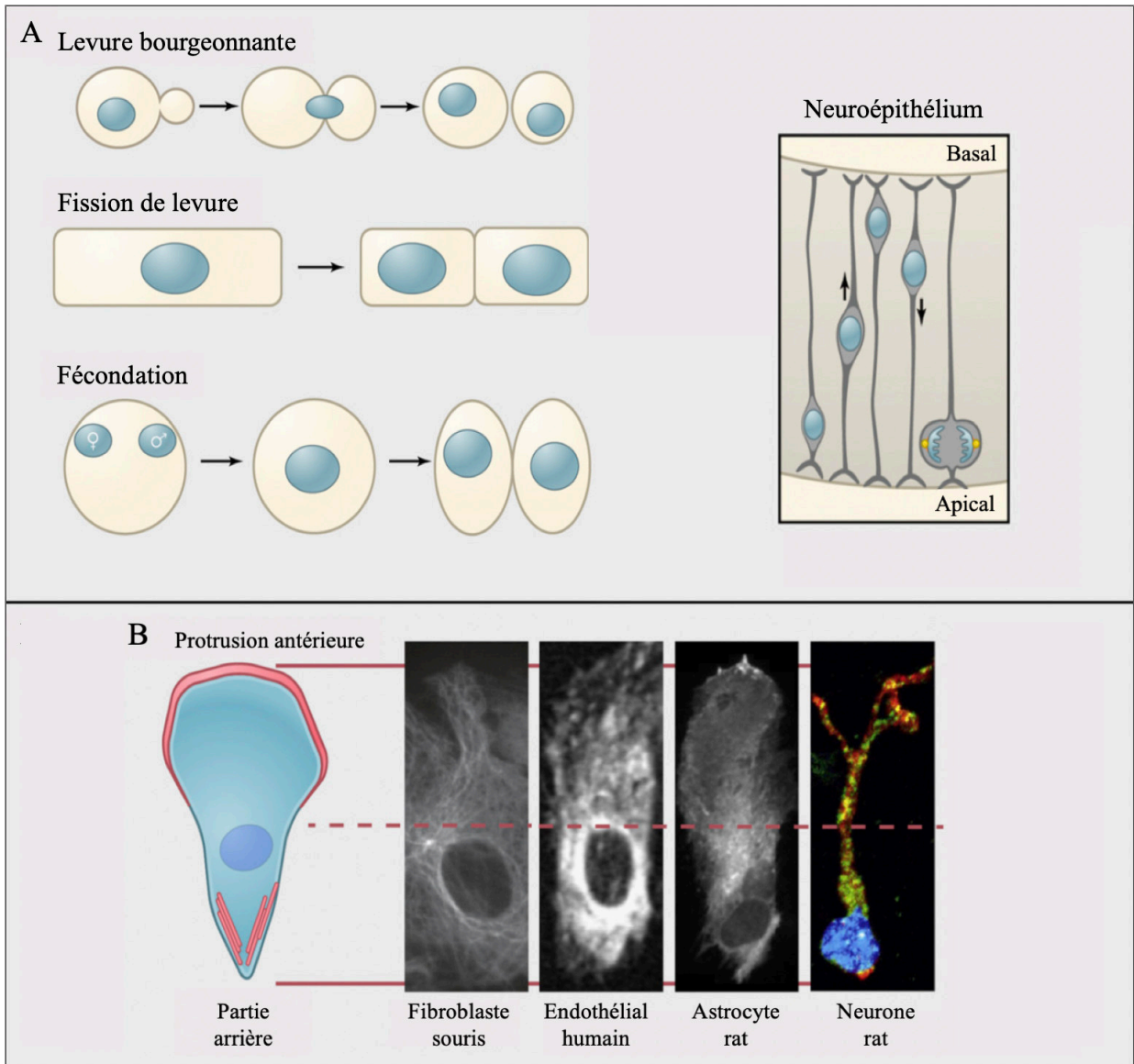
Le positionnement des noyaux dans un même processus biologique diffère selon l'espèce considérée. Au cours du développement embryonnaire de la drosophile, la position excentrée du noyau dans l'ovocyte prédéfinit l'axe dorso-ventral du futur embryon alors que dans les ovocytes de souris, le noyau est positionné au centre de la cellule par des mécanismes inconnus (Fig.20A) (Verlhac, 2016).

Au cours du cycle cellulaire dans le neuroépithélium en développement des vertébrés, les noyaux se déplacent en deux temps : en premier lieu vers le pôle basal, puis, vers le pôle apical (Fig.20A) (Gundersen et Worman, 2013).

Dans la plupart des cellules en migration, le noyau se positionne dans la partie arrière de la cellule, fuyant la protrusion cellulaire localisée à l'avant de la cellule (Fig.20B) (Gundersen et Worman, 2013).

Ces différents exemples démontrent que le positionnement des noyaux est un mécanisme qui permet de répondre aux fonctions spécialisées de chacun des types cellulaires dans un contexte biologique spécifique. Ainsi, une altération du positionnement des noyaux dans ces tissus pourrait conduire, dans un premier temps, à des dysfonctions cellulaires, puis *in fine* à des pathologies. En effet, certaines pathologies sont associées à des modifications de la position nucléaire, comme par exemple des stéatoses hépatiques où l'accumulation de larges vésicules lipidiques induit un repositionnement du noyau vers la périphérie cellulaire (Gundersen et Worman, 2013).





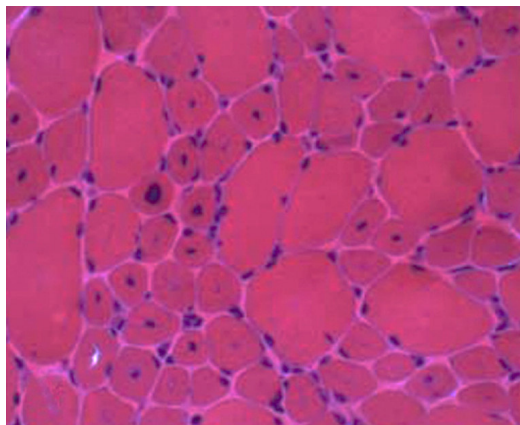
**Figure 20 :** Mouvements de noyaux dans divers systèmes biologiques, adapté de Gundersen et Worman (2013). **A.** Représentation schématique du positionnement des noyaux dans des cellules en division et dans un épithélium en développement. Le schéma de neuroépithélium de vertébrés représente une coupe longitudinale d'un cortex cérébral en développement. **B.** Positionnement postérieur typique de cellules en migration. Le schéma de gauche représente une cellule en migration avec sa protrusion antérieure et sa partie postérieure contractile. Les filaments d'actine sont représentés en rouge. La taille des cellules en migration présentées sur les images de droite a été normalisée selon leur longueur antéro-postérieure. La ligne pointillée indique la mi-distance entre les parties antérieure et postérieure.

## 2) Dans les fibres musculaires : pathologies associées au défaut de positionnement nucléaire

Le positionnement des noyaux est également crucial au fonctionnement du tissu musculaire. Le Dr. Spiro a été le premier, en 1966, à identifier un défaut de positionnement des noyaux dans les fibres musculaires d'un garçon atteint de myopathie (Spiro et al., 1966). En effet, certaines myopathies se caractérisent par une altération du positionnement des noyaux dans les fibres musculaires, telle qu'une centralisation.

Ces défauts peuvent être observés dans les myopathies dites centronucléaires qui se caractérisent par une accumulation de noyaux centraux sans processus de régénération musculaire, classiquement observé dans les dystrophies (Romero, 2010). Ce groupe de pathologies congénitales est hétérogène et peut être causé par des mutations dans divers gènes, tels que *MTM1* (code pour la Myotubularine), *DNM2* (code pour la Dynamine-2) ou encore *BINI* (code pour Myc box-dependent-interacting protein 1) pour les plus fréquentes (Rodriguez et al., 2014 ; Sewry and Wallgren-Pettersson, 2017 ; Böhm et al., 2014). L'apparition et la sévérité des symptômes chez les patients atteints par ces myopathies varient selon le gène touché par la mutation. Cependant tous les patients atteints de CNM souffrent de faiblesse musculaire (Susman et al., 2010). Au niveau cellulaire, ces CNM sont liées à une désorganisation générale de la fibre musculaire, un positionnement anormal des organelles, une altération des membranes internes et une centralisation des noyaux (Fig.21).

Plus récemment, ces défauts de positionnement nucléaire ont été corrélés à un défaut de fonctionnement musculaire chez la drosophile (Metzger et al., 2012 ; Auld and Folker, 2016).



**Figure 21 :** Le muscle pathologique. Coupe transversale de muscle strié squelettique issue d'une biopsie musculaire d'une patiente âgée de 7 ans et atteinte de myopathie centronucléaire liée à une mutation sur le gène *DNM2*. Le marquage hématoxiline-éosine de la coupe transversale permet de montrer la proportion importante de fibres musculaires arrondies de petite taille comportant des noyaux centraux. L'image de coupe transversale est issue de Romero et Bitoun (2011).

## II. Les mouvements de noyaux au cours de la myogenèse

De nombreux mouvements de noyaux ont été décrits au cours du développement musculaire et permettent d'aboutir à leur positionnement périphérique dans les fibres musculaires matures.

Les mouvements de noyaux au cours de la différenciation musculaire dépendent de cinq étapes décrites et détaillées dans les paragraphes ci-dessous (Cadot et al., 2015) (Fig.22).

### 1) Centralisation

La plupart des mouvements des noyaux durant la myogenèse sont MTs-dépendants. Le MTOC est positionné au centrosome dans les cellules mononucléées. Toutefois dans les cellules musculaires, la nucléation directe des MTs s'effectue depuis l'enveloppe nucléaire (Srsen et al., 2009 ; Tassin et al., 1985). Cette organisation permet un nouveau mécanisme de déplacement des noyaux qui se retrouvent poussés ou tirés par les MTs qui polymérisent directement depuis l'enveloppe nucléaire et ce, tout au long de la myogenèse.

Lorsque les myoblastes fusionnent pour former les myotubes, les noyaux migrent au centre du myotube et rejoignent les noyaux préalablement agrégés (Cadot et al., 2012). Ce mécanisme post-fusion est MTs- et dynéine-dépendant. Chez les mammifères, ce mouvement de centralisation des noyaux est régulé par la GTPase Cdc42 ainsi que par les protéines de polarité Par6 et Par3. La dynéine, Cdc42, Par3 et Par6 se localisent au niveau de l'enveloppe nucléaire des noyaux déjà présents dans le myotube. Ce complexe protéique recrute également la dynactine qui prend part à ce mécanisme. Ainsi, depuis les noyaux centraux agrégés, la dynéine va tirer sur les MTs ancrés au noyau nouvellement fusionné pour l'amener jusqu'au centre du myotube où il s'agrègera avec les autres noyaux (Cadot et al., 2012 ; Kotak and Gönczy, 2013).

Chez l'embryon de drosophile, le mécanisme se rapproche davantage de celui observé chez *C. elegans*. La dynéine, ancrée au cortex de la fibre musculaire *via* Pins, va tirer sur le MT ancré au noyau en se dirigeant vers l'extrémité négative du MT. Ce mouvement est dépendant de la protéine spécifique de l'extrémité positive des MTs : CLIP190 (Folker et al., 2012).

### 2) Alignement

Chez les mammifères, les noyaux s'alignent sur un plan unique selon un processus dépendant du complexe LINC. Le rôle de ce complexe, et plus précisément de la protéine Nesprine-1 $\alpha$ , diffère de son rôle habituel et est central pour ces mouvements nucléaires.

En effet, Nesprine-1 $\alpha$  est nécessaire pour recruter les protéines péricentriolaires, telles que PCM-1 (PeriCentriolar Material protein 1) (Espigat-Georger et al., 2016) et AKAP9 (A-Kinase Anchoring Protein 9) (Gimpel et al., 2017), à l'enveloppe nucléaire (Espigat-Georger

et al., 2016). Le complexe LINC sert donc d'ancrage pour la relocalisation de certaines protéines centrosomales depuis le centrosome des myoblastes vers l'enveloppe nucléaire des myotubes en différenciation. La protéine Nesprine-1 $\alpha$  recrute également à l'enveloppe nucléaire les moteurs moléculaires liés aux MTs (Wilson et Holzbaur, 2015).

Chez la drosophile, ce processus est également centré sur les MTs et fait intervenir les dynéines et les kinésines (Azevedo et al., 2016 ; Folker et al., 2012).

Les noyaux dynamiques tournent également en trois dimensions pendant leurs mouvements (Wilson et Holzbaur, 2012 ; Wilson et al., 2016). Ce mouvement a été observé pour la première fois dans des cultures dérivées d'embryons de poulet (Capers, 1960). Il a récemment été observé dans des cultures de cellules de mammifères (Wilson and Holzbaur, 2012) ainsi que dans des embryons de drosophiles (Folker et al., 2014). Les noyaux des cellules myoblastiques voient leur forme modifiée au cours de la différenciation. En effet, les noyaux des myotubes deviennent d'avantage circulaires, ce qui favorise ce mouvement rotatif. Cette rotation est dépendante des MTs et de la kinésine-1 liée à l'enveloppe nucléaire. Ce sont le nombre, la distribution des moteurs moléculaires ainsi que le réseau local de MTs qui déterminent la vitesse et la direction de rotation. De façon surprenante, ce mouvement de rotation est indépendant d'un noyau à l'autre.

### 3) Répartition

La répartition longitudinale des noyaux dans les myotubes de mammifères qui a lieu ensuite est un mouvement dépendant des MTs et des moteurs moléculaires kinésines et dynéines (Englander et al., 1987). Les MTs, qui polymérisent depuis l'enveloppe nucléaire des noyaux, forment un réseau antiparallèle de MTs entre les noyaux alignés.

#### a. Mécanisme dépendant de Kif5B/MAP7

Le premier mécanisme nécessite l'interaction de la kinésine-1 Kif5B et de la protéine associée aux MTs MAP7 (Metzger et al., 2012). Le complexe formé par Kif5B et MAP7 permet la liaison de deux MTs antiparallèles en même temps.

MAP7 lie de façon stable un MT pendant que la kinésine Kif5B migre vers l'extrémité positive. Ce mécanisme de coulisement des MTs les uns par rapport aux autres permet d'aboutir à la répartition des noyaux (Metzger et al., 2012).

L'inhibition d'expression de Kif5B ou MAP7 dans les muscles de larves de drosophile entraîne des agrégats de noyaux dans les fibres musculaires associés à une diminution de la capacité de mouvement des larves (Folker et al., 2012 ; Metzger et al., 2012).

## **b. Mécanisme dépendant du complexe LINC**

Le complexe LINC recrute les moteurs moléculaires à l'enveloppe nucléaire. Les protéines Nesprine-1 et -2 sont capables d'ancrer la kinésine-1 à l'enveloppe nucléaire *via* la chaîne légère des kinésines (KLC) (Wilson et Holzbaur, 2015 ; Wilson et Holzbaur, 2012). C'est le domaine conservé LEWD de la portion cytoplasmique des Nesprines qui permet la liaison avec les chaînes légères des kinésines. Ce complexe Nesprine/KLC/kinésine-1 fait du noyau un cargo que la kinésine-1 est capable de transporter à travers le myotube grâce au réseau parallèle de MTs.

Nesprine-1 et Kinésine-1 sont essentielles à ce mouvement de noyaux. En effet, l'inhibition d'expression de la Kinésine-1 dans le muscle dans des lignées de souris KO conditionnelles entraîne la mort à la naissance due à une dystrophie musculaire. Ces souris présentent une accumulation de noyaux centraux et agrégés (Wang et al., 2013).

De plus, les fibres musculaires issues de souris Nesprine-1 $\alpha$ 2 KO présentent des noyaux agrégés. En effet, l'absence d'expression de Nesprine-1 $\alpha$ 2 empêche le recrutement de la Kinésine-1 à l'enveloppe nucléaire (Stroud et al., 2017).

## **c. Implication d'autres protéines**

D'autres protéines sont importantes pour la répartition des noyaux dans ces phases précoces de développement musculaires. C'est le cas des moteurs moléculaires dont les rôles sont importants pour l'alignement des noyaux dans ces phases précoces de différenciation musculaire. C'est le cas des kinésines, telles que Kif1c, Kif1a, Kif9, Kif5B, Kif26a, Kif4 ou encore des dynéines, telles que Dync1li1, Dynl11, Dynlrb1 (Gache et al., 2017).

## **4) Périphérisation**

Une des caractéristiques des fibres musculaires striées squelettiques est la présence en périphérie de nombreux noyaux.

Chez les mammifères, le mouvement des noyaux vers la périphérie a lieu après la formation des myofibrilles. En effet, les noyaux centraux se retrouvent entourés de myofibrilles qui remplissent le cytoplasme du myotube avant que les noyaux aillent vers la périphérie (Roman et al., 2017). Des expériences de timelapse en trois dimensions ont montré que les noyaux vont se glisser dans des espaces étroits entre les myofibrilles pour atteindre la périphérie de la fibre musculaire.

Les filaments intermédiaires de desmine vont permettre de former un réseau interconnecté avec les myofibrilles. Elles vont se contracter et fonctionner comme une fermeture éclair de chaque côté du noyau en exerçant des forces aux extrémités du noyau pour le pousser vers la

périphérie. Ces forces entraînent une déformation du noyau avec une diminution de sa sphéricité et que de son volume.

De plus, des changements locaux des niveaux d'expression de Lamine A/C vont permettre au noyau d'être moins rigide, ce qui le rend plus malléable, et facilite son passage entre les myofibrilles. L'inégale distribution de Lamine A/C crée des points de faiblesse locaux qui guident le noyau dans son mouvement.

Ce mouvement de noyaux vers la périphérie fait aussi intervenir les filaments fins d'actine qui contribuent à l'organisation du réseau de desmine.

Par ailleurs, l'organisation spécifique des MTs autour des noyaux périphériques ainsi que la localisation juxtanucléaire des MTOCs dans les fibres musculaires matures suggèrent un rôle essentiel des MTs et du protéome qui y est associé dans la localisation périphérique des noyaux.

## 5) Ancrage

Les défauts d'ancrage de noyaux dans les fibres musculaires sont souvent associés à des noyaux mal orientés et déformés (Chapman et al., 2014 ; Staszewska et al., 2015 ; D'Alessandro et al., 2015). Le maintien de cette position périphérique des noyaux passe par différents mécanismes :

### a. Un mécanisme direct : les filaments intermédiaires de desmine

Les filaments intermédiaires de desmine participent à l'ancrage des noyaux périphériques (Capetanaki et al., 1997). Les souris KO pour la desmine montrent des défauts d'ancrage des noyaux dans les fibres musculaires. En effet, ces noyaux se répartissent de façon hétérogène, sont non périphériques (Chapman et al., 2014 ; Capetanaki et al., 1997) et perdent l'alignement parallèle à l'axe de la fibre musculaire. Ce rôle d'ancrage des noyaux *via* la desmine est dépendant de la protéine plectine-1 (Winter and Wiche, 2013) qui agit en synergie avec la desmine pour relier les organites dans les fibres musculaires (Konieczny et al., 2008 ; Mihailovska et al., 2014 ; Winter et al., 2015).

### b. Un mécanisme indirect : limitation du stress mécanique

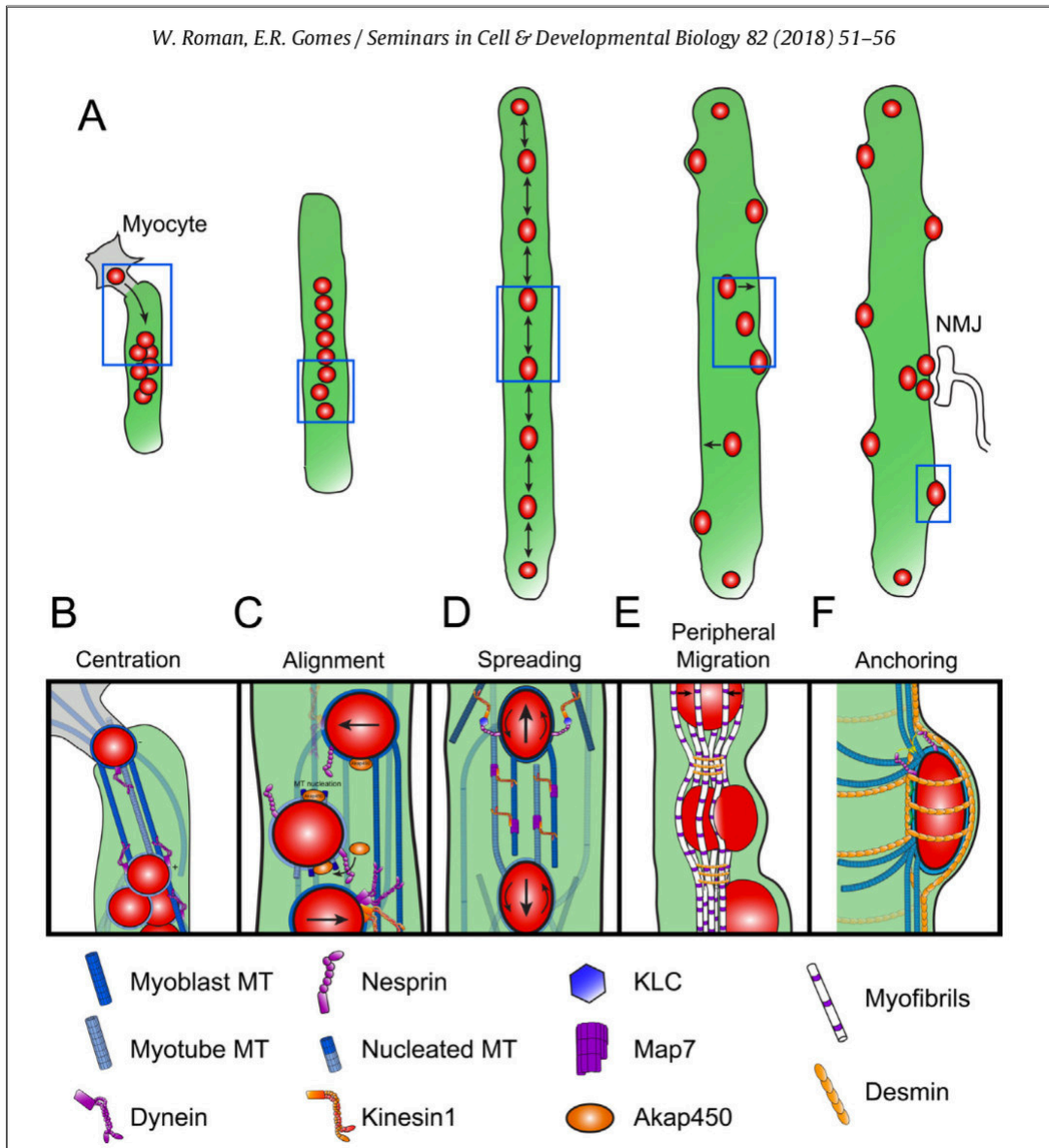
Le positionnement périphérique des noyaux des fibres musculaires permet potentiellement de limiter le stress mécanique généré par la contraction musculaire. Le cytosquelette et la protéine Nesprine-1 jouent un rôle protecteur. Par exemple, la Nesprine-1 coopère avec la spectraplakine et EB1 pour apporter de l'élasticité aux noyaux (Volk and Wang, 2015) et ainsi permettre le maintien de leur position périphérique. Ces résultats ont été confirmés dans des souris KO pour la Nesprine-1 ou pour la desmine. En effet, les noyaux des fibres musculaires de ces souris ont une déformabilité moindre lorsque la longueur de la fibre varie

(Chapman et al., 2014). Ces capacités de déformation des noyaux et de modification de leur rigidité passent par des modifications dans la distribution des Lamines et dans la conformation de la chromatine (Chapman et al., 2014 ; Davidson and Lammerding, 2014 ; Banerjee et al., 2014).

## **6) Agrégation des noyaux sous-synaptiques et à la jonction myotendineuse**

Des noyaux spécialisés restent toutefois agrégés dans les fibres matures fonctionnelles : il s'agit des noyaux des jonctions neuromusculaires (JNM) (Razafsky and Hodzic, 2015, Carlsson et al., 1999). Ceux-ci sont particulièrement importants pour contrôler l'excitation musculaire (Jevsek et al., 2006). Ainsi, l'absence de ces agrégats de noyaux à la JNM est corrélée à des pathologies neuromusculaires (Grady et al., 2005 ; Zhang et al., 2007).

L'ancrage des agrégats de noyaux aux JNM diffère du reste des noyaux. L'agrégation des noyaux à la JNM est corrélée à une boucle positive de maturation entre le neurone et le muscle (Burden, 1998). Cela inclut la sécrétion d'agrine par le motoneurone qui active MuSk (Muscle Specific Kinase) et les récepteurs Lrp4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4). A leur tour, MusK et Lrp4 vont entraîner une augmentation de l'expression d'AchR à la surface des fibres (Burden et al., 2013 ; Kim et al., 2008 ; Zhang et al., 2011 ; Yumoto et al., 2012). Les protéines du complexe LINC semblent importantes pour cette agrégation des noyaux à la JNM. Ainsi, des patients avec une mutation dans une protéine du complexe LINC SUN, ou encore les souris KO pour la Nesprine-1 ou SUN, présentent de sévères défauts d'agrégation des noyaux synaptiques (Lei et al., 2009 ; Chapman et al., 2014).



**Figure 22 :** Représentation schématique des mouvements de noyaux au cours de la myogenèse. Illustration issue de Roman et Gomes (2018). **A.** Mouvements de noyaux au cours de la myogenèse. Les rectangles bleus représentent les zooms présentés de B à F. **B.** Le noyau du myoblaste nouvellement fusionné est tiré jusqu’au centre du myotube par la dynéine et les MTs. **C.** Nesprine-1 $\alpha$  et PCM-1 recrutent les protéines centrosomales ainsi que les moteurs moléculaires à l’enveloppe nucléaire. **D.** Kif5B et MAP7 attachés aux MTs utilisent le réseau antiparallèle de MTs pour répartir les noyaux dans la longueur du myotube. Kif5B et la chaîne légère de la kinésine KLC se déplacent depuis l’enveloppe nucléaire vers l’extrémité positive du MT et induisent sa rotation. **E.** L’organisation et la contraction des myofibrilles ainsi que la modulation de la rigidité des noyaux guident les noyaux vers la périphérie de la fibre musculaire. Le réseau de desmine participe à l’organisation des myofibrilles. **F.** La Nesprine organise le réseau de MTs pour ancrer les noyaux en position périphérique à la membrane plasmique. Cet ancrage est renforcé par le réseau de desmine.



## 7) Théorie des domaines nucléaires

La nature plastique du muscle ainsi que son organisation syncytiale ont permis de faire émerger une théorie apparue récemment : la théorie des domaines nucléaires (Qaisar and Larsson, 2014 ; Gundersen, 2016 ; Schwartz et al., 2016). Cette théorie controversée énonce que les noyaux périphériques régulièrement espacés des fibres musculaires seraient en charge de contrôler la portion cytoplasmique qui les entourent directement. Cette théorie permettrait d'expliquer le fait que la distance entre noyaux soit maximisée (Pavlati et al., 1989). Suivant cette théorie, dans des fibres bien matures, les noyaux non synaptiques se répartissent selon une corrélation linéaire entre la taille de la fibre musculaire et la distance entre noyaux (Bruusgaard et al., 2003). Ainsi, si les noyaux étaient agrégés plutôt que bien espacés, certaines régions cytoplasmiques seraient déficientes en transcrits et en protéines qui sont nécessaires au maintien de la fibre musculaire.

Cette théorie énonce également que pour maintenir un ratio nucléo-cytoplasmique optimal, de nouveaux noyaux sont incorporés durant l'hypertrophie et d'autres sont perdus lors de l'atrophie musculaire. En effet, des données montrent que le nombre de noyaux augmente avec l'hypertrophie musculaire (Moss, 1968 ; Cabric and James, 1983 ; Egner et al., 2016). Ces noyaux surnuméraires sont acquis lors de la fusion des cellules satellites avec les fibres musculaires (voir paragraphe cellules satellites pour plus de détails) (Brack and Rando, 2012 ; Bachman et al., 2018).

L'aspect controversé de cette théorie est relatif à la condition d'atrophie musculaire. En effet, aucune perte de noyaux n'est constatée dans des fibres musculaires atrophiques (Bruusgaard et Gundersen, 2008 ; Gundersen et Bruusgaard, 2008).

## III. Mécano-transduction, des microtubules aux mouvements de noyaux

La capacité des cellules à répondre aux forces mécaniques est critique pour de nombreux processus biologiques. Des évidences ont émergé indiquant que les forces mécaniques externes entraînent des modifications de la structure de l'enveloppe nucléaire, de sa composition, de l'organisation chromatinienne et de l'expression des gènes. Toutefois, on ne comprend pas encore si ces processus prennent origine dans le noyau, s'ils sont l'aboutissement d'une cascade de signalisation cytoplasmique, ou encore s'il s'agit d'une cumulation de ces deux éléments.

### 1) Le noyau comme mécanosenseur

Les cellules sont continuellement exposées aux forces de contraction (Magrid et Law, 1985). La capacité des cellules à ressentir et à répondre à ces signaux mécaniques est importante pour de nombreux processus biologiques, tels que l'embryogenèse, le développement (Le et al., 2016 ; Lecuit et Lenne, 2007) et l'homéostasie tissulaire (Barnes et al., 2017 ; Matthews et al., 2006). En effet, les forces mécaniques peuvent influencer la

morphologie et le comportement des cellules (Reidy et Bowyer, 1977 ; Tucker et Meats, 1976) (Fig.23).

#### **a. Le noyau, un organite mécanosensible**

Au cours des deux dernières décennies, des études ont permis de mieux comprendre quelle est la réponse nucléaire face aux stimuli mécaniques (Fedorchak et al., 2014 ; Maniotis et al., 1997). Une telle mécanotransduction nucléaire pourrait être une façon rapide et directe pour transduire des forces en événements cellulaires (Chambliss et al., 2013 ; Wang et al., 2009). Ainsi, les forces appliquées sur les noyaux *via* le cytosquelette pourraient moduler les signaux cytoplasmiques ou encore pourraient être suffisantes pour entraîner des changements directs dans l'expression des gènes. En effet, les forces extracellulaires et cytoplasmiques sont transmises dans le noyau *via* l'enveloppe nucléaire. Ces forces peuvent entraîner des déformations de la chromatine et des corps nucléaires (Maniotis et al., 1997 ; Lombardi et al., 2011). Le noyau est donc un organite mécanosensible.

#### **b. Le complexe LINC**

Les forces externes peuvent être appliquées aux noyaux indépendamment du complexe LINC ; par exemple pendant la compression du noyau (Elosegui-Artola et al., 2017) ou la migration cellulaire à travers un environnement confiné, tels qu'à travers la matrice extracellulaire ou encore à travers un tissu avec une forte densité cellulaire (Thiam et al., 2016). Cependant, dans la plupart des cas, cette transmission de forces nécessite le complexe LINC qui permet une transmission efficace des forces entre le cytosquelette et le noyau (Fig.23A). En effet, altérer l'intégrité de ce complexe protéique, en inhibant l'expression ou encore en exprimant une forme dominante négative des protéines Nesprine ou Sun, entraîne un défaut de transmission des forces entre le noyau et le cytosquelette (Lombardi et al., 2011) ainsi qu'un défaut de l'expression des gènes mécanoréactifs tels que les gènes *RAC1* et *Src* (Tajik et al., 2016 ; Banerjee et al., 2014).

#### **c. Importance du cytosquelette**

La déformation nucléaire induite par des forces nécessite un réseau de cytosquelette intact et rigide (Makhija et al., 2016 ; Keeling et al., 2017) pour transmettre les forces de la surface de la cellule au noyau (Wang et al., 2009). En effet, si l'actine est altérée par des approches pharmacologiques ou génétiques, alors la transmission des forces au noyau sera altérée (Keeling et al., 2017 ; Hatch et Hetzer, 2016). Ce phénomène s'accompagne de changements dans la dynamique de la chromatine (Makhija et al., 2016).

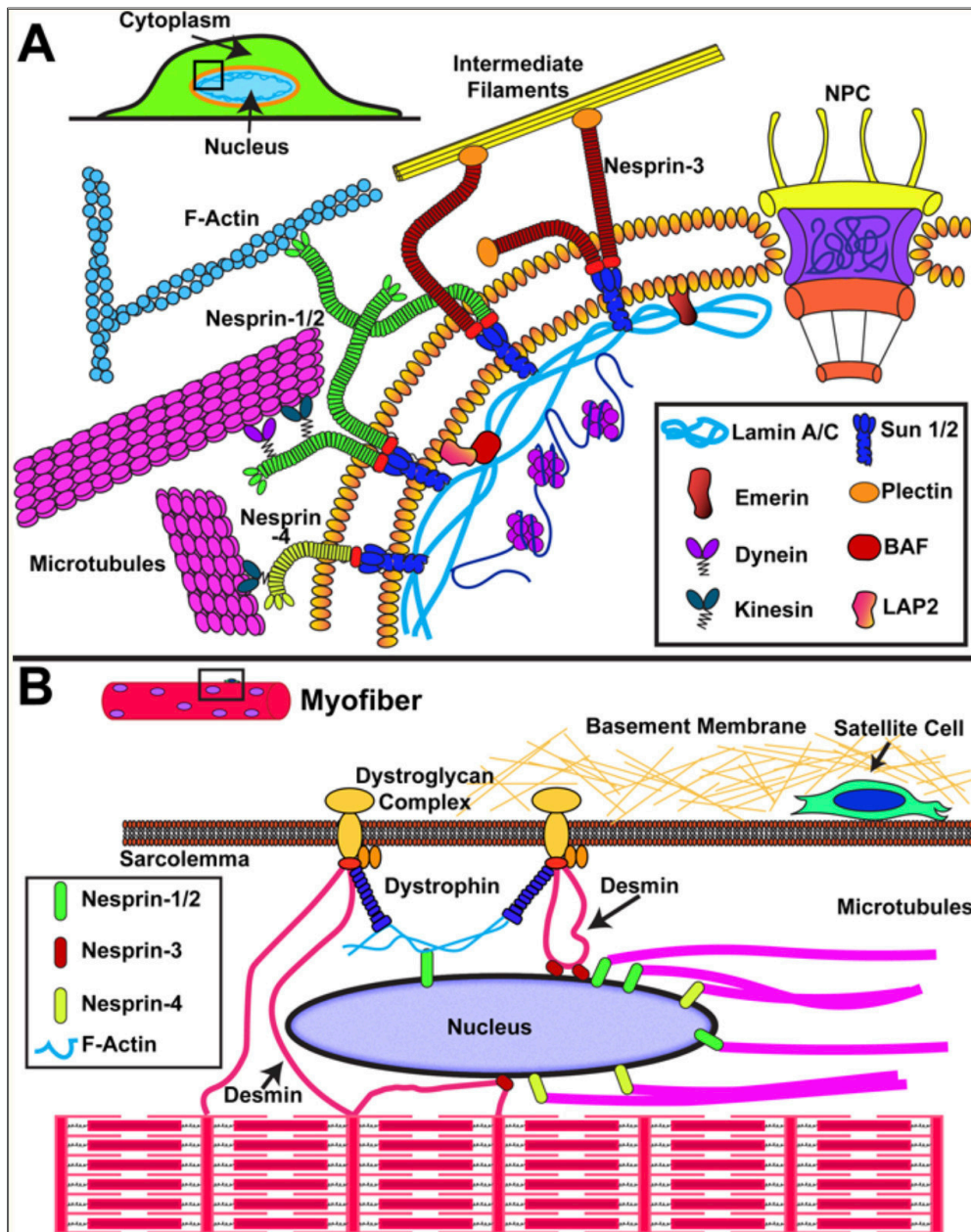
#### d. Mécanotransduction nucléaire dans le tissu musculaire

La relation complexe entre le réseau de cytosquelette, le noyau et l'environnement mécanique est particulièrement importante dans les cellules du muscle strié squelettique. En effet, ces cellules contractiles ont un cytosquelette périnucléaire spécialisé qui ancre le noyau sur place (Fig.23B). Du fait de sa localisation membranaire, le complexe dystroglycane participe à la transmission des forces exercées à la surface cellulaire vers le compartiment intracellulaire. En effet, les filaments d'actine, de desmine ou encore de microtubules, fournissent un lien physique entre le complexe dystroglycane et les noyaux des fibres musculaires et participent à la transmission des forces aux noyaux.

Une connexion adéquate entre le noyau et le cytosquelette est cruciale pour l'intégrité et le maintien du muscle squelettique. Cette notion est supportée par le fait que les mutations dans le gène *LMNA*, qui entraînent des dystrophies musculaires et des cardiomyopathies dilatées, résultent en un couplage noyau-cytosquelette altéré (Zwerger et al., 2013 ; De Vos et al., 2011 ; Zuela et al., 2016) et une perte de la fonction structurale.

L'interaction de la desmine avec l'enveloppe nucléaire, *via* la plectine-1 (Staszewska et al., 2015), est cruciale pour l'intégrité de la fibre musculaire (Konieczny et al., 2008). En effet, la perte fonctionnelle de la plectine relâche les tensions exercées sur le noyau et résulte en une expression des gènes mécanoréactifs altérée (Staszewska et al., 2015).

Bien que les muscles striés soient les tissus les plus touchés par les perturbations de la mécanique nucléaire et le couplage nucléo-cytosquelettique, beaucoup d'autres types cellulaires sont également touchés par une transmission de force altérée entre le noyau et le cytosquelette (Gonzalez-Granado et al., 2014 ; Khatau et al., 2012).



**Figure 23 :** Transmission de forces aux noyaux *via* le complexe LINC. Illustration tirée de Kirby et Lammerding (2018). **A.** La transmission de forces aux noyaux implique des interactions entre le cytosquelette et les Nesprines de la membrane nucléaire externe. Les protéines Nesprines interagissent à leur tour avec les protéines SUNs ancrées dans la membrane nucléaire interne. Ces dernières transmettent les forces aux lamines nucléaires. **B.** Organisation du réseau de cytosquelette dans la fibre musculaire avec des structures d'actine et de myosine qui forment l'appareil contractile et les myofibrilles. Les noyaux sont positionnés à la périphérie des cellules où ils interagissent avec des protéines exprimées spécifiquement dans le muscle : la dystrophine *via* l'actine et la desmine. Des protéines additionnelles telles que les protéines du complexe LINC et les lamines peuvent être impliquées dans l'ancrage des noyaux et dans la transmission des forces entre les noyaux et le cytosquelette.

## 2) Mécanismes associés à la mécanotransduction nucléaire

Les forces externes sont transmises au noyau par le cytosquelette, ce qui peut entraîner une déformation du noyau (Khatau et al., 2009 ; Driscoll et al., 2015 ; Ramdas et Shivashankar, 2015). Ces forces et déformations peuvent moduler l'activité transcriptionnelle et l'organisation de la chromatine à travers de nombreux mécanismes (Fig.24).

### a. Repositionnement génique

La chromatine sous forme d'hétérochromatine est enroulée étroitement autour des histones et est donc inaccessible pour la machinerie transcriptionnelle. Cette chromatine compacte est souvent localisée en périphérie du nucléoplasme (Solovei et al., 2013), localisation associée à la répression génique. Lorsque le gène est repositionné vers l'intérieur du noyau, il y a activation génique (Zullo et al., 2012). Ainsi le repositionnement des gènes à la périphérie induit par les forces exercées sur le noyau, peut altérer l'activité transcriptionnelle de gènes spécifiques et contribuer à la mécanotransduction nucléaire.

Dans le même sens, sur des cellules *in vitro*, altérer l'organisation du cytosquelette et sa tension, en utilisant différents substrats, altère la forme du noyau et la distribution des chromosomes. Ce phénomène est accompagné d'un changement dans l'expression des gènes (Ramdas et Shivashankar, 2015 ; Wang et al., 2017).

### b. Etat transcriptionnel de la chromatine

Des travaux ont montré que l'application de forces à la surface de la cellule entraîne un étirement instantané de la chromatine dans le noyau associé à une induction rapide de la transcription d'un transgène dans la même région de la chromatine (Tajik et al., 2016). De plus, le niveau de transcription est corrélé avec la fréquence et la magnitude des forces appliquées (Tajik et al., 2016).

### c. Déformabilité nucléaire

La décondensation de la chromatine augmente la déformabilité nucléaire (Spasgnol et Dahl, 2016 ; Spasgnol et al., 2016 ; Chalut et al., 2012 ; Dahl et al., 2005 ; Stephens et al., 2017). Ces modifications peuvent se produire indépendamment de changements d'expression des lamines (Stephens et al., 2018). Ainsi, des changements dans l'organisation nucléaire peuvent avoir des effets directs sur la conformation du noyau et peuvent moduler d'autres processus de mécanotransduction nucléaire.

#### **d. Changements conformationnels et modifications post-traductionnelles des protéines de l'enveloppe nucléaire**

Par ailleurs, des études récentes ont montré qu'un stress mécanique peut induire des changements conformationnels et post-traductionnels des protéines de l'enveloppe nucléaire (Guilluy et al., 2014 ; Ihalainen et al., 2015 ; Swift et al., 2013 ; Buxboim et al., 2014).

En effet, l'application de force sur le noyau entraîne également des différences apico-basales dans la conformation des Lames A/C, ce qui induit le masquage de certains épitopes en C- et en N- terminal (Ihalainen et al., 2015). L'exposition de noyaux isolés à une contrainte de cisaillement entraîne l'exposition d'un résidu cystéine cryptique (Cys552) des Lames A/C, qui est normalement inaccessible dans des conditions de faible stress mécanique (Swift et al., 2013).

De plus, une faible tension du cytosquelette sur le noyau augmente le taux de phosphorylation des Lames A/C (Swift et al., 2013 ; Buxboim et al., 2014). A l'inverse, de fortes tensions du cytosquelette diminuent la phosphorylation des Lames A/C (Buxboim et al., 2014). La protéine émerine est également impactée par ces modifications puisque l'application de forces sur des noyaux isolés entraîne une augmentation de sa phosphorylation (Guilluy et al., 2014). L'application de forces prolongée permet, *via* l'émerine, de renforcer le réseau d'actine à la membrane nucléaire externe et de faciliter le remodelage de la chromatine (Le et al., 2016).

#### **e. Perméabilité des pores nucléaires**

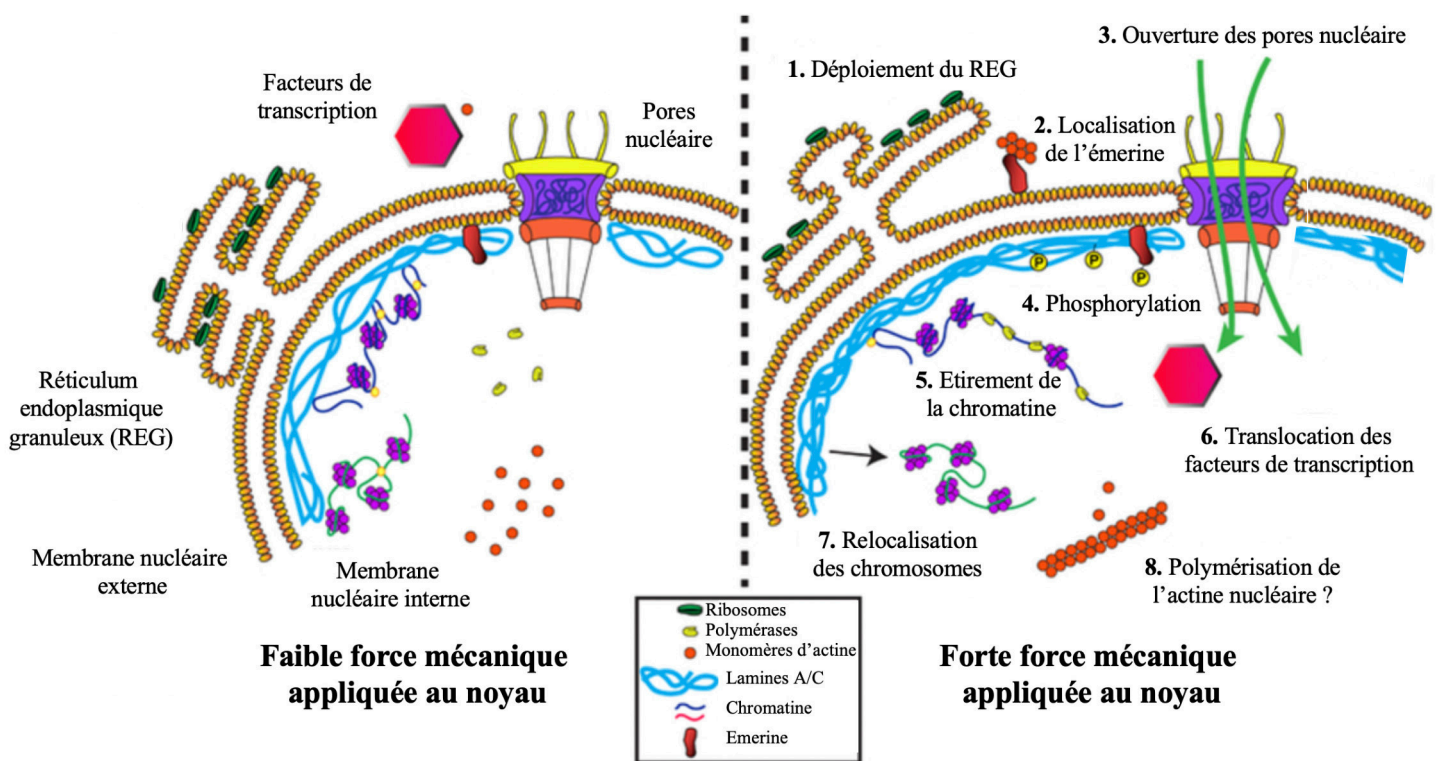
L'augmentation de la tension sur la membrane nucléaire peut potentialiser des voies de signalisation cytoplasmiques en altérant la perméabilité des pores nucléaires. Des données suggèrent que les pores nucléaires peuvent changer de conformation en réponse aux forces mécaniques (Chug et al., 2015 ; Stuwe et al., 2015 ; Solmaz et al., 2013).

Cette modification de conformation peut être due à des tensions de la membrane nucléaire ou à la transmission de forces à travers les protéines du complexe LINC et les lames nucléaires. En effet, Sun1 et la lame A/C interagissent avec une protéine des pores nucléaires, NUP153 (Nucleoporin NUP53) (Liu et al., 2007 ; Jahez et al., 2016 ; Fahrenkrog et al., 2003). L'application de forces directement sur le noyau est suffisante pour promouvoir l'entrée du facteur de transcription mécanosensible YAP dans le noyau (Elosegui-Artola et al., 2017) *via* l'augmentation de son import grâce à l'augmentation de perméabilité des pores nucléaires (Elosegui-Artola et al., 2017).

Mis à part l'augmentation de perméabilité des pores nucléaires, d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire peuvent moduler l'import/export de facteurs de transcription mécanosensibles *via* d'autres mécanismes (Ho et al., 2013 ; Bertrand et al., 2014 ; Dupont et al., 2011). La lame A/C a ainsi été décrite pour séquestrer des facteurs de transcription à la périphérie nucléaire et ainsi contrôler leur activité dans le noyau. Par ces mécanismes, la lame nucléaire peut moduler l'expression génique et le comportement cellulaire.

## f. Réponse transcriptionnelle

L'application de forces à court terme (de quelques secondes à une trentaine de minutes) induit rapidement la transcription (Tajik et al., 2016 ; Lammerding et al., 2004) alors qu'une application à long terme (pendant 12 heures) entraîne une augmentation globale de l'hétérochromatine et de la répression transcriptionnelle (Le et al., 2016). Cela suggère une réponse différentielle à l'application de forces selon la durée de stimulation. L'application de forces mécaniques *via* les Nesprines sur des noyaux isolés génère un recrutement des Lames A/C et une phosphorylation de l'émerine induisant ainsi une augmentation de la rigidité nucléaire (Guilluy et al., 2014). Ainsi les voies de signalisation biochimiques activées par des gènes mécanoréactifs peuvent entraîner des boucles de rétroaction qui modifient la réactivité de la cellule à d'autres forces mécaniques.



**Figure 24 :** Mécanisme proposé par Kirby et Lammerding (2018) concernant la réponse du noyau face à l'application mécanique de forces. 1. L'étirement de l'enveloppe nucléaire peut altérer la conformation du réticulum endoplasmique granuleux, exposant ainsi plus de ribosomes dans le cytoplasme. 2. L'application de forces favorise la translocation de l'émerine de la membrane nucléaire interne vers la membrane nucléaire externe. Cela entraîne une modulation dans l'organisation de la chromatine et facilite la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane nucléaire externe. 3. L'augmentation de la tension membranaire peut entraîner l'ouverture des pores nucléaires (NPC) et moduler leur perméabilité. 4. La transmission des forces aux noyau entraîne des modifications post-traductionnelles et altère la dynamique des Lamines A/C et des protéines de la membrane nucléaire interne telle que l'émerine. Cela peut moduler les propriétés mécaniques du noyau et induire une signalisation en aval. 5. Les forces externes peuvent induire un étirement de la chromatine, altérant ainsi l'accessibilité et l'activité des polyméras et des facteurs de transcription. 6. L'ouverture des pores nucléaires peut moduler la localisation et l'activité des facteurs de transcription. 7. Les forces agissant sur le noyau peuvent entraîner des modifications dans la localisation des chromosomes, altérant ainsi leur activité transcriptionnelle. 8. La polymérisation de l'actine induite mécaniquement peut moduler l'export et l'activité de régulateur de la transcription, et également affecter d'autres processus nucléaires qui nécessitent l'actine monomérique.





# SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE



Les fibres musculaires composent le muscle strié squelettique et proviennent de la fusion des myoblastes. Ces cellules fusionnent entre-elles par milliers afin de former les myotubes (Wakelam, 1985). Ceux-ci devront subir différentes étapes de maturation pour permettre le fonctionnement de la fibre musculaire mature : la formation de l'appareil contractile (agencement entre les réseaux d'actine et de myosine à la base des sarcomères), la mise en place du réseau de réticulum sarcoplasmique (réserves calciques) ou bien encore l'établissement de jonctions neuromusculaires qui permettront à la fibre musculaire de répondre suite à l'excitation par le motoneurone. Les noyaux qui composent les cellules musculaires subissent différents mouvements avant d'atteindre leur position périphérique dans les fibres musculaires matures. Les étapes précoces de positionnement des noyaux le long des myotubes commencent à être mieux comprises. Celles-ci passent par des mouvements nucléaires contrôlés par différents acteurs clés du cytosquelette tels que les microtubules, les moteurs moléculaires ainsi que certaines protéines associées aux microtubules. Par exemple, après l'événement de fusion entre myoblastes, les noyaux vont rapidement se positionner au centre du myotube *via* un mécanisme dynéine-dépendant (Cadot et al., 2012). Puis, les noyaux s'alignent et s'espacent les uns des autres pour se répartir régulièrement au centre des myotubes en formation, grâce à une interaction entre MAP7 et Kif5B (Metzger et al., 2012). Cependant, ce mécanisme est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît et fait intervenir au moins 17 autres kinésines dans ce processus (Gache et al., 2017). Les étapes moléculaires tardives de positionnement des noyaux, tels que leur périphérisation, leur espacement et leur ancrage à la périphérie, restent encore à identifier. Les réseaux de cytosquelette d'actine et de microtubules étant totalement remodelés durant la différenciation musculaire avec une accumulation de ces deux éléments autour des noyaux dans les myotubes, on peut supposer qu'ils constituent un potentiel support à la périphérisation des noyaux (Falcone et al., 2014 ; Roman et al., 2017).

Les conséquences fonctionnelles d'une mauvaise localisation des noyaux sur les fibres ont longtemps suscité des interrogations. Une désorganisation du positionnement nucléaire, que ce soit en termes d'espacement ou de périphérisation, est associée à un dysfonctionnement de la fibre musculaire (Metzger et al., 2012). Ces défauts sont observés dans certaines conditions pathologiques, telles que les myopathies centronucléaires où les noyaux perdent (ou n'acquièrent pas) cette localisation périphérique, et se retrouvent alors au centre des fibres musculaires (Jungbluth et al., 2008). D'autres études ont montré que des défauts de la localisation des noyaux dans les fibres musculaires altèrent leur fonctionnalité (Metzger et al., 2012). Par conséquent, la localisation périphérique des noyaux dans les fibres musculaires semble essentielle à leur fonctionnalité.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a consisté en l'identification des protéines en lien avec les MTs et impliquées dans la régulation du positionnement des noyaux au cours de la différenciation des fibres musculaires striées squelettiques.

Pour répondre à cette problématique, l'hypothèse selon laquelle les protéomes associés aux MTs sont différents dans des myotubes immatures et dans des fibres musculaires matures a été émise. Faisant suite à l'identification de ces deux protéomes, un ensemble de protéines a été sélectionné. Un crible utilisant des ARN interférents ciblant ces différentes protéines a

été réalisé, de façon à identifier celles impliquées dans le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire.

Ce criblage a permis d'identifier l'implication de diverses protéines dans ce processus. Parmi celles-ci, la protéine NuMA1 s'est révélée particulièrement intéressante. La deuxième partie de ma thèse s'est donc intéressée à comprendre le mécanisme d'action de NuMA1 sur le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire.

L'ensemble de ces approches a permis d'aboutir aux résultats présentés dans les pages suivantes.

# MATERIELS ET METHODES



## **I. Culture cellulaire**

### **1. Culture des cellules musculaires primaires de souris**

Les cellules musculaires primaires sont extraites à partir de souriceaux C57BL/6 âgés de 5 jours. Pour cela, les souriceaux sont mis à mort par décapitation. Les muscles des membres inférieurs sont prélevés. Après digestion mécanique, les morceaux de muscle sont digérés 1h à 37°C sous agitation à l'aide d'une solution enzymatique de collagénase/dispase. Une centrifugation de 5min à 600rpm permet d'éliminer le culot contenant les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation de 5min à 1600rpm permet d'obtenir un culot cellulaire contenant des fibroblastes, des myoblastes ainsi que des globules rouges. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu DMEM – 15% sérum de veau fœtal – 1% Pénicilline/Streptomycine, puis filtré sur tamis cellulaire de 40µm et enfin placé à l'incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 5h. Cette étape permet d'éliminer les fibroblastes, qui sont des cellules à adhérence rapide. Faisant suite à cette étape d'adhésion différentielle, le surnageant contenant les myoblastes, des globules rouges ainsi que des débris cellulaires est centrifugé 5min à 1600rpm. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu permettant le maintien en prolifération des myoblastes primaires contenant de l'IMDM – 20% sérum de veau fœtal – 1% extrait embryon de poulet – 1% Pénicilline/Streptomycine – 0.5% Gentamycine, puisensemencé dans des boîtes de culture cellulaire préalablement recouvertes de IMDM – 1% Matrigel.

Lorsque la confluence des myoblastes atteint 70%, le milieu de culture est appauvri en sérum pour induire les myoblastes en différenciation. Pour cela, le milieu de différenciation suivant est utilisé : IMDM – 2% sérum de cheval – 1% Pénicilline/Streptomycine. Après 3 jours de culture *in vitro* de ces cellules primaires, le stade de myotube immature est atteint.

Afin d'obtenir des myofibres matures après 10 jours de différenciation *in vitro*, du Matrigel 50% - IMDM est déposé sur les myotubes immatures. 45min d'incubation à 37°C sont nécessaires pour permettre la polymérisation du Matrigel. Du milieu de différenciation complétement d'Agrine diluée au 1/1000 est ajouté sur les cellules. La moitié du volume de milieu de différenciation supplémenté d'agrine est remplacé toutes les 48h.

### **2. Culture des cellules musculaires immortalisées C2C12**

Les cellules sontensemencées sur des boîtes préalablement recouvertes d'IMDM – 1% Matrigel. Les cellules sont maintenues en prolifération à l'aide d'un milieu de culture contenant du DMEM – 15% SVF – 1% Pénicilline/Streptomycine. Lorsqu'elles atteignent 70% de confluence, le milieu est remplacé par du milieu de différenciation contenant du DMEM – 2% sérum de cheval – 1% Pénicilline/Streptomycine. Le milieu de différenciation est remplacé toutes les 48h. Les cellules C2C12 peuvent être maintenues jusqu'à 6 jours de différenciation *in vitro*.



### 3. Culture des cellules musculaires humaines immortalisées

Les cellules sont ensemencées sur des boîtes préalablement recouvertes d'IMDM – 1% Matrigel. Les cellules sont maintenues en prolifération à l'aide d'un milieu de culture contenant : 40% de milieu « Skeletal Muscle cell Growth Medium » (Promocell) supplémenté en « Supplemented Mix », 30% de « DMEM, High Glucose, Pyruvate (Gibco), 20% de sérum de vœu fœtal décomplémenté, 9% de « Medium 199, GlutaMAX Supplement (Gibco), 1% de pénicilline – streptomycine, 0,005% de puromycine et 0,003% de Dexaméthasone.

Les cellules sont ensuite maintenues en différenciation grâce au milieu « Skeletal Muscle Cell Growth Medium » (Promocell). Le milieu de différenciation est changé toutes les 48h.

### 4. Transfection de petits ARNs interférents et de plasmides

Les transfections de siRNAs ciblant *NuMA1* ou encore les transfections permettant la surexpression de *hNuMA1* ont été réalisées dans le même temps où les myoblastes étaient induits en différenciation de façon à ne pas interférer avec les divisions cellulaires. Toutes les autres transfections ont été réalisées sur des myoblastes prolifératifs qui ont été induits à se différencier 24h post-transfection.

Le protocole fourni par LipofectamineRNAimax® a été utilisé pour transférer des ARN interférents de type siRNA. 4h post-transfection, le milieu de culture a été remplacé. Les siRNA suivants ont été utilisés :

| siRNA                       | Séquence/Référence  |
|-----------------------------|---------------------|
| siRNA Scramble              | Ambion, AM4641      |
| siRNA Kif5B – sens          | GCAAGAAGUAGACCGGAUA |
| siRNA Kif5B - antisens      | UAUCCGGUCUACUUCUUGC |
| siRNA NuMA1 - Sens          | GGGCAAGGUGAAGCAUUA  |
| siRNA NuMA1 - Antisens      | UUAAUGCUUCACCUUGCCC |
| siRNA n°1 Zbtb8a - Sens     | GGCAAGGUCUCAAAGCGC  |
| siRNA n°1 Zbtb8a - Antisens | GCGCUUGAAGACCUUGCC  |
| siRNA n°2 Zbtb8a - Sens     | GGAAGAGAAUAGAUCUUAU |
| siRNA n°2 Zbtb8a - Antisens | AUAGGAUCUAUUCUCUUC  |
| siRNA n°3 Zbtb8a - Sens     | CCGUAUCCAUCUGAACGU  |
| siRNA n°3 Zbtb8a - Antisens | ACGUUCAGAAUGGAUACGG |

La Lipofectamine3000® a été utilisée pour la transfection de plasmides. 4h post-transfection, le milieu de culture a été remplacé.

Les plasmides suivants ont été utilisés :

| Plasmide                 | Séquence/Référence            |
|--------------------------|-------------------------------|
| shRNA Scramble           | CSHCTR001-LVRU6GP (Tebu-bio)  |
| shRNA NuMA1              | GCCAGATGGATCGAAAGATTA (Sigma) |
| Lamin-chromobody-RFP     | Chromotek®                    |
| EB1-GFP                  |                               |
| Plasmides <i>h</i> NuMA1 | Haren et Merdes (2002)        |

## II. Identification des protéomes associés aux microtubules au cours de la différenciation musculaire et criblage ARN interférents utilisant des siRNAs

### 1. Approche biochimique permettant l'identification des protéomes microtubule-dépendants

#### a. Purification de protéines associées aux microtubules

Afin d'identifier les protéomes associés aux microtubules dans les myotubes et dans les myofibrilles obtenus *in vitro*, le protocole décrit dans Gache et al., (2007) a été suivi.

Des cultures primaires de myotubes et de myofibrilles ont été trypsinées et les cellules resuspendues dans un volume optimal de tampon de lyse BRB80, contenant 0.5M PIPES (1,4-Piperazinediethanesulfonic acid) pH 6.8, 2M MgCl<sub>2</sub>, 0.5M EGTA, à +4°C. Afin de clarifier les extraits, ils ont été centrifugés deux fois sur un coussin de 40% de glycérol dilué dans du BRB80 à 45000rpm avec un rotor Beckman TLA100.3 à +4°C.

Afin de lier les protéines associées aux microtubules ainsi que les moteurs moléculaires au réseau microtubulaire, l'extrait cellulaire clarifié a été chauffé au bain-marie à 20°C. Des microtubules en suspension stabilisés grâce au Taxol ont été ajoutés aux extraits en présence de 1mM de GTP et 1,5mM d'AMP-PNP (adenylyl-imidophosphate, un analogue non hydrolysable de l'ATP). La suspension a été incubée à 20°C pendant 10min.

La solution de microtubules/extrait cellulaire a été déposée sur un coussin contenant 40% de glycérol et 10µM de Taxol dilués dans du BRB80, et a été centrifugée pendant 10min à 45000rpm à 20°C.

Le culot microtubulaire contenant les protéines associées aux microtubules et les moteurs moléculaires a été resuspendu dans 3mL de BRB80 et centrifugé 10min à 45000rpm, à 20°C. Cette étape de lavage a été répétée 3 autres fois.

Le culot final obtenu a été resuspendu dans 1mL de BRB80 contenant 10mM d'ATP et incubé 10min à 20°C. Cette étape permet l'éluion des moteurs moléculaires. Après l'incubation, les microtubules ont été culotés pendant 10min à 103000g à 20°C. Le surnageant contenant les

protéines éluées (correspondant à la fraction des moteurs moléculaires) a immédiatement été transféré sur glace. Cette étape d'éluion a été répétée et le surnageant a été compilé avec celui obtenu à la précédente centrifugation.

Le culot de microtubules restant a été resuspendu dans 1mL de BRB80 contenant 0.5M de NaCl et incubé 10min à 20°C. Cette étape permet d'éluier les protéines associées aux microtubules et toutes les protéines sensibles à une importante force ionique. Après incubation, les microtubules ont été culotés par une centrifugation de 10min à 103000g à 20°C. Le surnageant contenant les protéines éluées (correspondant à la fraction des protéines associées aux microtubules) a été transféré sur glace.

La fraction des moteurs moléculaires ainsi que la fraction des protéines associées aux microtubules ont été concentrées grâce à un concentrateur de 0,5mL (contenant une membrane de polyéthersulfone présentant un seuil de poids moléculaire de 10.000 ; Vivaspin) pour obtenir un volume de 50µL. À la suite de cette étape, la fraction des moteurs moléculaires est prête pour l'analyse sur gel d'électrophorèse.

La fraction des protéines associées aux microtubules contient à cette étape 0.5M de NaCl qui peuvent perturber la migration des protéines sur gel d'acrylamide. Cette fraction a donc été diluée dans 10 volumes d'eau de façon à réduire son contenu en sels à environ 50mM de NaCl. Cette fraction a ensuite été concentrée grâce au concentrateur Vivaspin de 0,5mL. La fraction des protéines associées aux microtubules est ainsi prête pour l'analyse par électrophorèse.

De façon à identifier les protéomes associés aux microtubules dans les myotubes et dans les myofibrilles, ce protocole a été réalisé sur des extraits de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* et de myofibrilles primaires après 10 jours de différenciation *in vitro* qui ont été cultivés comme indiqué précédemment.

### **b. Analyse des protéines sur gel d'électrophorèse SDS-Polyacrylamide**

Les fractions de moteurs moléculaires et des protéines associées aux microtubules ont été chargées sur des gels d'électrophorèse gradients de 6 à 18%. La migration est réalisée à 25mA à +4°C. Après l'étape de migration, les gels ont été marqués par du bleu de Coomassie.

### **c. Digestion des bandes protéiques**

Les bandes des gels marquées par le bleu de Coomassie ont été excisées puis découpées en cubes de 1mm x 1mm. Celles-ci ont été déshydratées avec de l'acétonitrile. Les protéines ont été réduites avec 10mM de DTT dans 100mM de bicarbonate d'ammonium à 56°C, puis alkylées avec 55mM d'iodoacétamide. Après des lavages avec 100mM de bicarbonate d'ammonium et une déshydratation par l'acétonitrile, un volume optimal de tampon de digestion est ajouté aux morceaux de gel pour les recouvrir. Ce tampon contient 12,5ng/µL de

trypsine dans 40mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /10% acétonitrile). Les échantillons sont ensuite incubés 2h à +4°C, puis digérés sur la nuit à 37°C après addition de tampon si nécessaire.

Après digestion, les peptides sont extraits, successivement avec 50 $\mu\text{L}$  d'acétonitrile et 100 $\mu\text{L}$  d'acétonitrile : 5% d'acide formique (50/50).

Les extraits ont été regroupés et séchés dans une centrifugeuse à vide, et stockés à -20°C.

#### **d. Identification des peptides**

L'identification des peptides a été réalisée par Yohann Couté et Alexandra Kraut du laboratoire CEA (Grenoble) grâce à une analyse par spectrométrie de masse.

## **2. Criblage ARN interférents de type siRNA**

### **a. Méthodologie**

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits préalablement recouvertes de IMDM – 1% Matrigel. Les cellules sont maintenues en prolifération jusqu'à atteindre 70% de confluence. Les transfections ont ensuite été réalisées en milieu de prolifération dépourvu d'antibiotique, selon le protocole fourni par LipofectamineRNAimax®. Pour chaque condition, un mélange de 3 ARNs interférents de type siRNAs a été utilisé. 4h post-transfection, le milieu de culture a été remplacé ; puis 24h post-transfection, les cellules ont été passées en différenciation.

Les cellules C2C12 ont été maintenues en différenciation 6 jours *in vitro*, temps leur permettant d'atteindre le stade de myotubes immatures. Seulement 3 jours de différenciation *in vitro* sont nécessaires aux cellules primaires pour atteindre ce même stade. Les cultures de myotubes immatures ont ensuite été fixées et immunomarquées, par l'anticorps MF20 et le DAPI.

### **b. Microscopie**

Dans le but d'obtenir une image la plus représentative de chacune des conditions, des images mosaïques 5 par 5 ont été acquises au microscope Timelapse AxioObserver Z1 (Zeiss) à l'objectif 10X (N-Achroplan, 0.25 Ph1, N.A 0.25).

### **c. Analyse**

L'analyse phénotypique de l'aire et de la longueur des myotubes, ainsi que des paramètres représentant le positionnement des noyaux dans chacune des conditions du criblage ARN interférents a été réalisée grâce à l'outil d'analyse bio-informatique développé en collaboration avec des bio-informaticiens (Claire Burny [laboratoire LMBC], Stéphane Janczarski [LMBC], Florian Barbazange [laboratoire LARIS], David Rousseau [LARIS] et Jacques Brocard

[plateforme microscopie PLATIM]). Cette méthode d'analyse est présentée dans la partie « Résultats ».

### **III. Immunomarquage et microscopie**

#### **1. Fixation de cultures cellulaires et marquage immunofluorescent**

Après rinçage au PBS, les cultures cellulaires ont été fixées à l'aide d'une solution de 4% PFA – 4% sucrose - PBS, 20min à 37°C. Trois rinçages PBS ont ensuite été réalisés.

La perméabilisation des cellules a été effectuée à l'aide d'une solution de PBS – Triton 0.5% pendant 5min. Deux rinçages au PBS ont été réalisés avant de procéder à l'étape de saturation par une solution de PBS – BSA 1% pendant 30min.

L'anticorps primaire dilué en PBS – BSA 1% a ensuite été déposé sur la nuit, à +4°C.

Les cellules ont été rincées deux fois 5min avec une solution de PBS – Triton 0.05% et une fois 5min au PBS. Les anticorps secondaires et les fluorochromes ont été dilués en PBS – BSA 1% et incubés 2h à température ambiante. Les anticorps secondaires ont été utilisés à une dilution de 1/500. La phalloïdine et le DAPI ont été utilisés à une dilution de 1/100. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois 5min avec une solution de PBS – Triton 0.05% et une fois 5min au PBS. Les cellules ainsi marquées ont été stockées à +4°C avant observation au microscope.

#### **2. Microscopie**

##### **a. Expérience de timelapse pour étudier les mouvements de noyaux et quantifications**

Les expériences de timelapse ont été réalisées grâce au microscope Z1-AxioObserver (Zeiss). Des images ont été acquises toutes les 15min, pendant 16h, avec l'objectif 10X (N-Achroplan, 0.25 Ph1, N.A 0.25). Les vidéos obtenues ont été analysées grâce au logiciel Metamorph (Zeiss) et au plugin SkyPad décrit dans Cadot et al. (2014).

##### **b. Acquisition de la dynamique des microtubules**

L'enregistrement de la dynamique des microtubules par le plasmide EB1-GFP a été réalisé grâce au microscope Ti Eclipse (Nikon), à l'objectif 60X (Plan Apo, N.A 1.4, W.D 0.13). Des images ont été acquises durant 15s, toutes les 150ms.

Les trajectoires des comètes ont été analysées manuellement sur le logiciel ImageJ®. La vitesse de polymérisation des comètes a été analysée grâce au plugin « Particle Tracker » dans ImageJ® (Sbalzarini et Koumoustakos, 2005).

### c. Imagerie confocale

L'imagerie confocale a été réalisée grâce au microscope LSM880 (Zeiss).

## IV. Analyse transcriptomique

### 1. Extraction ARN

Après addition de Trizol<sup>®</sup>, les échantillons ont été incubés avec du chloroforme pendant 5min à température ambiante puis centrifugés 15min à 12000g à +4°C. La phase supérieure incolore a été prélevée, incubée avec de l'isopropanol pendant 10min à température ambiante de façon à précipiter les ARN, puis centrifugée 15min à 12000g, à +4°C. Les échantillons ont été lavés deux fois à l'aide d'éthanol 70%. Le culot contenant les ARN a été resuspendu dans de l'eau ultrapure dépourvue de RNase. La concentration d'ARN ainsi extraits a été dosée au Nanodrop.

### 2. Reverse transcription et PCR quantitative

Le système de reverse transcription GoScript a été utilisé pour produire les cDNA selon le protocole élaboré par le fournisseur Promega.

Le mélange réactionnel Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) et le système de détection CFX Connect<sup>™</sup> Real-Time PCR (Biorad) ont été utilisés pour réaliser les PCR quantitative. Les amorces utilisées pour réaliser ces expériences sont présentées dans le tableau ci-dessous. Les résultats ont été normalisés par 3 gènes de ménage : Gapdh, GusB et Rpl41.

| Amorce                   | Séquence              |
|--------------------------|-----------------------|
| Gapdh – Amorce sens      | AACTTTGGCATTGTGGAAGG  |
| Gapdh – Amorce antisens  | ACACATTGGGGGTAGGAACA  |
| GusB – Amorce sens       | GAGGATTGCCAACGAAACCG  |
| GusB – Amorce antisens   | GTGTCTGGGGACCACCTTTGA |
| Rpl41 – Amorce sens      | GCCATGAGAGCGAAGTGG    |
| Rpl41 – Amorce antisens  | CTCCTGCAGGCGTCGTAG    |
| Zbtb8a – Amorce sens     | CCAGGCTTCGGTTCAAATGC  |
| Zbtb8a – Amorce antisens | GCATGCCTGGTGAATAGTTCG |

## V. Analyse protéomique

### 1. Préparation des échantillons

Pour les cultures de cellules primaires et de C2C12, les cellules ont été décollées par trypsination pendant 5 min à 37°C, puis centrifugées à 1500rpm pendant 5min à +4°C. Le culot cellulaire obtenu a été dilué et incubé 10min à +4°C dans un volume optimal de tampon de lyse

RIPA, supplémenté en inhibiteurs de phosphatases (Sigma, P5726) et inhibiteurs de protéases (Sigma, P8340).

## **2. Fractionnement cellulaire**

### **a. Tampon de lyse cellulaire**

Le tampon de lyse utilisé pour réaliser le fractionnement subcellulaire est le TSE 1X. Il se compose de 10mM de Tris pH 7.4, 250mM de sucrose, 1mM d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique), d'inhibiteurs de protéases (Sigma, P8340) et d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma, P5726).

### **b. Protocole de fractionnement cellulaire**

Les cultures cellulaires de C2C12 et de cellules musculaires humaines ont été trypsinées 5min à 37°C de façon à les détacher de la boîte de culture cellulaire. La suspension cellulaire ainsi obtenue est ensuite centrifugée à 1500rpm, 5min, à +4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans du PBS 1X à +4°C puis à nouveau centrifugé à 1500rpm, 5min, à +4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans un volume optimal de TSE 1X, et passé 40 fois, sur glace, à travers une aiguille 27G montée sur une seringue de 1mL. Cette étape permet de casser les membranes plasmiques. Le lysat cellulaire est centrifugé à 1500rpm, 5min, à +4°C. Le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est conservé à -80°C jusqu'à l'étape de sonication. Le culot contenant la fraction nucléaire est lavé à trois reprises. Pour cela, la fraction nucléaire est resuspendue dans du TSE 1X, passée 10 fois à travers la seringue 27G puis centrifugée à 1500rpm, 10min à +4°C. Le culot nucléaire purifié est resuspendu dans du TSE 1X + 1% NP40 et laissé sur glace 1h avant d'être stocké à -80°C.

## **3. Sonication et dosage protéique**

Les extraits protéiques ont été soniqués à l'aide de l'appareil bioruptor. Le protocole suivant a été appliqué : 10 cycles de 1min à +4°C, 1 cycle correspondant à 30s de sonication à haute fréquence et 30s de pause. Les échantillons protéiques sont ensuite laissés 30min à +4°C.

Le dosage protéique permettant de déterminer la concentration des échantillons a été réalisé à l'aide du kit «BCA protein» en suivant le protocole mentionné par le fournisseur (Thermofisher scientifique).

## 4. Western Blot

La même quantité de protéine est déposée sur des gels de 6% d'acrylamide. 25µg de protéine sont classiquement déposés sur les gels, à l'exception de la protéine NuMA1, dont la détection en Western Blot requiert un dépôt de 80µg de protéines.

Une fois les extraits protéiques déposés, la migration est effectuée à 130V pendant 5min, puis à 160V pendant 1h15. Le transfert sur membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène) est réalisé en utilisant un système de transfert liquide (BioRad), à 40V, pendant 16h à +4°C.

Les membranes sont saturées à l'aide de 5% de lait dilué dans du TBS-0,1%Tween à température ambiante, pendant 1h. Les anticorps primaires sont incubés dans 1% de lait dilué dans du TBS-0,1%Tween, sur la nuit, à +4°C et sous agitation. Les membranes sont rincées 3x10min dans du TBS-0,1%Tween à température ambiante, puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans 1% de lait-TBS-0,1%Tween, 1h à température ambiante. Après 3 rinçages de 10min à l'aide de TBS-0,1%Tween, les membranes sont révélées à l'aide du réactif ECL-Clarity (BioRad) et du système d'imagerie ChemiDoc (BioRad).

## VI. Expériences *in vivo*

Toutes les procédures et les expérimentations utilisant des animaux ont été réalisées dans le respect des directives développées par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1, par le Ministère Français de l'Agriculture (décret 57/848) et par le groupe de travail relatif à la Directive Européenne 2010/63/EU.

Le protocole d'électroporation des souris a été approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et par le Ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche (CECCAPP\_ENS\_2019\_014).

### 1. Modèle de souris

Pour réaliser ces expériences *in vivo*, des souris C57BL/6 mâles âgées de 8 semaines ont été utilisées.

### 2. Expérience d'électroporation de plasmides

#### a. Protocole d'électroporation

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de Kétamine (100mg/kg) - Xylazine (10mg/kg) diluée dans du PBS. L'injection est réalisée à l'aide d'une aiguille 25G montée sur une seringue de 1mL. Le volume à injecter est adapté à la masse de la souris : 3µL/g de souris. Les membres postérieurs des souris sont tondues et 20µg d'ADN plasmidique dilué dans une solution de NaCl 0,9% sont injectés dans les deux muscles *Tibialis Anterior* contralatéraux à l'aide d'une aiguille 25G montée sur une seringue de 1mL. Les muscles *Tibialis Anterior* sont



massés pendant 30s de façon à permettre une diffusion de la solution d'ADN plasmidique injectée précédemment. Une mince couche (1mm) de gel échographique est appliquée en surface des muscles injectés. Les électrodes sont positionnées à l'aide d'un pied à coulisse de part et d'autre des muscles. Un champ électrique de 8 impulsions de 20ms espacées de 500ms, à 200Volts/cm d'épaisseur de muscle (soit 80V) est appliqué.

Deux semaines post-électroporation, les souris sont anesthésiées par isoflurane gazeux puis mises à mort par dislocation cervicale. Les muscles *Tibialis Anterior* électroporés sont prélevés et sont analysés par différentes approches qui sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

## **b. Plasmides électroporés**

20µg des plasmides suivants sont électroporés par muscle :

- shScramble (Tebu-bio),
- shRNA NuMA dont la séquence ADN est GCCAGATGGATCGAAAGATTA (Sigma),
- plasmides de surexpression de la forme humaine de NuMA1 donnés par Dr. Merdes (Haren et Merdes, 2002).

## **3. Coupes transversales de muscles *Tibialis Anterior***

### **a. Inclusion des muscles et coupes au cryostat**

Les muscles *Tibialis Anterior* prélevés sont inclus dans la gomme Tragacanth<sup>®</sup> par le tendon, puis plongés 45s dans de l'isopentane préalablement refroidi dans de la carboglace. Les muscles sont stockés à -80°C jusqu'à réalisation de coupes au cryostat.

Les coupes transversales d'une épaisseur de 10µm sont réalisées à -17°C à l'aide du cryostat NX50. Les coupes sont ensuite stockées à -80°C.

### **b. Immunomarquage**

Les coupes sont réhydratées 5-10min avec du PBS 1X à température ambiante puis perméabilisées 10 min à l'aide de PBS – Triton 0,5%. Les coupes sont ensuite rincées 3x5min avec du PBS 1X. L'étape de saturation a été réalisée par une solution de PBS – BSA 4% pendant 1h à température ambiante. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBS – BSA 2% puis incubés sur la nuit, à +4°C en chambre humide. Les coupes ont été rincées 3x5min au PBS 1X. Les anticorps secondaires ont été dilués au 1/200 dans du PBS. Les coupes ont été recouvertes d'une feuille de Parafilm<sup>®</sup> puis placées dans une étuve sèche à +37°C pendant 45min. Trois rinçages de 5min ont été réalisés à l'aide de PBS 1X. Les coupes ont été montées au Fluoromount<sup>®</sup> puis stockées à -20°C.

### **c. Microscopie et quantifications**

Des images mosaïques 5 par 5 ont été acquises au microscope Z1-AxioObserver (Zeiss) à l'objectif 10X (N-Achroplan, 0.25 Ph1, N.A 0.25).

Les images ainsi obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ®.

## **4. Dissection de fibres isolées**

### **a. Fixation et dissection de fibres isolées**

Les muscles *Tibialis Anterior* prélevés sont fixés dans une solution de PBS – PFA 4% à pH 7 pendant 30min à température ambiante.

Les muscles sont disséqués de façon à isoler des fibres musculaires uniques sous loupe binoculaire.

### **b. Immunomarquage**

Les fibres musculaires isolées sont perméabilisées 15min à +37°C à l'aide de PBS – Triton 1%. Deux rinçages au PBS 1X sont réalisés et l'étape de saturation est réalisée par une solution de PBS – BSA 1% pendant 30min à température ambiante. Les anticorps primaires sont incubés durant 2 nuits à +4°C dilués en solution de PBS – BSA 1%. Deux rinçages de 2h au PBS – Triton 0,05% et un rinçage de 2h au PBS 1X sont réalisés à température ambiante, sous agitation. Les anticorps secondaires, dilués dans une solution de PBS – BSA 1%, sont incubés durant une nuit à +4°C. Le DAPI est incubé 10min à température ambiante dans du PBS 1X. Trois rinçages de 15min au PBS – Triton 0,05% sont réalisés, puis les fibres musculaires sont montées entre lame et lamelle à l'aide de Fluoromount®. Les lames sont stockées à +4°C.

### **c. Microscopie**

Les lames de fibres musculaires isolées ont été observées au microscope confocal LSM880 (Zeiss), à l'aide de l'objectif à immersion huile 63X.

### **d. Analyse de l'architecture du réseau microtubulaire**

L'organisation des microtubules des fibres musculaires isolées est analysée grâce au logiciel TeDT décrit par Liu et Ralston (2014).

## VII. Anticorps

| Anticorps                   | Espèce | Dilution                  | Référence                           |
|-----------------------------|--------|---------------------------|-------------------------------------|
| Anti- $\alpha$ -Tubuline    | Souris | 1/100 (IF)<br>1/1000 (WB) | Sigma T6074-200uL                   |
| Anti-HSP90                  | Souris | 1/1000 (WB)               | Enzo life SPA830                    |
| DHPR                        | Lapin  | 1/100                     | DSHB IID5E1                         |
| MF20                        | Souris | 1/10                      | DSHB                                |
| Myogénine                   | Souris | 1/1000                    | Santa Cruz sc-12732                 |
| NuMA1                       | Lapin  | 1/100 (IF)<br>1/800 (WB)  | Thermofisher scientific<br>PA316829 |
| Zbtb8a                      | Lapin  | 1/100 (IF)<br>1/1000 (WB) | Sigma HPA031770                     |
| DAPI                        | /      | 1/50000                   | Thermofisher scientific D1306       |
| Anti-Mouse-HRP              | Chèvre | 1/5000                    | Invitrogen 62-6520                  |
| Anti-Lapin-HRP              | Chèvre | 1/5000                    | Invitrogen 65-6120                  |
| Anti-Souris Alexa Fluor 488 | Chèvre | 1/500                     | Thermofisher scientific<br>A32723   |
| Anti-Lapin Alexa Fluor 555  | Chèvre | 1/500                     | Thermofisher scientific<br>A21429   |
| Anti-Lapin-Alexa-Fluor 647  | Chèvre | 1/500                     | Thermofisher scientific<br>A21245   |
| Anti-souris Alexa-Fluor 647 | Chèvre | 1/500                     | Thermofisher scientific<br>A21240   |
| Phalloïdine Alexa Fluor 555 | /      | 1/100                     | Invitrogen A34055                   |
| Phalloïdine Alexa Fluor 488 | /      | 1/100                     | Invitrogen A12379                   |

## VIII. Mutagenèse dirigée

De façon à introduire des mutations ponctuelles dans le plasmide de surexpression de la forme humaine de NuMA, *hNuMA-WT*, (Haren et Merdes, 2002), une mutagenèse dirigée a été réalisée selon le protocole fourni par le kit de mutagenèse QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, 200521).

Deux plasmides ont été générés :

- Un plasmide non phosphorylable sur le site 1853. La mutation S1853A a été introduite (c.5557T>G).
- Un plasmide mimant la phosphorylation constitutive de *hNuMA-WT*, dit phosphomimétique, sur le site 1853. Pour cela, la mutation S1853D a été introduite (c.5557\_5558CdelinsGA).

### 1. PCR

Pour introduire ces mutations dans le plasmide *hNuMA-WT*, une PCR a été réalisée. Les amorces suivantes ont été utilisées pour réaliser la PCR permettant d'introduire les mutations voulues :

Pour le plasmide non phosphorylable :

NUMA1\_S1853A-sens : CTAGAGACTGAGTAGCGGAGGTGGCTCGCAG

NUMA1\_S1853A-antisens : CTGCGAGCCACCTCCGCTACTCAGTCTCTAG

Pour le plasmide phosphomimétique :

NUMA1\_S1853D-sens : AGCTAGAGACTGAGTATCGGAGGTGGCTCGCAGG

NUMA1\_S1853D-antisens : CCTGCGAGCCACCTCCGATACTCAGTCTCTAGCT

Un mélange PCR, d'un volume de 50µL, a été réalisé comme indiqué :

|                           | Quantité par tube |
|---------------------------|-------------------|
| Tampon 10X                | 1X                |
| Plasmide <i>hNuMA</i> -WT | 10ng              |
| Amorce F à 10µM           | 125ng             |
| Amorce R à 10µM           | 125ng             |
| dNTP mix                  | 1µl               |
| QuickSolution             | 3µl               |
| Eau stérile qsp 50µL      |                   |

Le mélange a été homogénéisé, puis 1µL d'enzyme *PfuUltra* HF DNA Polymerase a été ajouté. Enfin, la PCR a été réalisée selon le programme suivant :

|                   |              |      |      |           |
|-------------------|--------------|------|------|-----------|
| Activation        |              | 95°C | 1'   | 1 cycle   |
| Amplification     | Dénaturation | 95°C | 50'' | 18 cycles |
|                   | Hybridation  | 60°C | 50'' |           |
|                   | Elongation   | 68°C | 13'  |           |
| Élongation finale |              | 68°C | 13'  | 1 cycle   |
|                   |              | 4°C  | ∞    |           |

Les produits PCR ont été immédiatement mis sur glace.

## 2. Digestion

Les produits PCR obtenus ont été digérés par l'enzyme DpnI, de façon à digérer les brins parentaux méthylés sur les Adénines par les bactéries. Cette digestion permettra *in fine* de ne conserver que les plasmides nouvellement synthétisés.

Les produits PCR ont été centrifugés et 1µL d'enzyme DpnI à 10U/µL est ajouté. Les tubes ont été incubés 1h à 37°C.

## 3. Transformation

Les digestions de PCR ont été transformées par choc thermique dans des bactéries XL10-Gold® Ultracompetent cells (Agilent, 200314). 2µL β-Mercapto-Ethanol ont été ajoutés aux tubes contenant 45µL de XL10-Gold® Ultracompetent cells. Ceux-ci ont été incubés sur glace

pendant 10min, pendant lesquelles ils ont été agités toutes les 2min. 2µL de la digestion obtenue par DpnI ont été ajoutés. Les tubes ont été homogénéisés puis incubés dans la glace pendant 30min. Un choc thermique a été réalisé 30s à 42°C puis les tubes ont été mis sur glace pendant 5min. 500µL de milieu SOC (Super Optima broth with Catabolite repression) préalablement chauffé ont été ajoutés, puis les tubes ont été incubés 1h à 37°C sous agitation à 220rpm. 250µL ont été déposés sur des boîtes d'agar-LB (lysogeny broth) avec 100µg/mL d'ampicilline. Les boîtes ont été incubées sur la nuit à 37°C.

#### 4. Criblage des clones

Les clones ont été criblés de façon à sélectionner ceux qui comportent les mutations voulues. Pour cela, une PCR de 908pb a été réalisée à l'aide du kit HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, 203603). Le mélange réactionnel par colonie criblée suivant a été réalisé :

|                     | Volume (µL) |
|---------------------|-------------|
| Eau distillée       | 15,35       |
| dNTP                | 5           |
| T PCR               | 2,5         |
| Taq                 | 0,15        |
| Amorce sens 5µM     | 1           |
| Amorce antisens 5µM | 1           |
| Total               | 25,00       |
| ADN 40ng/ml         | 1 colonie   |

Les amorces suivantes ont été utilisées :

Amorce-sens : AGGCAGCTGAGCACTATAAG

Amorce-antisens : GGCAAGTGCCCATGTAGAAG

Le programme de PCR suivant a été utilisé :

|                   |              |      |     |           |
|-------------------|--------------|------|-----|-----------|
| Activation        |              | 95°C | 5'  | 1 cycle   |
| Amplification     | Dénaturation | 95°C | 20" | 35 cycles |
|                   | Hybridation  | 55°C | 20" |           |
|                   | Elongation   | 72°C | 40" |           |
| Elongation finale |              | 72°C | 4'  | 1 cycle   |

## 5. Sélection des clones

Les clones ont été sélectionnés par PCR sur gel d'agarose 2%.

Les clones obtenus à taille attendue de 908pb ont ensuite été séquencés à l'aide des amorces suivantes :

Amorce-sens : AGGCAGCTGAGCACTATAAG

Amorce-antisens : GGCAAGTGCCCATGTAGAAG

## 6. Purification et dosage de l'ADN

L'ADN plasmidique a été purifié selon le protocole fourni par le kit Xtra Midi (Macherey-Nagel, 740410.50). L'ADN ainsi obtenu a finalement été dosé au Nanodrop.



# RÉSULTATS





## CHAPITRE 1 - STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

### **I. Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire**

#### **1) Stratégie et systèmes *in vitro***

L'objectif de mon travail de thèse a consisté à comprendre l'influence des protéines associées au réseau microtubulaire sur le positionnement des noyaux, au cours du développement et de la maturation des fibres musculaires. Les protéines spécifiquement associées au réseau microtubulaire au cours de la différenciation musculaire et qui régulent le positionnement des noyaux ont donc été recherchées.

Pour ce faire, une stratégie d'identification protéomique différentielle entre des myotubes immatures et des fibres musculaires matures a été développée grâce à une méthode originale de culture *in vitro* de cellules primaires de souris (Fig.25) (Falcone et al., 2014). Des cellules primaires purifiées à partir de souriceaux C57BL/6 âgés de 5 jours ont été induites dans une voie de la différenciation courte ou longue (Fig.25A). La singularité de cette méthode de culture cellulaire se base sur le protocole de différenciation longue qui peut être appliqué pour obtenir des fibres musculaires « matures » *in vitro*. En effet, une fois les myotubes obtenus après 3 jours de différenciation *in vitro* (Fig.25B), une matrice protéique de Matrigel® est apposée sur les cellules et de l'agrine neurale est implémentée au milieu de différenciation. Dans ces conditions, 10 jours de différenciation *in vitro* sont nécessaires pour obtenir des fibres musculaires matures (Fig.25C) qui présentent des caractéristiques similaires aux fibres musculaires matures *in vivo*. En effet, elles sont contractiles, et présentent des noyaux périphériques, des réseaux d'actine, de T-tubules et de réticulum sarcoplasmique transverses striés (Fig.25D).

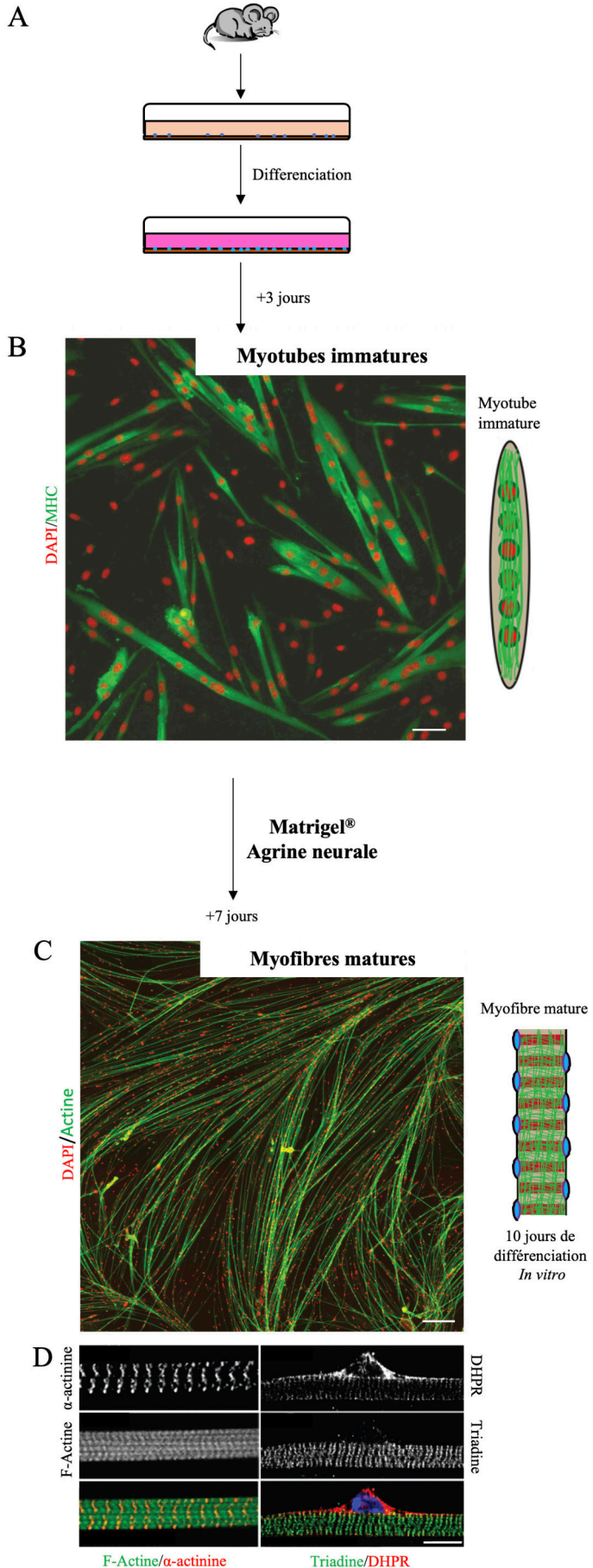
**Figure 25 :** Méthode de culture cellulaire *in vitro*.

**A.** Les cellules musculaires primaires sont extraites et purifiées à partir de souriceaux Wild-Type C57BL/6 âgés de 5 jours ; puis mises en culture *in vitro*.

**B.** Cliché représentant une culture de myotubes immatures immunomarqués après 3 jours de différenciation *in vitro*. Les cellules sont marquées pour la chaîne lourde de la myosine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente 50µm.

**C.** L'application du protocole de différenciation longue permet d'obtenir des fibres musculaires matures, par l'ajout superficiel de Matrigel® sur les cellules adhérentes ainsi que par la supplémentation du milieu de différenciation par de l'agrine neurale. Le cliché représente une culture de fibres musculaires immunomarquées, obtenues à partir de cellules primaires WT après 10 jours de différenciation *in vitro*. Les cellules sont marquées pour l'actine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente 250 µm.

**D.** Caractéristiques des fibres musculaires matures *in vivo* observables sur les fibres musculaires obtenues *in vitro* : noyaux périphériques, réseaux d'α-actinine, d'actine, de DHPR et de triadine transverses striés. La barre d'échelle représente 15µm. Images de Falcone et al. (2014).

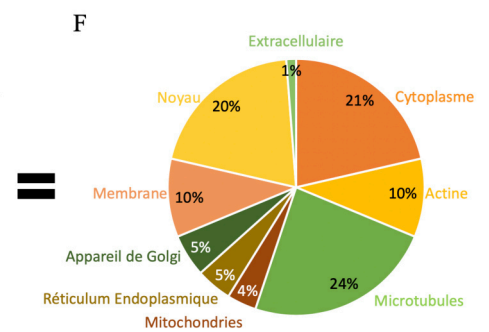
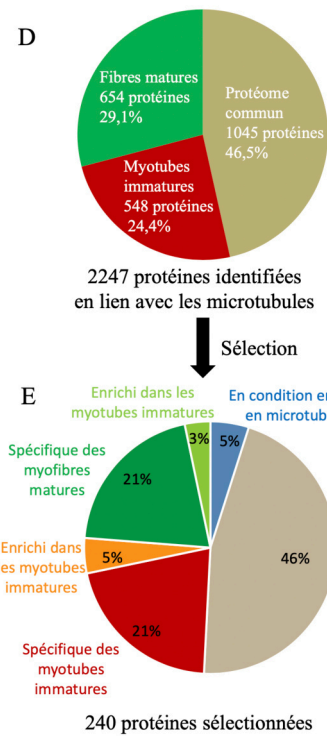
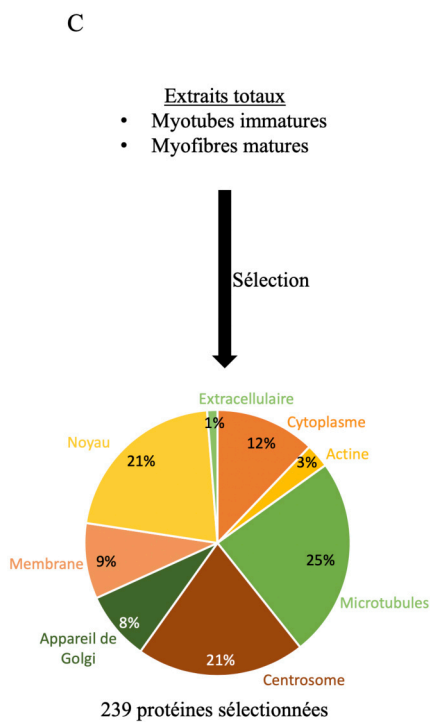
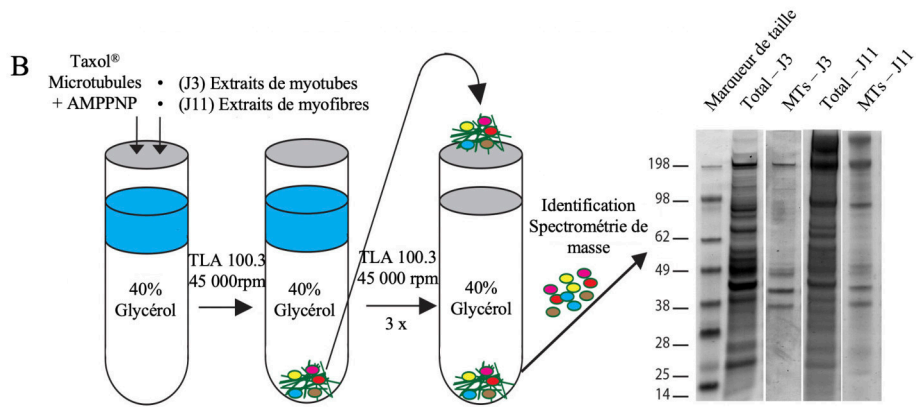
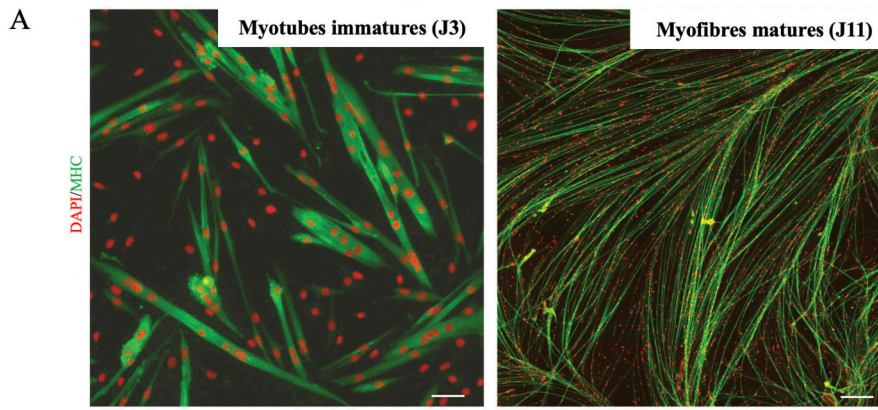


## 2) Approche biochimique

A partir des cultures primaires *in vitro*, des extraits protéiques totaux des myotubes immatures et des fibres musculaires matures ont été réalisés. Cette analyse protéomique a permis d'identifier et de sélectionner 239 protéines à partir d'extraits totaux issus des cultures de myotubes et de fibres musculaires matures primaires (Fig.26A-C).

Cette approche globale a été complétée par une stratégie ciblée sur le protéome associé au réseau microtubulaire, dont la méthodologie a été publiée en 2007 par Gache et al. Celle-ci fait intervenir deux stratégies complémentaires (Fig.26B). La première repose sur la purification des microtubules avec leurs protéines associées par centrifugation sur coussin de glycérol, après addition dans l'extrait cytoplasmique de Taxol<sup>®</sup> afin de stabiliser le réseau microtubulaire au cours de sa formation. La deuxième approche consiste en un enrichissement microtubulaire par ajout préalable de microtubules stabilisés à l'aide de Taxol<sup>®</sup> dans l'extrait cytoplasmique. Les microtubules et protéines associées purifiés par ces deux approches ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse (Fig.26B).

Les protéines identifiées grâce à l'analyse par spectrométrie de masse ont été classées en 3 catégories : spécifiquement exprimées dans les étapes précoces de différenciation des myotubes (3 jours de différenciation, immatures), spécifiques d'un stade de différenciation tardif (11 jours de différenciation des fibres, matures) et une dernière catégorie regroupant les protéines exprimées de façon non spécifique aux deux stades de maturation des fibres (protéome commun) (Fig.26D). Parmi les 2247 protéines identifiées, 240 protéines d'intérêt ont été sélectionnées (Fig.26E-F).



**Figure 26 :** Méthode biochimique et identification de protéomes. **A.** Immuno-marquages de myotubes immatures (3 jours de différenciation *in vitro*) et de fibres musculaires matures (11 jours de différenciation *in vitro*) marqués pour les noyaux (rouge) et la chaîne lourde de la myosine (vert). Barres d'échelles = 150  $\mu$ m. **B.** Protocole biochimique utilisé pour purifier et identifier les protéomes microtubulaires des myotubes et des myofibres. **C.** Localisation subcellulaire des 239 protéines candidates sélectionnées à partir des extraits cellulaires totaux. **D.** Protéomes microtubulaires identifiés dans les cultures *in vitro* de myotubes et de myofibres primaires. **E.** Sélection des 240 protéines issues des protéomes microtubulaires dont le rôle sera étudié par criblage de petits ARNs interférents. **F.** Localisation subcellulaire des 240 protéines sélectionnées.

### 3) Critères de sélection des candidats

Les sélections des 239 protéines issues des extraits totaux ainsi que des 240 protéines issues de l'analyse par spectrométrie de masse ont été réalisées selon deux critères :

- Leur représentativité dans les extraits totaux ou dans les résultats de l'analyse de spectrométrie de masse.
- Leur fonction moléculaire en lien avec les microtubules.

Le rôle de ces protéines sur le positionnement des noyaux ainsi que sur les caractéristiques du réseau microtubulaire a été étudié à travers un criblage phénotypique en utilisant des petits ARNs interférents.

### 4) Validation de l'approche

#### a. Validité des protéomes microtubules-dépendants

De façon à valider l'approche MT-dépendante issue de l'analyse par spectrométrie de masse, des protéines dont le lien avec les MTs est connu ont été recherchées. Ces protéines ainsi que le nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse sont présentés en Figure 27. Ces protéines appartiennent aux catégories :

- Des tubulines : Tubb4a, Tubb4b, Tubgcp3, Tubgcp2, Tuba1c, Tubb5, Tuba4a, Tuba1a, Tubb2a, Tubg1, Tubb6, Tubal3 ainsi que Tubb3
- Des moteurs moléculaires de types kinésines et dynéines : Kif2a, Kif13b, Kifap3, Kif3a, Klc et Kif5B ; Dync1li2, Dync1l1, Dync1h1, Dctn2, Dync1li1 et Dync1li2.
- Des protéines associées aux microtubules de type MAPs : Map4, Map1s, Mapre1, Map1a et Map1b.

Retrouver ces protéines permet de valider le fait que les protéomes identifiés sont bien en lien avec les microtubules.

| Protéine   | Gène                     | Myotubes           | Myofibres          |
|--|--------------------------|--------------------|--------------------|
|  |                          | Nombre de peptides | Nombre de peptides |
| Tubulin beta-4A chain                                | Tubb4a                   | 17                 | 16                 |
| Tubulin beta-4B chain                                | Tubb4b Tubb2c            | 23                 |                    |
| Gamma-tubulin complex component 3                    | Tubgcp3 Gcp3             | 1                  |                    |
| Gamma-tubulin complex component 2                    | Tubgcp2 Gcp2             | 1                  |                    |
| Tubulin, alpha 1C                                    | Tuba1c Tuba6             | 23                 | 23                 |
| Tubulin beta-5 chain                                 | Tubb5                    | 27                 | 24                 |
| Tubulin alpha-4A chain                               | Tuba4a Tuba4             | 20                 | 21                 |
| Tubulin alpha-1A chain                               | Tuba1a Tuba1             | 22                 | 24                 |
| Tubulin beta-2A chain                                | Tubb2a Tubb2             | 25                 | 22                 |
| Tubulin gamma chain                                  | Tubg1 tubg1              | 3                  | 2                  |
| Tubulin, beta 6                                      | Tubb6                    | 22                 | 15                 |
| Tubulin alpha chain-like 3                           | Tuba13                   | 4                  | 4                  |
| Tubulin beta-3 chain                                 | Tubb3                    | 19                 | 13                 |
| Microtubule-associated protein 4                     | Map4 Mtap4               | 11                 | 4                  |
| Microtubule-associated protein 15                    | Map1s Mtap1s             | 4                  | 4                  |
| Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 | Mapre1                   | 1                  | 1                  |
| Microtubule-associated protein 1A                    | Map1a Mtap1a             | 3                  | 2                  |
| Microtubule-associated protein 1B                    | Map1b Mtap1b             | 29                 | 12                 |
| Kinesin-like protein                                 | Kif2a                    | 3                  | 3                  |
| Kinesin-like protein                                 | Kif13b                   |                    | 3                  |
| Kinesin-associated protein 3                         | Kifap3                   |                    | 1                  |
| Kinesin-like protein                                 | Kif3a                    |                    | 1                  |
| Kinesin light chain 1                                | Klc1                     | 3                  | 5                  |
| Kinesin-1 heavy chain                                | Kif5b Khcs               | 15                 | 10                 |
| Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2      | Dync1li2 Dncli2 Dnclc2   | 3                  | 5                  |
| Dynein light chain 1, cytoplasmic                    | Dynll1 Dlc1 Dncl1 Dnclc1 | 2                  | 2                  |
| Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | Dync1h1 Dhcl1 Dnch1 Dncl | 89                 | 102                |
| Dynactin subunit 2                                   | Dctn2                    | 2                  | 2                  |
| Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1      | Dync1li1 Dncli1 Dnclc1   | 9                  | 6                  |
| Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2            | Dync1i2                  | 5                  | 3                  |

**Figure 27 :** Tableau présentant des protéines dont l'interaction avec les microtubules est connue et a été retrouvée par l'approche par spectrométrie de masse. Sont présentées diverses tubulines ainsi que des moteurs moléculaires tels que les kinésines et les dynéines. Le protéome identifié dans les myotubes est présenté en rouge et le protéome identifié dans les myofibres est présenté en vert. Le nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse correspondant à chaque protéine est indiqué.

## b. Protéomes microtubulaires et musculaires

Par ailleurs, des protéines dont le lien avec les microtubules ainsi que le rôle au cours de la différenciation musculaire sont connus ont été retrouvées dans les protéomes issus de la spectrométrie de masse.

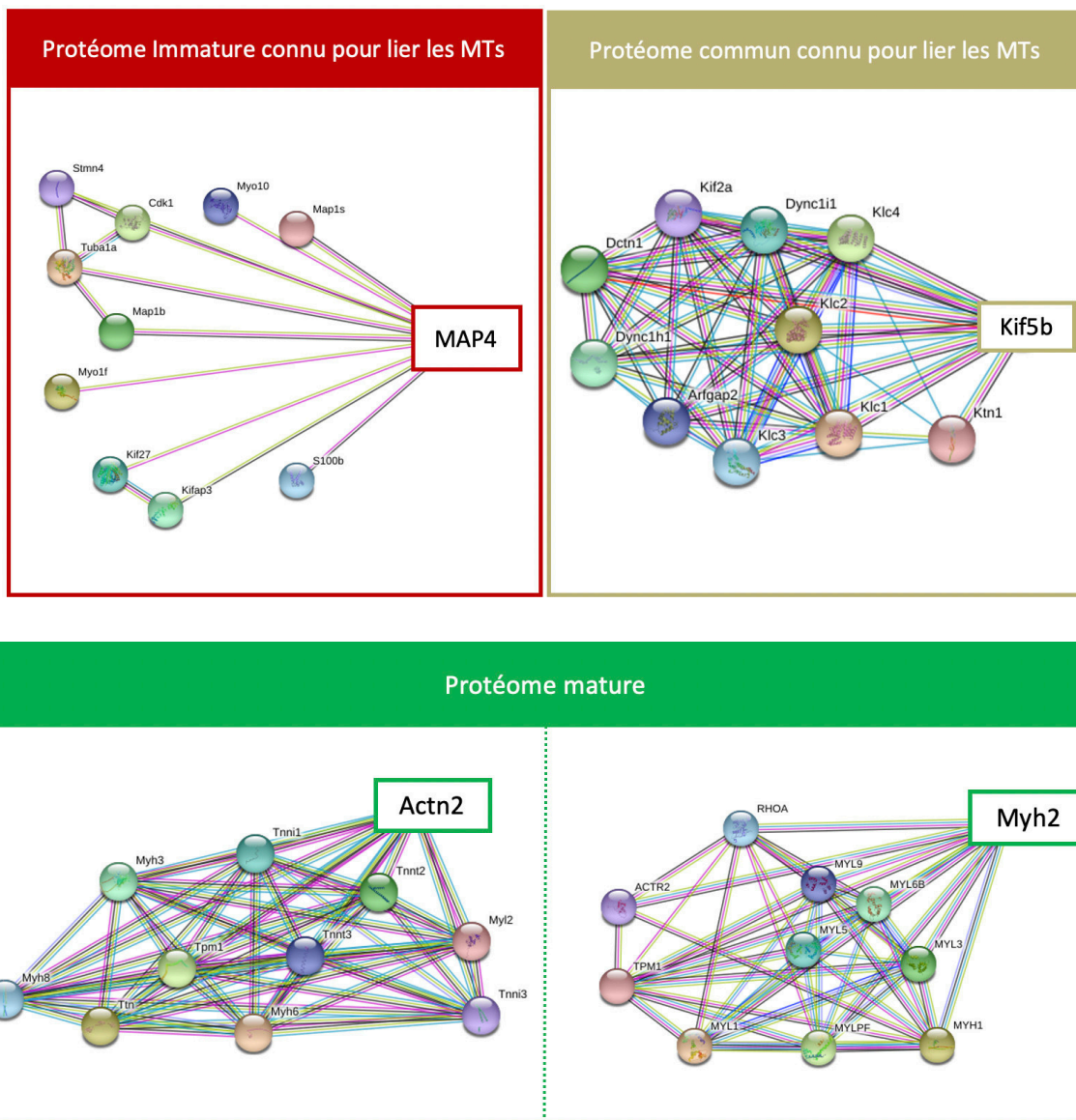
Par exemple, la protéine MAP4 a été retrouvée préférentiellement dans le protéome des myotubes. En effet, 11 peptides ont été retrouvés dans le protéome immature contre 4 dans le protéome mature (Fig.27). Comme présenté dans le schéma d'interaction protéique en Figure 28, MAP4 interagit avec de nombreuses tubulines et MAPs qui ont également été retrouvées dans l'analyse par spectrométrie de masse (Fig.27). De plus, son rôle dans les myotubes immatures a été démontré par Mogessie et al., (2015). En effet, MAP4 permet l'organisation parallèle des MTs dans les myotubes ainsi que la progression du processus myogénique.

Un autre exemple est la protéine Kif5b, retrouvée dans le protéome commun aux deux stades de différenciation. 15 peptides ont été retrouvés dans le protéome immature et 10 dans le protéome mature (Fig.27). Ce moteur moléculaire est connu pour interagir avec les MTs. Son rôle dans le positionnement des noyaux dans les myotubes immatures, en lien avec la protéine MAP7, est connu (Metzger et al., 2012). Kif5b a également un rôle plus tardif dans le processus de différenciation. En effet, elle a été décrite pour contrôler la localisation des composants des myofibrilles permettant leur assemblage ainsi que leur liaison aux jonctions myotendineuses (Wang et al., 2013).

L'identification de ces protéines permet de valider le fait que les protéomes microtubulaires sont bien spécifiques des étapes de différenciation musculaire dans lesquelles ils ont été identifiés.

Concernant le protéome mature, des protéines exprimées spécifiquement dans les fibres musculaires matures, telles que l' $\alpha$ -Actinine2 (Actn2) ou encore la Myosine2 (Myh2), y ont été identifiées. Ces protéines ne sont pas connues pour lier les microtubules, toutefois, elles permettent de valider le fait que les protéines issues du protéome mature sont bien spécifiques des fibres musculaires matures. Il est possible que des myofibrilles aient été culottées avec les microtubules lors des différentes centrifugations permettant de purifier les protéomes microtubulaires. Cette hypothèse permettrait d'expliquer que des protéines associées spécifiquement au réseau d'actine aient été identifiées par spectrométrie de masse.





**Figure 28 :** Protéines interagissant avec les protéines MAP4, retrouvées dans le protéome spécifique aux myotubes immatures, et Kif5b, retrouvé dans le protéome commun aux deux stades de différenciation. Des protéines spécifiques aux fibres musculaires matures sont également retrouvées dans le protéome mature, telles que Actn2 et Myh2, mais ne lient pas le réseau de microtubules.

### c. Protéome issu de la condition enrichie en tubuline exogène

L'efficacité de l'enrichissement en tubuline exogène a également pu être vérifiée. En effet, comme l'illustre la Figure 29, que ce soit dans les myotubes immatures ou dans les fibres musculaires matures, les tubulines ainsi que les MAPs se trouvent davantage représentées dans la condition supplémentée en tubuline exogène en comparaison aux extraits totaux.

Par exemple, pour la tubuline- $\beta$ 2, 32 peptides ont été identifiés dans le protéome immature en condition non enrichie alors qu'en condition d'enrichissement en tubuline exogène, 67 peptides sont retrouvés. De la même façon pour le protéome mature, 23 peptides supplémentaires ont été identifiés lorsqu'il y a enrichissement en tubuline exogène en comparaison à la condition basale.

Ce résultat nous permet donc de valider la condition d'enrichissement par la tubuline exogène.

| Protéines  | Gènes           | Extrait total Myotubes | Enrichi en Tubuline exogène Myotubes | Extrait total Myofibres | Enrichi en Tubuline exogène Myofibres |
|--|-----------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
|  |                 | Nombre de peptides     | Nombre de peptides                   | Nombre de peptides      | Nombre de peptides                    |
| Tubulin beta-2A chain                                | Tubb2a Tubb2    | 32                     | 67                                   | 31                      | 54                                    |
| Tubulin beta-2B chain                                | Tubb2b mCG_1395 | 0                      | 66                                   | 31                      | 53                                    |
| Tubulin beta-4B chain                                | Tubb4b Tubb2c   | 32                     | 57                                   | 33                      | 47                                    |
| Tubulin beta-5 chain                                 | Tubb5           | 31                     | 58                                   | 33                      | 49                                    |
| Tubulin beta-3 chain                                 | Tubb3           | 21                     | 58                                   | 17                      | 41                                    |
| Tubulin alpha-1A chain                               | Tuba1a Tuba1    | 27                     | 53                                   | 28                      | 39                                    |
| Tubulin beta-4A chain                                | Tubb4a Tubb4    | 26                     | 48                                   | 27                      | 40                                    |
| Tubulin alpha-4A chain                               | Tuba4a          | 20                     | 43                                   | 21                      | 33                                    |
| Tubulin beta-6 chain                                 | Tubb6 mCG_10510 | 27                     | 26                                   | 25                      | 25                                    |
| Tubulin alpha chain-like 3                           | Tubal3          | 4                      | 7                                    | 5                       | 7                                     |
| Tubulin alpha-1C chain                               | Tuba1c Tuba6    | 24                     | 0                                    | 25                      | 0                                     |
| Microtubule-associated protein                       | Map4            | 15                     | 9                                    | 7                       | 2                                     |
| Microtubule-associated protein                       | Mapt            | 0                      | 9                                    | 0                       | 6                                     |
| Microtubule-associated protein                       | Map4 Mtap4      | 9                      | 8                                    | 5                       | 2                                     |
| Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 | Mapre1          | 3                      | 0                                    | 3                       | 0                                     |
| Microtubule-associated protein 1A                    | Map1a Mtap1a    | 5                      | 1                                    | 0                       | 1                                     |
| Microtubule-associated protein 1S                    | Map1s Mtap1s    | 0                      | 0                                    | 2                       | 0                                     |
| Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 | Mapre3          | 0                      | 0                                    | 1                       | 0                                     |
| Microtubule-associated protein 6                     | Map6 Mtap6      | 1                      | 0                                    | 0                       | 0                                     |
| Microtubule-associated protein                       | Map2 Mtap2      | 0                      | 1                                    | 0                       | 0                                     |
| Microtubule-associated protein                       | Map4            | 33                     | 25                                   | 23                      | 7                                     |

**Figure 29 :** Tableau comparatif présentant les tubulines et les MAPs retrouvées dans l'analyse par spectrométrie de masse en condition d'extrait total (colonne blanche) ou en condition d'enrichissement en tubuline exogène (colonne en bleu foncé). La couleur rouge indique le protéome immature alors que la couleur verte indique le protéome mature. Le nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse est indiqué pour chacune des protéines dans chaque condition.

## II. Stratégie de criblage utilisant des petits ARNs interférents

### 1) Méthodologie

Le crible utilisant des petits ARNs interférents a été mené sur cellules musculaires dans deux systèmes *in vitro* :

- des cellules primaires issues de souriceaux âgés de 5 jours,
- une lignée de cellules musculaires immortalisées : les C2C12.

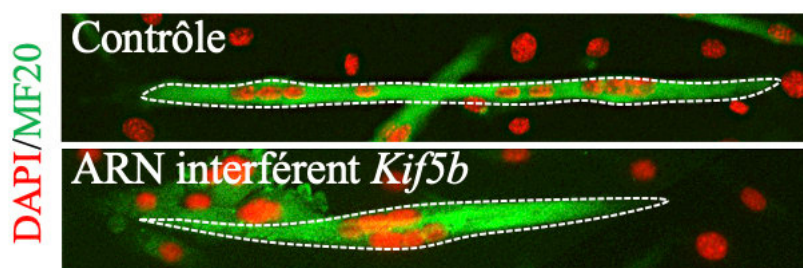
Les détails des protocoles sont présentés dans la partie « Matériels et Méthodes ». Brièvement, le criblage a été réalisé en plaque 96 puits et chaque condition a été réalisée en quadruplets. Les cellules ont été transfectées en milieu de prolifération avec un mélange de trois petits ARNs interférents.

Pour la réalisation de ce criblage, une triple stratégie a été adoptée. En effet, le criblage a été réalisé en différentes conditions :

- sur myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*,
- sur myofibres primaires après 10 jours de différenciation *in vitro*,
- sur lignées musculaires immortalisées C2C12 au stade de myotubes après 6 jours de différenciation *in vitro*.

Après fixation et immuno-marquage, l'effet de l'inhibition d'expression des protéines sur le positionnement des noyaux au sein des myotubes et des fibres matures a été analysé.

Un contrôle interne de transfection a été ajouté à chacune des plaques du criblage dans les cellules au stade de myotube immature : une condition de transfection d'un petit ARN interférent ciblant *Kif5b* dont l'inhibition d'expression entraîne une agrégation drastique des noyaux au centre des myotubes comme l'ont décrit Metzger et al. (2012) et Gache et al. (2017) dans leurs travaux. Ainsi, le fait d'observer ce phénotype drastique a permis de valider les conditions de transfection des petits ARNs interférents témoins lors du criblage (Fig.30).



**Figure 30 :** Contrôle interne du criblage ARN interférents, la condition *Kif5b* ARN interférent. Immunofluorescence de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* de myotubes contrôles et de myotubes traités avec un petit ARN interférent ciblant *Kif5b*. Les cellules sont immuno-marquées pour la chaîne lourde de la myosine (MF20, vert) et pour le DAPI (rouge). La ligne pointillée délimite les myotubes. Les barres d'échelle représentent 30µm.

## 2) Avantages de la triple approche du criblage

L'utilisation de divers systèmes musculaires *in vitro* a permis d'obtenir des résultats complémentaires lors du criblage utilisant des petits ARNs interférents. En effet, chaque système possède des avantages et des inconvénients qui lui sont propres. Mener le criblage ARN interférents sur les trois systèmes *in vitro* en parallèle permet une complémentarité dans les résultats obtenus.

### a. Myotubes et myofibres primaires

Les cellules musculaires primaires constituent le modèle *in vitro* dans lequel les phénomènes biologiques sont les plus similaires à ceux qui peuvent être observés *in vivo*. En effet, ces cellules directement extraites d'organismes vivants n'ont subi aucune modification génétique contrairement aux diverses lignées cellulaires. Elles conservent ainsi un fort potentiel de différenciation.

Grâce au système de culture *in vitro* des cellules musculaires primaires, il nous est donc possible d'obtenir des fibres musculaires matures qui présentent de fortes similitudes avec les fibres musculaires *in vivo*. Cette méthode de culture permet ainsi d'étudier le rôle de chaque candidat dans les phases tardives de différenciation musculaire.

Ainsi, combiner un criblage ARN interférents sur les myotubes ainsi que sur les myofibres primaires permet d'avoir un suivi longitudinal, au cours de la différenciation musculaire, du rôle de chaque candidat sur le positionnement des noyaux.

Toutefois, les cellules primaires purifiées de souriceaux sont des cellules bien plus sensibles que les cellules de lignées immortalisées et les méthodes de culture cellulaires sont davantage contraignantes. Les transfections d'ARN interférents doivent être réalisées dans une fenêtre temporelle étroite afin de limiter la toxicité de la transfection et de ne pas perturber la différenciation. D'autre part, la quantité de cellules primaires est limitée puisqu'elle dépend de naissances ponctuelles de souriceaux que nous ne contrôlons pas.

### b. Lignées immortalisées C2C12

Outre le fait que les cellules C2C12 soient plus résistantes et plus faciles d'entretien, il n'y a aucune limitation en termes de quantité de cellules. Cela permet donc d'obtenir des résultats en un temps réduit.

Toutefois, ces cellules ne peuvent pas être différenciées en fibres matures. En effet, leur maximum de différenciation est atteint aux alentours de 6 jours de différenciation *in vitro* lorsqu'elles atteignent l'état de myotubes immatures.

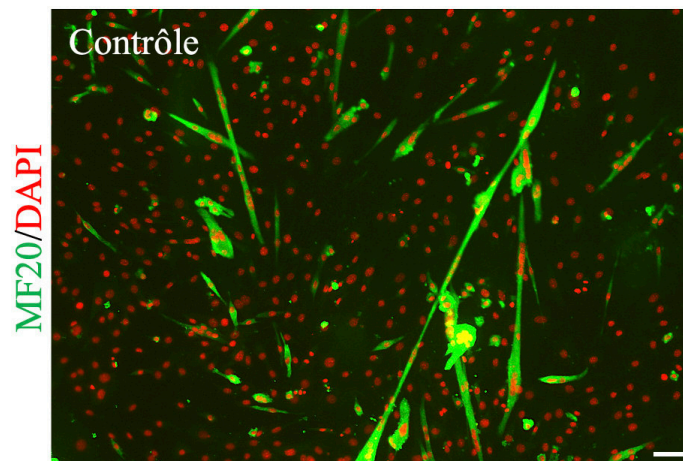
### III. Méthodes d'analyse des cultures cellulaires issues du criblage ARN interférents

Étant donné la spécificité de chacun des systèmes musculaires *in vitro*, différentes méthodes d'analyse ont été utilisées et sont présentées ci-dessous.

#### 1) Myotubes primaires

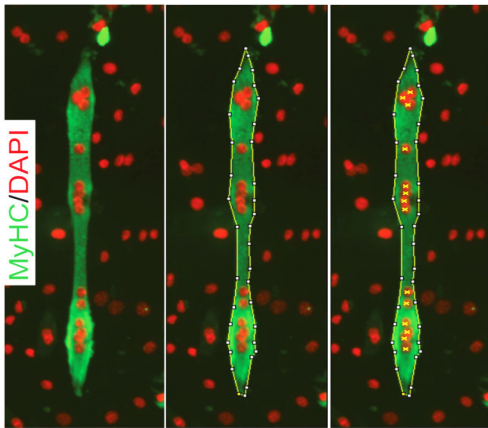
##### a. Développement d'un outil d'analyse bio-informatique

Les événements de fusion des myoblastes primaires n'étant pas simultanés, les myotubes primaires obtenus après 3 jours de différenciation *in vitro* sont hétérogènes. En effet, les myotubes ont des longueurs et des contenus en noyaux très variables (Fig.31). Pour pallier cette hétérogénéité, il a été nécessaire de développer un outil d'analyse bio-informatique en collaboration avec des bio-informaticiens (Claire Burny [laboratoire LMBC], Stéphane Janczarski [LMBC], Florian Barbazange [laboratoire LARIS], David Rousseau [LARIS] et Jacques Brocard [plateforme microscopie PLATIM]). L'avantage de cette méthode d'analyse est qu'elle nous permet d'obtenir des données quantitatives relatives aux phénotypes ainsi qu'au positionnement des noyaux en fonction du contenu en noyaux de chacun des myotubes analysés.



**Figure 31 :** Myotubes primaires obtenus après 3 jours de différenciation *in vitro*. Les myotubes sont marqués pour la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente 60 $\mu$ m.

L'analyse se décompose en deux temps. Dans un premier temps, l'analyse des images est réalisée dans ImageJ®. Cette étape consiste à contourner le myotube puis à localiser chacun des noyaux le composant (Fig.32).



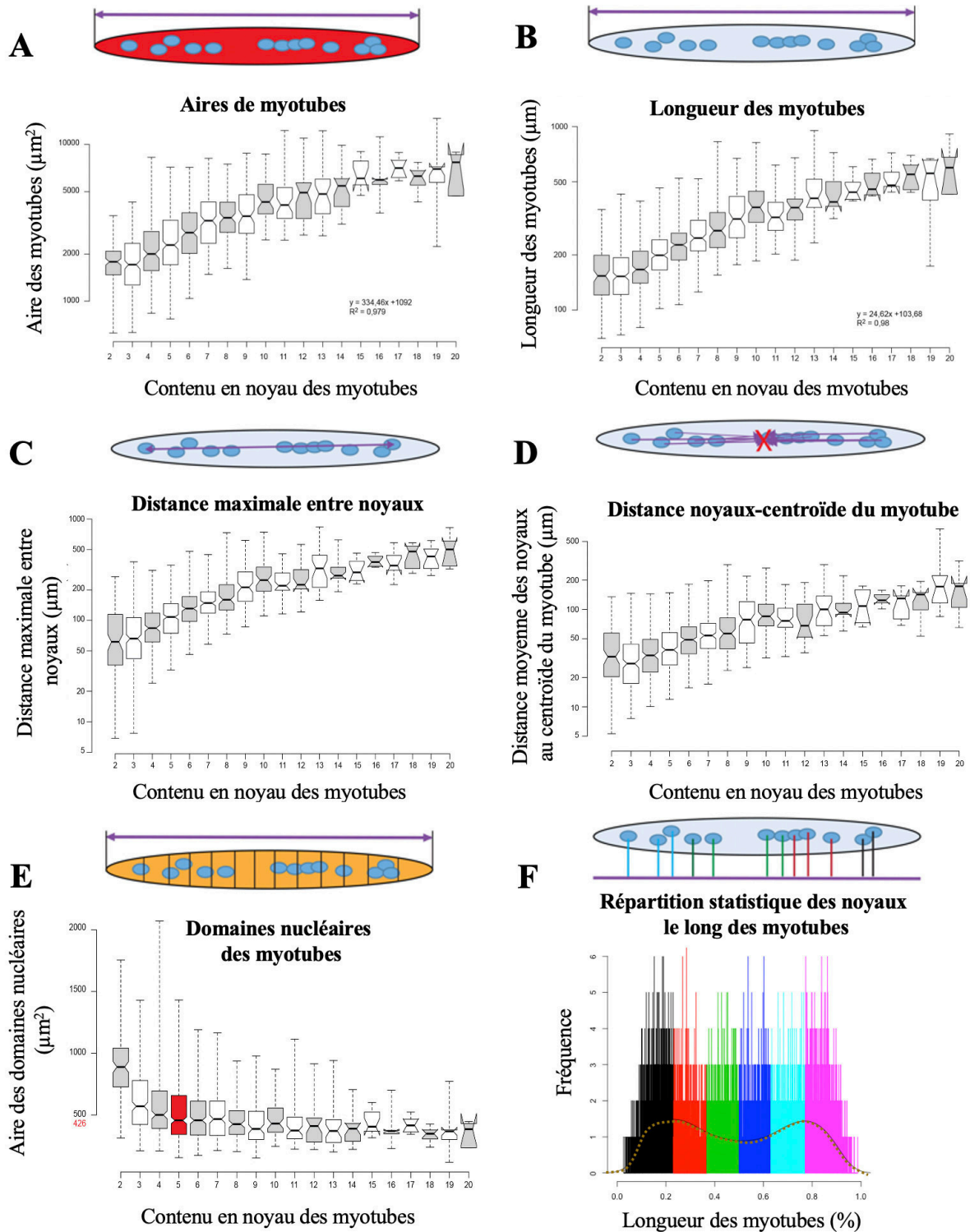
**Figure 32 :** Analyse d'image après traitement avec les différents ARN interférents. Le myotube, ici provenant de cellules primaires en condition contrôle, présente un marquage de la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) ainsi que des noyaux (en rouge). L'analyse d'image consiste à dessiner le pourtour de la cellule, puis à localiser les noyaux qui la composent.

Puis, dans un deuxième temps, les données brutes obtenues à l'issue de l'analyse d'image sont traitées dans RStudio®. Cette dernière étape permet d'obtenir de nombreux paramètres relatifs au phénotype des cellules, tels que l'aire, le périmètre ou encore la longueur du myotube ; mais aussi des paramètres concernant le positionnement des noyaux : distances moyenne et médiane entre noyaux adjacents, distance moyenne de chaque noyau au centre du myotube, ainsi que les distances maximale et minimale entre noyaux.

L'exemple des données présentées ci-dessous correspond à l'analyse de myotubes primaires en condition contrôle. Chaque paramètre est classé selon son contenu en noyaux dans le myotube. Ainsi, l'aire (Fig.33A) et la longueur (Fig.33B) des myotubes augmentent de façon linéaire avec le nombre de noyaux. Concernant les paramètres de positionnement des noyaux, en condition contrôle, les distances maximales (Fig.33C) ainsi que les distances des noyaux au centroïde du myotube (Fig.33D) varient d'une façon similaire puisque les valeurs de ces deux paramètres augmentent proportionnellement avec le nombre de noyaux des myotubes.

Au contraire, l'aire des domaines nucléaires présente une grande variabilité pour les myotubes contenant un faible nombre de noyaux (<5) (Fig.33E) puis, atteint un plateau dès 5 noyaux dans le myotube (de  $426\mu\text{m}^2$ ). La variabilité de ce paramètre est associée aux myotubes nouvellement formés qui ont subi de récents événements de fusion. Comme l'ont décrit Roman et Gomes (2018), les noyaux de ces myotubes vont se centraliser, s'aligner puis se répartir le long du myotube dans un deuxième temps. La variabilité de l'aire des domaines nucléaires des myotubes contenant un faible nombre de noyaux est donc associée aux mouvements de centralisation et d'alignement des noyaux nouvellement fusionnés. Le criblage ARN interférents réalisé s'intéresse à l'étape de répartition des noyaux le long des myotubes. Ainsi, de façon à ne pas biaiser l'analyse, seuls les myotubes contenant au minimum 5 noyaux ont été analysés.

Cet outil d'analyse permet également d'obtenir une visualisation de la répartition des noyaux le long des myotubes (Fig.33F). Pour construire ce graphique, la longueur des myotubes analysés pour une même condition a été normalisée à 100%. Puis chacun des noyaux a été projeté sur le fêret de façon à obtenir la répartition statistique des noyaux le long des myotubes. Ainsi, pour chaque noyau de chacun des myotubes analysés, une position normalisée entre 0 et 100 a été calculée. Ce graphique représente donc la probabilité (axe des Y) de trouver un noyau à une position donnée (axe des X) le long de myotubes dont les longueurs ont été normalisées à 100. La courbe de densité des noyaux le long des myotubes est représentée en marron sur ce graphique. En condition contrôle, les noyaux ont tendance à se positionner régulièrement le long du myotube. De plus, un code couleur permet de quantifier le groupement statistique de noyaux au sein d'un myotube. Ainsi, plus il y aura de catégories, plus les noyaux seront répartis de façon homogène. Au contraire, une unique classe signifiera un fort agrégat des noyaux.

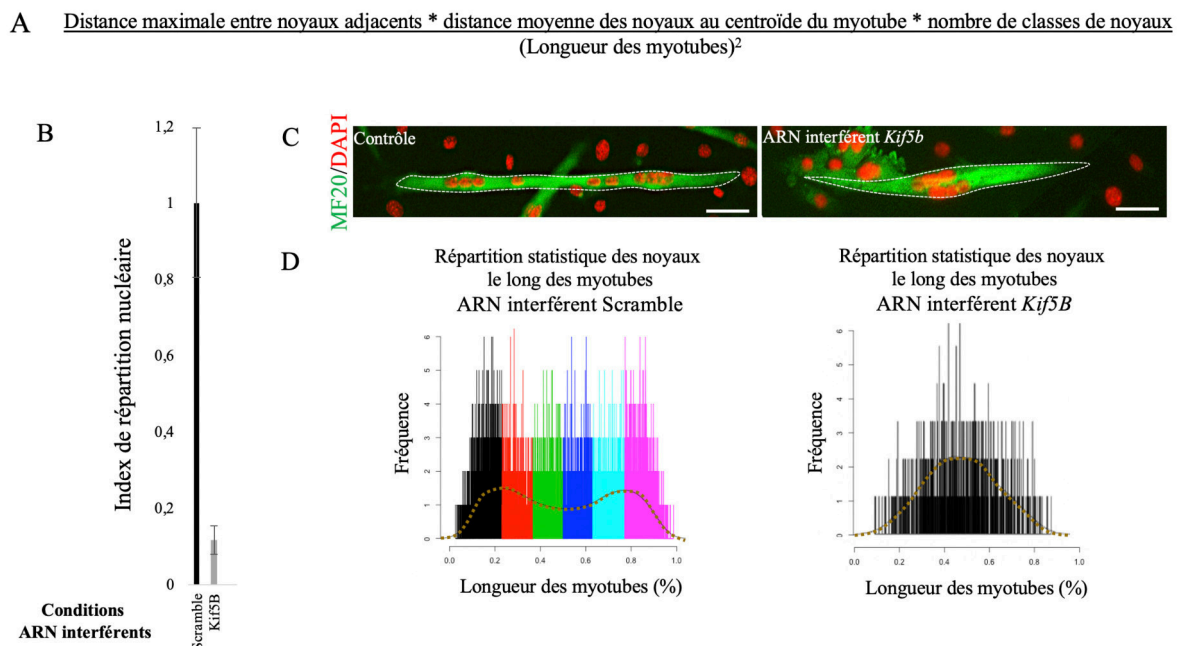


**Figure 33 :** Paramètres obtenus après traitement des images de myotubes en condition contrôlée dans l'outil d'analyse bio-informatique. **A-E.** Aire des myotubes (A), longueur des myotubes (B), distance maximale entre noyaux (C), distance entre noyaux et centroïde du myotube (D), aire des domaines nucléaires (E) classés en fonction du nombre de noyaux contenus dans les myotubes analysés. **F.** Répartition statistique des noyaux le long des myotubes. La courbe de densité des noyaux est représentée en marron.



Différents paramètres obtenus grâce à l’outil d’analyse bioinformatique ont été compilés afin de générer un paramètre unique, dit index de répartition nucléaire, qui permet la comparaison des candidats entre eux (Fig.34). Pour cela, les paramètres suivants ont été utilisés : la distance maximale entre noyaux adjacents (Fig.33C), la distance moyenne des noyaux au centroïde du myotube (Fig.33D), ainsi que le nombre de groupements statistiques identifiés grâce au code couleur sur le graphique de répartition des noyaux dans le myotube (Fig.33F). Ces valeurs ont été normalisées par la longueur des myotubes (Fig.33B).

Cet index de répartition nucléaire a été appliqué à toutes les conditions testées dans le cadre du criblage ARN interférents et a permis de sélectionner les candidats dont l’inhibition d’expression affecte le positionnement des noyaux au sein des myotubes. Comme démontré par l’utilisation de l’ARN interférent ciblant *Kif5b*, une faible valeur de cet index indique une agrégation des noyaux au centre des myotubes. À l’inverse, une valeur élevée indique une agrégation des noyaux aux extrémités des myotubes (des exemples seront présentés dans les paragraphes suivants).



**Figure 34** : Index de répartition nucléaire utilisé pour sélectionner les candidats impliqués dans le positionnement nucléaire. **A**. Paramètres issus de l’outil d’analyse bio-informatique utilisés pour générer l’index de répartition nucléaire. **B**. Histogramme représentant les index de répartition nucléaire en condition contrôle (myotubes transfectés à l’aide d’un ARN interférent *Scramble* (n=1160)) et en condition d’inhibition d’expression de *Kif5B* (n=419). **C**. Myotubes contrôles et en condition d’inhibition de *Kif5B*, immunomarqués pour la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d’échelle représente 30µm. **D**. Répartition statistique des noyaux le long des myotubes pour les conditions contrôles (gauche) et en condition d’inhibition d’expression de *Kif5B* (droite). La courbe de densité des noyaux est représentée par la ligne pointillée marron.

## b. Limite de cet outil d'analyse

Cet outil d'analyse, indispensable pour pallier l'hétérogénéité des cultures de myotubes primaires, comporte toutefois une limite. En effet, les myotubes doivent nécessairement être rectilignes pour être analysés. Ainsi, tout myotube incurvé sera exclu. Seuls une minorité de myotubes seront exclus de l'analyse puisque 95% des myotubes obtenus à l'issue des 3 jours de différenciation *in vitro* sont rectilignes. Cet outil d'analyse nous permet donc d'avoir une analyse complète et représentative de la population de myotubes obtenue pour une condition donnée.

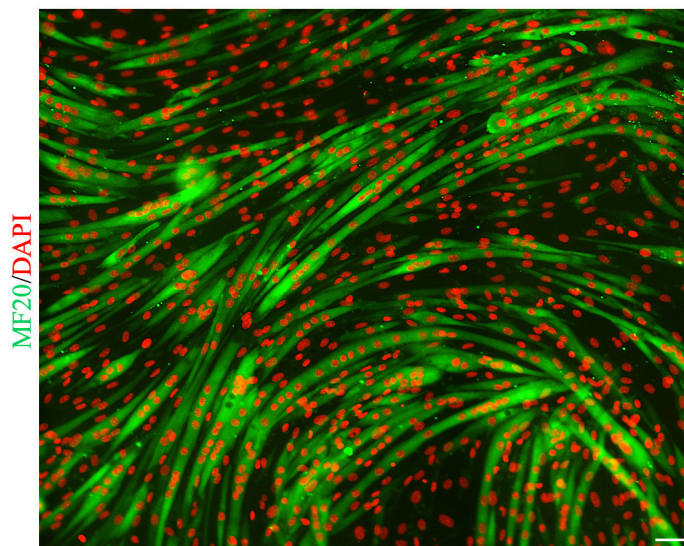
## 2. Lignées immortalisées C2C12

L'analyse des myotubes C2C12 obtenus après 6 jours de différenciation *in vitro* est différente. Le processus de fusion des myoblastes C2C12 est caractéristique de la lignée cellulaire. En effet, lorsque la différenciation est induite, les cellules vont faire un cycle de division supplémentaire avant de s'aligner et de fusionner ultérieurement. La fusion simultanée des myoblastes permet d'obtenir à l'issue de la différenciation une population de myotubes homogène en termes de contenu en noyaux (Fig.35). Toutefois, les myotubes obtenus présentent une forme incurvée, ce qui rend l'outil d'analyse bioinformatique inutilisable pour ces cultures cellulaires.

Ainsi, une appréciation qualitative a été réalisée sur les deux paramètres suivants :

- agrégation des noyaux,
- fusion.

Cette stratégie d'analyse a permis de rapidement discriminer les candidats dont l'inhibition d'expression n'affecte pas le positionnement des noyaux.

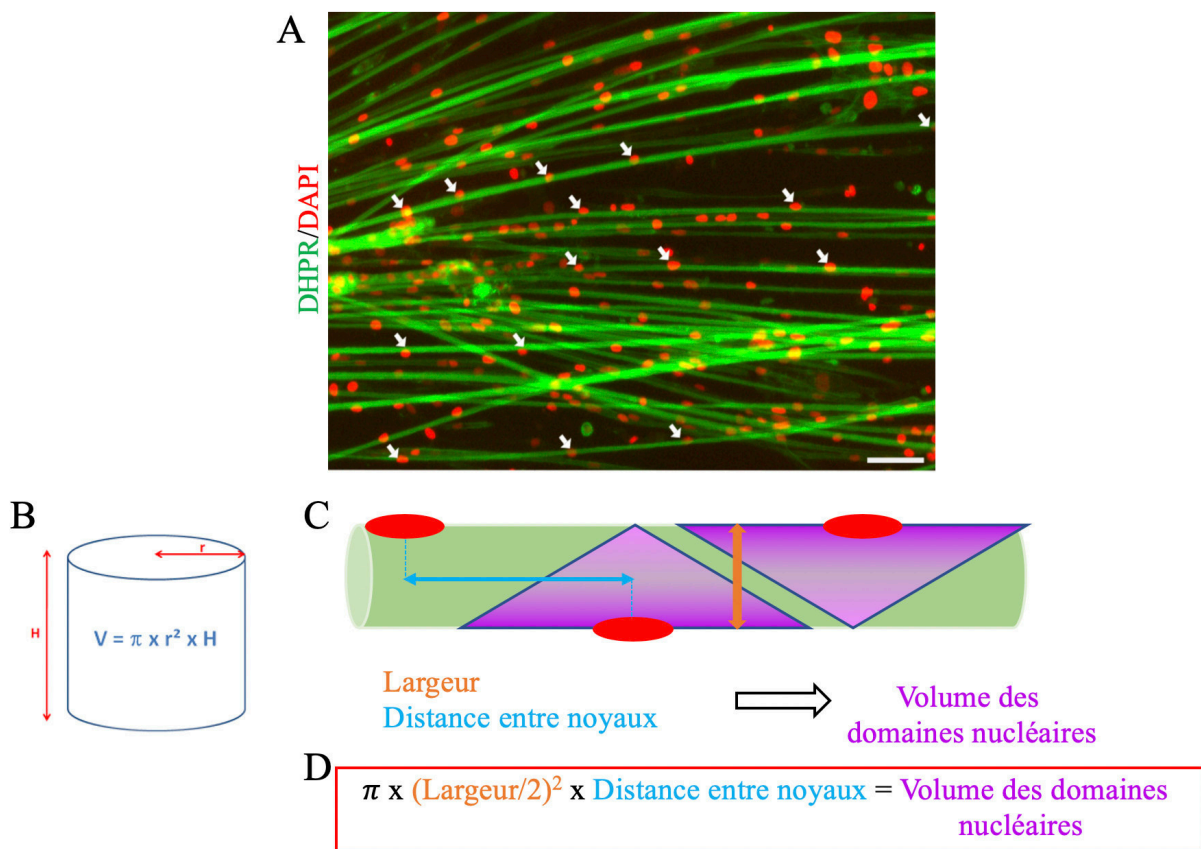


**Figure 35 :** Image de myotubes C2C12 après 6 jours de différenciation *in vitro*. Les cellules sont immunomarquées pour la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente 50 $\mu$ m.

### 3. Myofibres primaires

Les fibres musculaires matures obtenues à l'issue de la culture cellulaire primaire peuvent atteindre quelques millimètres de longs. Ainsi, il est difficile de suivre une fibre musculaire dans la totalité de sa longueur (Fig.36). L'utilisation de l'outil bio-informatique présenté précédemment est donc inadaptée à ces cultures cellulaires.

Afin d'étudier le positionnement des noyaux dans les différentes conditions, deux paramètres ont été mesurés manuellement : la distance entre noyaux adjacents et la largeur de la fibre musculaire (Fig.36C). Les fibres musculaires étant des cellules cylindriques, la formule permettant le calcul du volume d'un cylindre (Fig.36B) a pu être appliquée pour obtenir le volume des domaines nucléaires (Fig.36D).



**Figure 36 :** Analyse du positionnement des noyaux dans les cultures de fibres musculaires matures. **A.** Culture *in vitro* obtenue après 10 jours de différenciation des cellules primaires. Les fibres sont marquées pour les récepteurs aux dihydropyridines (DHPR ; en vert) et pour les noyaux à l'aide du DAPI (en rouge). Les flèches blanches indiquent les noyaux en position périphérique. La barre d'échelle représente 60µm. **B.** Formule calculatoire permettant d'obtenir le volume d'un cylindre. **C.** Représentation schématique d'une fibre musculaire mature cylindrique (en vert). Les noyaux périphériques sont représentés en rouge. La flèche bleue représente la distance entre noyaux adjacents. La flèche orange représente la largeur de la fibre. Les triangles violets représentent les domaines nucléaires. **D.** Formule appliquée pour extrapoler sur le volume des domaines nucléaires des fibres musculaires matures. Les mesures de distance entre noyaux adjacents et de largeur de la fibre musculaire ont été utilisées.

# PUBLICATION 1 :

Domaine nucléaire et protéome microtubulaire au cours de la maturation des fibres musculaires

Prix Master 2016 de la SFM.

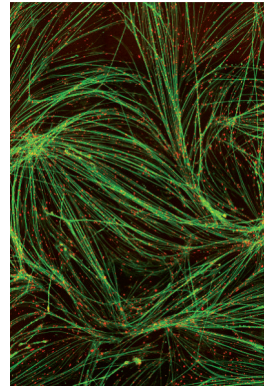


> Au cours du développement musculaire, les noyaux se positionnent activement le long des fibres musculaires, façonnant les Domaines Nucléaires (DN). Ce positionnement semble essentiel à la fonctionnalité des fibres car des défauts d'établissement des DN sont toujours associés à des dysfonctionnements musculaires. Des études montrent que le positionnement nucléaire est dynamique, suggérant que, dans des pathologies présentant des délocalisations nucléaires, relocaliser les noyaux pourrait restaurer certaines fonctionnalités musculaires. Les microtubules sont essentiels au positionnement précoce des noyaux dans les fibres musculaires. Le réseau microtubulaire étant totalement remodelé pendant la maturation musculaire, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les « protéomes associés aux microtubules » évoluent au cours de la maturation des fibres, ce qui contribue à la formation et au maintien des DN dans les fibres matures. Nous avons mené une approche biochimique *in vitro* afin d'isoler les protéines associées aux microtubules dans des fibres immatures et matures. L'identification des protéines par spectrométrie de masse a permis la sélection de candidats, associés/exprimés de façon différentielle aux microtubules pendant la maturation des fibres et potentiellement impliqués dans le contrôle des DN. Nous déchiffrons actuellement, *via* un criblage siARN, l'implication respective de ces candidats sur les différentes phases d'établissement des DN en utilisant une méthode non biaisée d'analyse statistique des DN dans les myotubes, en fonction de leur contenu en noyaux. Cette approche conduira à l'identification de nouvelles voies liées à la mise en place des DN et permettra d'identifier des candidats sur lesquels agir dans des pathologies associées de type myopathies centronucléaires (CNM). <

## Prix Master 2016 de la SFM

### Domaine nucléaire et protéome microtubulaire au cours de la maturation des fibres musculaires

Nathalie Couturier, Vincent Gache

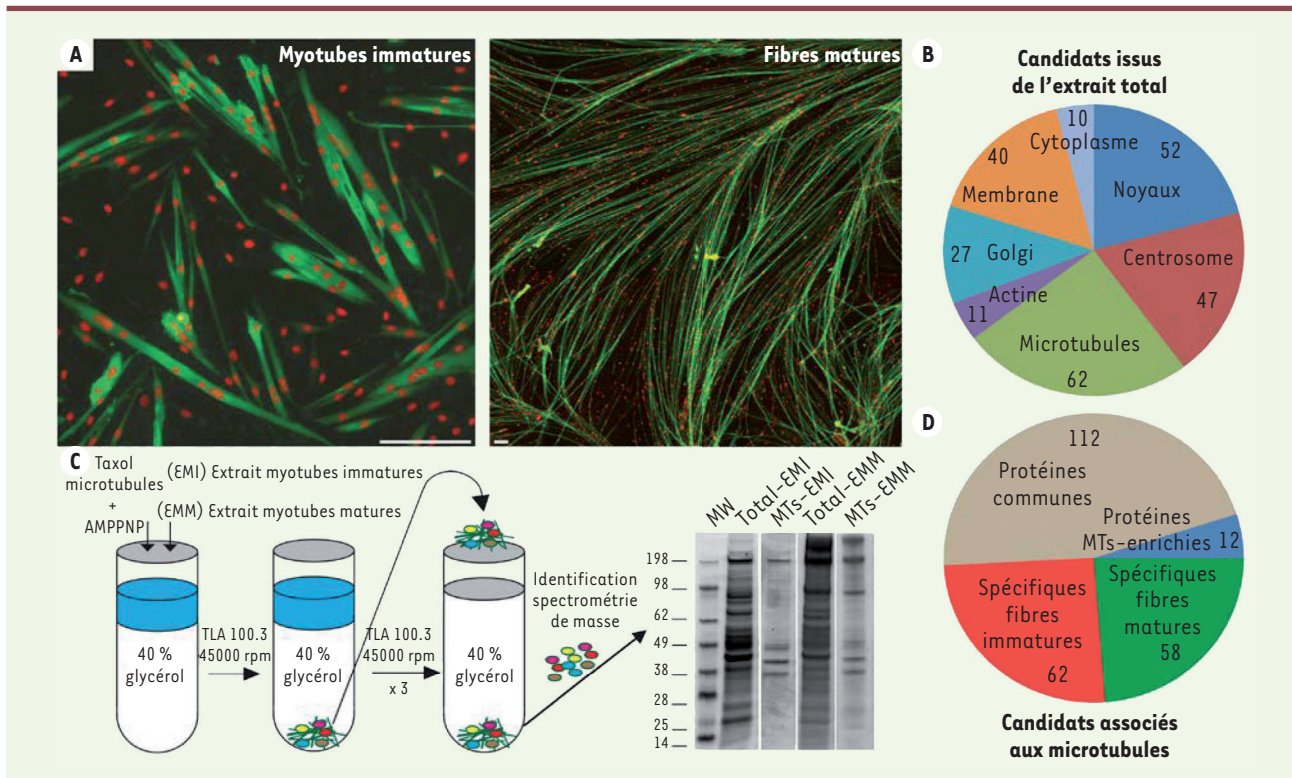


Institut NeuroMyogène- CNRS  
UMR 5310 - Inserm U1217 -  
Université de Lyon, Lyon, France.  
[vincent.gache@inserm.fr](mailto:vincent.gache@inserm.fr)

#### Contexte et hypothèse

Les fibres musculaires composent le muscle strié squelettique et proviennent de la fusion de cellules spécialisées : les myoblastes. Ces cellules ont la capacité de fusionner entre-elles par milliers afin de former un syncytium : le myotube [1]. Ces myotubes sont des fibres musculaires encore immatures et devront subir différentes étapes de maturation pour permettre leur bon fonctionnement : la formation de l'appareil contractile (agencement entre les réseaux d'actine et de myosine à la base des sarcomères), la mise en place du réseau de réticulum sarcoplasmique (réserves calciques) ou bien encore l'établissement d'un contact efficace entre la fibre et le motoneurone à la jonction neuromusculaire (permettant une réponse adéquate de la fibre musculaire suite à l'excitation par le motoneurone). Les noyaux qui composent les fibres musculaires suivent aussi un processus de maturation vis-à-vis de leur conformation propre mais aussi de leur positionnement le long de la fibre. Les étapes précoces de positionnement des noyaux le long des myotubes commencent à être mieux comprises et passent par des mouvements nucléaires contrôlés par différents acteurs clefs du cytosquelette tels que les microtubules, les moteurs moléculaires ainsi que certaines protéines associées aux microtubules (*microtubule associated proteins*). Par exemple, après l'événement de fusion entre myoblastes, les noyaux vont rapidement se positionner au centre du myotube *via* un mécanisme dynéine-dépendant [2]. Les noyaux s'alignent et s'espacent les uns





**Figure 1. Protéomes microtubulaires des fibres musculaires immatures et matures.** **A.** Immuno-marquages de myotubes immatures (3 jours de différenciation) et de myofibres matures (11 jours de différenciation) *in vitro* marqués pour les noyaux (rouge) et la chaîne lourde de la myosine (vert). Barres d'échelles = 150  $\mu$ m. **B.** Localisation subcellulaire des protéines candidates sélectionnées à partir des extraits cellulaires totaux. **C.** Protocole biochimique utilisé pour purifier et identifier le protéome microtubulaire dans les myotubes. **D.** Sélection des protéomes microtubulaire qui seront analysés par criblage siARN.

des autres pour se répartir régulièrement au centre des myotubes en formation grâce à une interaction entre MAP7 et Kif5B [3]. Cependant, ce mécanisme semble beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît, avec l'implication d'au moins 17 autres kinésines dans ce processus combinant mouvement nucléaire et alignement précoce des noyaux [4]. Les étapes finales de maturation positionnelle des noyaux telles que la « périphérisation », leur espacement et leur maintien à la périphérie restent encore à identifier. Les réseaux de cytosquelette d'actine et de microtubules sont totalement remodelés durant la maturation des fibres musculaires avec une forte accumulation péri-nucléaire observée en comparaison à leur organisation dans des cellules mononuclées. Récemment, ces réseaux cytosquelettiques ont été mis en évidence comme un potentiel support à la « périphérisation » des noyaux [5].

Les conséquences fonctionnelles d'une mauvaise localisation des noyaux sur les fibres ont longtemps suscité des interrogations. Une désorganisation du positionnement nucléaire, que ce soit en termes d'espacement ou de « périphérisation », est toujours associée à un dysfonctionnement de la fibre musculaire [3]. Particulièrement, dans certaines conditions pathologiques, telles que dans les CNM où les noyaux perdent (ou n'acquièrent pas) cette localisation périphérique et se concentrent au centre des fibres musculaires [6]. Des

études ont montré que l'altération de la localisation des noyaux dans les fibres musculaires influençait négativement la fonctionnalité de ces fibres [3]. Par conséquent, la maturation positionnelle des noyaux au cours de la formation des fibres musculaires est essentielle pour obtenir une fibre musculaire mature fonctionnelle. Ces données suggèrent un effet bénéfique de la restauration positionnelle des noyaux dans les fibres musculaires dans les pathologies associées.

### Identification de nouveaux régulateurs du positionnement nucléaire

Mon travail de thèse consiste à comprendre l'influence des protéines associées au réseau microtubulaire sur le positionnement nucléaire dans les fibres musculaires au cours du développement et de la maturation de ces fibres. Particulièrement, nous recherchons des protéines spécifiquement associées au réseau microtubulaire dans les fibres matures contrôlant la mise en place tardive des noyaux dans les fibres musculaires. Pour ce faire, nous avons développé une



stratégie d'identification protéomique différentielle entre des fibres musculaires immatures et matures grâce à une méthode originale de culture *in vitro* de cellules primaires de souris (Figure 1A) [5]. Cette analyse nous a permis d'identifier et de sélectionner un premier groupe de protéines (249) (Figure 1B). Cette approche globale a été complétée par une approche ciblée sur le protéome spécifiquement associé au réseau microtubulaire en utilisant deux stratégies complémentaires (Figure 1C). La première repose sur la purification des microtubules avec leurs protéines associées par centrifugation sur coussin de glycérol après addition dans l'extrait cytoplasmique de Taxol® afin de stabiliser le réseau microtubulaire au cours de sa formation. La deuxième approche consiste en un enrichissement microtubulaire par ajout préalable de microtubules stabilisés à l'aide du Taxol® dans l'extrait cytoplasmique. Les microtubules et protéines associées purifiés par ces deux approches ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse. Nous avons par la suite classé les protéines en trois grandes catégories : spécifiquement exprimées dans les étapes précoces de différenciation des myotubes (3 jours de différenciation, immatures), spécifiques d'un stade de différenciation tardif (11 jours de différenciation des fibres, matures) et une dernière catégorie regroupant les protéines exprimées de façon non spécifique aux deux stades de maturation des fibres. Ce classement nous a permis de sélectionner 244 protéines d'intérêt dont le rôle sur le positionnement des noyaux ainsi que sur les caractéristiques du réseau microtubulaire sera étudié à travers un criblage phénotypique en utilisant la technique des siARN (Figure 1D).

### Mise en place de la stratégie de criblage par siARN

Des cellules primaires purifiées à partir de souriceaux C57BL/6 âgés de 5 jours sont induites dans la voie de la différenciation courte (3 jours de différenciation), ou longue (11 jours de différenciation). L'effet de l'inhibition de chacune des protéines sélectionnées sur le positionnement des noyaux sera apprécié dans ces deux phases. L'analyse à 3 jours est basée sur un *plugin* développé dans ImageJ® par notre équipe combinée à une analyse statistique dans RStudio® afin d'extraire et d'analyser différents paramètres en lien avec les myotubes formés et le positionnement des noyaux. Nous obtenons ainsi automatiquement l'index de fusion, la longueur et l'aire des myotubes, l'aire des domaines nucléaires au cours de la formation des myotubes (grâce à la classification des myotubes en fonction de leur nombre de noyaux). Différents paramètres liés aux distributions/localisations des noyaux le long des myotubes formés sont aussi extraits. À partir de ces données, nous avons développé un index qui permet de rendre compte de l'effet de l'absence de chaque protéine ciblée par un siARN sur le phénotype global de répartition des noyaux dans les myotubes étudiés. L'analyse à 11 jours est basée sur des mesures réalisées sur les fibres musculaires matures obtenues comme la largeur des fibres, les distances entre noyaux adjacents et la « périphérisation » des noyaux. Cette analyse quantitative est combinée à une analyse plus qualitative des fibres sur leur aptitude à former des sarcomères et des tubules-T matures. Cette

approche protéomique nous a déjà permis d'identifier de nouveaux acteurs du positionnement nucléaire au cours de la formation des fibres musculaires. L'identification de ces protéines va permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des fibres musculaires mais surtout d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques pour les pathologies associées de type CNM. ♦

### SUMMARY

#### Myonuclear domain and microtubule proteome during skeletal muscle maturation

In the normal course of muscle fiber development, myonuclei actively position and adapt a precise localization in mature fibers, shaping MyoNuclear Domains (MNDs). Myonuclei positioning in fibers appears to be essential for muscle function as defects in MNDs settings are always associated with dysfunction (*i.e.*, centronuclear myopathy, sarcopenia). Previous studies have shown that myonuclei positioning in fibers is reversible, suggesting that in pathologies presenting MNDs impairment, myonuclei could be re-addressed to the “correct” position in fibers and this could benefit to muscle function. Cytoskeleton networks, and particularly microtubules, have been implicated in early nuclei localization in myotubes. As the microtubule network is completely redesigned during muscle maturation, we hypothesized that “microtubule associated proteomes” would change between immature and mature fibers and contribute to a microtubule-dependent process resulting in MNDs setting and maintenance in mature fibers. We performed an *in vitro* biochemical approach to isolate microtubules partners in immature (myotubes) and mature myofibers. Using mass-spectrometry identification, we selected 244 candidates, differentially associated/expressed with microtubules during myofiber maturation and potentially controlling MNDs settings. We are currently conducting a siRNA screen approach on these candidates to decipher their respective implication in early and late phases of MNDs establishment, using an unbiased assay developed by our team allowing statistical analysis of MNDs regarding myonuclei content. This approach will lead to the identification of new pathways related to nuclear positioning and MNDs setting in normal condition and in myopathies associated to MNDs impairment such as CNMs. ♦

### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



## RÉFÉRENCES

1. Wakelam MJ. The fusion of myoblasts. *Biochem J* 1985 ; 228 : 1-12.
2. Cadot B, Gache V, Vasyutina E, *et al.* Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep* 2012 ; 13 : 741-9.
3. Metzger T, Gache V, Xu M, *et al.* MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* 2012 ; 484 : 120-4.
4. Gache V, Gomes ER, Cadot B. Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 2017 ; 28 : 865-74.
5. Falcone S, Roman W, Hnia K, *et al.* N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy ; *EMBO Mol Med* 2014 ; 6 : 1455-75.
6. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2008 ; 3 : 26.

### TIRÉS À PART

V. Gache

## L'École d'Été de Myologie de Paris

20 ans déjà !



Promotion 1998



Promotion 2017

En vingt ans d'existence, la *Summer School of Myology* organisée à l'Institut de Myologie de Paris a formé près de 800 spécialistes, médecins ou scientifiques, venus du monde entier.

La prochaine édition aura lieu du 18 au 23 juin 2018 prochains.

Plus de renseignements sur <http://ssmparis.free.fr>

## **CHAPITRE 2 - CRIBLAGE ARN INTERFÉRENTS, IDENTIFICATION DE PROTÉOMES MICROTUBULES-DÉPENDANTS**

### **I. Criblage ARN interférents dans des myotubes immatures**

#### **1) Criblage sur cellules primaires**

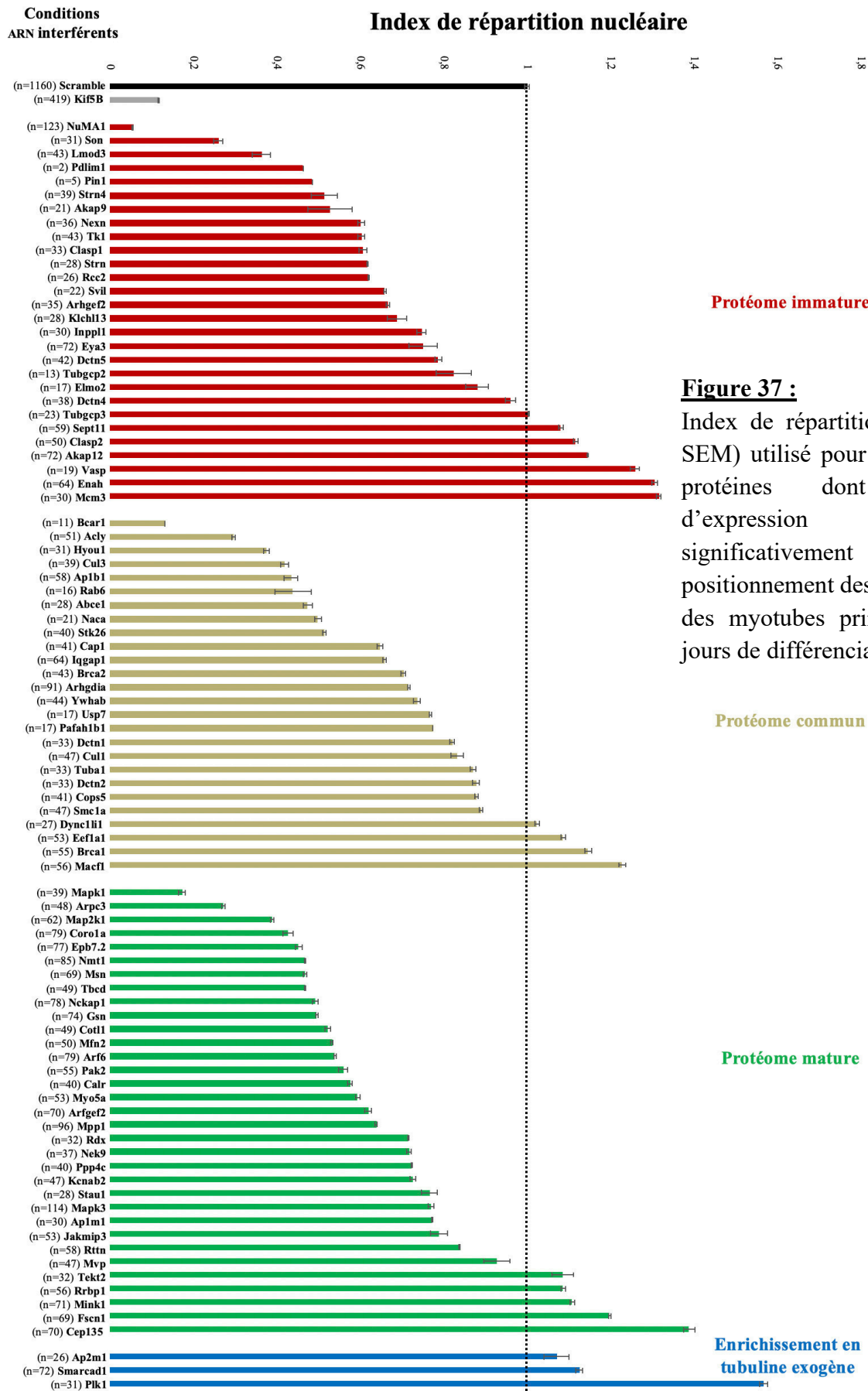
Parmi les 240 protéines sélectionnées à l'issue de l'analyse par spectrométrie de masse, 88 d'entre elles ont été testées dans les myotubes immatures primaires. Cela a permis d'identifier 42 protéines dont l'inhibition d'expression dans les myotubes primaires altère le positionnement des noyaux. L'index de répartition des noyaux de chacun des candidats testés est présenté en Figure 37.

Un panel d'images de quelques candidats dont l'inhibition d'expression affecte le positionnement des noyaux est présenté en Figure 38. L'inhibition d'expression des différents candidats induit une agrégation des noyaux au centre des myotubes primaires. L'effet est plus ou moins drastique selon la condition considérée.

L'inhibition d'expression, par des petits ARNs interférents, de candidats issus du protéome immature sont présentés : NuMA1 (NUclear Mitotic Apparatus protein 1), Strn4 (Striatine-4), Svil (Supervilline) et Arhgef2 (Rho guanine nucleotide exchange factor 2). Le phénotype le plus drastique est atteint lorsque l'expression de la protéine NuMA1 est inhibée. Celui-ci s'illustre par un index de répartition nucléaire faible (0,042 contre 1 pour les myotubes contrôles) (Fig.37).

Concernant le protéome commun, l'inhibition d'expression des candidats suivants est présentée : Hyou1 (Hypoxia up-regulated protein 1), Ap1b1 (AP-1 complex subunit bêta-1), Rab6 (Ras-related protein Rab-6A) et Abce1 (ATP-binding cassette sub-family E member 1).

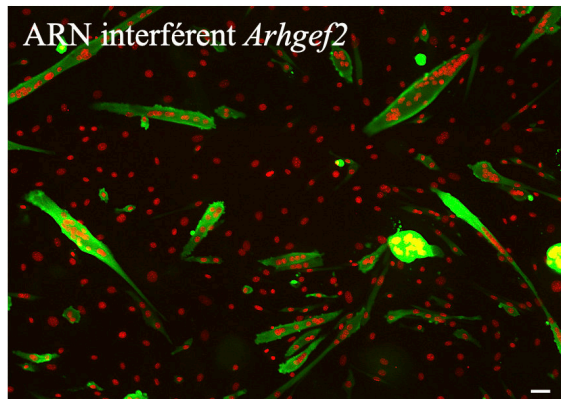
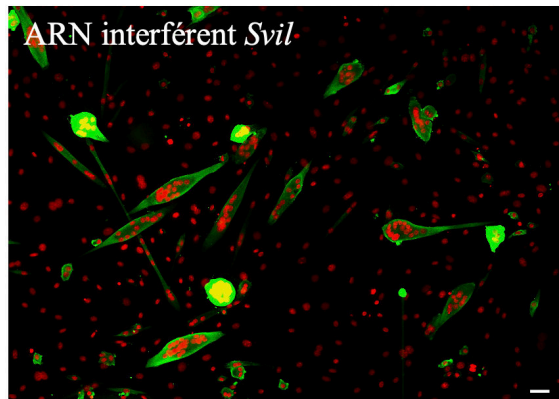
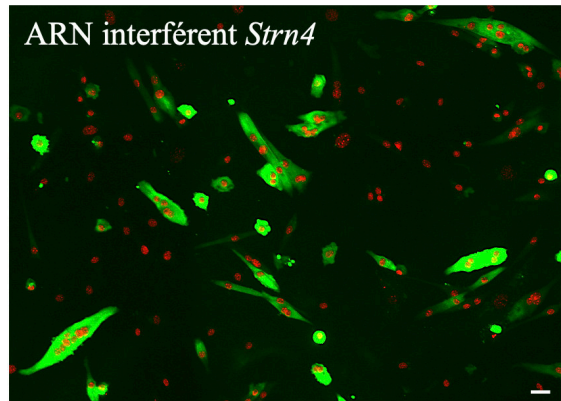
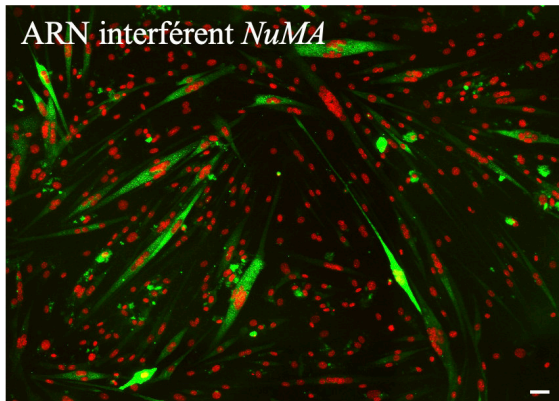
Issus du protéome mature, les phénotypes des myotubes dont l'expression de Mapk1 (Mitogen-activated protein kinase 1), Arpc3 (Actin-related protein 2/3 complex subunit 3), Corol1a (Coronin-1A) et Epb7.2 (Erythrocyte band 7 integral membrane protein) a été inhibée sont présentés.



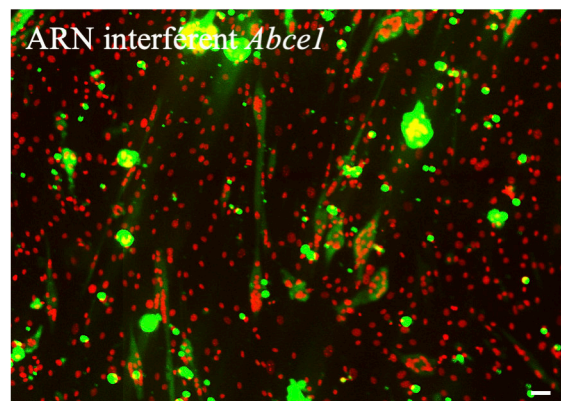
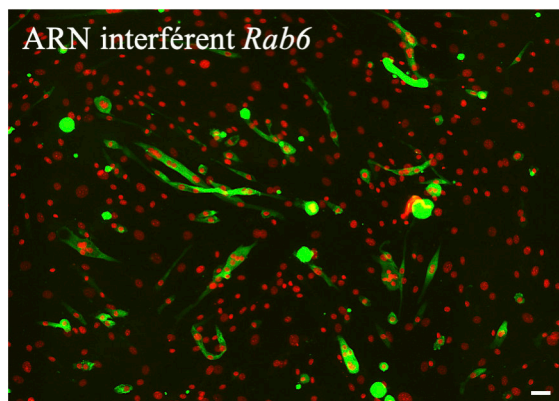
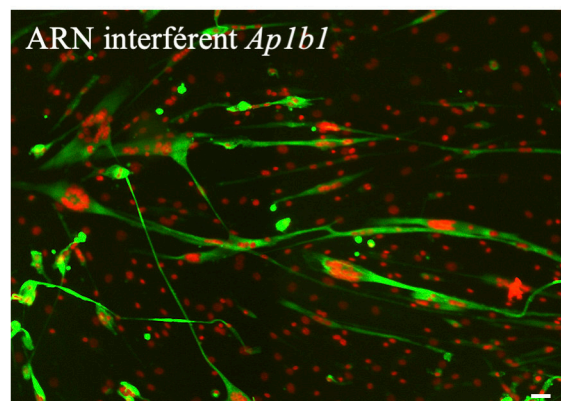
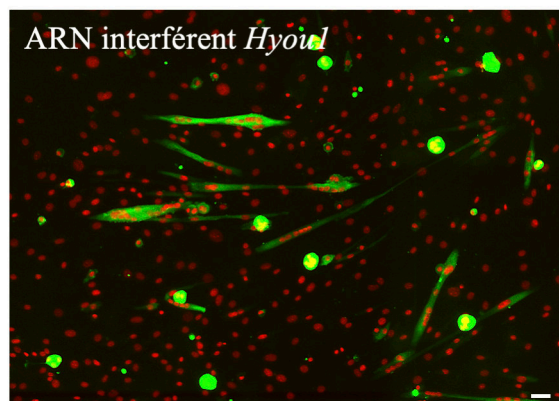
**Figure 37 :**

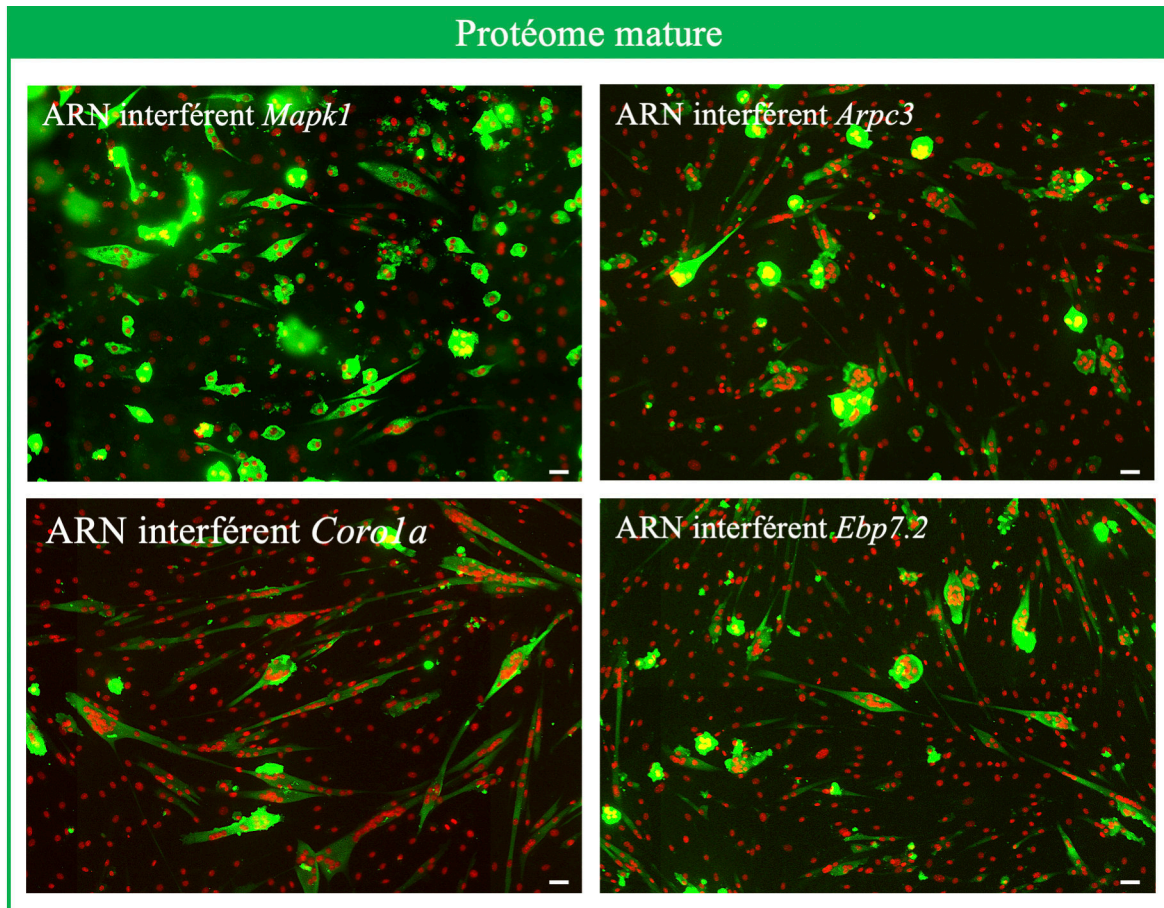
Index de répartition nucléaire ( $\pm$  SEM) utilisé pour discriminer les protéines dont l'inhibition d'expression affecte significativement le positionnement des noyaux au sein des myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*.

Protéome immature connu pour lier les MTs



Protéome commun connu pour lier les MTs



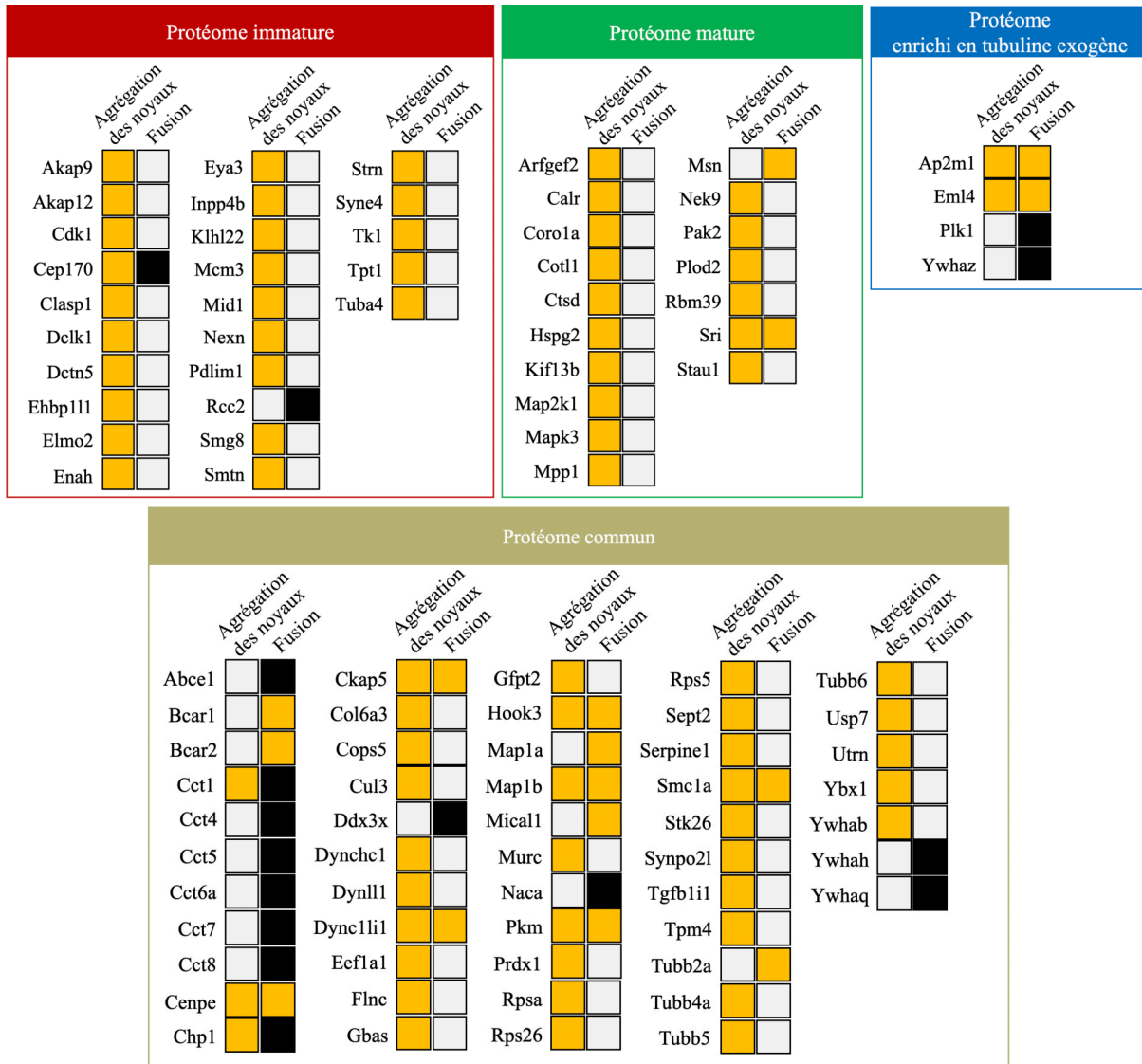


**Figure 38 :** Panel d'images de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* et dont l'expression de différentes protéines a été inhibée. Les myotubes sont immunomarqués pour la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) et pour les noyaux (en rouge). Les barres d'échelle représentent 30μm.

## 2. Criblage sur lignées de cellules musculaires immortalisées C2C12

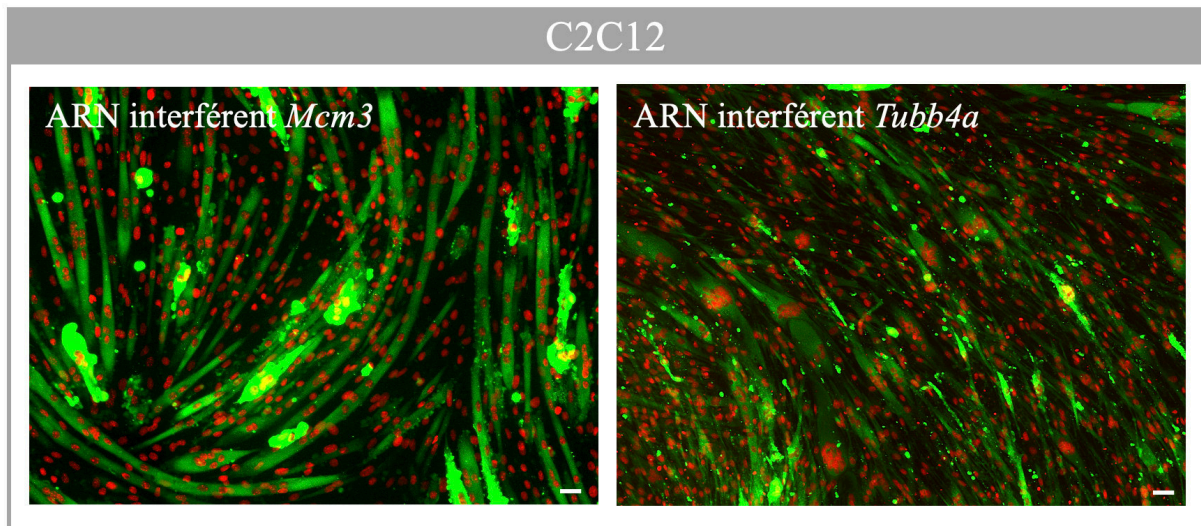
En parallèle du criblage réalisé sur cellules primaires, l'inhibition d'expression des mêmes candidats a été testée dans une lignée de cellules musculaires immortalisées : les C2C12.

Parmi les 240 protéines testées, l'inhibition d'expression de 96 d'entre elles (soit 40%) affecte le processus de fusion et/ou le positionnement des noyaux au sein des myotubes. La liste des 96 candidats et leurs effets respectifs sont présentés en Figure 39.



**Figure 39 :** Liste des 96 protéines dont l'inhibition d'expression altère le processus de fusion et/ou le positionnement des noyaux dans des cultures de myotubes C2C12 après 6 jours de différenciation *in vitro*. Les couleurs jaune et noire sont représentatives de l'effet qu'a l'inhibition de l'expression des candidats sur les deux paramètres considérés. La couleur orange indique une augmentation alors que la couleur noire représente une diminution.

Deux exemples sont présentés en Figure 40. L'inhibition d'expression de ces deux protéines, Mcm3 et Tubb4a, entraîne une altération du positionnement des noyaux dans les myotubes. L'effet est modéré pour les myotubes dont l'expression de Mcm3 a été inhibée, alors que l'effet est drastique dans les myotubes où Tubb4a est inhibée.



**Figure 40 :** Panel d'images de myotubes primaires après 6 jours de différenciation *in vitro* et dont l'expression de Mcm3 (gauche) et Tubb4a (droite) a été inhibée. Les myotubes sont immunomarqués pour la chaîne lourde de la myosine (MF20 ; en vert) et pour les noyaux (en rouge). Les barres d'échelle représentent 30 $\mu$ m.

## **II. Criblage ARN interférents dans des fibres musculaires matures**

### **1) Résultats du criblage sur fibres matures**

Le criblage a également été mené sur des fibres musculaires matures issues de cultures primaires après 10 jours de différenciation *in vitro*. Parmi les 240 protéines initialement sélectionnées (Fig.26E), 80 d'entre elles, soit 33%, ont été testées dans notre système de culture de fibres matures. La majorité des protéines candidates testées sont issues du protéome mature, les protéines spécifiques du protéome mature ayant plus probablement un effet sur les fibres musculaires matures contrairement aux protéines spécifiques du protéome immature.

La méthode d'analyse présentée en Figure 36 a été appliquée et a permis d'identifier des protéines régulant le positionnement des noyaux au cours des phases tardives de différenciation musculaire. Les moyennes des volumes des domaines nucléaires sont présentées en Figure 41.

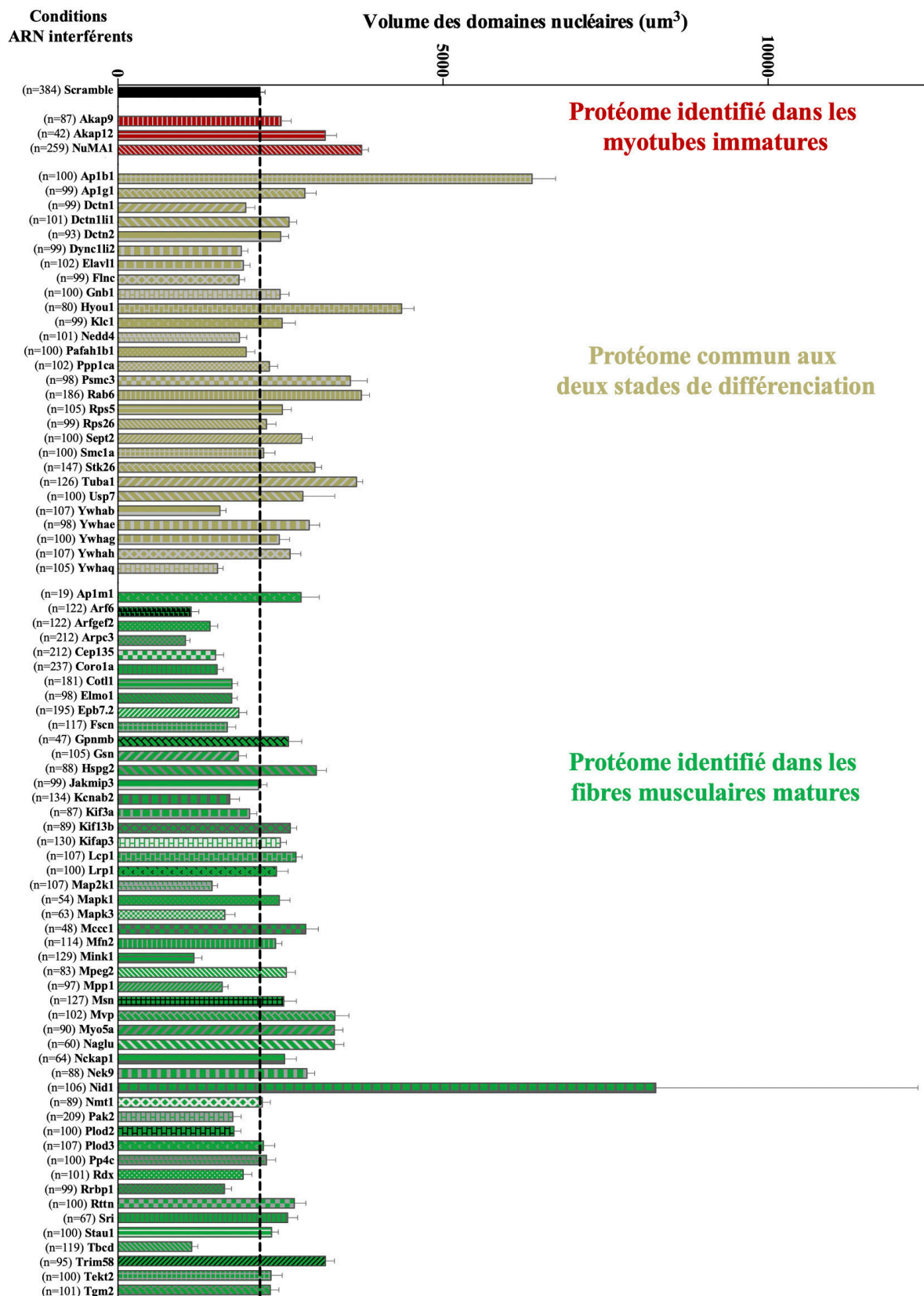
Cette méthode d'analyse a permis d'identifier des candidats qui semblent impliqués dans le positionnement des noyaux dans les phases tardives de différenciation musculaire. C'est le cas par exemple de Arf6 (ADP-ribosylation factor 6), Arpc3 (Actin-related protein 2/3 complex subunit 3), Mink1 (Misshapen-like kinase 1) ou encore Tbcd (Tubulin-specific chaperone D). En effet, en condition contrôle le volume des domaines nucléaires est de  $2123 \mu\text{m}^3$ . L'inhibition de l'expression des protéines Arf6, Arpc3, Mink1 et Tbcd dans les fibres musculaires matures entraîne une diminution drastique du volume des domaines nucléaires de respectivement, 80%, 70%, 80% et 60% en comparaison au volume des domaines nucléaires des fibres musculaires contrôles.

### **2) Limites du criblage ARN interférents sur fibres musculaires matures**

Bien que cette méthode d'analyse ait permis l'identification de candidats dans les fibres musculaires matures, l'utilisation d'ARN interférents ne permet pas de discriminer les fibres musculaires transfectées de celles qui ne le sont pas.

Par ailleurs, le maintien de l'efficacité des ARN interférents après 10 jours de différenciation *in vitro* n'a pas été testé. Il est donc possible que l'inhibition d'expression de certains candidats qui n'entraîne aucun effet sur le positionnement des noyaux soit due au fait que l'efficacité de l'ARN interférent soit perdue au cours du temps.





**Figure 41 :** Histogramme représentant les moyennes  $\pm$  SEM des volumes des domaines nucléaires des fibres musculaires matures dans différentes conditions d'ARN interférents. Les conditions représentées en rouge sont les candidats issus du protéome immature, celles en beige du protéome commun et celles en verte du protéome mature. Le nombre de myofibrilles (n) analysé est indiqué entre parenthèses.

### III. Conclusions

Grâce à la réalisation de ce criblage ARN interférents, nous avons pu mettre en évidence une complémentarité des systèmes *in vitro* utilisés. En effet, nous avons pu constater une disparité des résultats de certains candidats pour un temps de différenciation donné (Fig.42). Certaines protéines régulent le positionnement des noyaux uniquement dans les myotubes primaires ou à l'inverse, uniquement dans les myotubes C2C12. Cette différence peut s'expliquer par la cinétique de différenciation musculaire ralentie dans les cellules C2C12. En effet, lorsque la différenciation musculaire des cellules primaires est induite, les événements de fusion ont lieu quasiment simultanément. Seulement 3 jours de différenciation *in vitro* sont nécessaires pour obtenir des myotubes. Au contraire, dans les C2C12, lorsque la différenciation musculaire est induite, les myoblastes C2C12 font un cycle cellulaire supplémentaire avant de s'aligner. Les événements de fusion ne sont observés qu'à partir du 3<sup>ème</sup> jour de différenciation *in vitro*. Les myotubes sont donc obtenus plus tardivement, à 6 jours post-différenciation.

Cette triple approche complémentaire a également permis d'identifier des protéines dont les rôles sont temporellement régulés. L'identification de ces protéines a été permise grâce au double criblage réalisé sur cellules primaires (myotubes et myofibres). Cette stratégie a permis d'avoir un suivi longitudinal quant au rôle des candidats sur le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire (Fig.42).



Ainsi, de ces criblages ARN interférents, 3 cibles ont émergé et ont fait l'objet d'études approfondies qui seront présentées ultérieurement dans ce manuscrit.

- **NuMA1**

Nous avons sélectionné la protéine NuMA1 (NUclear Mitotic Apparatus 1) pour étudier son mécanisme de régulation sur le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire. Bien que cette protéine ait été majoritairement retrouvée dans le protéome issu des myotubes immatures, l'inhibition de son expression altère le positionnement des noyaux dans les myotubes mais également également dans les myofibres. En effet, l'inhibition de son expression entraîne une agrégation drastique des noyaux au centre des myotubes primaires. Son inhibition à long terme dans les fibres musculaires matures altère également le volume des domaines nucléaires.

- **MACF1**

A l'interface entre microtubules et actine, MACF1 (Microtubule-actin cross-linking factor) a été retrouvé de façon équivalente dans les myotubes et dans les myofibres. Bien que son inhibition d'expression n'altère pas drastiquement le positionnement des noyaux dans les myotubes primaires, il s'est avéré que son rôle est crucial dans les étapes tardives de différenciation musculaire.

- **Akap9**

Cette protéine de nucléation des microtubules (A-kinase anchor protein 9) a été préférentiellement identifiée dans le protéome immature. Son inhibition d'expression dans les C2C12 entraîne une agrégation des noyaux alors qu'elle ne semble pas réguler ce processus dans les phases tardives de différenciation.

## **CHAPITRE 3 - CRIBLAGE ARN INTERFÉRENTS, IDENTIFICATION DES PROTÉOMES TOTAUX**

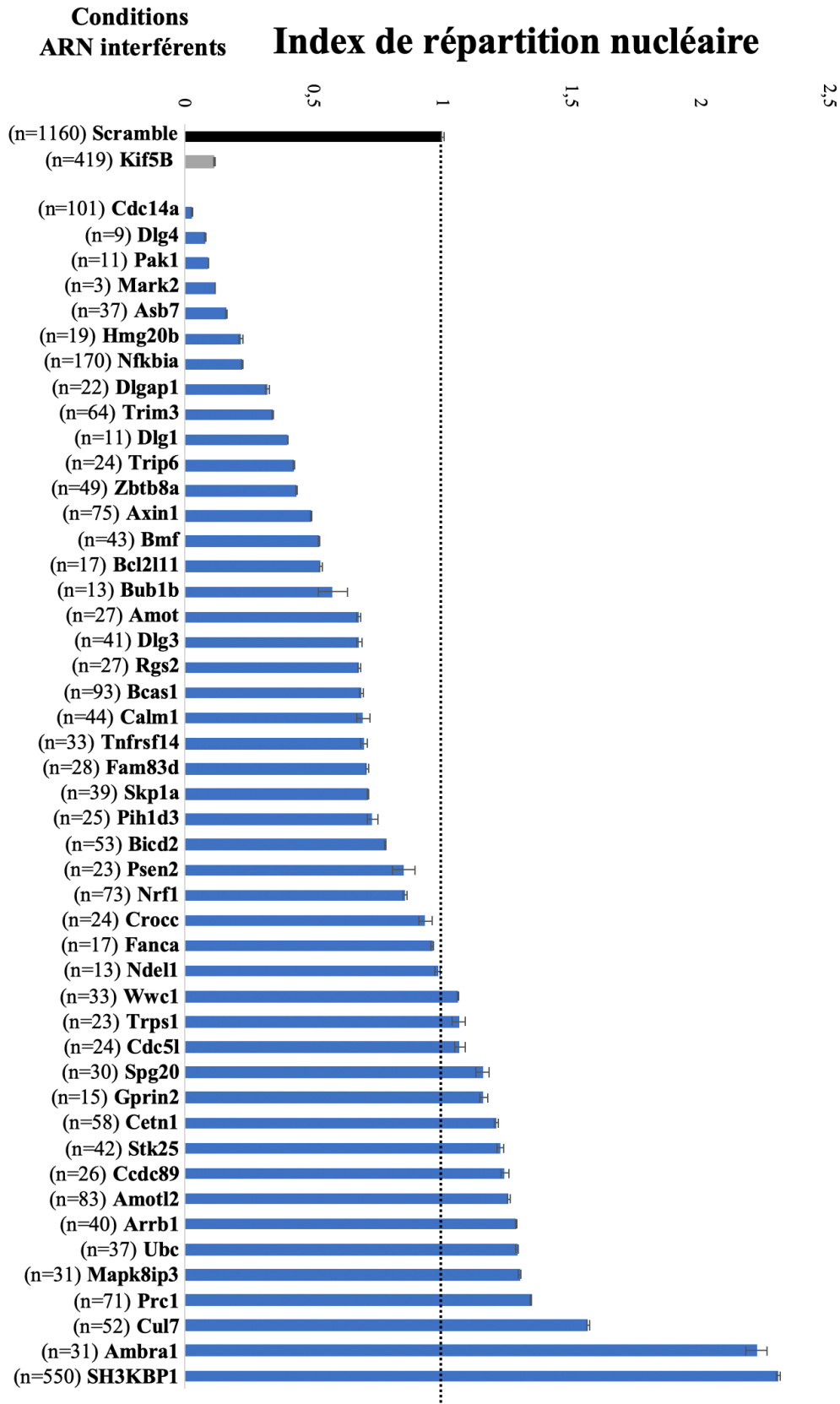
### **I. Criblage ARN interférents dans des myotubes immatures**

#### **1) Criblage sur cellules primaires**

Afin d'analyser les paramètres phénotypiques et de positionnement des noyaux au sein des myotubes primaires, l'outil d'analyse bio-informatique a été utilisé.

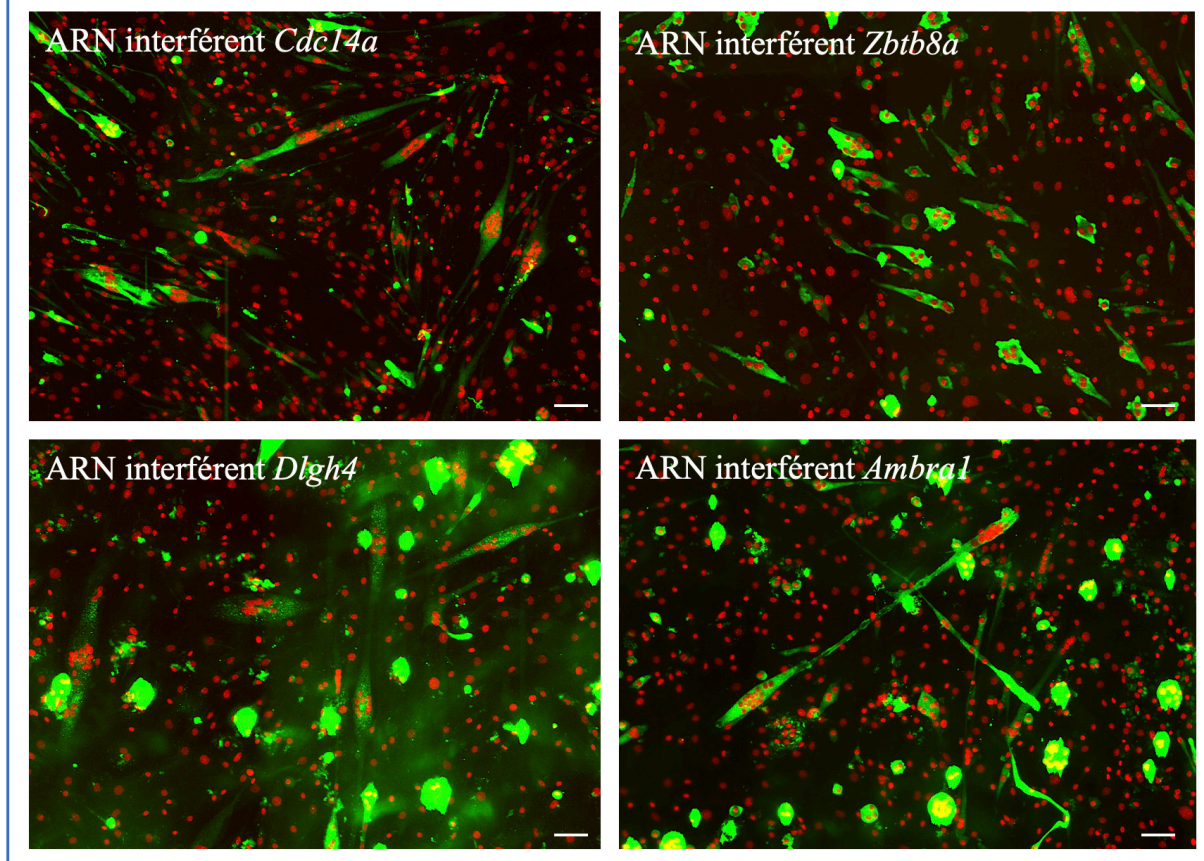
48 des 239 protéines identifiées (Fig.26C) ont été testées. Parmi celles-ci, l'inhibition d'expression de 19 de ces protéines entraîne une agrégation des noyaux au centre du myotube : Cdc14a, Dlg4, Pak1, Mark2, Bcar1, Asb7, Hmg20b, Nfkb1a, Dlgap1, Trim3, Txnl5, Dlg1, Trip6, Zbtb8a, Hem1, Axin1, Bmf, Dncl1 et Bcl2l11. A l'inverse, les traitements ARN interférents de trois protéines, Cul7, Ambra1 et SH3KBP1, entraînent une agrégation des noyaux aux extrémités des myotubes immatures (Fig.43). Les effets de l'inhibition d'expression de la protéine SH3KBP1 seront traités ultérieurement dans ce manuscrit.

Un panel d'images des cultures cellulaires obtenues après transfection avec ARN interférents ciblant Cdc14a, Dlg4, Zbtb8a et Ambra1 est présenté en Figure 44.



**Figure 43 :** Index de répartition nucléaire ( $\pm$  SEM) après transfection de cellules primaires avec les différents ARN interférents ciblant diverses protéines sélectionnées par étude bibliographique. Le nombre de myotubes analysé est présenté entre parenthèses.

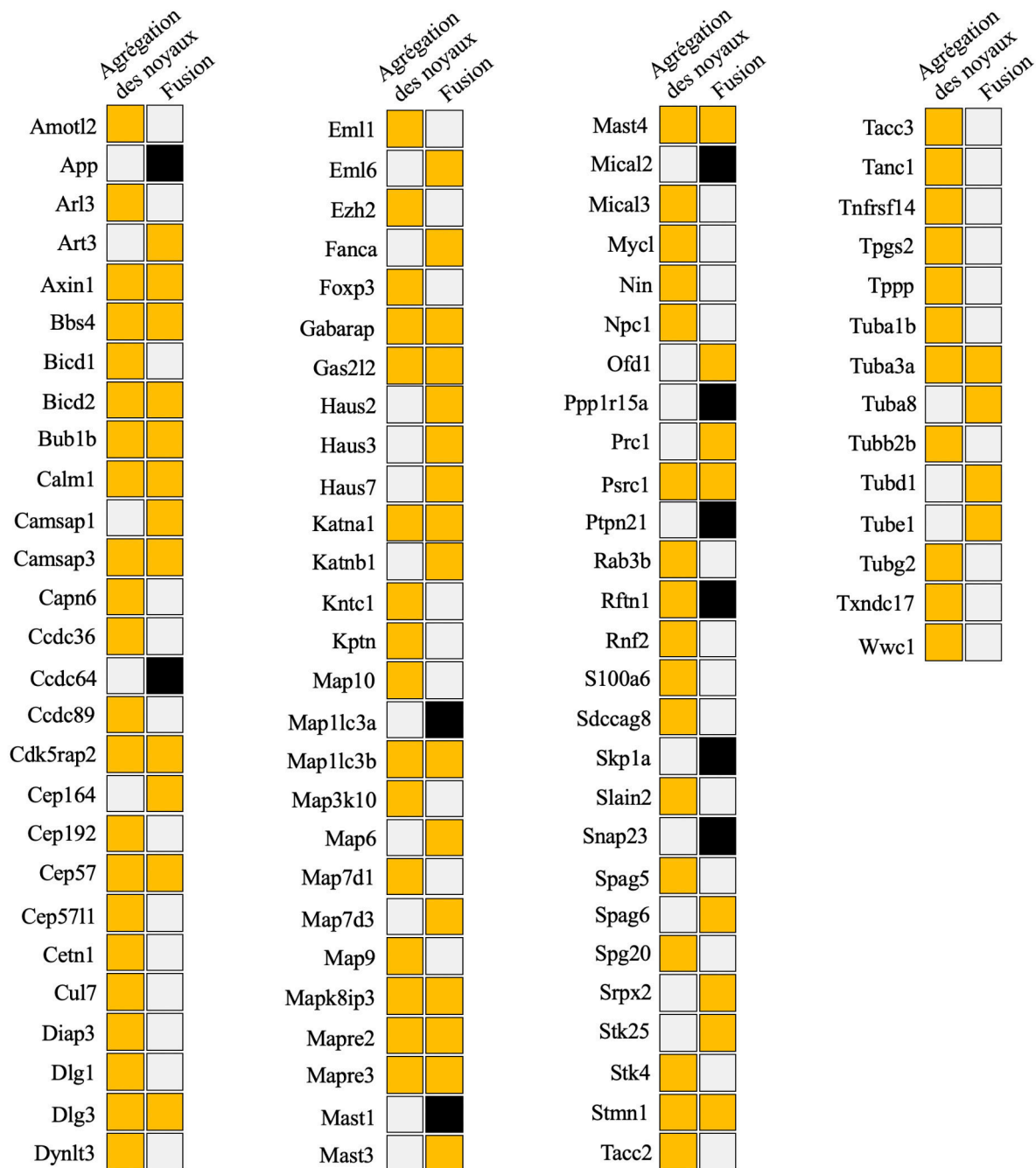
## Sélection extraits totaux



**Figure 44 :** Image des cultures de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* en condition d'ARN interférents ciblant *Cdc14a*, *Zbtb8a*, *Dlgh4* et *Ambra1*. Les myotubes sont marqués en vert par la chaîne lourde de la myosine et en rouge par le DAPI. Les barres d'échelle représentent 50 μm.

## 2) Criblage sur cellules C2C12

Le criblage ARN interférents a été mené sur la totalité des 239 candidats dans le système de culture C2C12. Parmi ceux-ci, 95 protéines, soit environ 40% des candidats, s'avèrent altérer le positionnement des noyaux et/ou le processus de fusion. La liste de ces candidats et l'effet de leur inhibition d'expression sont présentés en Figure 45.

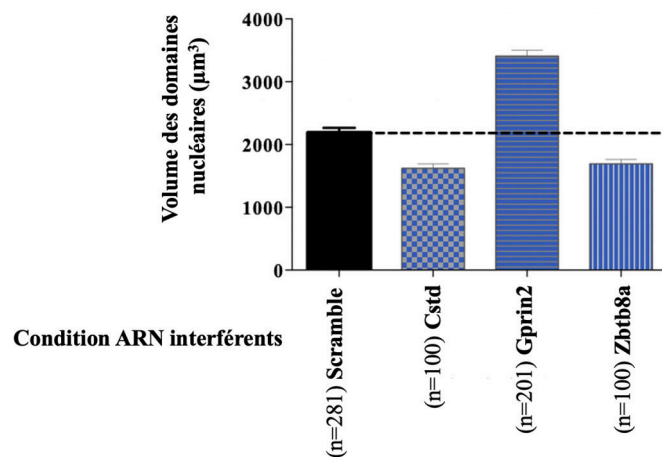


**Figure 45 :** Liste des candidats issus de la sélection bibliographique dont l'inhibition d'expression affecte le positionnement des noyaux et/ou le processus de fusion dans des myotubes C2C12 après 6 jours de différenciation *in vitro*. La couleur orange indique une augmentation du paramètre considéré alors que la couleur noire en indique une diminution.



## II. Criblage ARN interférents dans des fibres musculaires matures

L'inhibition d'expression de 3 candidats a été testée dans les fibres musculaires matures. Il s'agit de Cstd, Gprin2 et Zbtb8a dont les volumes des domaines nucléaires sont présentés en Figure 46. Alors que l'inhibition d'expression de Cstd et de Zbtb8a tendent à entraîner une diminution du volume des domaines nucléaires dans les fibres matures, l'inhibition d'expression de Gprin2 tend à l'augmenter.



**Figure 46 :** Histogramme représentant les moyennes  $\pm$  SEM des volumes des domaines nucléaires des fibres musculaires matures dans différentes conditions d'ARN interférents. Le nombre de myofibres (n) analysées est indiqué entre parenthèses.

## III. Conclusions

Un tableau récapitulatif des protéines dont l'inhibition affecte le positionnement des noyaux dans au moins l'un des trois systèmes *in vitro* utilisés est proposé en Figure 47.

Le criblage ARN interférents sur les 239 protéines sélectionnées à partir des extraits totaux a également permis de faire émerger la cible Sh3kbp1. En effet, inhiber son expression dans les myotubes immatures (primaires et C2C12) entraîne une agrégation de leurs noyaux. Dans les myotubes primaires, les noyaux de ces myotubes s'agrègent préférentiellement aux extrémités des myotubes. Le rôle de cette protéine sur le positionnement des noyaux sera étudié de façon plus détaillée ultérieurement dans ce manuscrit.

Ce criblage a également permis d'identifier la protéine Zbtb8a, dont l'inhibition d'expression dans les myotubes primaires entraîne une altération dans le positionnement de leurs noyaux. Des résultats préliminaires quant au rôle de Zbtb8a sur le positionnement des noyaux au sein des cellules musculaires sont présentés dans ce manuscrit.

| Extraits totaux |       |                    |                   | Extraits totaux |       |                    |                   |
|-----------------|-------|--------------------|-------------------|-----------------|-------|--------------------|-------------------|
| Protéines       | C2C12 | Myotubes immatures | Myofibres matures | Protéines       | C2C12 | Myotubes immatures | Myofibres matures |
| Ambra1          | ∅     | X                  |                   | Map7d1          | X     |                    |                   |
| Amot            | ∅     | X                  |                   | Map9            | X     |                    |                   |
| Amotf2          | X     | X                  |                   | Mapk8ip3        | X     | X                  |                   |
| Arl3            | X     |                    |                   | Mapre2          | X     |                    |                   |
| Arrb1           | ∅     | X                  |                   | Mapre3          | X     |                    |                   |
| Asb7            | ∅     | X                  |                   | Mark2           | ∅     | X                  |                   |
| Axin1           | X     | X                  |                   | Mast4           | X     |                    |                   |
| Bbs4            | X     |                    |                   | Mical3          | X     |                    |                   |
| Beas1           | ∅     | X                  |                   | Mycl            | X     |                    |                   |
| Bcl2l11         | ∅     | X                  |                   | Ndel1           | ∅     | ∅                  |                   |
| Bicd1           | X     |                    |                   | Nfkbia          | ∅     | X                  |                   |
| Bicd2           | X     | X                  |                   | Nin             | X     |                    |                   |
| Bmf             | ∅     | X                  |                   | Npc1            | X     |                    |                   |
| Bub1b           | X     | X                  |                   | Nrf1            | ∅     | ∅                  |                   |
| Calm1           | X     | X                  |                   | Pak1            | ∅     | X                  |                   |
| Camsap3         | X     |                    |                   | Plhd3           | ∅     | X                  |                   |
| Capn6           | X     |                    |                   | Prc1            | ∅     | X                  |                   |
| Ccdc14a         | ∅     | X                  |                   | Psen2           | ∅     | ∅                  |                   |
| Ccdc36          | X     |                    |                   | Psrc1           | X     |                    |                   |
| Ccdc89          | X     | X                  |                   | Rab3b           | X     |                    |                   |
| Cdc51           | ∅     | ∅                  |                   | Rftm1           | X     |                    |                   |
| Cdk5rap2        | X     |                    |                   | Rgs2            | ∅     | X                  |                   |
| Cep192          | X     |                    |                   | Rnf2            | X     |                    |                   |
| Cep57           | X     |                    |                   | S100a6          | X     |                    |                   |
| Cep57l1         | X     |                    |                   | Sdceag8         | X     |                    |                   |
| Cetn1           | X     | X                  |                   | Sh3kbp1         | X     | X                  |                   |
| Crocc           | ∅     | ∅                  |                   | Skp1a           | ∅     | X                  |                   |
| Cstd            | ∅     |                    | X                 | Slain2          | X     |                    |                   |
| Cul7            | X     | X                  |                   | Spag5           | X     |                    |                   |
| Diap3           | X     |                    |                   | Spg20           | X     | ∅                  |                   |
| Dlgap1          | ∅     | X                  |                   | Stk4            | X     |                    |                   |
| Dlg1            | X     | X                  |                   | Stk25           | ∅     | X                  |                   |
| Dlg3            | X     | X                  |                   | Stmn1           | X     |                    |                   |
| Dlg4            | ∅     | X                  |                   | Tacc2           | X     |                    |                   |
| Dynlt3          | X     |                    |                   | Tacc3           | X     |                    |                   |
| Eml1            | X     |                    |                   | Tanc1           | X     |                    |                   |
| Ezh2            | X     |                    |                   | Tnfrsf14        | X     | X                  |                   |
| Fam83d          | ∅     | X                  |                   | Tpgs2           | X     |                    |                   |
| Fanca           | ∅     | ∅                  |                   | Tppp            | X     |                    |                   |
| Foxp3           | X     |                    |                   | Trim3           | ∅     | X                  |                   |
| Gabarap         | X     |                    |                   | Trip6           | ∅     | X                  |                   |
| Gas2l2          | X     |                    |                   | Trps1           | ∅     | ∅                  |                   |
| Gprin2          | ∅     | ∅                  | X                 | Tuba1b          | X     |                    |                   |
| Hmg20b          | ∅     | X                  |                   | Tuba3a          | X     |                    |                   |
| Katna1          | X     |                    |                   | Tubb2b          | X     |                    |                   |
| Kntc1           | X     |                    |                   | Tubg2           | X     |                    |                   |
| Kptn            | X     |                    |                   | Txndc17         | X     |                    |                   |
| Map10           | X     |                    |                   | Ubc             | ∅     | X                  |                   |
| Map1lc3b        | X     |                    |                   | Wwc1            | X     | ∅                  |                   |
| Map3k10         | X     |                    |                   | Zbtb8a          | ∅     | X                  | X                 |

**Figure 47 :** Tableau récapitulatif des cibles sélectionnées à partir des extraits totaux et affectant le positionnement des noyaux dans au moins l'un des trois systèmes *in vitro* utilisés. X indique que l'inhibition d'expression de la protéine concernée entraîne une altération du positionnement des noyaux dans le système mentionné. A l'inverse, ∅ indique que l'inhibition d'expression des candidats n'affecte pas le positionnement des noyaux. Enfin, les cases grisées indiquent que le test n'a pas été réalisé dans la condition concernée.



## **CHAPITRE 4 - LA PROTEINE ZBTB8A**

A l'issu du criblage utilisant des ARN interférents de type siRNA, deux protéines ont été sélectionnées afin de mieux comprendre leur rôle sur le positionnement des noyaux dans le système musculaire. Il s'agit des protéines NuMA1, dont l'étude sera détaillée ultérieurement dans ce manuscrit, et Zbtb8a, dont les résultats préliminaires ont été présentés dans les paragraphes précédents.

La protéine Zinc finger and BTB domain-containing protein 8A (Zbtb8a) fait partie de la famille des facteurs de transcription POK. Les protéines de la famille POK jouent des rôles essentiels à divers processus biologiques tels que l'apoptose, la différenciation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, le développement embryonnaire, la suppression tumorale ainsi que l'oncogenèse (Costoya, 2007 ; Kelly et Daniel, 2006).

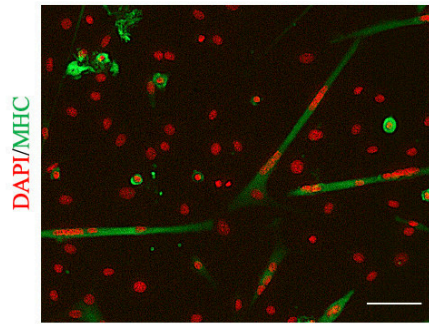
Zbtb8a est une petite protéine de 67 kb. Cette protéine contient deux domaines en doigt de zinc qui lui permettent de lier l'ADN, et se localise dans le noyau. Il a été montré que Zbtb8a est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Kim et al., 2013) et se trouve fortement exprimée dans les tissus cancéreux du poumon, de la prostate ou encore du col de l'utérus. A ce jour, le rôle de Zbtb8a dans les cellules musculaires reste méconnu.

### **I. Rôle de Zbtb8a dans les myotubes immatures**

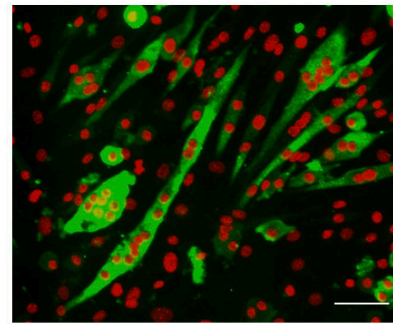
#### **1) Rôle sur le positionnement des noyaux dans les myotubes primaires**

Le rôle de la protéine Zbtb8a sur le positionnement des noyaux dans les phases précoces de développement musculaire a été identifié au cours du criblage siRNA (Fig.43). En effet, l'inhibition d'expression de la protéine Zbtb8a entraîne une altération de la répartition des noyaux le long des myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* (Fig.48A-D). Ainsi, la répartition homogène des noyaux observée le long des myotubes contrôles est perdue dans les myotubes dans lesquels l'expression de la protéine Zbtb8a est inhibée (Fig.48C-D). Ces derniers ont tendance à se positionner préférentiellement au centre du myotube (Fig.48D-H) sans toutefois s'agréger (Fig.48G). Le phénotype des myotubes transfectés par un siRNA ciblant *Zbtb8a* se trouve également perturbé avec une aire augmentée (Fig.48E) alors que la longueur reste inchangée (Fig.48F) pour un même contenu en noyaux.

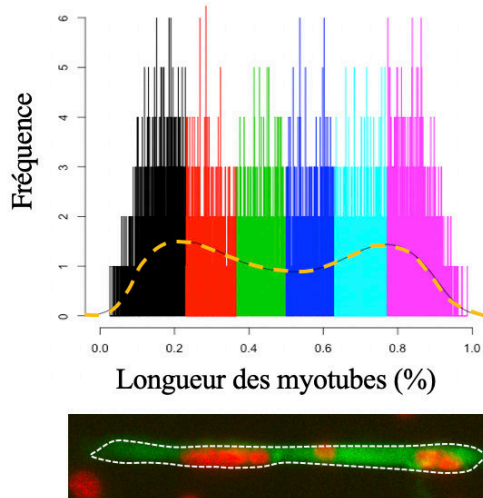
**A** *Scramble* ARN interférent



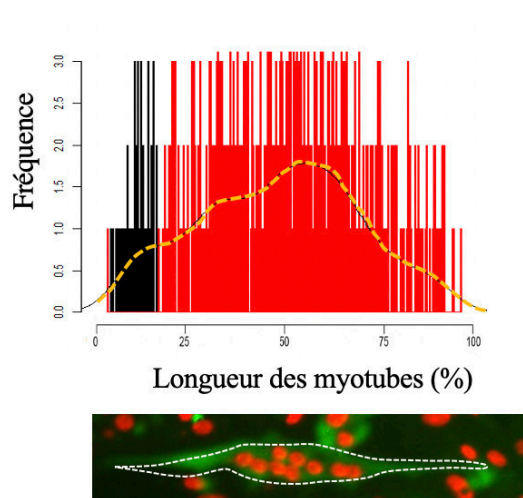
**B** *Zbtb8a* ARN interférent



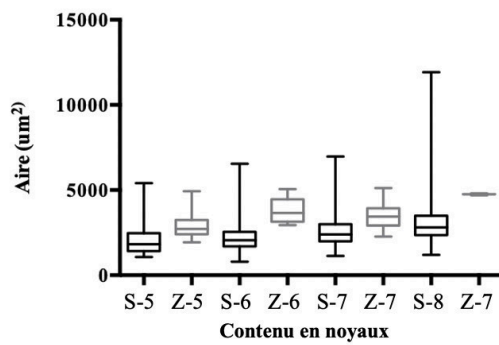
**C** Répartition statistique des noyaux  
*Scramble* ARN interférent



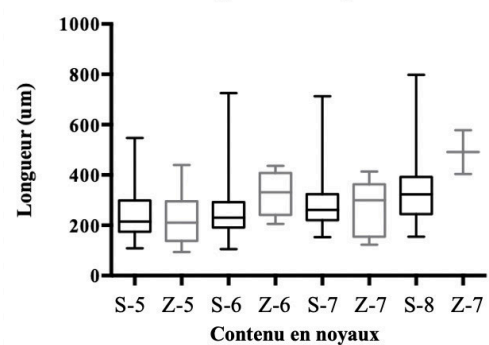
**D** Répartition statistique des noyaux  
*Zbtb8a* ARN interférent



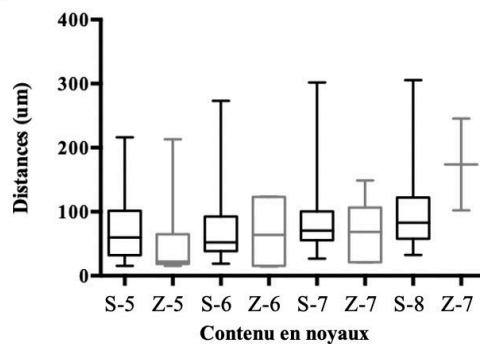
**E** Aire des myotubes



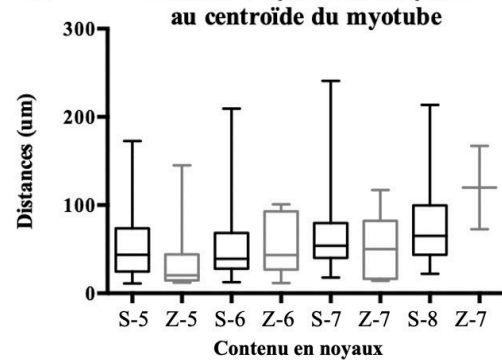
**F** Longueur des myotubes



**G** Distance moyenne entre noyaux



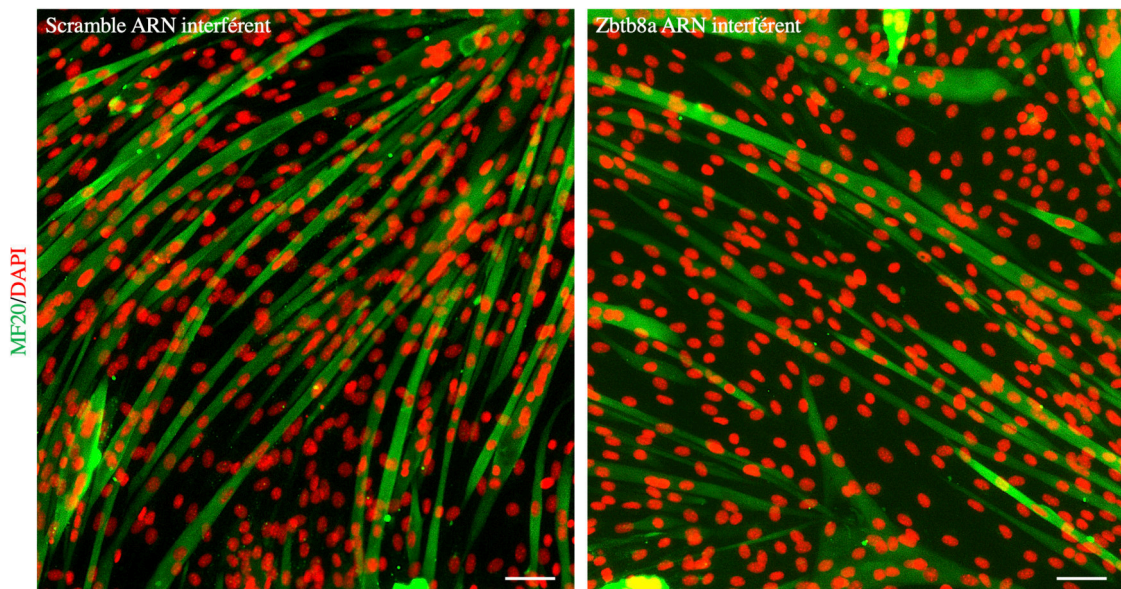
**H** Distance moyenne des noyaux  
au centroïde du myotube



**Figure 48 :** Effets de l'inhibition d'expression de Zbtb8a sur les myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro*. **A-B.** Marquage immunofluorescent de la chaîne lourde de la myosine (en vert) et des noyaux (en rouge) dans les myotubes primaires en condition contrôle (A) et en absence d'expression de Zbtb8a (B). La barre d'échelle représente 100 $\mu$ m. **C-D.** Graphique représentant la répartition statistique des noyaux le long des myotubes contrôles (C) et des myotubes dont l'expression de Zbtb8a a été inhibée (D). La lignée pointillée orange représente la courbe de densité des noyaux. **E-F-G-H.** Aire (E), longueur des myotubes (F), distance moyenne entre noyaux adjacents (G) et distance moyenne des noyaux au centroïde du myotube (H) classifiées selon le contenu en noyaux des myotubes analysés. Le boîte à moustache noire représentent la condition contrôle alors que les boîtes à moustache grises représentent la condition où l'expression de Zbtb8a a été inhibée. n(Scramble-siRNA)=408 myotubes ; n(Zbtb8a-siRNA)=50 myotubes.

## 2) Étude du rôle de Zbtb8a dans les C2C12

Afin de mieux comprendre l'implication de Zbtb8a dans les myotubes issus de C2C12, le même protocole a été réalisé. A l'issue de 6 jours de différenciation *in vitro*, les paramètres de fusion et d'agrégation des noyaux ont été appréciés. Il s'avère qu'inhiber l'expression de la protéine Zbtb8a n'entraîne aucun défaut du processus de fusion ni de positionnement des noyaux (Fig.49). Cette différence d'effet sur le positionnement des noyaux par la protéine Zbtb8a entre des myotubes de cellules primaires et de cellules C2C12, peut s'expliquer par la cinétique de différenciation qui diffère entre ces deux systèmes musculaires *in vitro*. En effet, les processus de fusion et de différenciation sont ralentis dans les cellules C2C12.

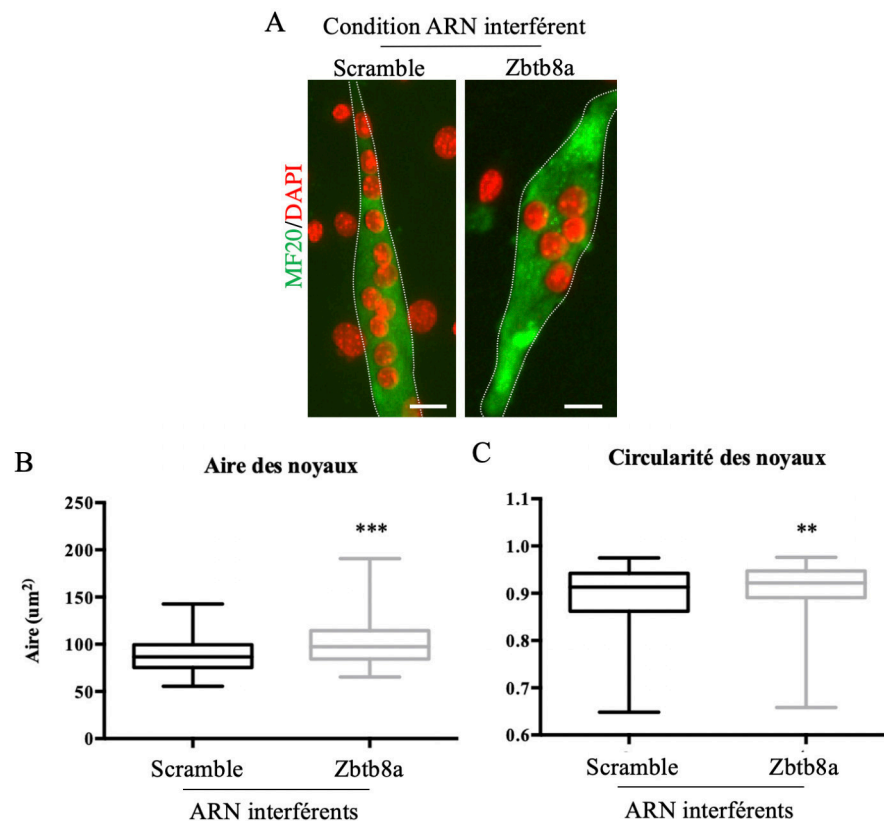


**Figure 49 :** Effet de l'inhibition d'expression de Zbtb8a dans les myotubes issus de 6 jours de différenciation de cellules C2C12. Les myotubes ont été marqués pour la chaîne lourde de la myosine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente 70 $\mu$ m.

### 3) Rôle sur la forme des noyaux

#### a. Dans les myotubes primaires

Lors de l'analyse du positionnement des noyaux dans les myotubes immatures, il est apparu que les noyaux constituant les myotubes dans lesquels l'expression de *Zbtb8a* est inhibée semblaient avoir une forme altérée (Fig.50A). En effet, ceux-ci paraissaient être davantage circulaires. Dans le but de confirmer cette observation, des paramètres de forme des noyaux, telles que l'aire et la circularité, ont été quantifiés dans les myotubes primaires (Fig.50). L'aire ( $88,5\mu\text{m}^2 \pm 1,11$  pour les noyaux contrôles *versus*  $101,6\mu\text{m}^2 \pm 1,64$  pour les noyaux des myotubes traités par un ARN interférent de type siRNA ciblant *Zbtb8a*) (Fig.50B) ainsi que la circularité ( $0,89 \pm 0,0035$  pour les noyaux contrôles *versus*  $0,91 \pm 0,003$  pour les noyaux des myotubes traités par un siRNA ciblant *Zbtb8a*) (Fig.50C) des noyaux composant les myotubes transfectés par un ARN interférent ciblant *Zbtb8a* sont significativement augmentées.



**Figure 50 :** Effet de la protéine *Zbtb8a* sur la forme des noyaux dans les myotubes primaires. **A.** Immunofluorescence de myotubes primaires contrôles et en condition de déplétion de *Zbtb8a* après 3 jours de différenciation *in vitro*, marqués pour la chaîne lourde de la myosine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). La barre d'échelle représente  $20\mu\text{m}$ . **B-C.** Mesure de l'aire (B) et de la circularité (C) des noyaux constituant les myotubes. 261 noyaux ont été quantifiés pour les myotubes transfectés avec un siRNA Scramble et 194 noyaux pour les myotubes transfectés avec un siRNA ciblant *Zbtb8a*. Des T-tests ont été réalisés sur ces quantifications ; \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .  $n(\text{Scramble-siRNA}) = 229$  noyaux ;  $n(\text{Zbtb8a-siRNA}) = 195$  noyaux.

## b. Dans les myotubes C2C12

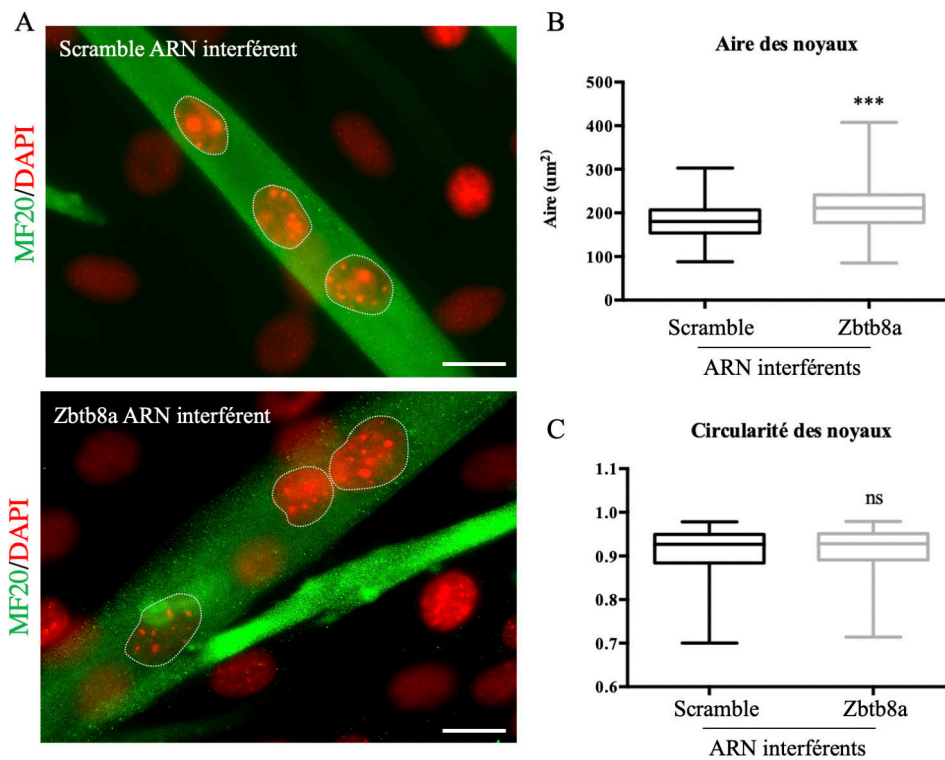
Les paramètres de forme des noyaux ont également été mesurés dans les myotubes issus de cellules C2C12. L'aire des noyaux des myotubes dans lesquels *Zbtb8a* est inhibée est significativement augmentée ( $213,6\mu\text{m}^2 \pm 3,89$ ) en comparaison à celle des noyaux des myotubes contrôles ( $183,8\mu\text{m}^2 \pm 2,61$ ) (Fig.51B). En revanche, la circularité des noyaux n'est pas significativement affectée en condition d'inhibition de *Zbtb8a* ( $0,91 \pm 0,0036$  pour les noyaux contrôles *versus*  $0,92 \pm 0,0031$  pour les noyaux des myotubes traités par un siRNA ciblant *Zbtb8a*) (Fig.51C)

Ainsi, bien que *Zbtb8a* n'affecte pas le positionnement des noyaux au sein des myotubes C2C12, il s'avère que cette protéine est impliquée dans le maintien de la forme des noyaux de ces myotubes.

A l'obtention de ces résultats, deux hypothèses ont été émises :

- Étant donné que *Zbtb8a* est décrite comme un facteur de transcription, il est possible que son absence des noyaux des myotubes transfectés avec un siRNA ciblant *Zbtb8a* entraîne une modification dans l'organisation chromatinienne et, *in fine*, un changement dans la forme du noyau.
- A cette étape de la différenciation musculaire, ce sont les microtubules et les moteurs moléculaires associés qui, en exerçant des forces sur les noyaux, régulent leur positionnement (Gache et al., 2017). Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle *Zbtb8a* serait cytoplasmique et régulerait la dynamique des microtubules. Ainsi, en condition où *Zbtb8a* est déplétée, les MTs exerceraient moins de force sur les noyaux, ce qui entraînerait finalement une modification de leur forme.





**Figure 51 :** Effet de la protéine Zbtb8a sur la forme des noyaux dans les myotubes C2C12.

**A.** Immunofluorescence de myotubes C2C12 contrôles et en condition de déplétion de Zbtb8a marqués pour la chaîne lourde de la myosine (en vert) et pour les noyaux (en rouge) après 3 jours de différenciation *in vitro*. La barre d'échelle représente 10µm. **B-C.** Mesure de l'aire (B) et de la circularité (C) des noyaux constituant les myotubes. 230 noyaux ont été quantifiés pour les myotubes transfectés avec un siRNA Scramble et 250 noyaux pour les myotubes transfectés avec un siRNA ciblant *Zbtb8a*. Des T-tests ont été réalisés sur ces quantifications ; ns  $p > 0.05$  ; \*\*\*  $p < 0.0001$ . n(Scramble-siRNA) = 230 noyaux ; n(*Zbtb8a*-siRNA) = 250 noyaux.

#### 4) Rôle sur la dynamique microtubulaire

##### a. Approche méthodologique et résultats

Nous avons voulu tester l'hypothèse microtubule-dépendante présentée précédemment. Pour cela, des myoblastes primaires ont été co-transfectés avec un ARN interférent de type siRNA (Scramble ou ciblant *Zbtb8a*) ainsi que le plasmide EB1 couplé à la GFP qui permet de visualiser l'extrémité positive en croissance des microtubules, également appelée comète. Les cellules ont été filmées durant 15 secondes, avec une image prise toutes les 150ms. Les enregistrements ont été réalisés à l'étape de prolifération (Fig.52A-B) et à l'étape de myotubes (Fig.52C-D).

Les longueurs de comètes ont été mesurées sur des projections successives de 2x450ms. Celles-ci ont été associées en une image unique présentant la première projection de 450 msec en vert et la seconde projection présentant les 450msec suivantes en rouge (Fig.52B-D). Seules les comètes polymérisant dans le même plan focal ont été mesurées de façon à avoir une mesure la plus représentative possible. Pour cela, les comètes présentant une longueur égale entre les deux projections ont été analysées.

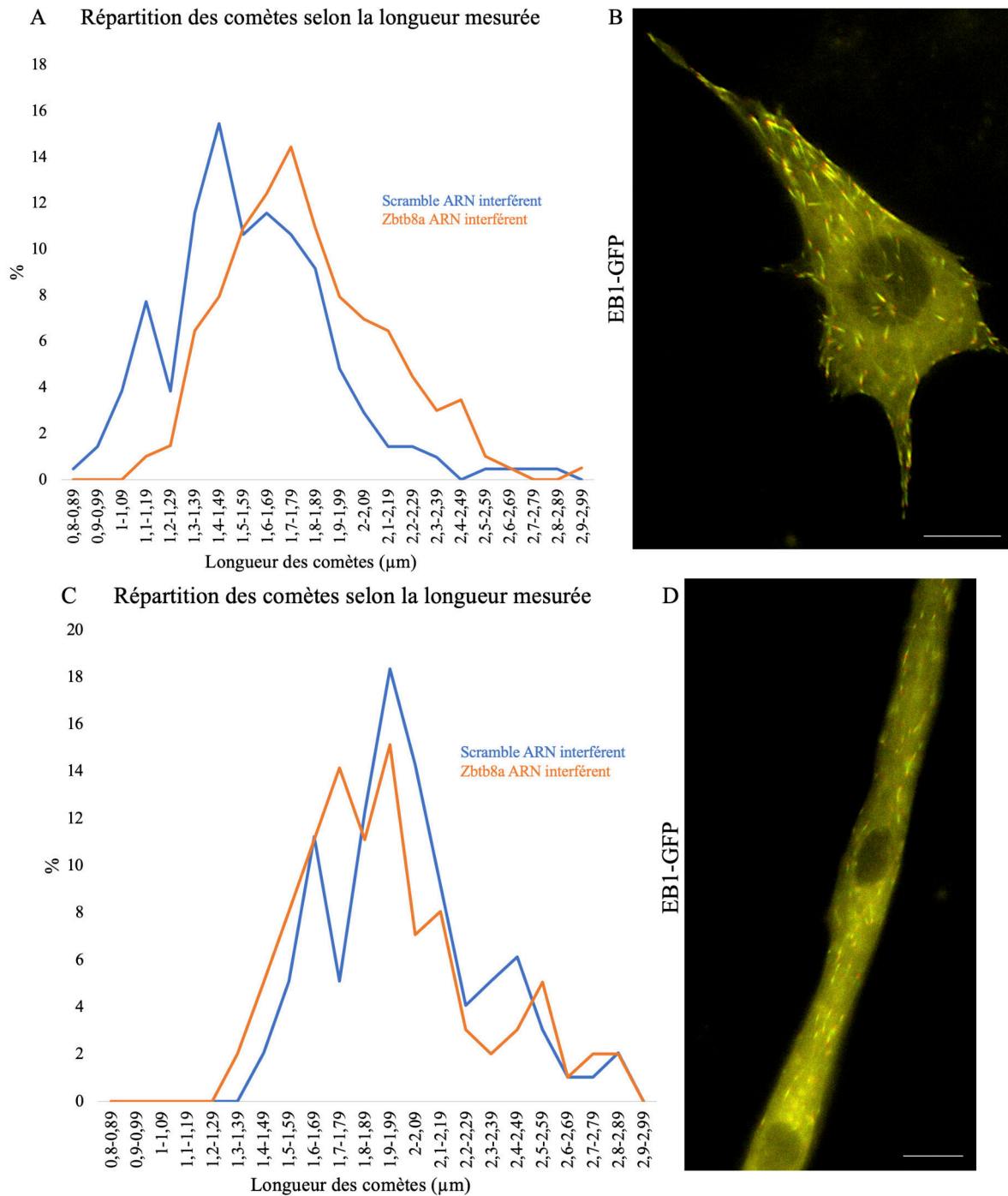
Dans les myoblastes, les comètes évoluant dans un environnement où l'expression de *Zbtb8a* a été inhibée ont une longueur augmentée de 20% en comparaison aux comètes des myoblastes contrôles. En effet, dans les conditions contrôles, la majorité des comètes mesurent entre 1,4 et 1,5 $\mu$ m de long. Ce pic est décalé dans la condition où l'expression de *Zbtb8a* est inhibée. Dans cette dernière condition, la majorité des comètes mesurent entre 1,7 et 1,8 $\mu$ m (Fig.52A).

Ainsi sur une même période de temps, l'extrémité en croissance des microtubules des myoblastes dans lesquels l'expression de *Zbtb8a* est inhibée présente une augmentation de sa longueur. Ce résultat suggère que l'inhibition de *Zbtb8a* entraîne une augmentation de la vitesse de polymérisation dans les myoblastes. Ainsi, la protéine *Zbtb8a* pourrait jouer un rôle sur le taux de polymérisation des microtubules.

Toutefois et contre toute attente, cet effet n'est pas observé dans les myotubes (Fig.52C).

##### b. Limite de l'approche

L'utilisation d'ARN interférent ne permet pas de discerner les cellules transfectées de celles qui ne le sont pas. Il a donc fallu analyser les myotubes qui présentaient le phénotype caractéristique des myotubes en condition d'inhibition d'expression de *Zbtb8a* (Fig.48), et qui exprimaient le plasmide EB1-GFP. Toutefois, l'efficacité de la co-transfection était assez faible. La plupart des myotubes présentant le phénotype typique des myotubes n'exprimant plus *Zbtb8a* n'exprimaient pas le plasmide EB1-GFP.



**Figure 52 :** Mesure des comètes sur myoblastes et myotubes.

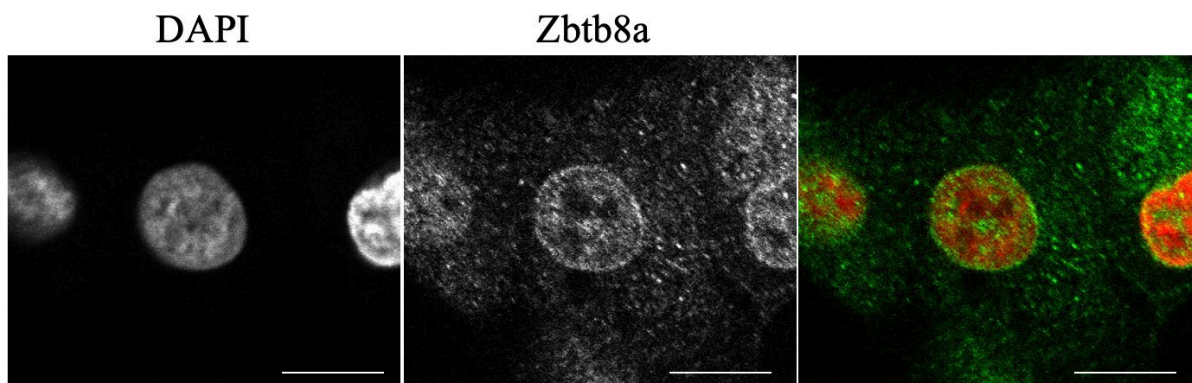
**A-C.** Répartition des comètes en fonction de leur longueur dans des myoblastes (A) et dans des myotubes (C). La courbe de répartition bleue représente la condition contrôle alors que la courbe orange représente la condition où l'expression de *Zbtb8a* est inhibée.  $n$  (Scramble-siRNA)=207 comètes ;  $n$ (*Zbtb8a*-siRNA)=201 comètes. Dans les myotubes, 98 comètes ont été analysées en condition contrôle et 99 en condition d'inhibition d'expression de *Zbtb8a*. **B-D.** Compilation de deux projections consécutives de 450ms chacune au sein d'un myoblaste (B) et d'un myotube (D). Le marquage vert correspond à la première projection ; le marquage rouge correspond à la projection des 450ms suivantes. La barre d'échelle correspond à 10µm.

## 5) Localisation subcellulaire de Zbtb8a dans les myotubes immatures

Afin de mieux comprendre le rôle de Zbtb8a dans le positionnement des noyaux, un marquage immunofluorescent de la protéine Zbtb8a a été réalisé sur myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* (Fig.53).

Grâce à cette expérience, nous avons pu identifier sa double localisation : nucléaire et à l'enveloppe nucléaire. La protéine Zbtb8a a donc une localisation à l'interface entre le noyau et les microtubules. De part cette localisation stratégique, la protéine Zbtb8a pourrait ainsi participer à l'ancrage des microtubules aux noyaux et ainsi contrôler le mouvement des noyaux au cours de la différenciation musculaire.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si Zbtb8a se localise au niveau de la membrane nucléaire interne et/ou externe.



**Figure 53 :** Localisation subcellulaire de la protéine Zbtb8a dans des myotubes primaires. Les myotubes sont marqués pour la protéine Zbtb8a (vert) et pour les noyaux (rouge). La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m.

## II. Rôle de *Zbtb8a* dans les fibres musculaires matures

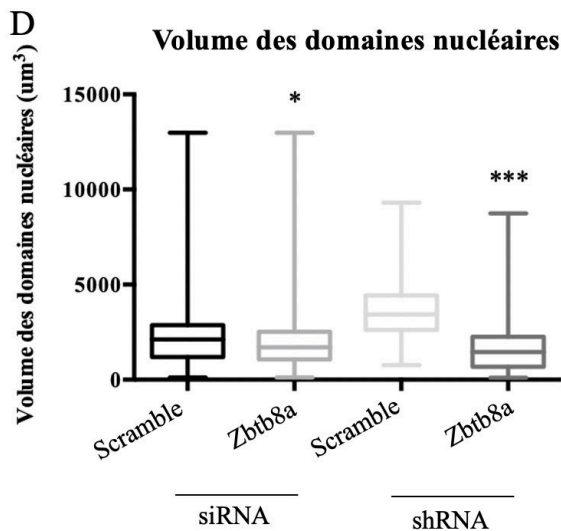
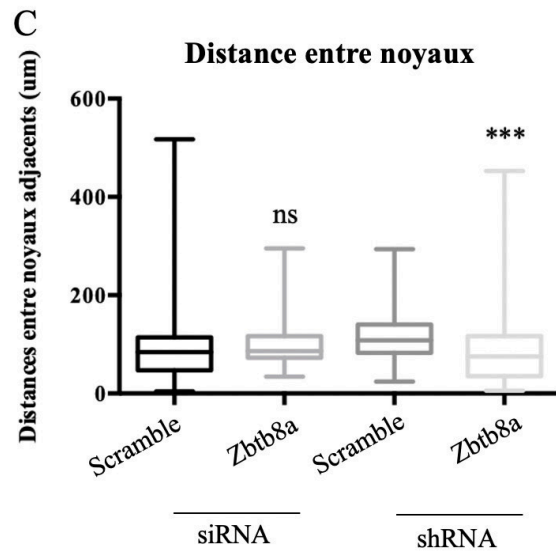
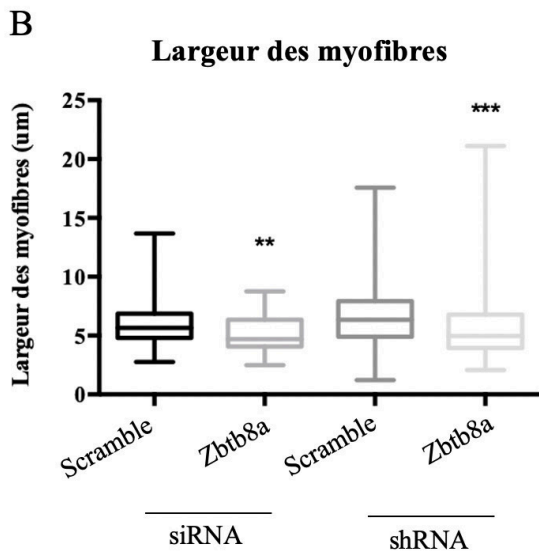
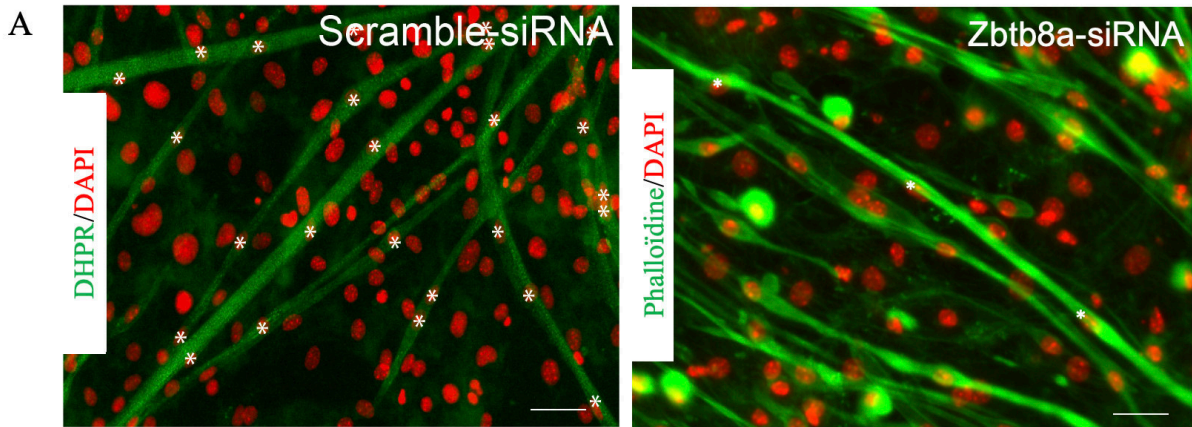
De façon à mieux caractériser le rôle de *Zbtb8a* sur le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire, des cellules primaires ont été transfectées avec un ARN interférent, soit de type siRNA, soit de type shRNA. Puis les cellules ont été différenciées jusqu'à obtenir des fibres musculaires matures après 10 jours de différenciation *in vitro* (Fig.54A). Les cultures cellulaires ont ensuite été fixées, immunomarquées et le positionnement des noyaux a été analysé (Fig.54B-C).

En condition d'inhibition d'expression de *Zbtb8a*, que ce soit par l'utilisation de siRNA ou de shRNA, les fibres musculaires sont significativement moins larges (pour les siRNA :  $6,12\mu\text{m} \pm 0,19$  pour les fibres contrôles *versus*  $5,14\mu\text{m} \pm 0,25$  pour les myofibres traitées avec le siRNA *Zbtb8a*. Pour les shRNA :  $6,71\mu\text{m} \pm 0,11$  pour les fibres contrôles *versus*  $5,63\mu\text{m} \pm 0,21$  pour les myofibres traitées avec le shRNA *Zbtb8a*) (Fig.54B).

En revanche, concernant la distance entre noyaux, les résultats obtenus entre les myofibres traitées avec le siRNA et celles traitées avec le shRNA ne concordent pas. Alors que les fibres musculaires traitées avec le siRNA ne présentent pas de différence significative ( $87,2\mu\text{m} \pm 3,05$  pour les fibres contrôles *versus*  $97,9\mu\text{m} \pm 3,98$  pour les myofibres traitées avec le siRNA *Zbtb8a*), les fibres musculaires transfectées avec le shRNA ciblant *Zbtb8a* ont une distance entre noyaux adjacents significativement diminuée ( $115,3\mu\text{m} \pm 2,19$  pour les fibres contrôles *versus*  $93,2\mu\text{m} \pm 5,64$  pour les myofibres traitées avec le shRNA *Zbtb8a*) (Fig.54C).

Sur la base des mesures de largeur de fibres musculaires et de distance entre noyaux adjacents, nous avons extrapolé sur le volume des domaines nucléaires (Fig.54D). Ainsi, de façon générale, lorsque l'expression de *Zbtb8a* est inhibée dans les fibres musculaires matures, que ce soit en condition de siRNA ou de shRNA, le volume des domaines nucléaires est significativement diminué en comparaison à celui calculé dans les fibres musculaires contrôles (pour les siRNA :  $2187,3\mu\text{m}^3 \pm 76,49$  pour les fibres contrôles *versus*  $1692,9\mu\text{m}^3 \pm 68,52$  pour les myofibres traitées avec le siRNA *Zbtb8a*. Pour les shRNA :  $3651\mu\text{m}^3 \pm 76,60$  pour les fibres contrôles *versus*  $1592,7\mu\text{m}^3 \pm 57,26$  pour les myofibres traitées avec le shRNA *Zbtb8a*).

Nos résultats indiquent donc que la protéine *Zbtb8a* est également importante pour le maintien de l'homéostasie de la fibre musculaire mature ainsi que pour le positionnement des noyaux dans les étapes tardives de différenciation musculaire.



**Figure 54 :** Rôle de *Zbtb8a* dans les fibres musculaires matures.

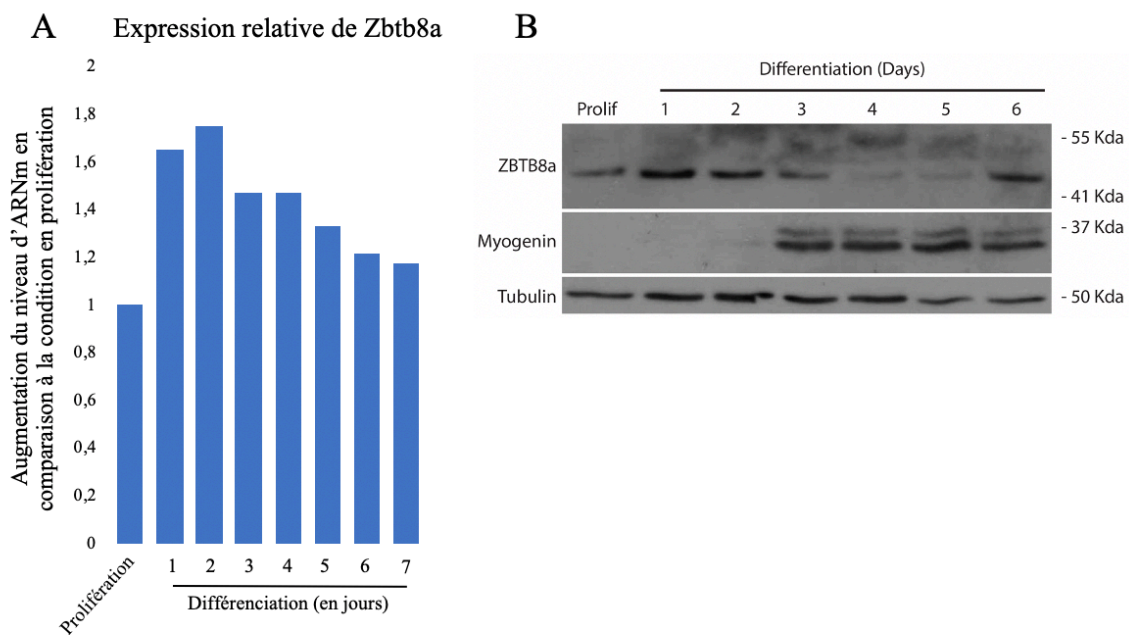
**A.** Marquage immunofluorescent de fibres musculaires matures transfectées à l'aide de siRNA Scramble (gauche) et ciblant *Zbtb8a* (droite). Les myofibres contrôles sont marquées pour le récepteur aux dihydropyridines (en vert) et les noyaux (en rouge). Les myofibres transfectées avec le siRNA ciblant *Zbtb8a* sont marquées pour l'actine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). Les barres d'échelle représentent 60µm.

**B-C-D.** Mesures des paramètres de largeur des fibres (B), distance entre noyaux adjacents (C) et volume des domaines nucléaires des fibres musculaires.  $n(\text{Scramble-siRNA})=381$  ;  $n(\text{Zbtb8a-siRNA})=100$  ;  $n(\text{Scramble-shRNA})=406$  ;  $n(\text{Zbtb8a-shRNA})=438$ . Des T-tests ont été réalisés. ns  $p>0.05$  ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

### III. Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire

L'étude de la cinétique d'expression de Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire a été réalisée aux niveaux transcriptomique (Fig.55A) et protéique (Fig.55B). Pour cela, des cinétiques sur cellules C2C12 ont été réalisées. Les taux d'ARNm et de protéine Zbtb8a augmentent au début de la différenciation musculaire. Le niveau des transcrits de *Zbtb8a* atteint un pic au 2<sup>ème</sup> jour de différenciation *in vitro* puis diminue (Fig.55A), alors que le niveau protéique de Zbtb8a atteint un pic au 1<sup>er</sup> jour de la différenciation puis diminue à son tour (Fig.55B).

Du fait de sa prépondérance à l'initiation de la différenciation, la protéine Zbtb8a semble importante au processus de fusion ainsi qu'aux premières étapes de la différenciation musculaire.



**Figure 55 :** Cinétique de transcription et d'expression de Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire des cellules C2C12.

**A.** Cinétique présentant l'évolution de la quantité d'ARNm de Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire. n=1 expérience. **B.** Cinétique présentant l'évolution du taux de protéine Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire. n=1 expérience.

#### **IV. Conclusions**

Les résultats préliminaires obtenus concernant la protéine Zbtb8a ont permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine dans le processus de positionnement des noyaux tout au long de la différenciation musculaire. Sa localisation préférentielle au niveau de l'enveloppe nucléaire permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle Zbtb8a pourrait faire potentiellement partie des protéines du complexe LINC et pourrait ainsi participer à l'ancrage des microtubules au niveau de l'enveloppe nucléaire. Elle permettrait ainsi de participer à la transmission des forces exercées par les microtubules sur les noyaux des cellules musculaires pour les mouvoir tout au long de la myogenèse.





## **CHAPITRE 5 - LA PROTÉINE NuMA1**

Identifiée pour la première fois il y a 40 ans, NuMA1 est une protéine de 238kDa (Lydersen et Pettijohn,1980). Cette protéine a été décrite comme étant nucléaire dans les cellules en interphase et devenant cytoplasmique, localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique, au cours de la division cellulaire (Lydersen et Pettijohn,1980).

D'autres travaux ont identifiés cette protéine et plusieurs noms lui ont été attribués : Centrophilin (Tousson et al., 1991), SP-H (Maekawa et al., 1991) ou encore SPN (Kallajoki et al., 1991). C'est seulement après leur clonage, en 1992, que Compton et al. ont montrés que la Centrophilin, SPN et NuMA1 étaient finalement la même protéine.

Cette protéine est délimitée par deux extrémités globulaires qui sont séparées par 1500 acides aminés formant un domaine coiled-coil (Yang et al., 1992). La partie C-terminale comporte une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Gueth-Hallonet et al., 1996) mais également de nombreux sites d'interaction. En effet, NuMA1 possède des domaines qui lui permettent d'interagir avec les microtubules (Gallini et al., 2016 ; Du et al., 2002 ; Seldin et al., 2016 ; Haren et Merdès, 2002), les lipides (Kotak et al., 2014 ; Zheng et al., 2014), l'importin- $\alpha$  (Chang et al., 2017), la protéine 4.1R (Kiyomitsu et Cheeseman, 2013- 23870127 ; Seldin et al., 2013), la protéine LGN (Du et al., 2001 ; Du et Macara, 2004) ou encore avec la protéine des pores nucléaires Rae1 (Wong et al., 2006 ; Stockum et al., 2018).

### **I. Découverte historique**

Le rôle de cette protéine a historiquement été découvert dans le processus de mitose. A chaque cycle cellulaire, un fuseau mitotique bipolaire s'assemble de façon à ségréger l'ADN répliqué en deux cellules filles (Prosser et Pelletier, 2017). Ce fuseau mitotique est une structure dynamique temporaire qui s'assemble et se désagrège à chaque début et fin de mitose, et qui consiste en deux pôles protéiques qui permettent la nucléation des microtubules, qui y sont ancrés *via* leur extrémité négative. Historiquement, des micro-injections d'anticorps inhibiteurs de NuMA1 dans des cellules de mammifères ont été réalisées à différentes étapes de la mitose (Yang et Snyder, 1992). De plus, des expressions de mutants de NuMA1 qui expriment des formes tronquées en C-ter et en N-ter (Compton et Cleveland, 1993) ont été réalisées pour mieux comprendre le rôle de NuMA1 dans ce processus. Dans les deux cas, cela a conduit à la formation de fuseaux aberrants. Alors que de nombreuses études avaient mis en évidence que NuMA1 pouvait être requise pour réassembler le noyau et ainsi achever la mitose (Kallajoki et al., 1991 ; Cleveland, 1995), il a finalement été montré que ces phénotypes reflètent le rôle de NuMA1 qui consiste à focaliser les microtubules à chaque pôle du fuseau mitotique (Merdès et al., 1996 ; Merdès et Cleveland, 1997).

## II. Rôle au cours de la division cellulaire

Depuis ces découvertes historiques, de nombreuses études ont été menées et ont permis d'apporter une meilleure compréhension du rôle de NuMA1 dans le processus mitotique.

### 1. Relocalisation aux pôles du fuseau mitotique

Au début de la mitose, la localisation et l'activité de NuMA1 répondent à la signalisation de Ran<sup>GTP</sup> (Wiese et al., 2001) ainsi qu'à différents événements de phosphorylation.

Simultanément à la destruction de l'enveloppe nucléaire, NuMA1 va adopter une localisation stratégique aux pôles du fuseau mitotique (Tousson et al., 1991 ; Maekawa et al., 1991 ; Dionne et al., 1999), mais aussi au niveau des régions corticales des cellules en division (Kiyomitsu et Cheeseman, 2012) (Fig.56). Ce positionnement de NuMA1 au sein des cellules en division passe par le complexe protéique Dynéine/Dynactine (Merdes et al., 1996 ; Merdes et al., 2000 ; Hueschen et al., 2017). Cette interaction essentielle permet de recruter la dynéine au cortex de la cellule, où elle favorisera l'organisation des microtubules astraux (Gaglio et al., 1995 ; Merdes et al., 2000 ; Silk et al., 2009). Ce complexe protéique agit en synergie sous la forme d'agrégats grâce à l'activité d'oligomérisation de la protéine NuMA1 (Okumura et al., 2018).

Cette relocalisation de NuMA1 a lieu dans un état hyperphosphorylé de la protéine par p34<sup>cdc2</sup> (Compton et Luo, 1995). NuMA1 possède 4 sites de phosphorylation supposés par p34<sup>cdc2</sup> qui régulent potentiellement son interaction avec la dynéine et ainsi sa localisation dynéine-dépendante aux pôles du fuseau (Compton et Luo, 1995 ; Gehmlich et al., 2004 ; Sparks et al., 1995 ; Saredi et al., 1997). Des mutations dans ces sites de phosphorylation empêchent NuMA1 de s'associer aux pôles du fuseau et de se localiser à la membrane plasmique (Compton et Luo, 1995). De plus, l'état phosphorylé de NuMA1 entraîne potentiellement une augmentation de sa solubilité, qui est nécessaire pour sa relocalisation aux pôles (Saredi et al., 1997). NuMA1 reste ainsi localisée jusqu'à l'anaphase.

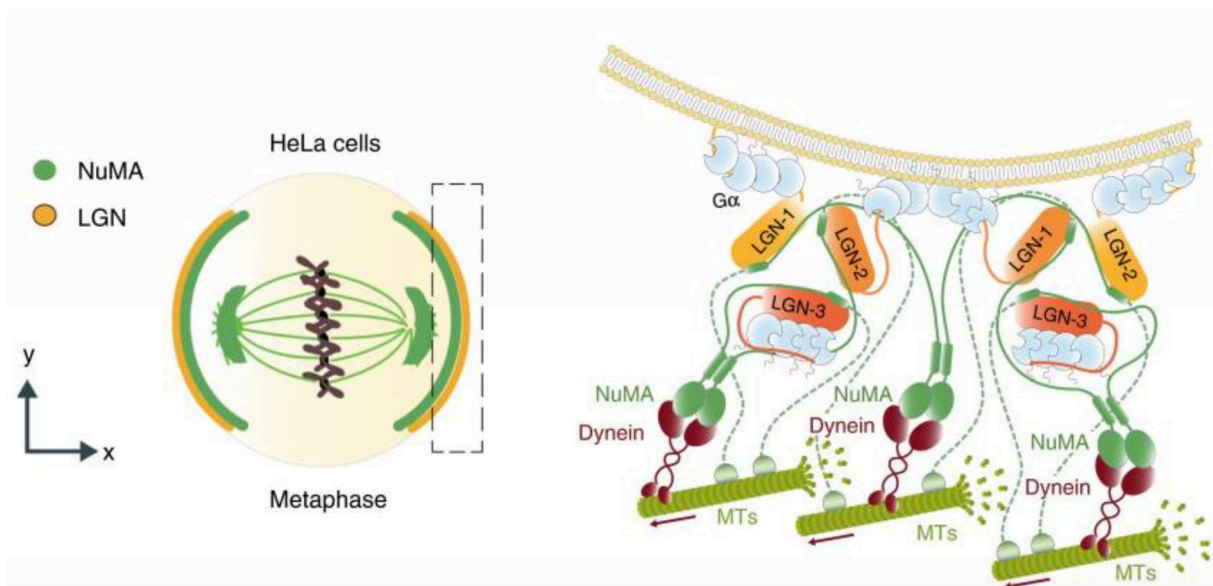
### 2. Orientation du fuseau mitotique

L'état de phosphorylation de NuMA1 permet de contrôler l'orientation du fuseau mitotique. Entre la pro-métaphase et la métaphase, la phosphorylation de NuMA1 par CDK1 sur Thr2055 régule négativement l'interaction directe entre NuMA1 et la membrane plasmique (Seldin et al., 2013 ; Zheng et al., 2014 ; Kotak et al., 2013). En effet, il a été montré dans des cellules HeLa que l'activité de Plk1 aux pôles aide à centrer le fuseau en diminuant l'affinité de NuMA1 pour la Dynéine/Dynactine (Kiyomitsu et Cheeseman, 2013). A l'inverse, la phosphorylation de NuMA1 par Abl1 est nécessaire pour accroître l'affinité du fuseau mitotique avec NuMA1 et LGN (Matsumura et al., 2012).

Des études menées chez l'embryon *C. elegans* montrent que la phosphorylation de l'orthologue NuMA1, Lin-5, par  $\alpha$ PKC réduit les forces de traction exercées par les microtubules sur la portion antérieure pour favoriser le positionnement asymétrique du fuseau (Galli et al., 2011). Des études *in vitro* et un cribble protéomique ont identifiés NuMA1 parmi les substrats de la kinase Aurora-A (Kettenbach et al., 2011 ; Toughiri et al., 2013) qui, en régulant l'état de phosphorylation de NuMA1, permettrait de contribuer à l'orientation du fuseau mitotique.

Finalement, l'inactivation de CDK1 par l'inhibition de Cyclin B entraîne la déphosphorylation de NuMA1, entraînant ainsi sa dissociation de la dynéine (Gehmlisch et al., 2004).

La présence de NuMA1 aux pôles permet ainsi le maintien du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire, et son état de phosphorylation permet quant à lui de contrôler l'orientation du fuseau (Radulescu et al., 2010).



**Figure 56 :** Modèle présentant le complexe protéique cortical requis pour réguler le positionnement du fuseau mitotique au sein des cellules en division. Les protéines « LGN-1 », « LGN-2 » et « LGN-3 » représentent la multiplicité des protéines LGN requises pour former un complexe NuMA1/Dynéine/Dynactine/LGN efficace. Tirée de Pirovano et al. (2019).

### III. NuMA1 au cours des divisions asymétriques

Les divisions asymétriques sont importantes pour le devenir des cellules durant le développement mais également lors de la division des cellules souches.

Divisions symétrique et asymétrique présentent des mécanismes très similaires. En effet, toutes deux reposent sur la formation du complexe Dynéine/NuMA1/LGN. Les divisions asymétriques nécessitent des protéines Par (Partitioning defective), qui forment le complexe Par3/Par6/ $\alpha$ PKC au pôle apical et définissent ainsi la polarité apico-basale. Ces protéines Par permettent de localiser au pôle apical la protéine G hétérotrimérique. Cette localisation est essentielle puisque la protéine LGN peut lier à la fois Gai et NuMA1, permettant ainsi de recruter, *via* Gai, la protéine NuMA1 au cortex de la cellule (Du et Macara, 2004 ; Izumi et al., 2006 ; Nipper et al., 2007).

Le mécanisme par lequel le fuseau s'ancre au cortex dépend de la dynéine, qui va générer des forces de traction sur les MTs depuis sa position corticale (Nguyen-Ngoc et al., 2007 ; Couwenbergs et al., 2007).

Étant donné que NuMA1 peut interagir avec la dynéine, mais également avec LGN/Gai, l'hypothèse selon laquelle NuMA1 permettrait de faire le lien entre la dynéine (Merdes et al., 1996 ; Nguyen-Ngoc et al., 2007 ; Couwenbergs et al., 2007) et le complexe apical LGN/Gai (Du et al., 2002 ; Du et Macara, 2004 ; Nguyen-Ngoc et al., 2007) a été émise.

NuMA1 est indispensable à ce processus ; des expériences menées chez la drosophile ont montré que des mutants de l'orthologue NuMA1, *Mud*, entraînent une division asymétrique anormale générée par un défaut d'alignement du fuseau dans l'axe de polarité (Siller et al., 2006 ; Bowman et al., 2006).

L'implication de NuMA1 dans les divisions asymétriques passe également par une régulation de la dynamique des MTs, en lien avec la sous-unité p80 de la Katanine, qui est essentielle. En effet, l'inhibition d'expression de NuMA1 dans des cerveaux de souris en développement altère la neurogenèse et la migration neuronale (Jin et al., 2017).

### IV. Régulation de la dynamique des microtubules et pathologies

#### 1. Régulation de la dynamique des microtubules

Récemment, Jin et al. (2017) ont identifié un rôle de NuMA1 dans la dynamique des microtubules, en lien avec la sous-unité p80 de la Katanine et le complexe Dynéine/Dynactine. Ainsi, cette sous-unité p80 en association avec le complexe NuMA1/Dynéine/Dynactine est essentielle pour réguler la dynamique des MTs au centrosome et au fuseau mitotique.

## 2. NuMA1 et pathologies associées

Étant donné son rôle central dans les processus de division cellulaire (symétrique et asymétrique) ainsi que son rôle sur la dynamique des MTs, l'implication de NuMA1 dans la tumorigenèse a été suggérée.

En effet, le devenir cellulaire ainsi que l'organisation tissulaire sont impliqués dans le développement de tumeurs. Ainsi, une possibilité est qu'une orientation altérée du fuseau contribuerait à la genèse de cancers (Gonzalez, 2007 ; Knoblich, 2014 ; Pease et Tirnauer, 2011). Cette hypothèse s'illustre notamment par le fait qu'une mauvaise orientation du fuseau peut être observée dans différents modèles de tumeurs (Fleming et al., 2009).

En ce sens, NuMA1 pourrait potentiellement être impliquée dans la tumorigenèse.

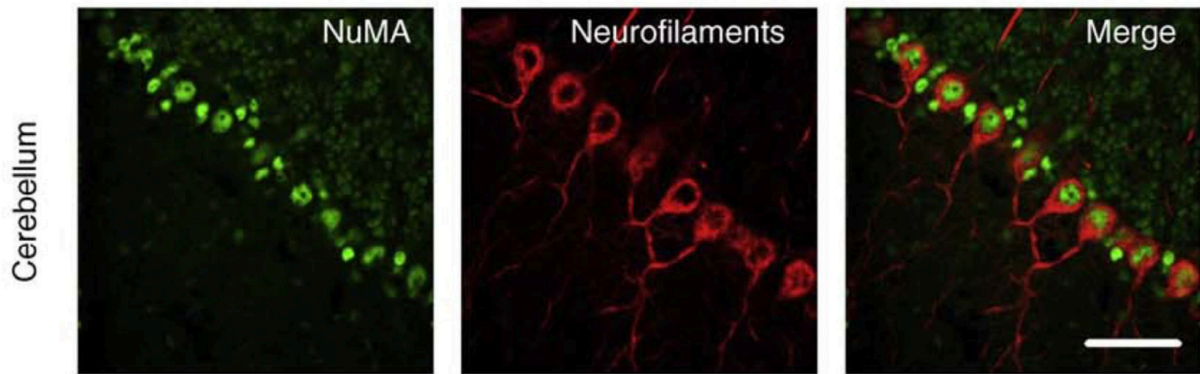
Par ailleurs, des gènes codant pour des protéines du fuseau mitotique ont été impliqués dans diverses pathologies. C'est le cas du gène *MCPH* dont les mutations peuvent provoquer une pathologie de type microcéphalie (Thornton et Woods., 2009). C'est également le cas de la protéine Huntingtin (Godin et Humbert, 2011), dont certaines mutations, entraîne la maladie de Huntington.

Ainsi, le rôle de NuMA1 dans l'organisation du fuseau mitotique, le devenir cellulaire, l'organisation tissulaire ou encore la dynamique des microtubules, pourrait l'impliquer dans les pathologies précédemment présentées.

## V. Rôle nucléaire de NuMA1

### 1. Composante de la matrice nucléaire

Observée dans les noyaux des cellules en interphase (Lydersen et Pettijohn, 1980 ; Merdes et Cleveland, 1998) ou encore dans les noyaux de neurones post-mitotiques (Fig.57), le rôle de NuMA1 n'est pas limité aux pôles du fuseau mitotique lors de la division cellulaire.



**Figure 57 :** Expression de NuMA1 dans les noyaux post-mitotiques de neurones. Le marquage immunofluorescent de coupes de cervelet d'une souris adulte C57BL/6 montre en vert la présence de NuMA1 dans les noyaux et, en rouge, les neurofilaments. La barre d'échelle représente 50 $\mu$ m.

L'ADN contenu dans les cellules est organisé en chromosomes linéaires compactés sous forme de chromatine dans l'espace nucléaire. Dans cet espace restreint, la chromatine est associée à divers complexes d'enzymes impliqués dans la réplication de l'ADN, la réparation ou encore l'expression génique. Des sous-compartiments nucléaires ont également été définis en fonction de la composition protéique des structures (Dellaire et Bazett-Jones, 2004 ; Lamond et Spector, 2003). Il s'agit par exemples des nucléoles, des granules (communément appelées speckles) ou encore des corps nucléaires. Dans ce contexte, une matrice protéique nucléaire pourrait être responsable du maintien de l'organisation génomique et de l'identité fonctionnelle de ces structures.

Ce concept de matrice nucléaire, initialement proposé par Berezney et Coffey (1974), est défini comme un réseau tridimensionnel de protéines de structure insolubles qui reste dans le noyau même en absence de membrane et de chromatine. Ce concept a été repris par Nickerson et Penman (Capco et al., 1982 ; Nickerson et al., 1997), qui ont suggéré que cette matrice protéique fournit une structure pour la compartimentalisation au sein du noyau, à l'image du cytosquelette dans le cytoplasme. Les constituants proposés de cette matrice nucléaire sont les lamines (Gerace et Blobel, 1982 ; Gerace et al., 1984) et des protéines liant les lamines et s'associant à la membrane (Schirmer et Foisner, 2007).

Les caractéristiques et propriétés de la protéine NuMA1 en font également un candidat idéal à la composition de cette matrice :

- Le maintien de cette protéine dans les noyaux post-mitotiques suggère un rôle actif de cette protéine dans le noyau.
- NuMA1 contient un grand domaine coiled-coil qui lui permet potentiellement de s'assembler sous la forme de filaments (Saredi et al., 1996).
- Son domaine coiled-coil lui permet de s'assembler en dimères puis en structure d'ordre supérieure tels que des oligomères (Harborth et al., 1999).
- NuMA1 est très abondante dans le noyau, elle est estimée à 10<sup>6</sup> copies (Kempf et al., 1994).

## 2. Rôle dans divers processus nucléaires

Diverses études ont ainsi montré l'importance de la protéine NuMA1 dans le noyau des cellules. En effet, NuMA1 est impliquée dans divers processus nucléaires qui sont présentés ci-dessous.

L'hypothèse selon laquelle NuMA1 pouvait organiser la structure nucléaire a été énoncée dès 1994, lorsque Compton et Cleveland ont montré la prévalence de NuMA1 dans le noyau après une étape d'extraction à l'aide de détergent. Par la suite, différents travaux ont montré le rôle de NuMA1 dans l'organisation de la chromatine en lien avec la différenciation épithéliale de mammifères (Abad et al., 2007 ; Chandramouly et al., 2007).

NuMA1 serait également impliquée dans l'architecture du noyau, ce rôle impliquant la distribution des granules de facteurs d'épissage ou encore l'intégrité du réseau de ribonucléoprotéines (Lelièvre et al., 1998 ; Gribbon et al., 2002 ; Barboro et al., 2003).

Par ailleurs, de nombreuses études ont révélé l'implication de NuMA1 dans différentes voies de signalisation nucléaires, telles que :

- La réponse de la chromatine aux dommages de l'ADN (Moreno et al., 2019 ; Vidi et al., 2012 ; Vidi et al., 2014),
- Les phases précoces de modifications nucléaires en lien avec l'apoptose (Lin et al., 2007 ; Hsu et Yeh, 1996 ; Gueth-Hallonet et al., 1997),
- La voie de transcription dépendante de p53 dans laquelle NuMA1 agit comme un co-activateur (Ohata et al., 2013 ; Endo et al., 2013),
- La réponse au stress nucléolaire de façon p53-indépendante (Jayaraman et al., 2017).

L'implication de NuMA1 dans ces voies de signalisation essentielles font de cette protéine un acteur clé du maintien de l'homéostasie cellulaire.

## VI. Découverte d'un rôle cytoplasmique de NuMA1 dans des cellules post-mitotiques

Bien que, dès 1998, Ferhat et al. avait déjà suggéré un rôle cytoplasmique de NuMA1 dans des neurones post-mitotiques, ce n'est qu'en 2020 que Torii et al., ont identifié un rôle transitoire de NuMA1 dans les segments initiaux des axones. La protéine NuMA1 favorise la stabilité des segments initiaux des axones en inhibant l'endocytose des protéines membranaires de cette région.

Cette publication récente montre pour la première fois un rôle cytoplasmique de la protéine NuMA1 dans des cellules post-mitotiques.

C'est dans ce contexte bibliographique que nous avons étudié le rôle de la protéine NuMA1 au cours de la différenciation musculaire.





## PUBLICATION 2 :

Cytoplasmic NuMA1 promotes microtubules stabilization and controls myonuclear spreading and neuromuscular junctions integrity of skeletal muscle

*Nathalie Couturier, Alireza Ghasemizadeh, Emilie Christin, Anaïs Kebaier, Alexandre Janin, Alexis Osseni, Jean-Luc Thomas, Laurent Schaeffer, Stéphane Konig, Jessica Brunetti, Maud Frieden, Yohann Couté, Alexandra Kraut, Audrey Garcia, Julien Courchet et Vincent Gache*



# Cytoplasmic NuMA1 promotes microtubules stabilization and controls myonuclear spreading and neuromuscular junctions integrity of skeletal muscle

Nathalie Couturier<sup>1</sup>, Alireza Ghasemizadeh<sup>1</sup>, Emilie Christin<sup>1</sup>, Anaïs Kebaier<sup>1</sup>, Alexandre Janin<sup>1</sup>, Alexis Osseni<sup>1</sup>, Jean-Luc Thomas<sup>1</sup>, Laurent Schaeffer<sup>1</sup>, Stéphane König<sup>2</sup>, Jessica Brunetti<sup>2</sup>, Maud Frieden<sup>2</sup>, Yohann Couté<sup>3</sup>, Alexandra Kraut<sup>3</sup>, Audrey Garcia<sup>1</sup>, Julien Courchet<sup>1</sup> and Vincent Gache<sup>1,4</sup>.

1 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine, Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08, France.

2 Department of Basic Neurosciences, Geneva Medical Center, 1, Rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland.

3 University Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BGE, F-38000 Grenoble, France.

4 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine, Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08, France. [vincent.gache@inserm.fr](mailto:vincent.gache@inserm.fr)

## Abstract

Skeletal muscles is a bundle of thousand of post-mitotic multinucleated cells, myofibers, within which myonuclei are regularly positioned. Nuclei motions control many cellular functions and are mainly driven by cytoskeleton and associated proteins. Internalized and mispositioned myonuclei are a hallmark of muscle phenotype in numerous muscles diseases including centronuclear myopathies. It is still unclear how myonuclei motion is regulated through myogenesis and how myonuclei are maintained at the periphery of muscle fibers. Here we identify the microtubule-associated protein NuMA1 as an essential regulator of microtubule architecture and myonuclear spreading in cultured primary mammalian myotubes and myofibers as well as *in vivo* in mature myofibers. We find that during muscle fibers formation, NuMA1 is progressively transferred from myonuclei compartment to the cytoplasm and that this process controls myonuclei motion through the regulation of nucleus-microtubule-organizing-center (nMTOC). In association with dynein-1 heavy chain-1, NuMA1 shapes microtubules orientation in muscle fibers. Finally, we demonstrate that NuMA1 control of peripheral myonuclear anchoring and neuromuscular junction integrity is physiologically important. Our work reveals that cytoplasmic accumulation of NuMA1 in the post-mitotic muscle fibers is key to organize microtubule network and to control myonuclei motion.

## 40 Introduction

41 The building block of skeletal muscle is the post-mitotic muscle fiber, formed by the fusion of  
42 hundreds of specialized cells, myoblasts, that shape syncytial cells called myotubes and in which  
43 positioning of nuclei (*i.e.* myonuclei) is finely regulated <sup>1</sup>. In the normal course of muscle  
44 development, myonuclei are actively positioned within differentiating muscle cells. Myonuclei  
45 finally adopt a special location in mature myofibers: regularly spaced at the periphery of myofibers.  
46 Density of myonuclei (extra-synaptic myonuclei) along myofibers length remains relatively constant  
47 with the exception of immediately below the neuromuscular junction (NMJ) where about 5-6  
48 myonuclei are clustered (synaptic myonuclei) <sup>2</sup>. Peripheral and clustered myonuclei locations are  
49 concomitant with drastic changes in their shape, mainly due to changes in forces applied on nuclear  
50 envelope, as myonuclei are stuck between plasma membrane of myofibers and myofibrils structures  
51 <sup>3</sup>. This myonuclei conformation adaptation is believed to stabilize internal and external mechanical  
52 forces and thus constrain chromatin organization and gene expression <sup>4,5</sup>. Thus, this precise  
53 myonuclei organization in muscle fibers gives rise to the formation of the *so-called* “MyoNuclear  
54 Domains” (MNDs) wherein each myonucleus is responsible for specific gene expression in its  
55 surrounding cytoplasm and guaranties a spatial functional integrity inside muscle fibers <sup>6</sup>.  
56 Maintenance of MNDs is closely related to muscle functionality in relation with gene expression  
57 regulation in specific location and at a specific time <sup>7-10</sup>.

58 We and others showed that microtubule-related molecular motors, Microtubule-Associated Proteins  
59 (MAPs) and an interplay between actin, microtubule and intermediate filaments networks are  
60 involved in different steps of myonuclei localization during muscle fibers formation and maturation  
61 <sup>8,11-13</sup>. Additionally, previous studies highlighted critical roles of proteins localized inside myonuclei  
62 (such as Lamin A/C) or Nuclear Envelope Proteins (NEPs) coupling the nuclear lamina to  
63 cytoskeleton through the “linker of nucleoskeleton and cytoskeleton” (LINC) complex, such as SUN  
64 proteins, in the localization of myonuclei inside myofibers<sup>14-16</sup>. Delocalization of microtubule  
65 nucleation center at myonuclei membrane during myogenesis leads to the accumulation of a  
66 meshwork of proteins such as  $\gamma$ -tubulin, AKAP9, MACF1 that regulate myonuclei availability to  
67 different cytoskeleton networks<sup>13,17-21</sup>. Additionally, at NMJ sites, synaptic myonuclei capture  
68 microtubule networks by interacting with a subset of MAPs such as Clasp2, MACF1, EB1 and the  
69 molecular motor Dynein to stabilize Acetylcholine receptors (AChR) and MuSK (muscle-specific  
70 receptor tyrosine kinase) in the post-synaptic region <sup>22-25</sup>.

71 Here we report that the Nuclear Mitotic Apparatus 1 protein (NuMA1) is progressively transferred  
72 from myonuclei compartment to the cytoplasm where it accumulates and stabilizes microtubule  
73 network in developing muscle fibers. Cytoplasmic-NuMA1, in association with dynein-1 heavy  
74 chain-1, sets microtubules architecture, distance between adjacent myonuclei and is crucial for the  
75 maintenance of peripheral myonuclei both along myofibers and at neuromuscular junction sites. This  
76 study identifies cytoplasmic-NuMA1 as an essential microtubule stabilizer that controls physiological  
77 roles in muscle fibers through nuclear positioning and NMJ integrity maintenance.

## 78 Results

### 79 NuMA1 is required for myonuclear positioning during myofiber formation.

80 To identify new factors that contribute to myonuclear domains establishment during muscle fibers  
81 formation through the regulation of microtubule network architecture, we purified proteins able to  
82 bind microtubules from 3 days differentiated mouse primary myotubes as previously described<sup>13</sup>.  
83 Using this protocol, mass-spectrometry analysis revealed the significant presence of the microtubule-  
84 associated Protein NuMA1 (for Nuclear mitotic apparatus protein 1) and in an amount equivalent to  
85 proteins such as MAP4 or AKAP9 already known to participate in microtubules remodeling during  
86 myotubes formation<sup>18,26</sup> (Extended Data Fig.1A). NuMA1 is a microtubule-binding protein that was  
87 previously reported to play important roles in cell division<sup>27,28</sup>. However, the function of NuMA1 in  
88 postmitotic myofibers was still unknown. We first addressed the role of NuMA1 in early steps of  
89 myotubes formation (Fig.1A-G). Primary murine myoblasts purified as previously described<sup>29</sup> were  
90 treated with siRNAs targeting either a scrambled sequence or *Numa1* mRNA and were induced to  
91 form immature myofibers (myotubes) during 3 days (Fig.1A-C). At this step, myonuclei are aligned  
92 in the center of myotubes mainly because of the interplay between MAPs and microtubules<sup>8,11,26</sup>.  
93 Interestingly at this step of differentiation, efficient *Numa1* down-regulation (Extended Data Fig.1B-  
94 C) results in the formation of myotubes that exhibit strong myonuclei aggregation (Fig.1A-C). As  
95 this cell culture technique leads to an accumulation of heterogeneous myotubes regarding myonuclei  
96 content and myotubes length, we developed an ImageJ<sup>®</sup> plugin to extract parameters regarding  
97 myotubes phenotype and localization of their respective myonuclei. Data were then classified  
98 according to myonuclei content using a homemade program in RStudio<sup>®</sup> software (Fig.1D-G). In  
99 control condition, we clearly observe a nearly linear relationship between myonuclei addition into  
100 myotubes and myonuclei spreading, reflected by the increase of the mean distance between myotubes  
101 centroid and myonuclei (DMcM) (Fig.1D). Interestingly, NuMA1 down-regulation reduces from  
102 nearly 40% DMcM, reflecting a failure in myonuclei spreading during myotube expansion (Fig.1D).

103 Myonuclei aggregation is an early phenotype as myotubes containing five myonuclei already failed  
104 to spread myonuclei. Additionally, statistical repartition of myonuclei along myotubes length  
105 illustrated by “Myo-Spreading Graph” (MSG) shows a clear accumulation of myonuclei in the center  
106 of formed myotubes (Fig.1E). As myonuclei alignment directly influences elongation and shape of  
107 myotubes by allowing parallelization of microtubules network<sup>30,31</sup>, we investigated evolution of  
108 myotubes length and area according to myonuclei content (Fig.1F-G). Each additional myonuclei is  
109 associated with a gradual raise of myotubes length (+9,6% ± 4,13; Fig.1F) and area (+11% ± 3,51;  
110 Fig.1G). In NuMA1 depleted conditions, myotubes length is slightly decreased from 5 to 8  
111 myonuclei until it reaches a plateau, starting from 9 myonuclei until 14 myonuclei by myotubes  
112 (Fig.1F). Thus, 8-9 myonuclei constitute a “breaking point” where myotubes failed to complete the  
113 elongation step. Interestingly, NuMA1 depletion impairs myotubes elongation but emphasizes  
114 myotubes expansion/spreading, reflected by a constant increase in myotubes area independently of  
115 myotubes myonuclei content (Fig.1G). To note, down-regulation of NuMA1 in C2C12 myotubes also  
116 leads to an accumulation of myotubes with aggregated myonuclei (Extended Data Fig.1D-F) but in a  
117 less dramatic aspect that find using murine primary myoblasts culture. We can explain this phenotype  
118 by a delay of C2C12 cells to start fusion events compared to primaries myoblasts. To further  
119 investigate the implication of NuMA1 in later steps of muscle differentiation, primary mice myotubes  
120 were induced into a long-termed maturation process using an already described protocol<sup>29</sup> (Fig.1H).  
121 This method allows the formations of in vitro mature muscle fibers with regularly spread and  
122 peripherized myonuclei. Using short hairpin RNA (shRNA) tagged with GFP, we addressed the  
123 consequences of NuMA1 depletion on long-term muscle maturation (Fig.1H-L). NuMA1 depletion  
124 induces a significant decline of isolated myonuclei within myofibers (89,6% ± 0,24 in control  
125 myofibers *versus* 62,5% ± 3,23 in *Numa1* down regulated myofibers; Fig.1K) associated to a  
126 significant higher proportion of aggregated myonuclei (10,3% ± 0,24 in control myofibers *versus*  
127 37,5% ± 3,23 in *Numa1* down regulated myofibers; Fig.1K). Interestingly, peripheral localization of  
128 myonuclei drops from half in *Numa1* down regulated myofibers (Fig. 1L). However, we observe  
129 peripheral myonuclei localization in 100% of myofibers that display myofibrils structures (Fig. 1J,  
130 asterix) while myofibers with myofibrils formation impairment show centralized myonuclei (Fig. 1I,  
131 arrows) suggesting NuMA1 involvement in muscle maturation regulation. Thus, NuMA1 controls  
132 myonuclei localization during myofibers elongation and maturation.

133 **NuMA1 governs microtubules orientation with dynein-1 heavy-chain 1 at the vicinity of**  
134 **myonuclei and controls myonuclei motion and activity.**

135

136 As NuMA1 contains tubulin-binding-domain that controls microtubules nucleation during mitosis<sup>32,33</sup>  
137 (Extended Data Fig. 2A), we investigated NuMA1 role in the control of microtubule network  
138 architecture during muscle differentiation (Fig. 2). In myotubes formed in control condition,  
139 microtubules mainly emanate from myonuclei membrane (*i.e.* nMTOC for nuclear Microtubule  
140 organizing center) and also from membranes associated nuclear Golgi elements<sup>34,35</sup> that results in the  
141 formation of a parallel network of microtubules along myotubes length<sup>8</sup>. We encountered this  
142 structure in scramble siRNA condition (Fig. 2A). However in NuMA1 depleted myotubes, even if  
143 we clearly see microtubule network parallelization, we notice that microtubule network densification  
144 seems weaker at the vicinity of myonuclei aggregates (Fig. 2B). Microtubule nucleation from the  
145 nucleus requires the relocalization of microtubule nucleator proteins near the membrane of  
146 myonucleus<sup>18,21</sup>. We thus examined how NuMA1 influences nMTOC organization in myotubes by  
147 analyzing in NuMA1 depleted condition, the centrosomal protein pericentrin and Golgi complex  
148 localization (Fig. 2C-G). In control condition, Pericentrin and Golgi elements are highly concentrated  
149 at the vicinity of myonuclei membranes (Fig. 2C-C'-E). In NuMA1 depleted myotubes, nuclear  
150 Pericentrin accumulation is highly reduced and dispersed within the cytoplasm (Fig. 2D-D'). This  
151 phenotype is also associated with a substantial Golgi fragmentation from the vicinity of myonuclei  
152 (Fig. 2F-G). As NuMA1 seems to control nMTOC during muscle differentiation, we thus  
153 investigated the role of NuMA1 on microtubules dynamics in myotubes (Fig. 2H-M). Primary  
154 myoblasts co-transfected with EB1 tagged with GFP and either siRNA targeting scramble or *NuMA1*  
155 mRNA were induced to differentiate for 3 days (Fig. 2H). This method allows the access to the  
156 velocity of EB1 comets, reflecting microtubules polymerization dynamics but also to the orientation  
157 of microtubules along myotubes length as previously described<sup>36</sup>. NuMA1 depleted myotubes  
158 exhibit a slight reduction of the median velocity of EB1-GFP comets but the repartition is not  
159 affected (Extended Data Fig. 2B-D, Supplementary movie 1-2) suggesting that NuMA1 is not  
160 involved in the global microtubules polymerization rate. As NuMA1 depletion leads to myonuclei  
161 aggregation in the center of myotubes, we next wondered whether NuMA1 regulates the organization  
162 of microtubule network in specific areas in myotubes (Fig. 2K-M). Indeed, in regions without  
163 myonuclei, NuMA1 depleted condition does not affect microtubules growing orientation as EB1-  
164 GFP comets trajectories are mainly tangential compared to the long axis of myotubes ( $56,1\% \pm 6,62$   
165 of EB1-GFP comets orientate in the horizontal axis from  $-10^\circ$  to  $10^\circ$  in control condition compared to  
166  $49,5\% \pm 6,61$  in NuMA1 depleted condition) (Fig. 2K-L). However, in myotubes areas containing  
167 myonuclei, EB1-GFP comets trajectories are dramatically disrupted in NuMA1 depleted condition.  
168 While in control myotubes, EB1-GFP comets trajectories are mostly in the horizontal axis ( $47,5\% \pm$   
169  $2,73$ ), in NuMA1 depleted myotubes, we observe a drop of 50 % of longitudinal oriented EB1-GFP



170 comets trajectories that shift to more randomized orientations (Fig.2K & M). These results suggest  
171 that NuMA1, through the maintenance of nMTOC at the vicinity of myonuclei, constrains growing  
172 microtubules orientation in the longitudinal axis of myotubes. Numerous studies have raised the  
173 interaction of NuMA1 and the Dynein/Dynactin complex to regulate mitotic spindle orientation <sup>37-39</sup>.  
174 We next investigated in the purified proteome able to bind microtubules in primary myotubes, the  
175 presence of Dynein/Dynactin proteins <sup>13</sup>. The mass-spectrometry identification revealed the  
176 significant presence of four proteins of the complex referred as the cytoplasmic dynein-1 heavy  
177 chain-1 (*Dnchc1*, most represented), the cytoplasmic dynein-1 intermediate chain-1 & -2 (*Dncic1* &  
178 *Dncic2*) and the dynactin subunit-1 (*Dctn1*) (Extended Data Fig. 2E). Therefore, we tested  
179 individually down-regulation impact of these specific Dynein/Dynactin proteins subunits on  
180 myonuclei positioning (DMcM & MSG) and on specific myotubes parameters using a pool of 3  
181 individual siRNAs targeting *scramble* or *Numa1*, *Dctn1*, *Dncic1*, *Dncic2* and *Dnchc1* mRNA (Fig.  
182 2N). This small siRNA screen shows that only down-regulation of the cytoplasmic dynein-1 heavy  
183 chain-1 recapitulates the aggregation phenotype observed in primary myotubes depleted for *Numa1*  
184 (Fig. 2O-Q). Myonuclei spreading graph (MSG) confirmed specific effect of the cytoplasmic dynein-  
185 1 heavy chain-1 on myonuclei aggregation phenotype (Extended Data Fig. 2F). Altogether, these  
186 results indicate that NuMA1, probably through the cytoplasmic dynein-1 heavy chain-1, shapes the  
187 nMTOC in developing myotubes that permits microtubules orientation close to myonuclei.

188 In myotubes/myofibers, myonuclei use mainly microtubule network paths to move and position  
189 <sup>11,13,36,40</sup>. We next investigated the impact of microtubules mis-orientation on myonuclei movements  
190 in myofibers (Fig. 3A-D). Myoblasts were transfected with lamin-chromobody<sup>®</sup> to allow the  
191 visualization of myonuclei concomitantly with either siRNA or shRNA targeting *scramble* or *Numa1*  
192 mRNA. shRNA plasmids tagged with a GFP reporter allowed the selection of myotubes containing  
193 both constructions (shRNA and lamin-chromobody<sup>®</sup>) (Fig. 3A, Supplementary movie 3-4). In 5-day  
194 differentiated myofibers (already covered by Matrigel<sup>®</sup>), myonuclei were tracked using time-lapse  
195 video-microscopy for a time period of 16 hours. Myonuclei displacement parameters were extracted  
196 and analyzed using SkyPad method <sup>41</sup>. In Scramble control condition using siRNA, myonuclei are in  
197 motion 90% of the time at a median speed of  $0,25 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $0,25 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$  in shRNA  
198 condition) which leads to a diffusion coefficient value of  $2,4 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{min}$  ( $3,1 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{min}$  in  
199 shRNA condition) (Fig. 3B-D). NuMA1 depletion in myofibers does not affect myonuclei percentage  
200 of time in motion compared to control condition (Fig. 3B). Conversely, myonuclei speed in NuMA1  
201 depleted myofibers decreases by 30 % to 40 % using either siRNA or shRNA techniques (Fig. 3C).  
202 This drop of myonuclei speed is concomitant with a drastic inhibition of myonuclei diffusion

203 coefficient that fall from respectively 50 % in siRNA condition and to more than 70% in shRNA  
204 conditions (Fig. 3D).

205 Interestingly, in NuMA1 depleted myofibers, beside myonuclei aggregation phenotypes, we observed  
206 a strong alteration of myonuclei shape that appear much bigger than the ones present in control  
207 condition myotubes (Fig. 3 E-F). We therefore analyzed myonuclei shape parameters in NuMA1  
208 depleted myotubes and observed that myonuclei areas increase from 30% compared to control  
209 conditions (Fig. 3G) concomitantly with a significant increase in myonuclei circularity (Fig. 3H).  
210 Nuclei are physically connected to the cell surface by an interplay between cytoskeleton and proteins  
211 from the LINC-complex and this contribute to the transmission of mechanical forces that influence  
212 many aspects of cell behavior such as myoblasts fusion events <sup>7</sup>. However, these forces are not  
213 restricted to cell surface receptors and adhesions but can occur inside nucleus through nuclear lamina  
214 and emerin <sup>42</sup>. We next investigated if NuMA1 influences content of proteins that maintain nuclear  
215 structure and function (Fig. 3I). Although, NuMA1 depletion in myofibers does not impact mRNA  
216 expression of both *LaminaA/C* and *LaminB*, but increase significantly *emerin* mRNA expression (Fig.  
217 3I). Altogether, NuMA1 depletion in myofibers leads to myonuclei aggregation through both the  
218 reduction of microtubules anchoring point at the vicinity of myonuclei and potentially changes in  
219 membrane myonuclei rigidity. These alterations controlled by NuMA1, dramatically impact speed  
220 and diffusion of myonuclei inside myotubes that ultimately lead to myonuclei aggregation.

### 221 **Progressive accumulation of cytoplasmic-NuMA1 controls myonuclei motion during muscle** 222 **fiber development.**

223 NuMA1 is a nuclear protein that controls microtubules anchoring specifically during mitosis <sup>27</sup>. This  
224 microtubules-related activity is allowed by the fragmentation of nuclear membrane at the beginning  
225 of mitosis events, leading to the accumulation of cytoplasmic NumMA1. At the end of mitosis,  
226 cytoplasmic NuMA1 is “repumped” and sequestered into the nucleus thanks to NLS sequence <sup>43</sup>. In  
227 this context, we investigated NuMA1 expression and subcellular localization throughout myogenesis  
228 (Fig. 4). We found a slight increase of *NuMA1* mRNA and NuMA1 protein during early steps of  
229 myotubes formation using respectively RT-qPCR and Western blotting experiments on mouse  
230 myoblast C2C12 cells and murine primaries myofibers (Extended Data Fig. 3A-D) suggesting a  
231 progressive accumulation of NuMA1 in myotubes/myofibers. Our previous data suggest that NuMA1  
232 is present in the cytoplasm of myotubes/myofibers (Fig. 1-3). To address the localization of NuMA1  
233 during muscle fibers development, we performed a differentiation kinetic staining of NuMA1 during  
234 human primary myoblasts differentiation (Fig. 4A-B). This experiment shows a progressive

235 accumulation of NuMA1 in the cytoplasmic compartment during muscle fiber differentiation whereas  
236 myonuclei progressively lose NuMA1 staining. Indeed, while NuMA1 is highly present in nuclei of  
237 non-fused myoblasts (Fig; 4A, asterix), we observed that myonuclei into myotubes show a mosaic of  
238 NuMA1 staining, with some myonuclei strongly stained. In more matured human myotubes (16 days  
239 of differentiation), NuMA1 staining into myonuclei is very weak while we clearly see an  
240 accumulation into cytoplasmic compartment (Fig. 4B). To confirm progressive accumulation of  
241 NuMA1 in cytoplasmic compartment of muscle fibers, we performed a subcellular fractionation  
242 assays on a kinetic of human primaries myoblasts during differentiation (Fig.4C). using this  
243 technique, we clearly observe that a part of NuMA1 pool is sequestered into the cytoplasmic  
244 compartment in both myoblasts and myotubes (Fig. 4C). We confirm the presence of a cytoplasmic  
245 form of NuMA1 in subcellular fractionation assays in C2C12 myoblasts and myotubes (Extended  
246 Data Fig. 3E). We next investigated the localization of NuMA1 in mature muscle myofibers to know  
247 whether its localization is dependent on the degree of muscle fibers maturation (myofibrillogenesis).  
248 To address this question, we used primary myoblasts cell cultures that we differentiated onto micro-  
249 patterns to allow functional myofibrils to form, reflected by the typical staining of the F-actin cross-  
250 linker protein, alpha-actinin (Fig. 4D). In this condition of *in vitro* formation of “mature” humans  
251 myofibers, we still observe NuMA1 accumulation in the cytoplasm and weaker NuMA1 myonuclei  
252 staining compared to immature humans myotubes (Fig. 4B & D). Interestingly, few myonuclei still  
253 contains high concentration of NuMA1 inside the same myofibers, suggesting the presence of  
254 different population of myonuclei regarding NuMA1 myonuclei content (Fig. 4D, asterix). To further  
255 investigate the localization of NuMA1 in fully matured myofibers, we isolated myofibers from  
256 *Tibialis Anterior* muscles, extracted from 2 months-old adult mice and assessed NuMA1 localization.  
257 In these mature myofibers, NuMA1 clearly accumulates on stable microtubules lattice such as  
258 acetylated or detyrosinated microtubules throughout all mature myofibers (Fig. 4E-F). Thus, NuMA1  
259 is present in the nucleus of proliferating myoblasts and as soon as myoblasts fusion occurs,  
260 myonuclei progressively clear out NuMA1 proteins that accumulate on stable microtubules lattice,  
261 controlling microtubule network organization and consequently myonuclei motion and positioning.  
262 In this view, immature myotubes contain a mix of myonuclei with high content of NuMA1 *versus*  
263 myonuclei with low NuMA1 content (Fig. 4A). We next wondered if these two populations of  
264 myonuclei have distinct motion behavior inside muscle fibers. To address this question, isolated  
265 murine myoblasts were transfected with full-length human NuMA1 tagged with GFP and cells were  
266 induced to form immature myofibers (myotubes) during 3 days (Fig.4G). As expected, we clearly  
267 observe a mosaic of myonuclei according to myonuclei NuMA1 content, suggesting that all  
268 myonuclei are not in the same status concerning NuMA1 protein uptake (Fig.4G). In this condition,

269 cytoplasmic-NuMA1 accumulation on microtubule network was visible only in some myotubes with  
270 apparent microtubules bundles (Extended Data Fig. 3F). In this condition, we next tracked motion of  
271 positive myonuclei for NuMA1 and compared it to the motion of negative myonuclei for NuMA1  
272 using time-lapse video-microscopy as developed before (Fig. 3A-D). We observe that myonuclei are  
273 in motion 90% of the time independently of the presence of NumMA1 myonuclei localization (Fig.  
274 4H). Interestingly, NuMA1 positive myonuclei move with a median speed of  $0,149 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$   
275 leading to a diffusion coefficient value of  $0,7 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{min}$  (Fig. 4I-J). In contrast, NuMA1 negative  
276 myonuclei move 40% slower than NuMA1 positive myonuclei with a speed of  $0,094 \pm 0,007 \mu\text{m}/\text{min}$   
277 leading to a 60% drop in the diffusion coefficient with a value of  $0,28 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{min}$  (Fig. 4I-J).  
278 Altogether, these data show that NuMA1 progressively clear out from myonuclei during muscle fiber  
279 maturation to target stable microtubules and control microtubule network organization and myonuclei  
280 motion.

281 **NuMA1 controls microtubule network organization, peripheral myonuclei anchoring and**  
282 **muscle homeostasis through the maintenance of neuromuscular junction integrity *in vivo*.**

283  
284 Our findings show that cytoplasmic-NuMA1 is essential to maintain microtubule network orientation  
285 and myonuclei positioning. To further understand how cytoplasmic-NuMA1 impacts the integrity of  
286 mature muscle fibers,, we conducted NuMA1 depletion *in vivo*, in *Tibialis Anterior* muscles from 8  
287 weeks old wild-type mice, using electroporation technique of shRNA targeting either scramble or  
288 *NuMA1* mRNA sequences. Two weeks after electroporation, isolated myofibers were extracted from  
289 *Tibialis Anterior* muscles and fixed for further analysis (Fig.5A). We first checked the impact of  
290 NuMA1 depletion on microtubule organization in this mature myofibers (Fig. 5B-E). As expected,  
291 microtubule network architecture was highly impacted with an apparent loss of transversally oriented  
292 microtubules compare to longitudinally oriented microtubules (Fig.5C-E). These results confirm that  
293 cytoplasmic NuMA1 is required to guide and organize microtubules network in mature myofibers.  
294 We next investigated in mature myofibers NuMA1 depletion impact on myonuclei localization (Fig.  
295 5F-H). Transversal cross-sections of *Tibialis Anterior* muscles show that muscle myofibers  
296 expressing shRNA targeting *NuMA1* mRNA exhibit nearly 8-fold more mis-localized myonuclei than  
297 control muscle fibers (Fig. 5H). Moreover, in *Tibialis Anterior* electroporated muscle depleted for  
298 *NuMA1*, we observed a shift to smaller sizes in the repartition of myofibers cross-sectional areas  
299 (CSA) (Fig. 5I). These results suggest that cytoplasmic-NuMA1 contributes to the maintenance of  
300 both microtubules organization and peripheral myonuclei anchoring and participates in the  
301 myofibers homeostasis.

302 Previous studies show that denervation rapidly induces muscle fibers atrophy <sup>44</sup>. Additionally,  
303 NuMA1 interacting partners dynein was identified to accumulate at the neuromuscular junction site  
304 <sup>23</sup>. We thus naturally investigated NuMA1 localization at NMJs (Fig. 6). To our surprise, NuMA1  
305 was strongly localized at NMJs site in isolated *Tibialis Anterior* muscle fibers (Fig. 6A). We next  
306 addressed the consequences of NuMA1 depletion in the integrity of neuromuscular junctions (Fig.  
307 6B-G). Compared to control muscle fibers, *Tibialis Anterior* myofibers expressing shRNA targeting  
308 *NuMA1* mRNA exhibit strong alterations of neuromuscular junctions shape characterized by a drop  
309 of 50 % in NMJ areas (Fig. 6D) and in the number of branches emerging from the NMJ sites (Fig.  
310 6E). In NuMA1 depleted myofibers, NMJs appear fragmented, illustrated by the two-fold increase in  
311 the number of acetylcholine receptors clusters (Fig. 6F). We observe a tendency of myonuclei to be  
312 recruited below the neuromuscular junctions as observed in some denervation conditions <sup>45</sup>(Fig. 6G).  
313 All in all, we show a crucial role of cytoplasmic-NuMA1 in the maintenance of microtubule network  
314 organization, myonuclei localization and neuromuscular junction integrity in mature muscle  
315 myofibers.

316

## 317 Discussion

318 Nuclear spreading at the periphery of muscle fibers is a prerequisite to obtain full functional mature  
319 myofibers. Diverse myonuclei motions control adjacent myonuclei interspace settings, first during  
320 immature myofibers formation (myotubes) and second in mature muscle fibers, allowing  
321 maintenance of peripheral myonuclei that guaranty muscle fibers functionality. These parameters are  
322 highly affected in many muscle disorders. Here, we elucidate mechanism by which myofibers control  
323 myonuclei spreading in the long-term time-course of muscle fibers formation. We demonstrate that  
324 the microtubule binding protein NuMA1 is progressively accumulated in the cytoplasmic  
325 compartment of post-mitotic muscle fibers (Fig. 4) and controls myonuclei motion through the  
326 maintenance of microtubule architecture, probably in association with dynein-1 heavy chain 1 (Fig.  
327 2). Furthermore, we found that NuMA1 is an essential factor for peripheral myonuclei maintenance  
328 in mature myofibers and most importantly, accumulates at neuromuscular junction site to control  
329 their integrity (Fig. 5-6).

330

### 331 **A cytoplasmic form of NuMA1 controls myonuclei motions and microtubules network** 332 **integrity.**

333 Nuclear movements within immature myofibers have been described to mainly depend on  
334 microtubule associated proteins and molecular motors<sup>11,40,46</sup>. During myofibers maturation,

335 myofibrils formation and bundling contribute to the peripheral localization of myonuclei<sup>12</sup>. From this  
336 maturation steps, myonuclei are thought to be anchored at the plasma membrane site, using a  
337 meshwork of proteins that contribute to stabilize these myonuclei localization<sup>47</sup>. Recent studies show  
338 that, although myonuclei in mature myofibers are stick at the periphery, myonucleus always  
339 possesses the ability to move between the plasma membrane and myofibrills<sup>13,48</sup>. According to our  
340 experimental data, myonuclei motion in mature myofibers is an interplay between (1) the ability to  
341 maintain at the vicinity of myonuclei a polarized architecture of microtubules and (2) a suitable  
342 myonuclei shape that depends on both nuclear stiffness and forces exerted by other structures around  
343 myonuclei. Our experiments suggest that just after the fusion, entering myonucleus inside myotubes  
344 cells possesses high content of nuclear NuMA1 allowing the increase of myonucleus motion and  
345 diffusion inside myotubes. Progressively, myonuclei clear out nuclear NuMA1 proteins that  
346 accumulate in the cytoplasmic compartment, specifically on stable microtubules lattice and  
347 contribute to the reduction of myonuclei motion. In this perspective, after local skeletal muscle fibers  
348 damages, satellite cells proliferate and become myocytes that fuse with damaged fibers<sup>49</sup>. The ability  
349 of entering myonuclei to maintain NuMA1 inside its nucleus could set the “invasion” capacity that  
350 will control how correct restoration of myonuclear domain in mature myofibers will occur. Future  
351 works should address how myonucleus controls the balance between the cytoplasmic and the nuclear  
352 fraction of NuMA1 in these post-mitotic cells and how these local changes affect nuclear stiffness  
353 and transcriptional activity.

354 Microtubules structures are dynamic networks that participate in the control of muscle fibers  
355 homeostasis as central node with multiple cytoskeleton networks<sup>50,51</sup>. In mature muscle fibers,  
356 accumulation of posttranslational modifications of tubulin contribute to the increase of microtubule  
357 stability, that allow maintenance of functional muscles<sup>13,52,53</sup>. Our results suggest that cytoplasmic  
358 NuMA1 targets more specifically stable forms of microtubule networks in mature muscle fibers.  
359 Thus, depletion of NuMA1 potentially reorganizes microtubules dynamics repartition, which is here  
360 reflected by the mis-orientation of microtubules network.

361

### 362 **NuMA1 as a neuromuscular junction keeper in skeletal muscle fibers**

363 In this study, we show that NuMA1 accumulates at neuromuscular junction sites (NMJs) and  
364 contributes to AcetylCholine receptors (AChRs) clustering. This property could be in a first instance  
365 related to the control of microtubule architecture and stability at NMJs sites. Microtubule dynamics  
366 with associated MAPs (Claps2, Clip170) and motors such as dynein are known to mediate  
367 microtubule capture at NMJs site and are crucial for AChRs stabilization at the post-synaptic  
368 region<sup>22-25</sup>. As we found that NuMA1 accumulates in the cytoplasmic compartment in developing

369 muscle fibers, it seems logic that NuMA1 is refined in areas where dynein is localized<sup>23,38,39,54</sup>. Our  
370 data demonstrate that cytoplasmic NuMA1 controls AChRs clustering and potentially stability of  
371 synaptic myonuclei beneath NMJ. Dynein mutations are involved in numerous neurodegenerative  
372 diseases such as Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) that causes axonal degeneration and  
373 progressive loss of motor and sensory nerve function<sup>55</sup>. At the light of our results, dynein mutations,  
374 especially the ones related to dynein-1 heavy chain-1, could also impact the interaction with muscle  
375 cytoplasmic NuMA1 that will in turn contribute to the instability of NMJs through microtubule  
376 destabilization<sup>56</sup>. This activity will contribute to the functionality of NMJs in addition with the recent  
377 role of cytoplasmic NuMA1 in post-mitotic cells in the control of endocytosis<sup>57</sup>. Future works should  
378 investigate the interplay between NuMA1, microtubules integrity and regulation of endocytosis at the  
379 NMJs sites from both side perspectives, either from muscle or motoneurons side.

### 380 381 **Nuclear mis-positioning and muscle associated disorders**

382 Numerous diseases are characterized by myonuclear domains settings and myonuclei shape  
383 alterations. In Duchenne muscular dystrophy (DMD), absence of Dystrophin leads to the most  
384 common and fatal form of muscular dystrophies as skeletal muscles undergo rapid degeneration  
385 followed by regeneration. These chronic cycles progressively lead to the accumulation of damaged  
386 myofibers with centralized myonuclei<sup>58</sup>. Dystrophin is a microtubule interacting protein and in DMD  
387 disease models, alteration of microtubules network and myonuclei motion as been observed<sup>48,59</sup>. In  
388 this type of disease, myonuclei aggregation phenotype in the center of myofibers can be explained by  
389 the direct disruption of microtubule network. However, centronuclear myopathies (CNMs), a  
390 heterogeneous group of inherited muscle diseases, is defined pathologically by abnormal localization  
391 of myonuclei in the center of muscle fibers and unlike many myopathies, is not linked to excessive  
392 degeneration/regeneration processes. Genes implicated in various forms of CNMs are mainly linked  
393 to membrane remodeling processes (MTM1, BIN1, DNM2), but the link with myonuclei  
394 centralization remain puzzling<sup>60</sup>. To position mitotic spindle, cortical NuMA1 assembles specialized  
395 focal structures, containing Dynein, dynactin and LGN and generate cooperative spindle-pulling  
396 forces<sup>38</sup>. Future works should address how in these types of diseases, cytoplasmic NuMA1 activity is  
397 spatially regulated along muscle fibers and contribute to the loss of peripheral anchorage of  
398 myonuclei. Thus, cytoplasmic accumulation of NuMA1, associated to microtubule network  
399 stabilization, involves a dynamic control of myonuclei motion and localization during muscle fibers  
400 formation and highlight new mechanisms that explain aberrant myonuclei localization in such  
401 myopathies.

## Figures legends

**Figure 1: NuMA1 regulates *in vitro* myonuclei positioning throughout myogenesis.** A. Scheme of cell transfection protocols and steps of analysis during time-course of *in vitro* formation of primary muscle fibers. B-C. Representative immunofluorescence images of 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1* and stained for myosin heavy chain (MHC, green) and nuclei (blue). Scale bar: 15 $\mu$ m. D. Quantification of the mean distance from myotubes centroid to each myonuclei (DmCM) according to each myotubes-myonuclei content in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. E. Myonuclei spreading graphic (MSG) representing statistical frequency of all myonuclei positioning along all analyzed myotubes. F-G Quantification of myotubes length (F) and myotubes area (G) in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. Data from six independent experiments were combined. n (Scramble=618); (NuMA1=687). Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. H-J. Source data are available in Supplementary Table 1. Representative immunofluorescence images of 10-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1* and stained for shRNA plasmid expression (green), actin (red) and nuclei (blue). Asterisks (peripheral myonuclei), Arrows (non-peripheral myonuclei). Scale bar: 15 $\mu$ m. K. Quantifications of myonuclei phenotype position in 10-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. Data from three independent experiments were combined. Unpaired t-test, \*\*p < 0.01. n (Scramble=1452); n (NuMA1=2009). L. Quantifications of peripheral myonuclei frequency in 10-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. Unpaired t-test, \*\*p < 0.01. n (Scramble=966); n (NuMA1=760). Data from four independent experiments were combined. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. Source data are available in Supplementary Table 1.

**Figure 2: NuMA1 shapes the nMTOC and microtubule network architecture in differentiating myotubes in association with dynein-1 heavy chain-1.** A-F. Representative immunofluorescence images of 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1* and stained for  $\alpha$ -tubulin (green; A.B), Pericentrin (green, C.D.C'.D'), Golgi (green, E.F) and nuclei (red, DAPI). Scale bar: 10 $\mu$ m. G. Quantifications of Golgi apparatus patches number (GM130 staining) by myonuclei in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. Data from three independent experiments were combined. Unpaired t-test, \*p < 0.05. n (Scramble=177); n (NuMA1 =177). Source data are available in Supplementary Table 2. H. Scheme of cell co-transfection protocol for siRNA and EB1-GFP constructs. I-J. Z-projection of EB1-GFP comets in 3-days knocked down myotubes for scrambled or



436 *Numa1* where six continuous frame of a time-lapse movie were overlapped, the first three are color-  
437 coded in green and the last three are color-coded in red. Scale bar=9 $\mu$ m. White stars are examples of  
438 EB1-GFP comets orientation in control (1&2) and in *Numa1* knocked down condition (3 & 4).  
439 Source data are available in Supplementary Video 1 & 2. K. Scheme of myotubes zone analyzed in  
440 sections L & M. L-M. Quantifications of comets orientation along myotubes axis in different zone of  
441 myotubes in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. Analyzed myotubes contain at  
442 least 6 myonuclei. Data from three independent experiments were combined. n(Scramble; free  
443 myonuclei zone)=175; n(NuMA1; free myonuclei zone)=260; n(Scramble; myonuclei zone)=284;  
444 n(NuMA1; myonuclei zone)=376. Source data are available in Supplementary Table 2. N.  
445 Representation of the mean distance from myotubes centroid to each myonuclei (DmCM), Myonuclei  
446 spreading graphic (MSG), myotubes area and length in 3-days knocked down myotubes for  
447 scrambled or *NuMA1*, *Dncic1*, *Dncic2*, *Dctn1* and *Dnchc1*. Colors are representative of the mean  
448 percentage of decrease for red and yellow colors, and increase for green colors compare to control.  
449 Source data are available in Supplementary Table 2. O-P. Representative immunofluorescence  
450 images of 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Dnchc* (*Dynein-1 heavy chain-1*) and  
451 stained for myosin heavy chain (MHC, green) and nuclei (blue). Scale bar: 10 $\mu$ m.. Q. Quantification  
452 of mean distances from myotubes centroid to each myonuclei (DmCM) according to each myotubes-  
453 myonuclei content in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1*. n(Scramble=580);  
454 n(*Dnchc1*=319); n(NuMA1=674). Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. H-J. Data  
455 from three independent experiments were combined. Center lines show the medians; box limits  
456 indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the  
457 interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. Source data  
458 are available in Supplementary Table 2.

459

460 **Figure 3: NuMA1 regulates myonuclei motion and shape.** A. Kymograph extracted from  
461 timelapse video experiments of 5-day knocked down primary myotubes for scrambled or *Numa1* and  
462 transfected with a Lamin-Chromobody®-RFP plasmid. The first frame of each representative 16h  
463 movie shows a myotubes. Myotubes were tracked during 16hrs with a picture every 20 min. Time-  
464 lapse movies data are available in Supplementary Video 3 & 4. B-D. Quantifications of percentage of  
465 time in motion (B), myonuclei speed (C) and diffusion coefficient (D) of 5-day knocked down  
466 primary myotubes for scrambled or *Numa1* using either siRNA or shRNA methods from 3  
467 independent experiments. n(Scramble-siRNA=207); n(NuMA1-siRNA=198); n(Scramble-  
468 shRNA=203); n(NuMA1-shRNA=203). Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01. Source data are  
469 available in Supplementary Table 3. E-F. Representative immunofluorescence images of 3-days

470 knocked down myotubes for scrambled or *Numa1* and stained for myonuclei (blue). Scale bar: 15 $\mu$ m.  
471 G-H. Quantification of myonuclei area (G) and myonuclei circularity (H) of 3-days knocked down  
472 myotubes for scrambled or *Numa1*. Data from three independent experiments were combined.  
473 n(Scramble=771); n(NuMA1=552). Unpaired t-test, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. I. Bar chart plotting  
474 *LaminA/C*, *LaminB* and *Emerin* expression in 3-day knocked down primary myotubes for scrambled  
475 or *Numa1*. Data from three independent experiments were combined. Center lines show the medians;  
476 box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5  
477 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots.  
478 Source data are available in Supplementary Table 3.

479  
480 **Figure 4: NuMA's localization throughout muscle fibers development.** A-B. Representative  
481 immunofluorescence images of 8-days (A) or 16-days human primary myotubes stained for NuMA1  
482 (red),  $\alpha$ -tubulin (green) and nuclei (blue). Scale bar: 10 $\mu$ m. C. Representative subcellular  
483 fractionation assay of human myoblasts and 10 day-differentiated human myotubes. HSP90 and  
484 Histone H3 are controls for respectively cytoplasm and nuclear compartments. D. Representative  
485 immunofluorescence images of 8-days human primary myotubes cultured on micro-patterned and  
486 stained for NuMA1 (red),  $\alpha$ -actinin (green) and nuclei (blue). Scale bar: 20 $\mu$ m. E-F Representative  
487 immunofluorescence images of 2-months extracted *Tibialis Anterior* muscles fibers stained for  
488 NuMA1 (red), Detyrosinated- Tubulin (green, E), Acetylated tubulin (green, F) and nuclei (blue).  
489 Scale bar: 10 $\mu$ m. G. Representative immunofluorescence images of 3-days mouse primary myotubes  
490 transfected with a constructs expressing human NuMA1 tagged with the GFP (hNuMA1-GFP) and  
491 stained for nuclei (red) and Numa1-GFP (green). Scale bar: 10 $\mu$ m. H-J. Quantifications of time in  
492 motion (H), myonuclei speed (I) and myonuclei diffusion coefficient (J) of 5-day primary myotubes  
493 expressing myonuclei localized of human-NuMA1 (h-Numa1 positives) or not expressing myonuclei  
494 localized of human-NuMA1 (h-Numa1 negatives). n(GFP-positive=150); n(GFP-negative=150).  
495 Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001. Data from three independent experiments were combined. Center  
496 lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R  
497 software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles,  
498 outliers are represented by dots. Source data are available in Supplementary Table 4.

499  
500 **Figure 5: NuMA1 controls microtubule network organization and peripheral myonuclei**  
501 **maintenance *in vivo* in mature muscle fibers.** A. Scheme of *in vivo* protocol to obtain single  
502 myofibers down regulated for *Numa1*. B-D. Representative immunofluorescence images of 2-months  
503 old mice extracted *Tibialis Anterior* muscles fibers down regulated during 2 weeks for scrambled or

504 *Numa1* and stained for  $\alpha$ -tubulin (green) and nuclei (red). Scale bar: 10 $\mu$ m. C-E. Microtubules  
505 network organization analysis of muscles fibers down regulated during 2 weeks for scrambled or  
506 *Numa1* using TeDT software. Data from five independent experiments were combined. Source data  
507 are available in Supplementary Table 5. F-G. Representative images of transversals cross-section of  
508 *Tibialis Anterior* muscle fibers electroporated with scramble or an individual shRNAs targeting  
509 *Numa1* and stained for GFP (shRNA, green), laminin (red) and myonuclei (blue) Scale bar: 50 $\mu$ m.  
510 White arrows indicate myonuclei. H. Quantification of mis-oriented myonuclei in *Tibialis Anterior*  
511 muscle fibers electroporated with scramble or an individual shRNAs targeting *Numa1*. Data from  
512 four independent experiments were combined. n(Scramble = 1258); n(NuMA1= 1915). Unpaired t-  
513 test, \*\*\*p < 0.001 I. Quantifications of cross-section areas repartition of electroporated *Tibialis*  
514 *Anterior* muscle fibers electroporated with scramble or an individual shRNAs targeting NuAM1.  
515 n(Scramble= 1693); n(NuMA1= 1942). Data from four independent experiments were combined.  
516 Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R  
517 software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles,  
518 outliers are represented by dots. Source data are available in Supplementary Table 5.

519

520 **Figure 6: NuMA1 controls neuromuscular junction integrity.** A. Representative  
521 immunofluorescence images of 2-months old mice extracted *Tibialis Anterior* muscles fibers stained  
522 for NuMA1 (green), actin (red) and nuclei (Blue) Scale bar: 10 $\mu$ m B-C. Representative  
523 immunofluorescence images of 2-months old mice extracted *Tibialis Anterior* muscles fibers down  
524 regulated during 2 weeks for scrambled or *Numa1* and stained for GFP (shRNA, green),  
525 AcetylCholine receptors (Red) and nuclei (blue). Scale bar: 100 $\mu$ m. D-G. Quantifications in 2-  
526 months old mice extracted *Tibialis Anterior* muscles fibers down regulated during 2 weeks for  
527 scrambled or *Numa1* of representative parameters of neuromuscular junction (NMJ) integrity  
528 represented by AcetylCholine receptors (AChR) area (D), number of branches by NMJ (E), number  
529 of AChR clusters (F) and number of myonuclei clustered below NMJ site. (G) Unpaired t-test, \*\*p <  
530 0.01, \*p < 0.05. n(Scramble=10); n(NuMA1= 12). Data from 3 independent experiments were  
531 combined. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as  
532 determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th  
533 percentiles, outliers are represented by dots. Source data are available in Supplementary Table 6.

534

535 **Figure 7: Proposed model of NuMA1 activity during muscle differentiation.**

536

537 **Supplementary figure 1: NuMA1 is present in the microtubule-associated proteome in**  
538 **myotubes and controls myonuclei positioning.** A. Table showing details of mass-spectrometry  
539 analysis of purified proteins able to bind microtubules from 3 days differentiated mouse primary  
540 myotubes as previously described<sup>13</sup>. Pep is the number of peptides; SC is the spectral counting, SSC  
541 is the spectral counting specific to the protein and WSC is the weighted spectral counting. B. Western  
542 blot of 3-days myotubes knocked down for scrambled or *Numa1* using siRNA technique. Blots were  
543 repeated more than 3 times. C. Bar chart plotting of *Numa1* expression in 3-day knocked down  
544 primary myotubes for scrambled or *Numa1*. Data from four independent experiments were combined.  
545 Values are means  $\pm$  standard deviation. Source data are available in Supplementary Table 7. D-E.  
546 Representative immunofluorescence images of 5-days knocked down C2C12 myotubes for  
547 scrambled or *Numa1* and stained for myosin heavy chain (MHC, green) and nuclei (red). Scale bar:  
548 50  $\mu$ m. Quantifications of myonuclei positioning phenotypes in 6-days differentiated mouse C2C12  
549 myotubes knocked down for scrambled or NUMA1 as described<sup>11,61</sup>. Data from three independent  
550 experiments were combined. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th  
551 percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the  
552 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. Source data are available in  
553 Supplementary Table 7.

554  
555 **Supplementary figure 2: NuMA1 controls microtubules network organization and myonuclei**  
556 **positioning independently of *Dctn1*, *Dncic1*, *Dncic2* but probably through *Dnchc1*.** A. Scheme of  
557 NuMA1 proteins domains. B. Representative images of timelapse experiments of primary myoblasts  
558 co-transfected with EB1-GFP plasmids and with either Scramble-siRNA (top) or *NuMA1*- siRNA  
559 (bottom). Scale bar: 9 $\mu$ m. C-D. Quantification of EB1-GFP comets velocity measured with Particle  
560 Tracker<sup>62</sup> in 3-days knocked down myotubes for scrambled or *Numa1* represented as the median of  
561 all EB1-GFP comets velocity (C) or through categories (D) N(Scramble= 1183); n(NuMA1= 2154).  
562 Data from three independent experiments were combined. Center lines show the medians; box limits  
563 indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the  
564 interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. Source data  
565 are available in Supplementary Table 8. E. Table showing details of mass-spectrometry analysis of  
566 purified proteins able to bind microtubules from 3 days differentiated mouse primary myotubes and  
567 from the dynein complex proteome. Pep is the number of peptides; SC is the spectral counting, SSC  
568 is the spectral counting specific to the protein and WSC is the weighted spectral counting. F.  
569 Myonuclei spreading graphic (MSG) representing statistical frequency median of all myonuclei  
570 positioning along all analyzed myotubes in knocked down myotubes for *scramble*, *Numa1*, *Dctn1*,

571 *Dncic1*, *Dncic2* and *Dnchc1* using each time a pool of three independent siRNAs. n(Scramble=618);  
572 n(NuMA1=687); n(Dctn1=50); n(Dncic1= 91); n(Dncic2=106); n(Dnchc1=336). Data from three  
573 independent experiments were combined. Source data are available in Supplementary Table 8.

574

575 **Supplementary figure 3: Transcription and expression kinetic of NuMA1 along muscle**  
576 **differentiation.** A. Western blot analysis of NuMA1 protein expression in total protein extracts from  
577 proliferating (GM) or differentiating C2C12 cells for up to 5 days. C2C12 differentiation is assessed  
578 by Myogenin expression and Tubulin is used as loading control. Blots were repeated more than 3  
579 times B-C. RT-qPCR analysis of *Numa1* (B) and *Myh4* (C) gene expression level relative to *Gapdh*;  
580 *GusB* and *Rpl41* genes in proliferating C2C12 cells (GM) or differentiating C2C12 cells for up to 6  
581 days. D. RT-qPCR analysis of *Numa1* and *Myh4* gene expression level relative to *Gapdh*; *GusB* and  
582 *Rpl41* genes in primary myotubes cells (3 days) or mature myofibers (10 days of differentiation).  
583 Data from three independent experiments were combined. Source data are available in  
584 Supplementary Table 9. E. Representative subcellular fractionation assay of C2C12 mouse myoblasts  
585 and 6 days-differentiated C2C12 myotubes. HSP90 and Histone H3 are controls for respectively  
586 cytoplasm and nuclear compartments. Blots were repeated more than 3 times. F. Representative  
587 images of human-NuMA1-GFP expression in 3-day differentiated myotubes stained for h-NumA1  
588 (GFP, green) and detyrosinated-tubulin (red). Scale bar: 10µm.

589

#### 590 **Video legend**

591

592 **Supplementary video 1 & 2:** Timelapse experiments of primary myoblasts co-transfected with EB1-  
593 GFP plasmids and with either Scramble-siRNA (Supplementary video-1) or *NuMA1*- siRNA  
594 (Supplementary video-2) and induce to form myotubes during 3 days after starting differentiation  
595 process. EB1-GFP comets were recorded in primary myotubes every 150 milliseconds for a period of  
596 time of 15 seconds.

597

598 **Supplementary video 3 to 5:** Timelapse experiments of primary myoblasts co-transfected with  
599 Lamin-Chromobody-RFP plasmids and with either Scramble-siRNA (Supplementary video-3) or  
600 *NuMA1*-siRNA (Supplementary video-4) or Full-length human-NuMA1 (Supplementary video-5)  
601 and induce to form myotubes during 5 days after starting differentiation process. Primary myotubes  
602 were recorded every 20 minutes for a period of time of 16 hours.

603

#### 604 **Materials and methods**

605

## 606 **Cell culture**

607 Primary mouse myoblasts were purified from wild type C57BL6 newborn mice as described  
608 before <sup>29,63</sup>., Myoblasts were cultured on 1% growth factor reduced matrigel<sup>®</sup>/IMDM coated-dish  
609 (Corning, 356231; ibidi  $\mu$ -Slide 4 Well, 80426) and induced to differentiate in myotubes for 2 to  
610 3 days in differentiation media (IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-  
611 122) + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)). Myotubes were then covered by a layer  
612 of 50% Growth factor reduced matrigel<sup>®</sup>/IMDM and maintain in culture up to 10 days (IMDM  
613 (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-122) + 0.1% Agrin + 1% penicillin-  
614 streptomycin (Gibco, 15140-122)). Half of medium volume was changed every two days.

615 Mouse myoblast C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM  
616 (Gibco, 41966029) + 15% fetal bovine serum (Gibco, 10270-106) + 1% penicillin-streptomycin  
617 (Gibco, 15140-122)) and were plated on 1% matrigel-coated dishes for 1-2 days before induction  
618 of differentiation by a switching into differentiation media (DMEM + 1% horse serum).

619 Primary human myoblasts were plated on 1% matrigel-coated dishes and cultured in a  
620 proliferative medium containing 40% Skeletal Muscle cell Growth Medium with supplemented  
621 Mix (Promocell, C-23060), 30% DMEM, High Glucose, Pyruvate (Gibco, 41966029), 20%  
622 decomplexed FBS (Gibco, 10270-106), 9% Medium 199, GlutaMAX Supplement (Gibco,  
623 41150-020), 1% pénicilline – streptomycine (Gibco, 15140-122), 0.005% Puromycin et 0.003%  
624 Dexamethasone. Differentiation was induced by a switch into differentiation media (Skeletal  
625 Muscle Cell Growth Medium, Promocell, C-23060). Differentiation medium was changed every  
626 two days.

## 627 **Cell transfection**

628 C2C12 and primary myoblasts cell were transfected with either Lipofectamine RNAiMAX  
629 (ThermoFisher Scientifics, 13778-150) for siRNA transfection or with Lipofectamine 3000  
630 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) for shRNA transfection, in accordance with manufacturer  
631 instructions. Co-transfection experiments (*i.e.* plasmids and siRNA) were performed using  
632 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) in accordance with manufacturer  
633 instructions. The list of siRNA and shRNA used is described in supplementary table 9.

634

## 635 **Video-Microscopy**

636 Myonuclei tracking: timelapse images were acquired every 20 min using Z1-AxioObserver  
637 (Zeiss). Myonuclei were manually tracked using Metamorph (Zeiss) and analyzed using  
638 SkyPad<sup>®</sup> plugin as described before <sup>41</sup>.

639 EB1 tracking: timelapse images were acquired every 150 milliseconds using Ti Eclipse (Nikon)  
640 microscope 60X oil objective, Plan Apo, NA: 1.4, WD: 0.13, coverglass thickness: 0.17. EB1  
641 comets trajectory were extracted using ImageJ<sup>®</sup>. To determine EB1 comets orientation, Six  
642 continuous frame of a time-lapse movie of EB1-GFP were overlapped, the first three are color-  
643 coded in green and the last three are color-coded in red as described before<sup>36</sup>. EB1 comets  
644 velocity was measured using Particle Tracker in ImageJ<sup>®</sup> <sup>62</sup>.

645

### 646 **Primary cells immunofluorescence staining**

647 Cells were fixed in 4% Paraformaldehyde – 4% sucrose in PBS for 20 min at 37°C followed by  
648 washes with PBS and membrane permeabilization with 0.5% Triton-X100 in PBS for 5 min at  
649 Room Temperature (RT). Following washes with PBS, cells were saturated with 1% BSA in  
650 PBS for 30 min at RT and incubated in primary antibodies overnight at 4°C. Following washes  
651 with 0.05% Triton-X100 in PBS, cells were incubated in secondary antibodies or dyes for 2 hrs  
652 at RT followed by washes with 0.05% Triton-X100 in PBS and a last wash in PBS. Cultured  
653 myofibers were imaged using Z1-AxioObserver (Zeiss) with a 10X objective N-Achroplan, 0.25  
654 Ph1, N.A 0.25 or confocal LSM880 microscope (Zeiss). The list of antibodies used for  
655 immunostaining is described in supplementary table 10.

656

### 657 **Protein sample preparation**

658 Cells were harvested using trypsin (Gibco, 15400054) for 5min at 37°C and centrifuged at  
659 1500RPM for 5 min at 4°C. Cell pellets were diluted and incubated in the optimal volume of  
660 RIPA lysis buffer containing phosphatases inhibitors (Sigma, P5726) and proteases inhibitors  
661 (Sigma, P8340) for 10 min at 4°C. Following a sonication at 4°C, protein samples were collected  
662 for further uses. The concentration of proteins was determined using BCA protein assay kit  
663 (Thermo Fisher Scientifics, 23225) as described by the manufacturer.

664

### 665 **Subcellular fractionation assay**

666 Cells were harvested, using Trypsin for 5min at 37°C and centrifuged at 1500RPM for 5min at  
667 4°C. Cell pellet was washed in PBS at 4°C, diluted into TSE containing 10mM Tris pH 7.4,  
668 250mM sucrose, 1mM EDTA, phosphatases inhibitors (Sigma, P5726) and proteases inhibitors  
669 (Sigma, P8340), and then passed 40 times through a 27G needle (Dutscher, 050100B). Cell

670 lysates were centrifuged at 1500 RPM, for 5 min at 4°C. Supernatants containing cytoplasmic  
671 fractions were collected and stored at -80°C for further use. Nuclear pellets were washed in TSE  
672 1X, passed 10 times through a 27G needle and centrifuged at 1500RPM for 10 min at 4°C. This  
673 step was repeated 3 times. Purified nuclear pellets were diluted in 1% NP40 – TSE 1X and  
674 incubated at 4°C for 1h before being stored at -80°C for further use.

675

#### 676 **Western blot analysis**

677 Samples were loaded onto 6% acrylamide gels and migrated at 130V for 10 min followed by  
678 90min at 160V. Wet blotting system (BioRad) was used to transfer proteins to PVDF membranes  
679 (Millipore, Immobilon-P, IPVH00010). Membranes were then saturated in 5% milk in 0.1%  
680 Tween20 – 1X TBS for 1hr at RT and were incubated in primary antibodies in 1% milk in TBS  
681 overnight at 4°C. Following washes by 0.1% Tween20 – 1X TBS, membranes were incubated in  
682 HRP conjugated secondary antibodies in 1% milk in TBST for 1hr at RT. Following washes in  
683 0.1% Tween20 – 1X TBS, detections of target proteins were carried out using clarity Western  
684 ECL substrate (BioRad, 1705060) and ChemiDoc imaging system (BioRad). The list of  
685 antibodies used for western blotting is described in supplementary table 10.

#### 686 **RNA extraction**

687 After addition of Trizol (Sigma, T9424), samples were incubated in chloroform for 5min at RT,  
688 centrifuged for 15 min at 12000g at 4°C and incubated in tubes containing isopropanol for 10  
689 min at RT. Samples were then centrifuge for 15 min at 12000 g at 4°C, washed two times with  
690 70% ethanol and RNA pellets were diluted into ultra-pure RNase free water (Invitrogen, 10977-  
691 035). RNA concentration was analyzed using Nanodrop® (ThermoFisher Scientific).

#### 692 **RT-q-PCR**

693 Goscript Reverse Transcriptase System (Promega, A5001) was used as described by the  
694 manufacturer to produce the cDNAs. Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche,  
695 04913914001) and CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) were used to  
696 carry out quantitative PCR using primer described in supplementary table 3. Normalization was  
697 performed using three housekeeping genes (*Gapdh*; *GusB* and *Rpl41*).

#### 698 **Mice electroporation**



699 8 weeks old male C57BL/6 WT mice were anesthetized with intraperitoneal injection of Ketamin  
700 (100mg/kg) - Xylazin (10mg/kg). Hind legs were shaved and 20µg of plasmid DNA diluted into  
701 0.9% NaCl were injected in both contralateral *Tibialis Anterior* muscles. Injected muscles  
702 received a short massage and a thin layer of ultrasound gel was applied. Electrodes were  
703 positioned on both side of muscles and an electrical field was applied characterized by 8 pulses  
704 of 20ms spaced 500ms apart, at 200V/cm of thickness of muscle (i.e. 80V). Two weeks post-  
705 electroporation, mice were sacrificed and muscles were harvested. The whole experiment  
706 procedure is in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the  
707 University Claude Bernard – Lyon 1 and in accordance with French and European legislation on  
708 animal experimentation and approved by the ethics committee CECCAPP and the French  
709 ministry of research.

710

### 711 **Isolation of mono-myofibers, immunofluorescence staining**

712

713 Following dissection of the whole muscle from the mice, *Tibialis Anterior* muscles were fixed in  
714 4% PFA in PBS for 30 min at RT. After washes, 30 to 50 mono-myofibers were isolated per  
715 condition from each muscle. Myofibers were permeabilized using 1% Triton-X100 in PBS for 15  
716 min at RT and saturated in 1% BSA in PBS for 30 min at RT. Myofibers were then incubated in  
717 primary antibodies at 4°C for 2 nights. Following 0.05% Triton-X100 in PBS washes, myofibers  
718 were incubated in secondary antibodies or dyes overnight at 4°C. Then, washes with 0.05%  
719 Triton-X100 in PBS and a last wash in PBS were carried. Myofibers were mounted on slides  
720 using Fluoromount Aqueous mounting (Sigma, F4680) and kept at 4°C. Analysis were conducted  
721 using confocal LSM880 microscope (Zeiss). Microtubule architecture organization was analyzed  
722 using TeDT software described <sup>64</sup>

723

### 724 **Microtubule architecture organization**

725 Microtubule architecture organization was analyzed using TeDT software as previously  
726 described <sup>64</sup>.

727

### 728 **Transversal muscles immunostaining and analysis**

729 *Tibialis anterior*, muscles were collected, embedded in tragacanth gum, and quickly frozen in  
730 isopentane cooled in liquid nitrogen. Cross-sections (10µm thick) were obtained from the middle

731 portion of frozen muscles and processed for immunostaining. Images were acquired using Z1-  
732 AxioObserver (Zeiss). The myofiber cross-sectional area and the number of centrally nucleated  
733 fibers were determined using Laminin and DAPI-stained sections. Cross-sectional areas and  
734 myonuclei misorientation within electroporated myofibers were measured and quantified  
735 manually using ImageJ® software.

### 736 **Quantification methods for myonuclei spreading in myotubes**

737 Quantifications in immature myotubes were assessed using an analysis tool developed in our  
738 team. An image analysis performed in ImageJ® software is combined with a statistical analysis  
739 in RStudio® software. This provides quantifications of parameters, ranked by myonuclei content  
740 per myotubes, regarding phenotype of myotubes (area, length) and their respective myonuclei  
741 positioning compare to centroid of myotubes (DMcM).

742 MSG diagrams were obtained through the normalization of lengths of all analyzed myotubes  
743 (independently to their myonuclei content) to 100%. White lines represent myonuclei density  
744 curves assessing the statistical frequency for myonuclei positioning along myotubes. Each color  
745 group reflects statistical estimation of myonuclei clustering along myotubes.

746

### 747 **Statistical analysis**

748 The statistical analyses were performed using Student's t test according to samples amount and  
749 distribution.

### 750 **Acknowledgment**

751

### 752 **References**

753

754 Roman, W. & Gomes, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Seminars in Cell and Developmental*  
755 *Biology* (2017). doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.005

756 Bruusgaard, J. C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K. & Gundersen, K. Number and spatial distribution  
757 of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *The Journal of Physiology* **551**, 467–478  
758 (2003).

759 Sanger, J. W., Wang, J., Fan, Y., White, J. & Sanger, J. M. Assembly and dynamics of myofibrils.  
760 *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 858606–8 (2010).

761 Cho, S., Irianto, J. & Discher, D. E. Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling  
762 relationships. *J. Cell Biol.* **216**, 305–315 (2017).

763 Lele, T. P., Dickinson, R. B. & Gundersen, G. G. Mechanical principles of nuclear shaping and  
764 positioning. *J. Cell Biol.* **109**, jcb.201804052 (2018).

765 Qaisar, R. & Larsson, L. What determines myonuclear domain size? *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **58**, 1–  
766 12 (2014).

767 Robson, M. I. *et al.* Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle Nuclear Membrane Proteins  
768 Enhances Repression of Critical Developmental Genes during Myogenesis. *Mol. Cell* **62**, 834–847  
769 (2016).

770. Metzger, T. *et al.* MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle  
771 function. *Nature* **484**, 120–124 (2012).
772. Janin, A. & Gache, V. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles.  
773 *Front Physiol* **9**, 97 (2018).
7740. Kirby, T. J. & Lammerding, J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat. Cell*  
775 *Biol.* 1–9 (2018). doi:10.1038/s41556-018-0038-y
7761. Gache, V., Gomes, E. R. & Cadot, B. Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal  
777 muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell* mbc.E16–06–0405 (2017). doi:10.1091/mbc.E16-06-0405
7782. Roman, W. *et al.* Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of  
779 skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **152**, 1376–33 (2017).
7803. Ghasemizadeh, A. *et al.* Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization  
781 through microtubules to control muscle functionalities. *bioRxiv* **12**, 636464 (2019).
7824. Lei, K. *et al.* SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal  
783 muscle cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 10207–10212 (2009).
7845. Méjat, A. *et al.* Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular  
785 dystrophy. *J. Cell Biol.* **184**, 31–44 (2009).
7866. Lee, Y. L. & Burke, B. LINC complexes and nuclear positioning. *Seminars in Cell and Developmental*  
787 *Biology* (2017). doi:10.1016/j.semcd.2017.11.008
7887. Karolczak, J., Sobczak, M., Skowronek, K. & R x119 dowicz, M. J. A Kinase Anchoring Protein 9 Is a  
789 Novel Myosin VI Binding Partner That Links Myosin VI with the PKA Pathway in Myogenic Cells.  
790 *Biomed Res Int* 1–12 (2015). doi:10.1155/2015/816019
7918. Gimpel, P. *et al.* Nesprin-1 $\alpha$ -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450  
792 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Current biology: CB* (2017).  
793 doi:10.1016/j.cub.2017.08.031
7949. Zhang, T. *et al.* Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation,  
795 elongation and fusion. *J. Cell. Sci.* **122**, 1401–1409 (2009).
7960. Wang, S., Reuveny, A. & Volk, T. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by cooperating  
797 with spectraplakins and EB1. *J. Cell Biol.* **209**, 529–538 (2015).
7981. Bugnard, E., Zaal, K. J. M. & Ralston, E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle  
799 differentiation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 1–13 (2005).
8002. Basu, S. *et al.* CLASP2-dependent microtubule capture at the neuromuscular junction membrane requires  
801 LL5 $\beta$  and actin for focal delivery of acetylcholine receptor vesicles. *Mol. Biol. Cell* **26**, 938–951 (2015).
8023. Vilmont, V., Cadot, B., Vezin, E., Le Grand, F. & Gomes, E. R. Dynein disruption perturbs post-synaptic  
803 components and contributes to impaired MuSK clustering at the NMJ: implication in ALS. *Scientific*  
804 *Reports* **6**, 27804 (2016).
8054. Schmidt, N. *et al.* Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular  
806 junction synaptic membrane. *J. Cell Biol.* **198**, 421–437 (2012).
8075. Basu, S. *et al.* Acetylcholine Receptor (AChR) Clustering Is Regulated Both by Glycogen Synthase  
808 Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )-dependent Phosphorylation and the Level of CLIP-associated Protein 2 (CLASP2)  
809 Mediating the Capture of Microtubule Plus-ends. *J. Biol. Chem.* **289**, 30857–30867 (2014).
8106. Mogessie, B., Roth, D., Rahil, Z. & Straube, A. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial  
811 microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife* **4**, e05697 (2015).
8127. Silk, A. D., Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Requirements for NuMA in maintenance and  
813 establishment of mammalian spindle poles. *J. Cell Biol.* **184**, 677–690 (2009).
8148. Gallini, S. *et al.* NuMA Phosphorylation by Aurora-A Orchestrates Spindle Orientation. *Current biology:*  
815 *CB* **26**, 458–469 (2016).
8169. Pimentel, M. R., Falcone, S., Cadot, B. & Gomes, E. R. In Vitro Differentiation of Mature Myofibers for  
817 Live Imaging. *Journal of visualized experiments: JoVE* e55141–e55141 (2017). doi:10.3791/55141
8180. Bugnard, E., Zaal, K. J. M. & Ralston, E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle  
819 differentiation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 1–13 (2004).
8201. Wilson, M. H. & Holzbaur, E. L. F. Opposing microtubule motors drive robust nuclear dynamics in  
821 developing muscle cells. *J. Cell. Sci.* **125**, 4158–4169 (2012).
8222. Haren, L. & Merdes, A. Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the  
823 tail domain that bundles and stabilizes microtubules. 1–10 (2002).
8243. Gache, V. *et al.* Identification of proteins binding the native tubulin dimer. *Biochem. Biophys. Res.*

825 *Commun.* **327**, 35–42 (2005).

8264. Ralston, E., Ploug, T., Kalhovde, J. & Lømo, T. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and  
827 microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J. Neurosci.* **21**, 875–883  
828 (2001).

8295. Tassin, A. M., Maro, B. & Bornens, M. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in  
830 vitro. *J. Cell Biol.* **100**, 35–46 (1985).

8336. Cadot, B. *et al.* Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is  
832 regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* **13**, 741–749 (2012).

8337. Hueschen, C. L., Kenny, S. J., Xu, K. & Dumont, S. NuMA recruits dynein activity to microtubule  
834 minus-ends at mitosis. *Elife* **6**, e29328 (2017).

8358. Okumura, M., Natsume, T., Kanemaki, M. T. & Kiyomitsu, T. Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate  
836 cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *Elife* **7**, 3453 (2018).

8379. Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. D. & Cleveland, D. W. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein  
838 is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* **87**, 447–458 (1996).

8390. Metzger, T. *et al.* MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle  
840 function. *Nature* **484**, 120–124 (2012).

8441. Cadot, B., Gache, V. & Gomes, E. R. Fast, multi-dimensional and simultaneous kymograph-like particle  
842 dynamics (SkyPad) analysis. *PLoS ONE* **9**, e89073 (2014).

8432. Guilluy, C. *et al.* Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus.  
844 *Nat. Cell Biol.* **16**, 376–381 (2014).

8453. Radulescu, A. E. & Cleveland, D. W. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends in Cell Biology*  
846 **20**, 214–222 (2010).

8474. Gundersen, K. & Bruusgaard, J. C. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost?  
848 *The Journal of Physiology* **586**, 2675–2681 (2008).

8495. Oury, J. *et al.* MACF1 links Rapsyn to microtubule- and actin-binding proteins to maintain  
850 neuromuscular synapses. *J. Cell Biol.* **114**, jcb.201810023 (2019).

8546. Bruusgaard, J. C., Liestøl, K. & Gundersen, K. Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle  
852 fibers of young, middle-aged, and old mice. *Journal of Applied Physiology* **100**, 2024–2030 (2006).

8537. Wang, S., Reuveny, A. & Volk, T. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by cooperating  
854 with spectraplakins and EB1. *J. Cell Biol.* **209**, 529–538 (2015).

8558. Iyer, S. R. *et al.* Altered nuclear dynamics in MDX myofibers. *Journal of Applied Physiology*  
856 jap.00857.2016–34 (2016). doi:10.1152/jap.00857.2016

8579. Comai, G. & Tajbakhsh, S. Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis. *Curr. Top. Dev.*  
858 *Biol.* **110**, 1–73 (2014).

8590. Oddoux, S. *et al.* Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated  
860 at Golgi elements. *J. Cell Biol.* **203**, 205–213 (2013).

8611. Osseni, A. *et al.* Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J.*  
862 *Cell. Sci.* **129**, 3744–3755 (2016).

8632. Robison, P. *et al.* Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes.  
864 *Science* **352**, aaf0659 (2016).

8653. Kerr, J. P. *et al.* Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle.  
866 *Nat Commun* **6**, 1–14 (2015).

8674. Folker, E. S., Schulman, V. K. & Baylies, M. K. Muscle length and myonuclear position are  
868 independently regulated by distinct Dynein pathways. *Development* **139**, 3827–3837 (2012).

8695. Sabblah, T. T. *et al.* A novel mouse model carrying a human cytoplasmic dynein mutation shows motor  
870 behavior deficits consistent with Charcot-Marie-Tooth type 2O disease. *Scientific Reports* **8**, 1739 (2018).

8716. Courchesne, S. L., Pazyra-Murphy, M. F., Lee, D. J. & Segal, R. A. Neuromuscular junction defects in  
872 mice with mutation of dynein heavy chain 1. *PLoS ONE* **6**, e16753 (2011).

8737. Torii, T. *et al.* NuMA1 promotes axon initial segment assembly through inhibition of endocytosis. *J. Cell*  
874 *Biol.* **219**, jcb.201907048 (2020).

8758. Rodrigues, M., Echigoya, Y., Fukada, S.-I. & Yokota, T. Current Translational Research and Murine  
876 Models For Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis* **3**, 29–48 (2016).

8779. Prins, K. W. *et al.* Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* **186**, 363–369 (2009).

8780. Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. & Laporte, J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J*  
879 *Rare Dis* **3**, 1–13 (2008).

8801. Metzger, T. *et al.* MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle  
881 function. *Nature* **484**, 120–124 (2012).
8802. Sbalzarini, I. F. & Koumoutsakos, P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in  
883 cell biology. *J. Struct. Biol.* **151**, 182–195 (2005).
8803. Falcone, S. *et al.* N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad  
885 organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy.  
886 *EMBO Mol Med* **6**, 1455–1475 (2014).
8804. Liu, W. & Ralston, E. A new directionality tool for assessing microtubule pattern alterations.  
888 *Cytoskeleton (Hoboken)* **71**, 230–240 (2014).
- 889

Figure 1

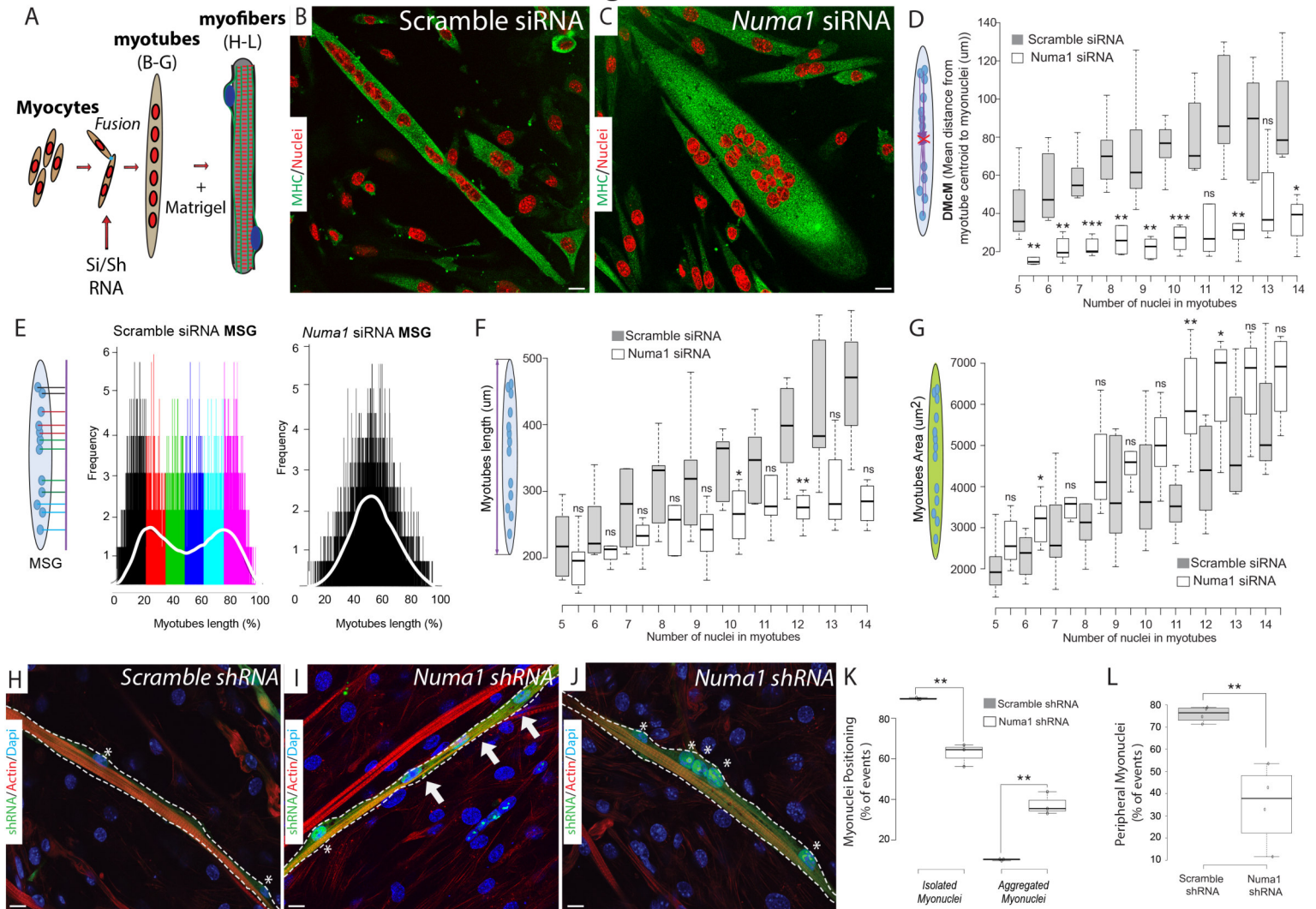
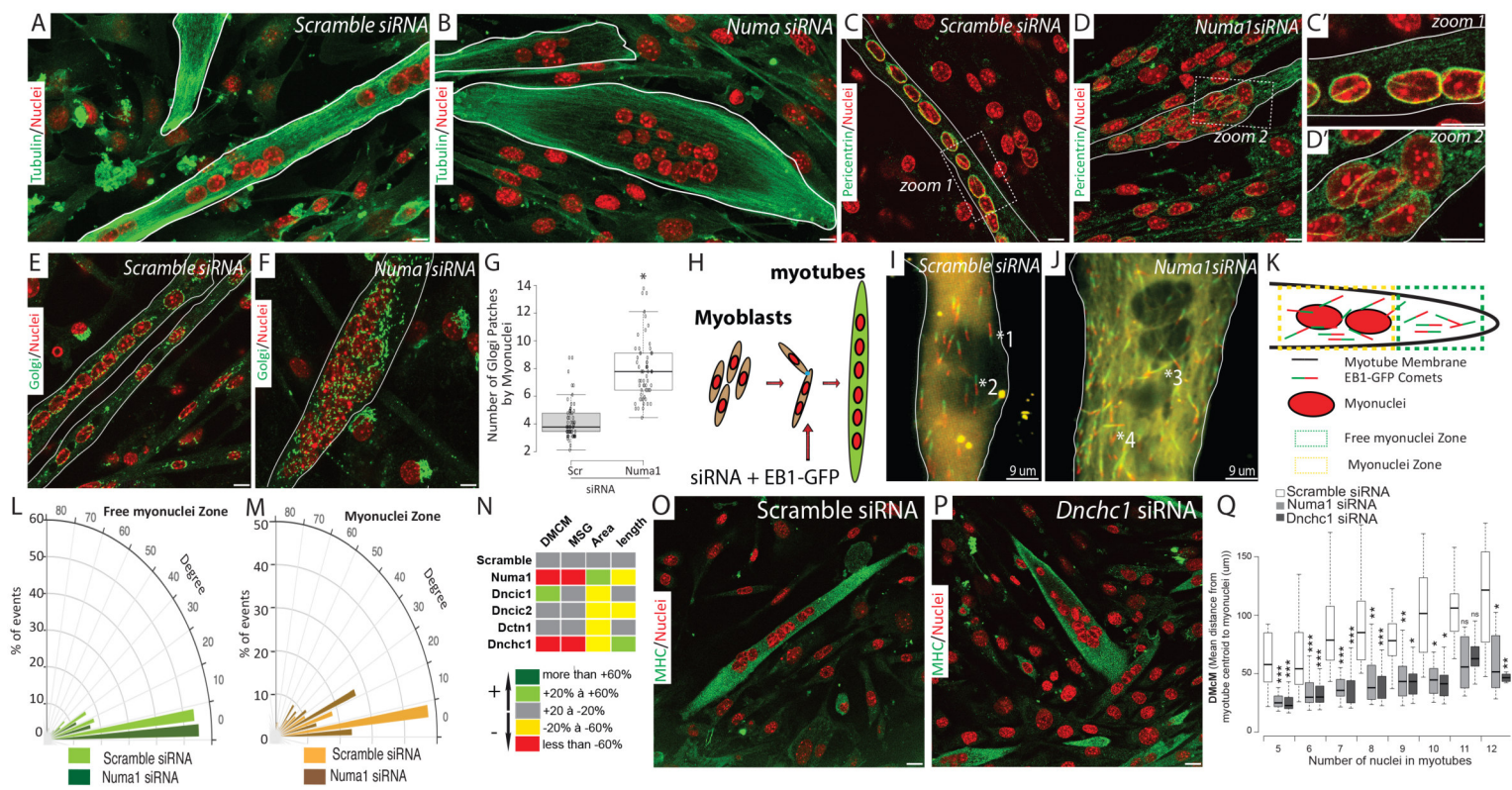


Figure 2



# Figure 3

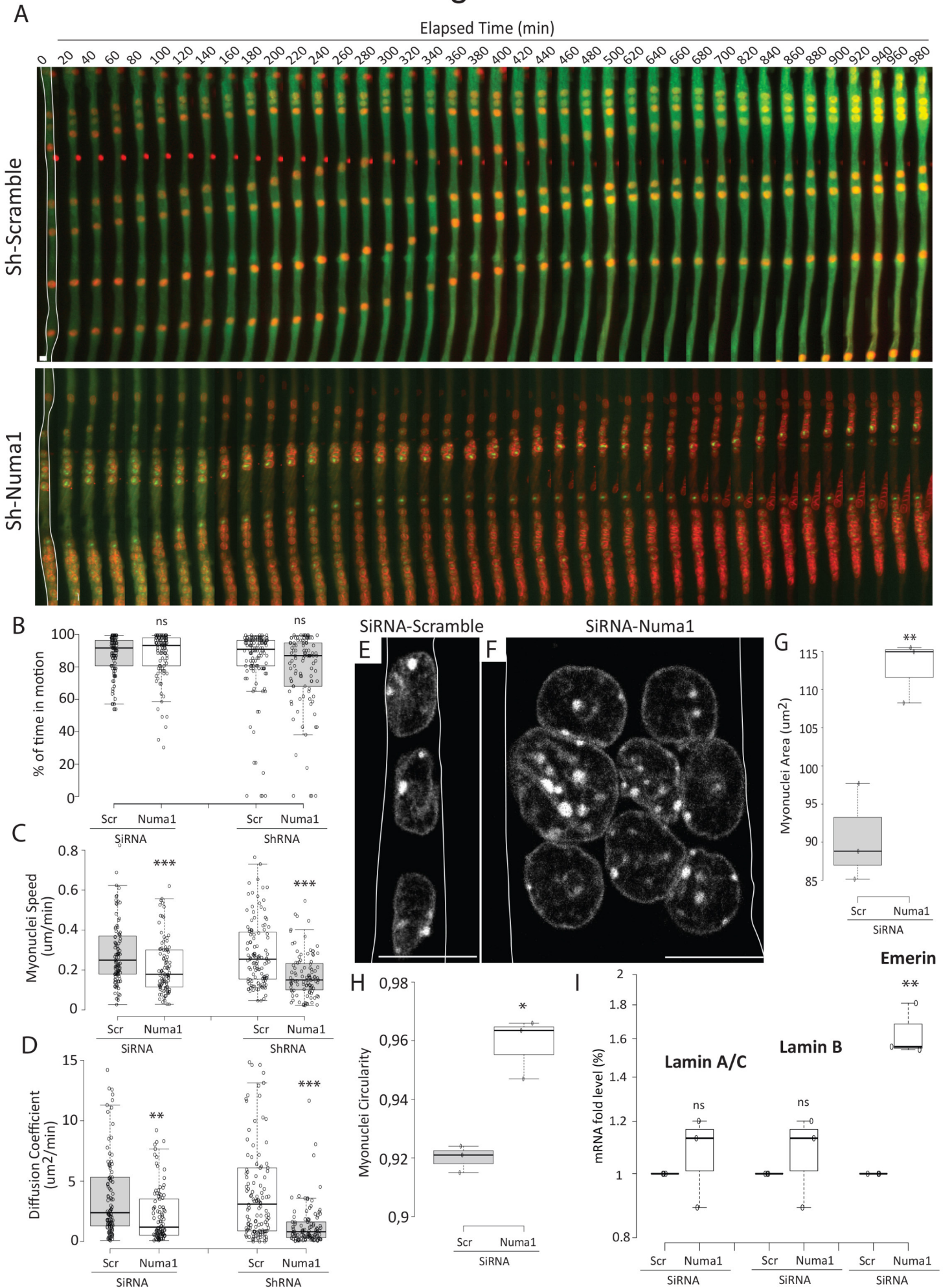
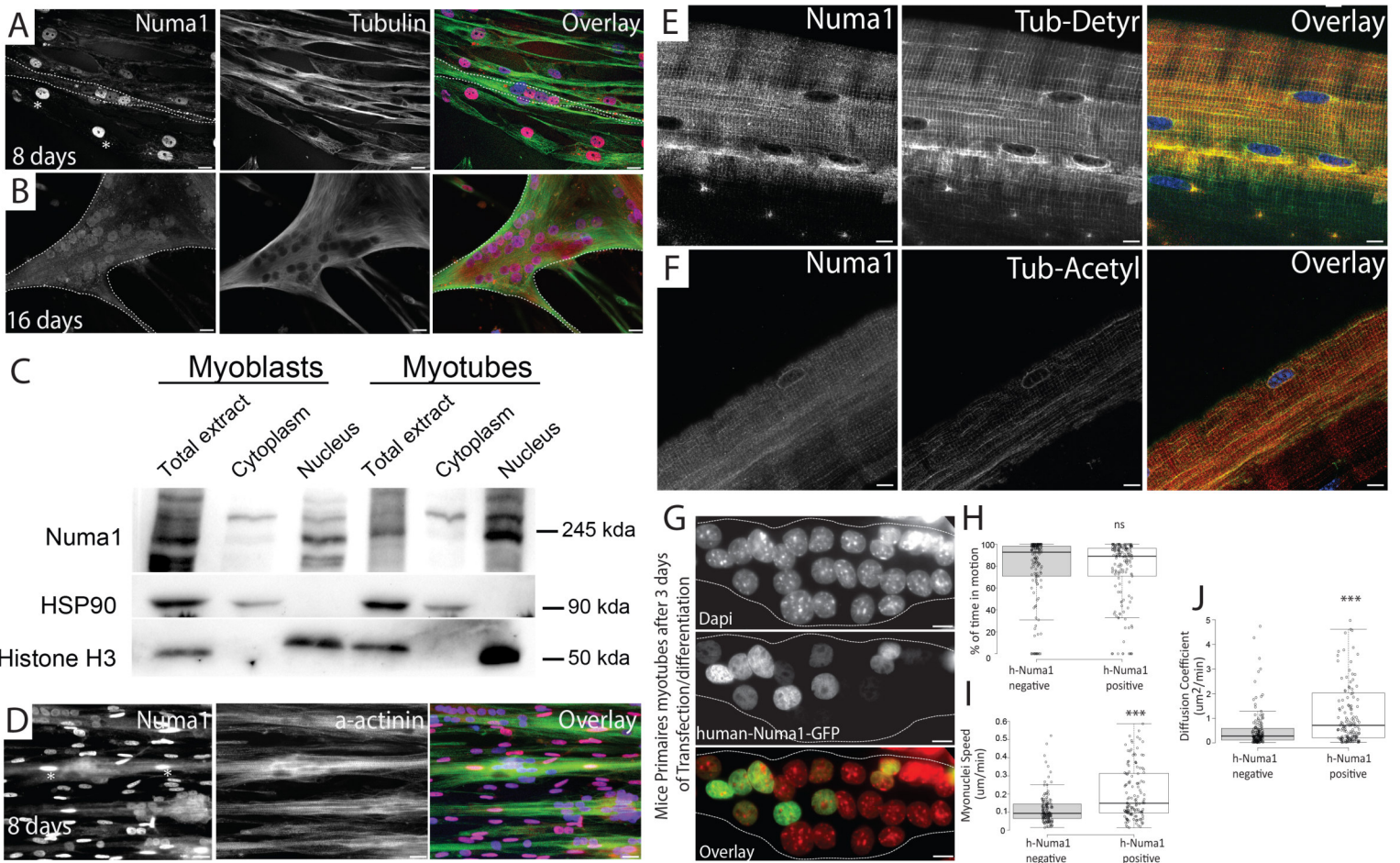




Figure 4



# Figure 5

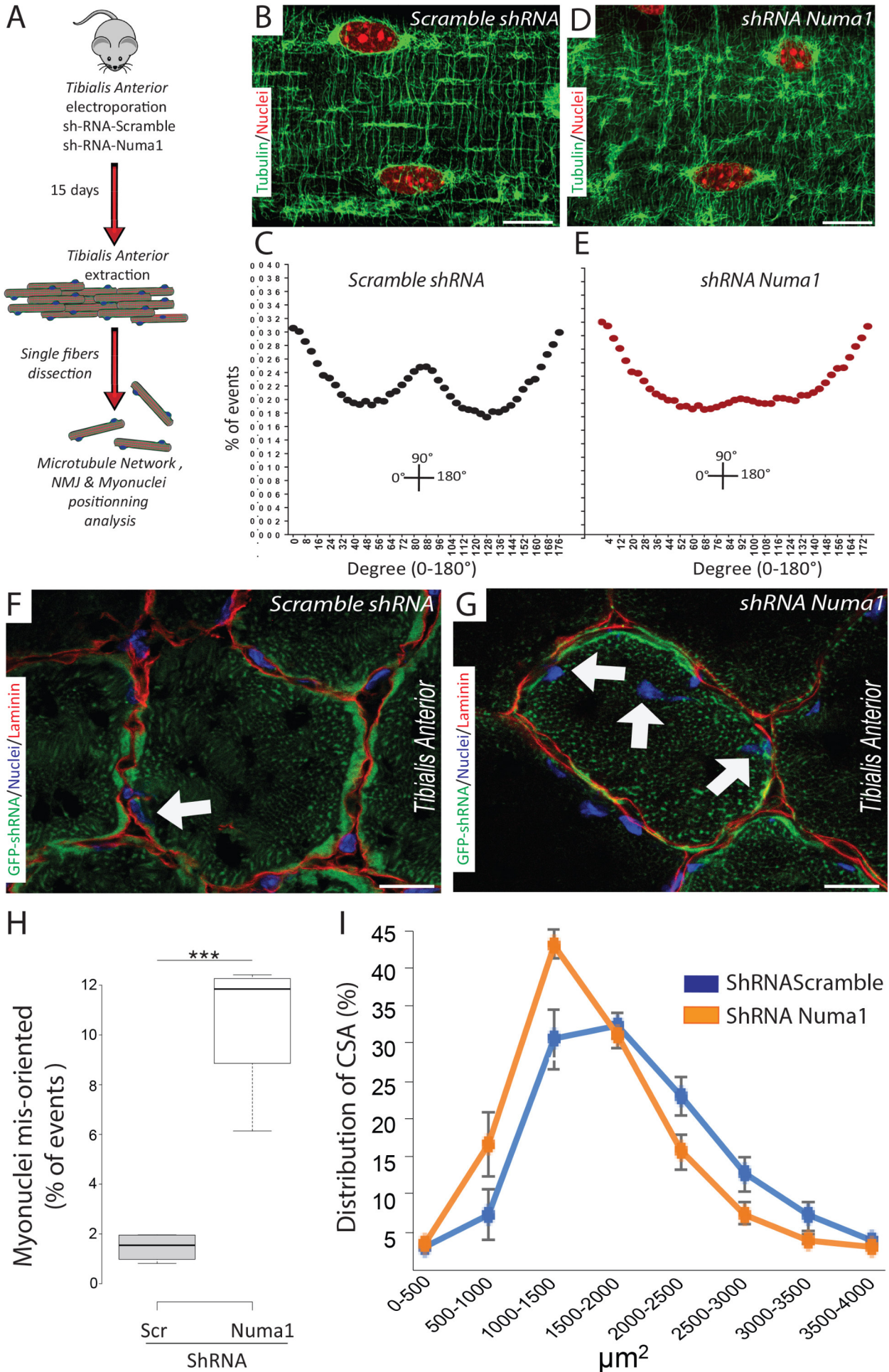


Figure 6

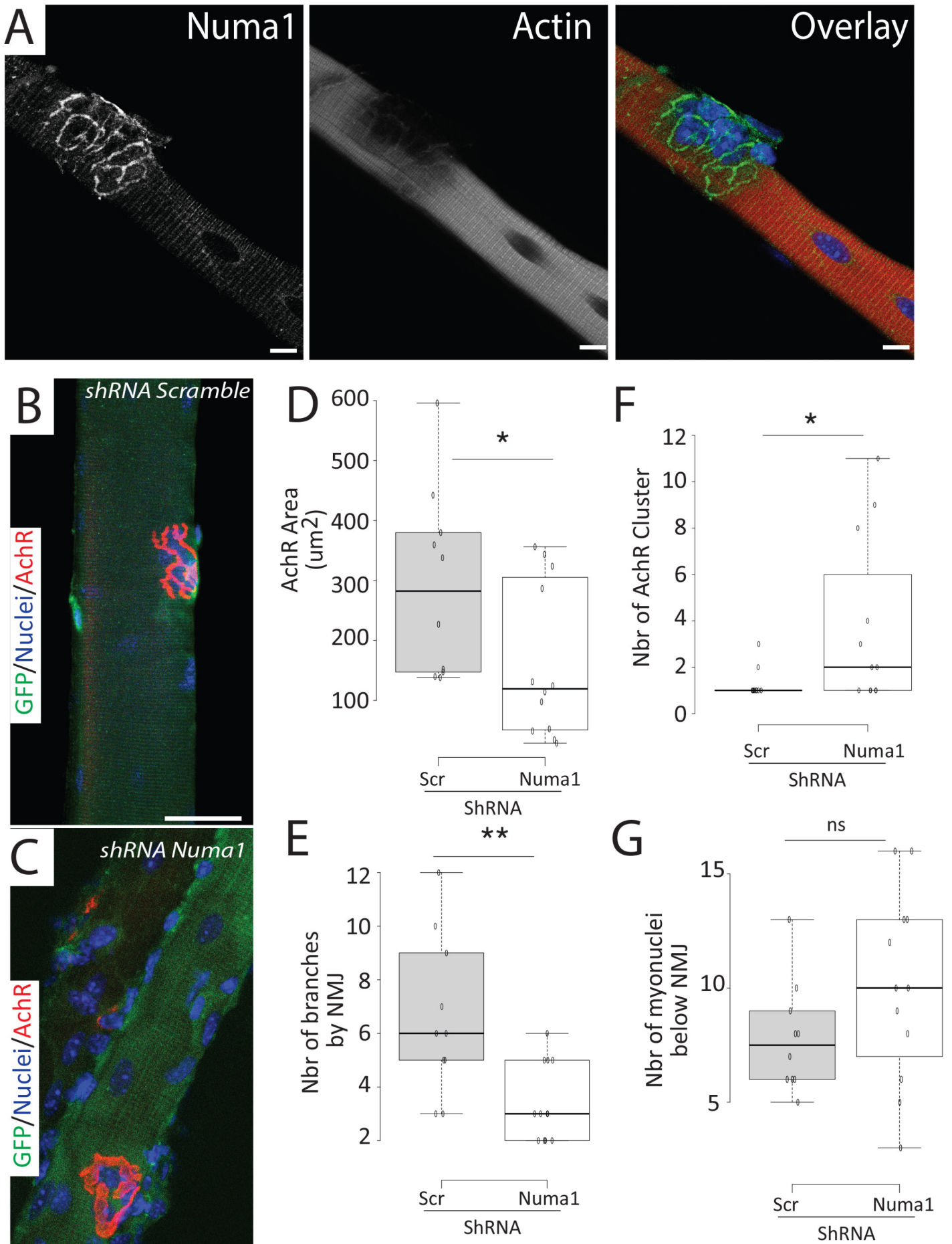
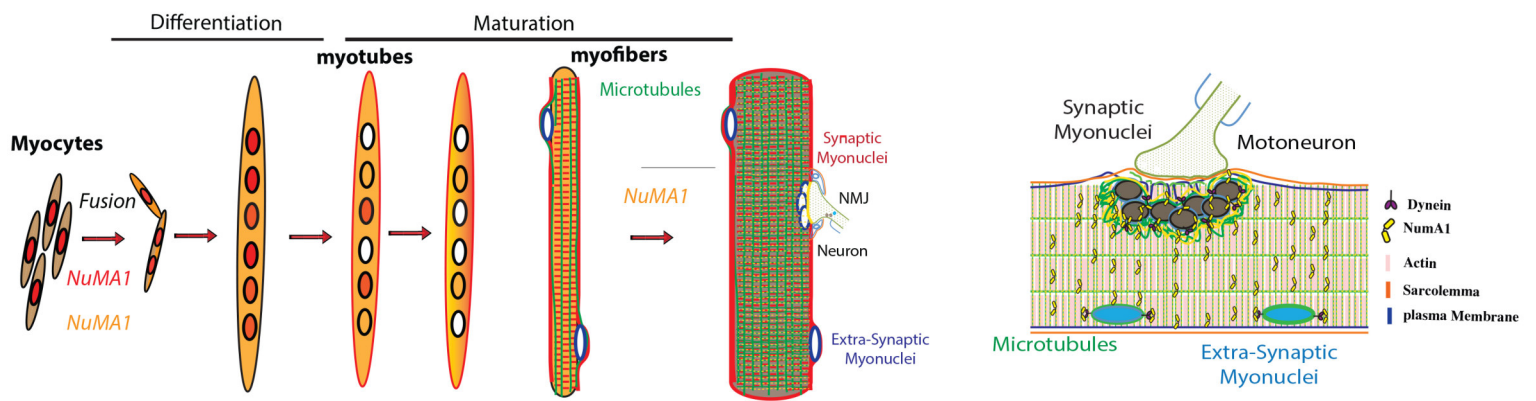
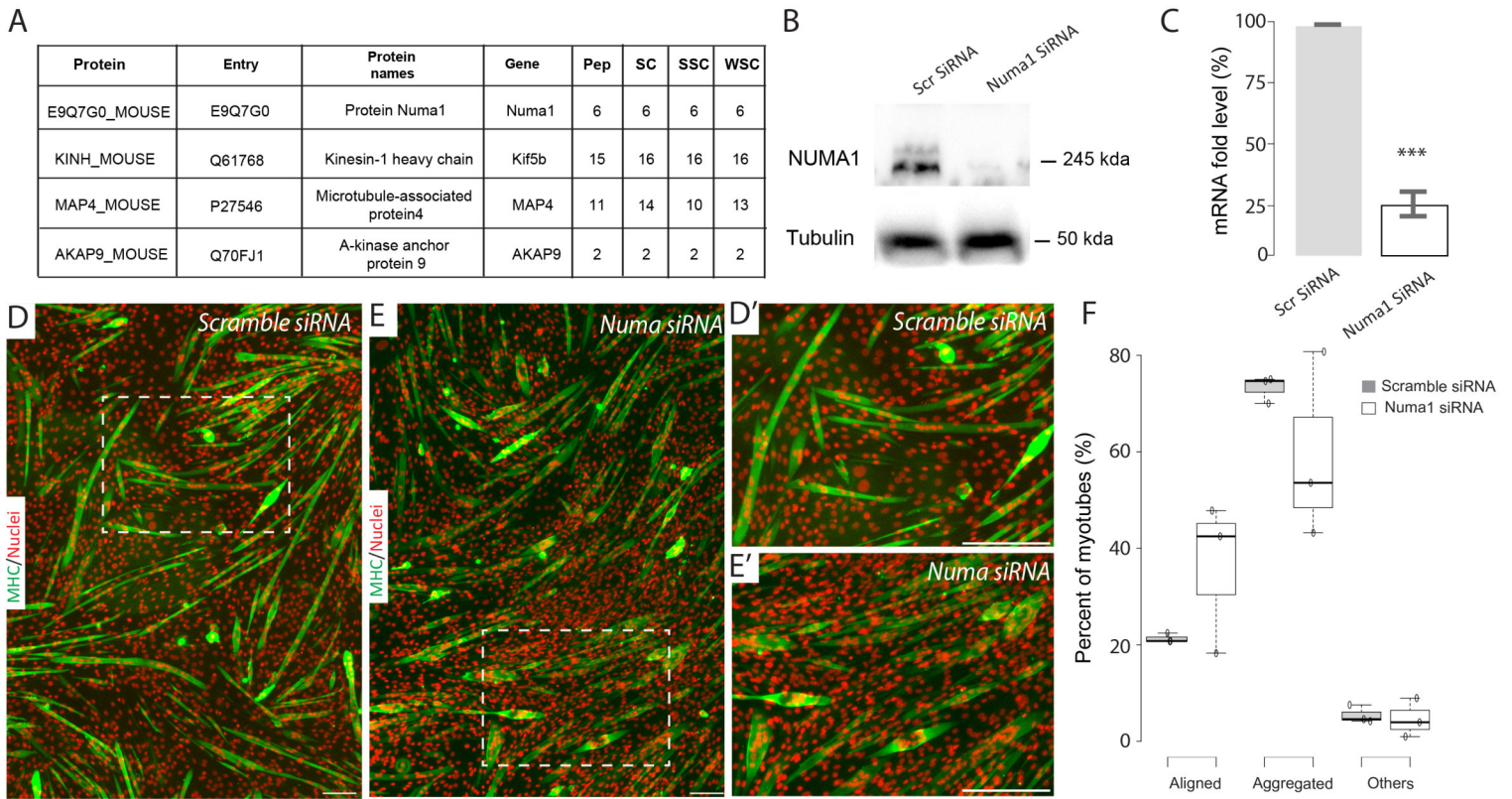


Figure 7



## Supplementary Figure 1

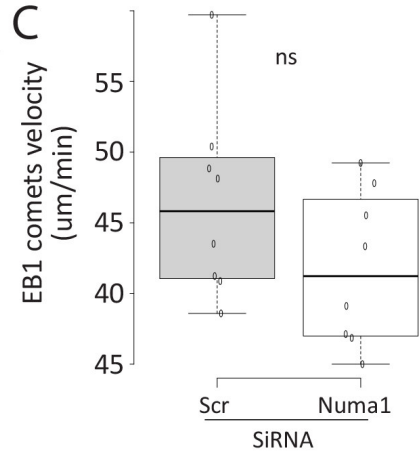
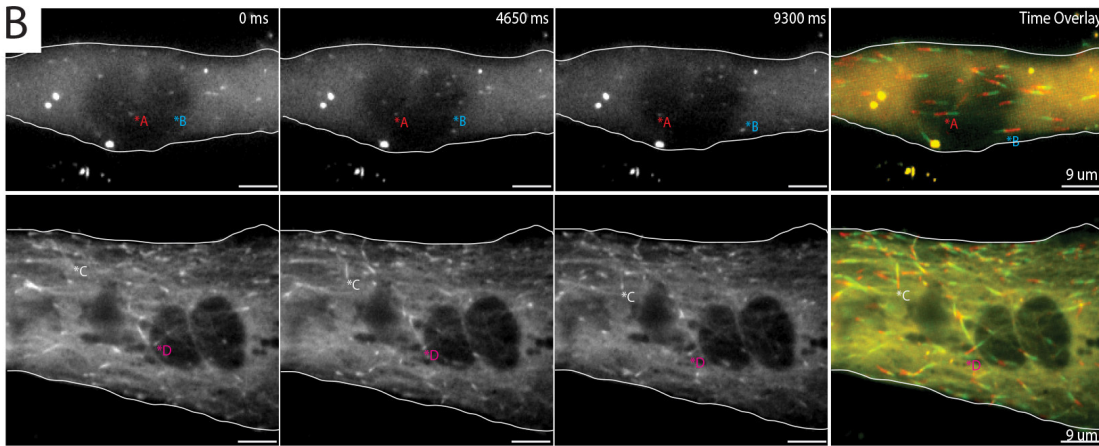
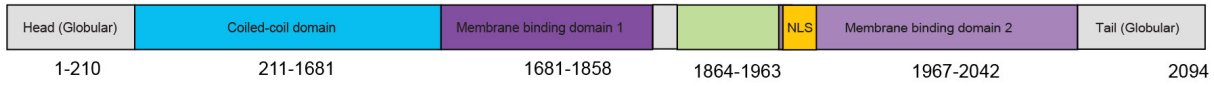


# Supplementary Figure 2

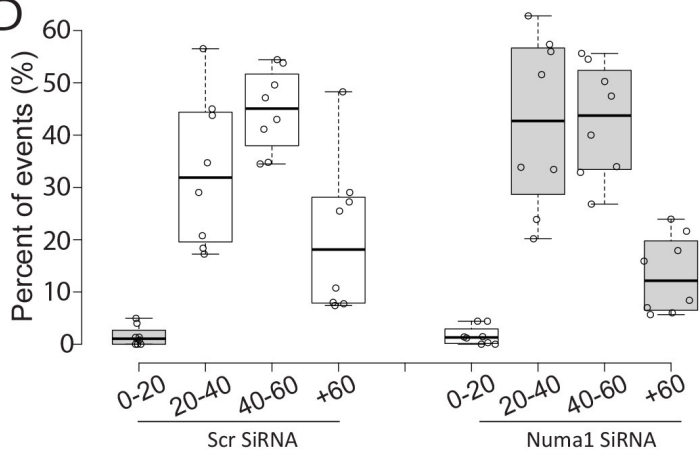
A

Dynein/dynactin binding domain

Microtubule binding domain



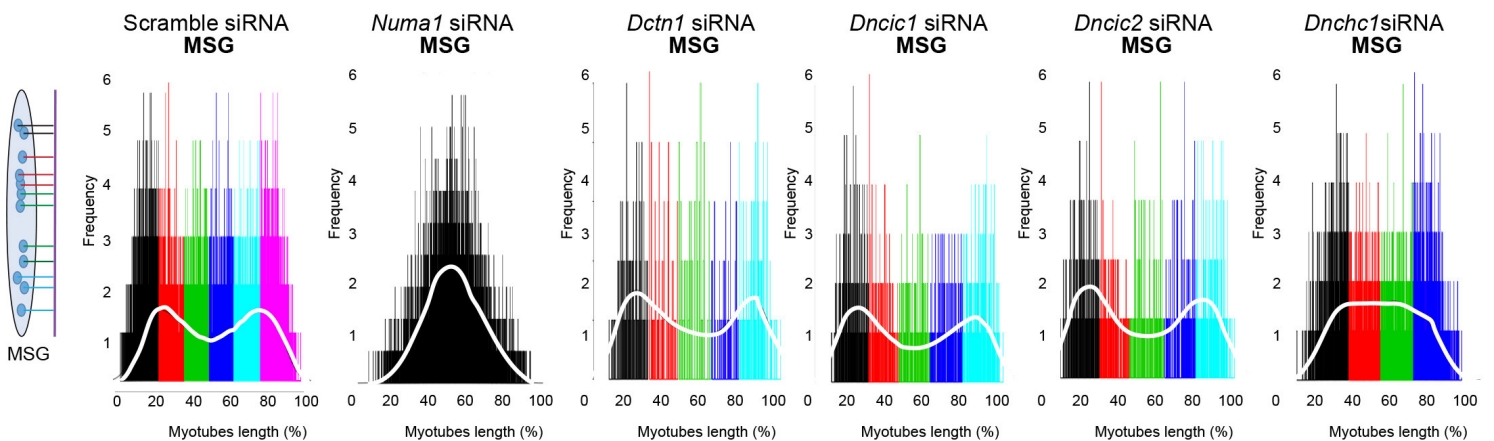
D



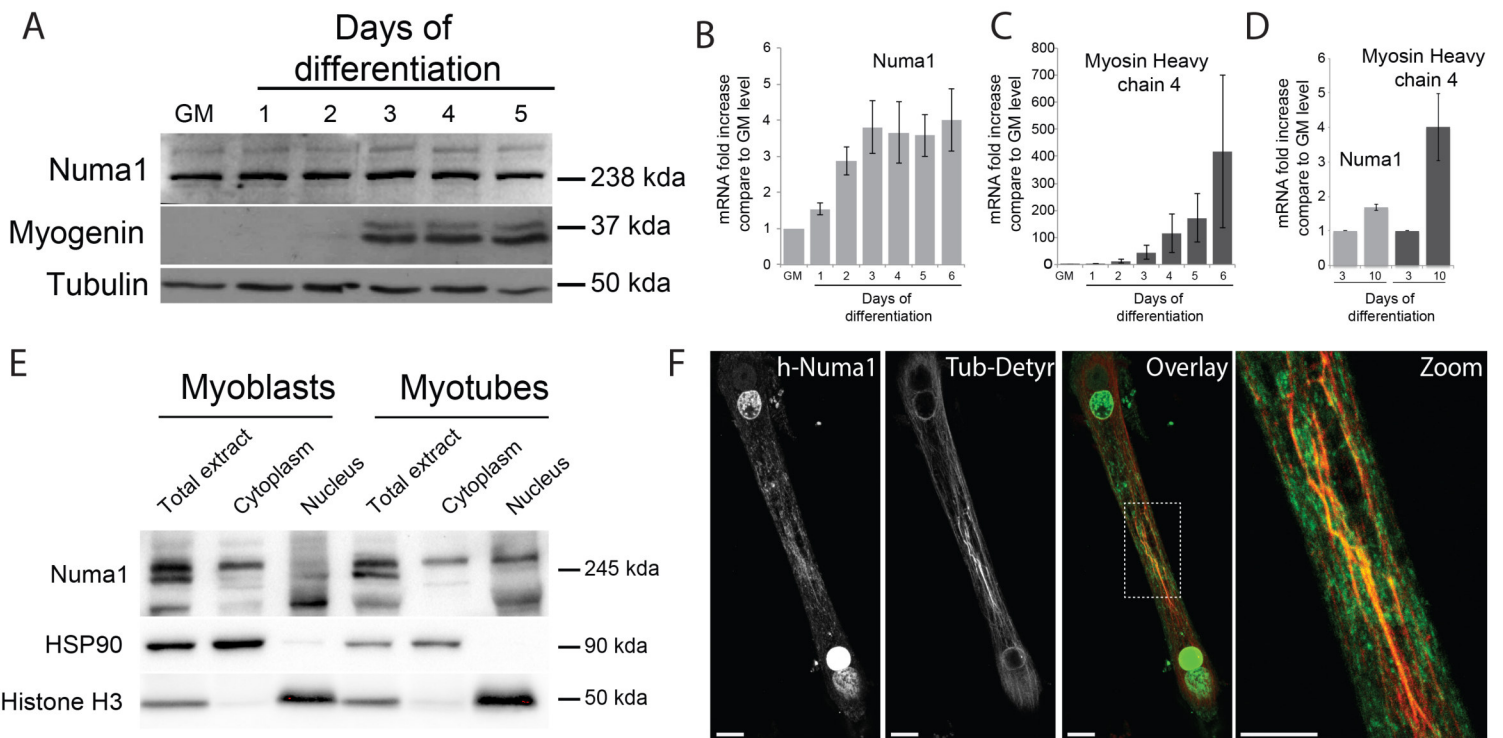
E

| Protein      | Entry  | Protein names                             | Gene   | Pep | SC  | SSC | WSC |
|--------------|--------|---|--------|-----|-----|-----|-----|
| DYHC1_MOUSE  | Q8R1Q8 | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1        | Dnchc1 | 89  | 111 | 11  | 111 |
| D3YX34_MOUSE | D3YX34 | Dynactin subunit 1                        | Dctn1  | 8   | 11  | 11  | 11  |
| DC1L1_MOUSE  | Q8R1Q8 | Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1 | Dncic1 | 9   | 10  | 9   | 9.8 |
| A2BFF5_MOUSE | A2BFF5 | Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 | Dncic2 | 5   | 5   | 5   | 5   |

F



### Supplementary Figure 3



Supplementary Table 1

Immunofluorescence

| Antibody or Dye                           | Species | Dilution Factor | Reference                        |
|---|---------|-----------------|----------------------------------|
| $\alpha$ -Tubulin                         | Mouse   | 1/100           | Sigma T6074                      |
| Acetylated-Tubulin                        | Mouse   | 1/100           | Sigma T7451                      |
| Detyrosinated Tubulin                     | Mouse   | 1/100           | US Biological T9154-05H          |
| Laminin-2                                 | Rat     | 1/200           | Sigma L0663                      |
| GM130                                     | Mouse   | 1/100           | BD Biosciences 610823            |
| NuMA1                                     | Rabbit  | 1/100           | Thermofisher scientific PA316829 |
| MF20                                      | Mouse   | 1/10            | DSHB                             |
| DAPI                                      | Dye     | 1/50000         | Thermofisher scientific D1306    |
| $\alpha$ -bungarotoxin<br>Alexa Fluor 647 | Dye     | 1/100           | Thermofisher scientific B35450   |
| Anti-Mouse<br>Alexa Fluor A488            | Goat    | 1/500           | Thermofisher scientific A32723   |
| Anti-Mouse<br>Alexa Fluor A555            | Goat    | 1/500           | Thermofisher scientific A21424   |
| Anti-Rabbit<br>Alexa Fluor A488           | Goat    | 1/500           | Thermofisher scientific A32731   |
| Anti-Rat Alexa<br>Fluor A594              | Donkey  | 1/500           | Thermofisher scientific A21209   |
| Pericentrin                               | Mouse   | 1/100           | BD Biosciences 611815            |
| Phalloidin Alexa<br>Fluor 555             | Dye     | 1/100           | Invitrogen A34055                |

Western Blotting

| Antibody or Dye   | Species | Dilution Factor | Reference                        |
|-------------------|---------|-----------------|----------------------------------|
| $\alpha$ -Tubulin | Mouse   | 1/1000          | Sigma T6074-                     |
| Histone H3        | Rabbit  | 1/2000          | Abcam 1791                       |
| HSP90             | Mouse   | 1/1000          | Enzo life SPA830                 |
| Myogenin          | Mouse   | 1/500           | Santa Cruz sc-12732              |
| NuMA1             | Rabbit  | 1/800           | Thermofisher scientific PA316829 |
| Anti-Mouse-HRP    | Goat    | 1/5000          | Invitrogen 62-6520               |
| Anti-Rabbit-HRP   | Goat    | 1/5000          | Invitrogen 65-6120               |



Supplementary Table 2

| siRNA           | Sense oligonucleotide sequence | Anti-Sense oligonucleotide sequence |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Scramble</b> | <b>Ambion, AM4641</b>          |                                     |
| NuMA1           | GGGCAAGGUGAAGCAUUAA            | UUAAUGCUUCACCUUGCCC                 |
| Dnc1c1 n°1      | GGAGUUUGACAAGAAGUAC            | GUACUUCUUGUCAAAACUCC                |
| Dnc1c1 n°2      | GGUGGCCAUUCUUCUGUUC            | GAACAGAAGAAUGGCCACC                 |
| Dnc1c1 n°3      | GGACUGCAUCCAAAUCCA             | UGGAAUUUGGAUGCAGUCC                 |
| Dnc1c1 n°1      | GGAAGAGGAGAGGAAGAAG            | CUUCUCCUCUCCUCUCC                   |
| Dnc1c1 n°2      | GGAAGAAAAACAGCAGAUC            | GAUCUGCUGUUUUUCUCC                  |
| Dnc1c1 n°3      | CCCAAAAUUGGUCAUGAUU            | AAUCAUGACCAAUUUUGGG                 |
| Dnc1c2 n°1      | GGAAAGGAAAAAAAAAGGAA           | UCCUUUUUUUUUCCUUCC                  |
| Dnc1c2 n°2      | GCAGAUUAACAUCUUCUUU            | AAAGAAGAUGUUAUCUGC                  |
| Dnc1c2 n°3      | CCAUUCUACGAGAAUUGUA            | UACAAUUCUCGUAGAAUGG                 |
| Dctn1 n°1       | GGAAGUAUUUCACAUGUGA            | UCACAUGUGAAAUACUCC                  |
| Dctn1 n°2       | CCUGGAAACAUCAUGUAGU            | ACUACAUGAUGUUUCCAGG                 |
| Dctn1 n°3       | CCACAUCAAGUUCACCCAG            | CUGGGUGAACUUGAUGUGG                 |
| Dnchc1 n°1      | GGAGAAAGAAUUCAUUUCC            | GGAAAUGAAUUCUUUCUCC                 |
| Dnchc1 n°2      | GGAGGUUAUGUUUAAAACU            | AGUUUUA<br>AACAUACCUC               |
| Dnchc1 n°3      | GCUCCUGUGAUUGAUGCAG            | CUGCAUCAAUCACAGGAGC                 |

| shRNA    | Clone ID               | Target sequence       |
|----------|------------------------|-----------------------|
| Scramble |                        |                       |
| NuMA1    | TRCN0000072130 (Sigma) | GCCAGATGGATCGAAAGATTA |

Supplementary Table 3

| <b>Primers</b> | <b>Sequence</b>         |
|----------------|-------------------------|
| Emerin_F       | CCAAGGAAGCAGCAAATGTT    |
| Emerin_R       | ACTGCCACCACCAAGTTTTC    |
| GAPDH_F        | AACTTTGGCATTGTGGAAGG    |
| GAPDH_R        | ACACATTGGGGGTAGGAACA    |
| GusB_F         | GAGGATTGCCAACGAAACCG    |
| GusB_R         | GTGTCTGGGGACCACCTTTGA   |
| LaminA/C_F     | GGCTACAGACGCTGAAGGAG    |
| LaminA/C_R     | CTGTTCCACCTGGTCCTCAT    |
| Lamin B_F      | GGGAACCTTTCAAGTGACCA    |
| Lamin B_R      | GGTGGAAGAGAGCTTGAACG    |
| Myh4_F         | CAAGTCATCGGTGTTTGTGG    |
| Myh4_R         | TGTCGTACTIONTGGGAGGGTTC |
| NuMA1_F        | AAGTATTGACAGCCTGGATCTGA |
| NuMA1_R        | GGTACGAGGCAGCTTGCTA     |
| Rpl41_F        | GCCATGAGAGCGAAGTGG      |
| Rpl41_R        | CTCCTGCAGGCGTCGTAG      |



## **Annexe à la publication 2 “Cytoplasmic NuMA1 promotes microtubules stabilization and controls myonuclear spreading and neuromuscular junctions integrity of skeletal muscle”**

### **Sélection de l'ARN interférent ciblant *Numa1***

Dans le but d'étudier le rôle de la protéine NuMA1 sur le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire, trois différents ARN interférents de type siRNA ont été testés dans nos systèmes *in vitro*. Leurs séquences sont présentées ci-dessous :

siRNA n°1 – sens : GGACUUAGAGAGUUUCUUGtt

siRNA n°1 - antisens : CAAGAAACUCUCUAAGUCCtc

siRNA n°2 – sens : GCCAGAUGGAUCGAAAGAUtt

siRNA n°2 - antisens : AUCUUUCGAUCCAUCUGGCtc

siRNA n°3 – sens : GGGCAAGGUGAAGCAUUAAtt

siRNA n°3 - antisens : UUAAUGCUUCACCUUGCCCtt

L'efficacité individuelle d'inhibition de NuMA1 de chacun des ARN interférents a été testé sur la lignée de cellules musculaires immortalisées C2C12. Des extraits protéiques et transcriptomiques ont été réalisés 48h après la transfection des ARN interférents sur des myoblastes C2C12 en prolifération. Nous avons pu confirmer l'efficacité de chacun des siRNA en RT-qPCR ainsi qu'en Western Blot. A l'issue de la réalisation de trois expériences séparées, le niveau d'ARN messenger de NuMA1 a été quantifié (Fig.58A). Les transfactions des siRNA entraînent respectivement une baisse du niveau d'ARNm de NuMA1 de 71% (siRNA n°1), 63% (siRNA n°2) et 73% (siRNA n°3). De manière intéressante, le mélange des trois ARN interférents n'a pas d'effet synergique et entraîne une baisse de 68% par rapport à la condition contrôle dans laquelle les myoblastes ont été transfectés avec un ARN interférent Scramble. Le niveau protéique de NuMA1 est également significativement diminué par les transfactions des différents siRNAs (Fig.58B). En effet, la quantification des signaux obtenus par Western Blot présente des diminutions du niveau protéique de NuMA1 de 43% pour le siRNA n°1, 74% pour le siRNA n°2, 45% pour le siRNA n°3 et enfin 52% pour le mélange des trois siRNA en comparaison à la condition contrôle.

Ainsi, les trois séquences d'ARN interférent s'avèrent être efficaces puisque leur transfection dans des myoblastes C2C12 entraîne après 48h une baisse significative et comparable des niveaux d'ARNm et protéiques de NuMA1.

L'effet de ces ARN interférents sur le positionnement des noyaux ainsi que sur la toxicité des cellules musculaires primaires a été testé sur des myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* (Fig.58C-G). L'ARN interférent n°1 ne semble pas affecter la répartition statistique des noyaux dans ces myotubes (Fig.58D). Toutefois dans ces cultures cellulaires, nous avons pu observer une forte mort cellulaire faisant suite à la transfection. Cette toxicité se traduit par l'apparition de nombreux « myosacs », qui sont des myotubes dont l'adhésion au support est altérée et qui disparaissent au fur et à mesure des lavages du

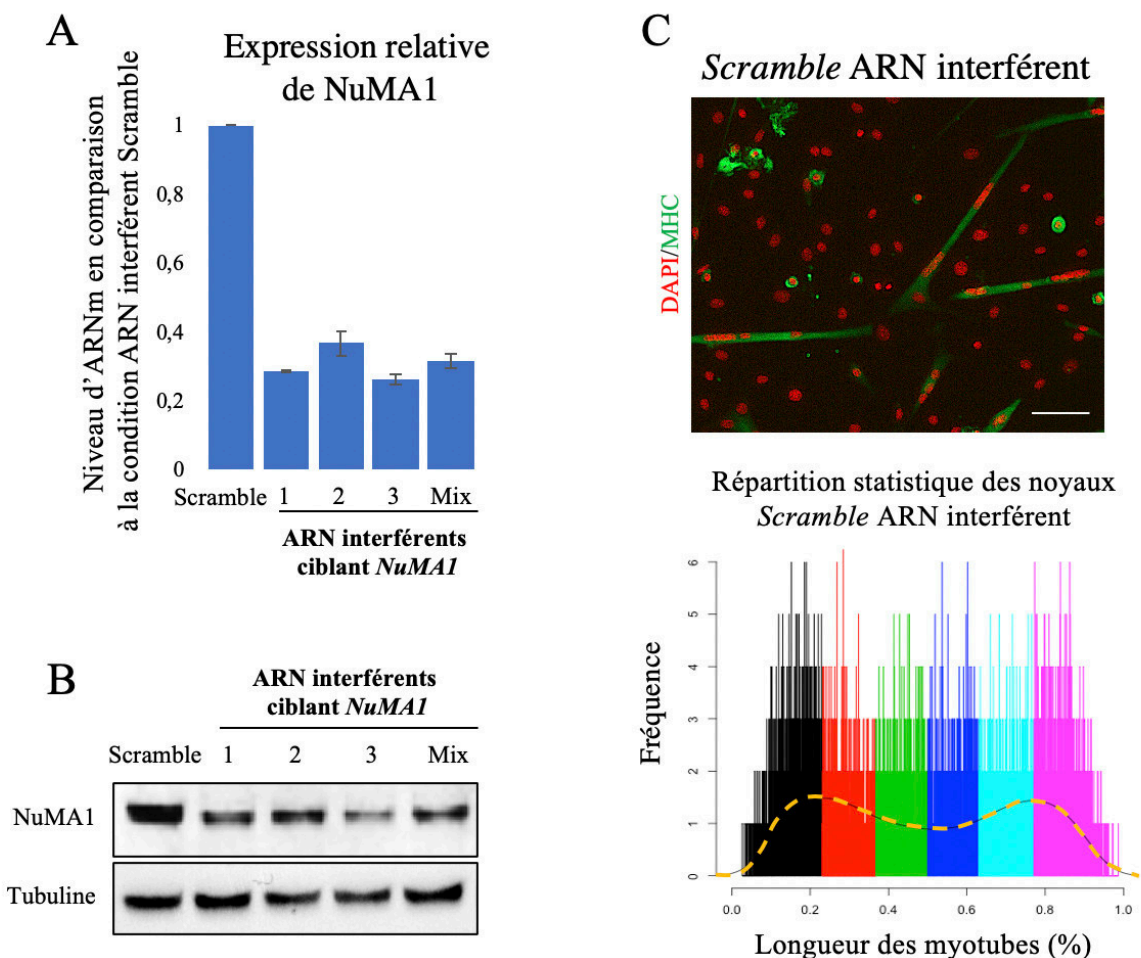
protocole d'immunofluorescence. Nous avons donc émis l'hypothèse que les myotubes adhérents restant sur le support sont des myotubes non transfectés par le siRNA, expliquant ainsi que le positionnement des noyaux dans ces myotubes ne soit pas affecté dans cette condition (Fig.58D).

La transfection du siRNA n°2 altère le positionnement des noyaux dans les myotubes comme le montre la répartition statistique des noyaux (Fig.58E). Cependant, la transfection de ce siRNA génère aussi un décollement des myotubes du support comme l'illustre l'immunofluorescence de la Figure 58E.

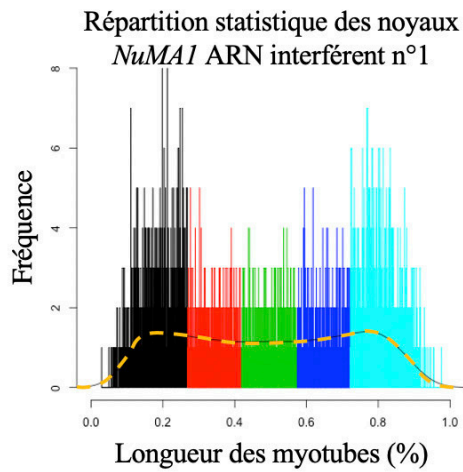
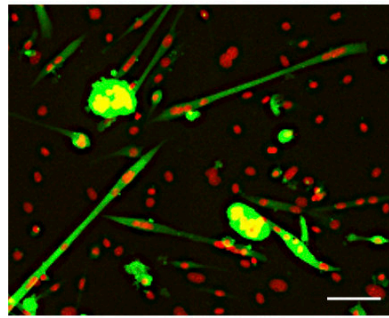
Enfin, la transfection du siRNA n°3 est la condition pour laquelle nous avons observé un décollement du support le plus réduit et avec effet notable sur le positionnement des noyaux.

En transfectant simultanément les trois siRNA, nous avons observé le même effet sur le positionnement des noyaux que celui obtenu dans la condition utilisant le siRNA n°3.

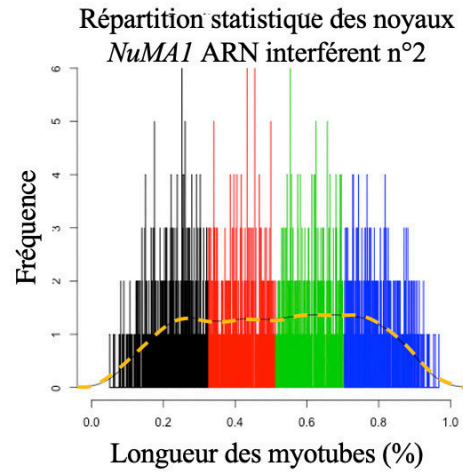
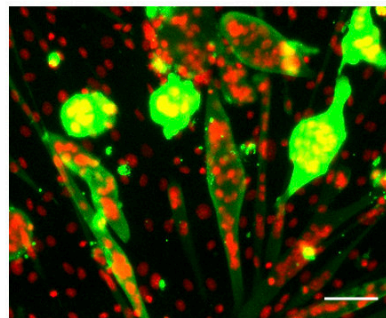
Afin de nous affranchir de la toxicité des siRNA n°1 et n°2, nous avons alors fait le choix de réaliser le reste de nos expériences en utilisant uniquement le siRNA n°3 qui entraîne une inhibition significative de la protéine NuMA1, tant au niveau des ARNm que sur le niveau de la protéine NuMA1, et qui minimise la toxicité sur la formation des myotubes au cours de la différenciation musculaire.



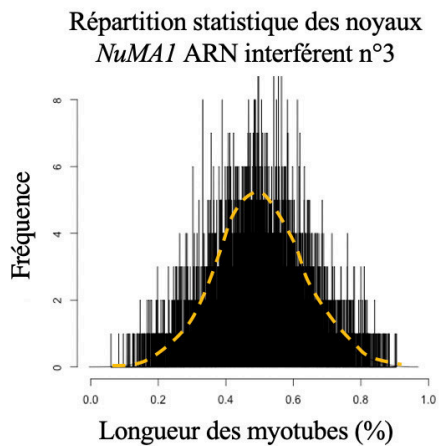
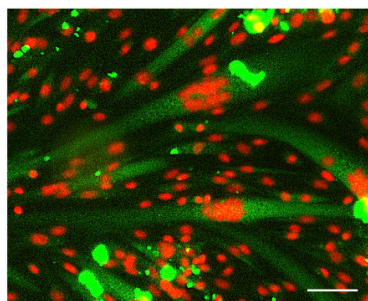
D *NuMA1* ARN interférent n°1



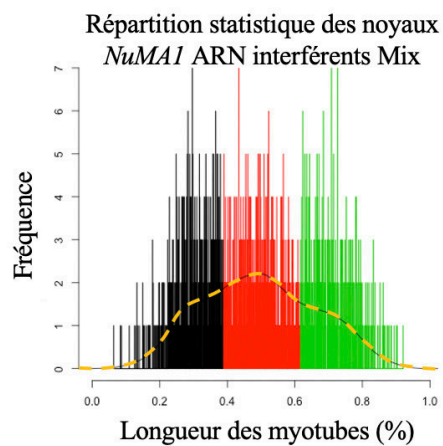
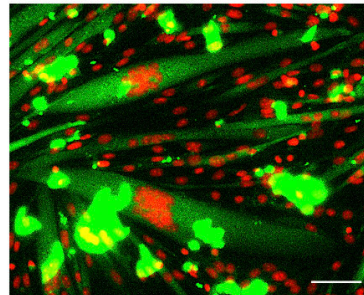
E *NuMA1* ARN interférent n°2



F *NuMA1* ARN interférent n°3



G *NuMA1* ARN interférents Mix



**Figure 58 :** Effet des différents ARN interférents de type siRNA ciblant *NuMA1*. **A-B.** Effet des transfections de différents ARN interférents sur le niveau d'ARNm (A) et sur le niveau d'expression de NuMA1 (B) dans des cellules C2C12, 48h post-transfection. **C-G.** Marquages immunofluorescent de la chaîne lourde de myosine (en vert) et des noyaux (en rouge) de myotubes primaires après 3 jours de différenciation *in vitro* dans différentes conditions de transfection : ARN interférent Scramble (C), ARN interférents n°1 (D), n°2 (E), n°3 (F) et un mélange (Mix) (G) des trois ARN interférents précédemment mentionnés ciblant *NuMA1*. Les barres d'échelle représentent 100µm. Les répartitions statistiques des noyaux le long des myotubes correspondant à ces différentes conditions sont présentées en dessous des immunofluorescences.

## VII. NuMA1, l'hypothèse AMPK

Après avoir identifié le rôle essentiel de la protéine NuMA1 au cours de la myogenèse, nous avons voulu mieux comprendre quels pouvaient être les mécanismes sous-jacents.

La protéine NuMA1 comporte de nombreux sites de phosphorylation qui permettent de réguler son activité au cours de la division cellulaire, processus biologique au cours duquel le mécanisme d'action de la protéine NuMA1 est bien caractérisé. Lors de l'étape de métaphase, la phosphorylation de la Thréonine-2055 est nécessaire pour assurer un positionnement correct du fuseau mitotique (Compton et Luo, 1995 ; Kotak et al., 2013 ; Zheng et al., 2014). Les phosphorylations sur les Thréonine-2015 et Sérine-2087 par la kinase CDK1 régulent probablement le recrutement de NuMA1 au cortex de la cellule lors de la métaphase et de l'anaphase (Kiyomitsu et Cheeseman, 2013).

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'activité de la fraction cytoplasmique de NuMA1 serait régulée par des phosphorylations de la protéine. Ainsi, le rôle de NuMA1 sur la dynamique des microtubules et par conséquent sur le positionnement des noyaux passerait par sa phosphorylation.

Or, une étude publiée en 2015 a suggéré que l'AMPK (AMP-activated protein kinase) pouvait phosphoryler la protéine NuMA1 sur la Sérine-1853 (Schaffer et al., 2015). Sur la base des résultats présentés dans ce papier, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de la Sérine-1853, localisée dans le domaine protéique qui permet la liaison de NuMA1 à la membrane plasmique, permettrait de réguler l'interaction de NuMA1 avec les microtubules et donc son action sur la dynamique du réseau.

La protéine AMPK est une kinase qui, dans sa forme active, constitue un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique ( $\alpha$ ), et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$ ,  $\gamma$ . Deux isoformes de la sous-unité catalytique existent ; il s'agit des isoformes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . De la même façon, deux isoformes existent pour la sous-unité  $\beta$  ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) et 3 isoformes pour la sous-unité  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  et  $\gamma 3$ ) (Stapleton et al., 1996 ; Thornton et al., 1998 ; Cheung et al., 2000).

Les travaux présentés dans cette partie constituent des résultats préliminaires qui nécessiteront d'être approfondis pour valider l'hypothèse émise.

### 1) Rôle de l'AMPK dans les myotubes primaires

La première approche mise en place permettant d'établir un lien entre l'AMPK et NuMA1 a été d'utiliser des souriceaux de la lignée murine invalidée pour l'AMPK- $\alpha 1$  appartenant à l'équipe du Dr. Chazaud (Institut Neuromyogène) (Jørgensen et al., 2003). Les cellules primaires extraites des souriceaux âgés de 5 jours ont été différenciées jusqu'à l'obtention de myotubes. Une fois fixées et immunomarquées, les cultures cellulaires ont été analysées à l'aide de l'outil bio-informatique présenté précédemment. Les résultats sont présentés en Figure 59.

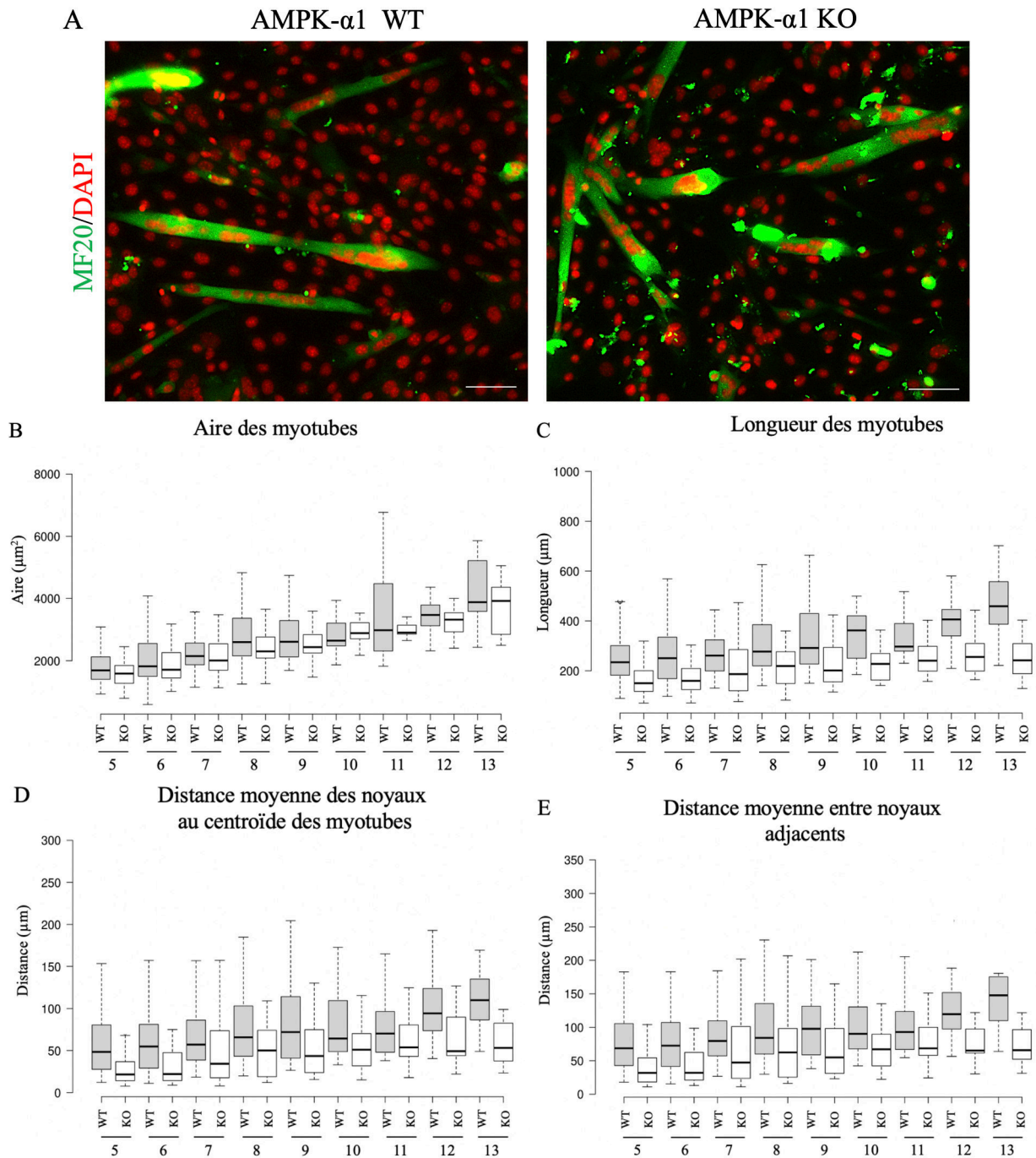


Il s'avère que les myotubes dans lesquels l'expression de l'AMPK- $\alpha$ 1 est abolie présentent un phénotype altéré. L'aire (Fig.59B) ainsi que la longueur (Fig.59C) des myotubes ont tendance à être diminuées en comparaison aux myotubes contrôles.

Le positionnement des noyaux se trouve également perturbé dans les myotubes où l'AMPK- $\alpha$ 1 est absente. En effet, les noyaux ont alors tendance à s'agréger au centre des myotubes. Cela s'illustre par les distances moyennes des noyaux au centroïde des myotubes (Fig.59D) et les distances moyennes entre noyaux adjacents (Fig.59E) qui se trouvent diminuées dans les myotubes différenciés en absence d'expression de l'AMPK- $\alpha$ 1, en comparaison aux myotubes contrôles.

Ainsi, les inhibitions d'expression de l'AMPK- $\alpha$ 1 et de NuMA1 entraînent des phénotypes comparables dans des myotubes après 3 jours de différenciation *in vitro*.

Ce résultat suggère que l'activité de NuMA1 pourrait potentiellement passer par l'AMPK.



**Figure 59 :** Rôle de l'AMPK sur le positionnement des noyaux et le phénotype des myotubes primaires. **A.** Marquage immunofluorescent de myotubes primaires AMPK WT (gauche) et AMPK KO (droite) après 3 jours de différenciation *in vitro*. Les myotubes sont marqués pour la chaîne lourde de la myosine (en vert) et pour les noyaux (en rouge). Les barres d'échelle représentent 60 $\mu$ m. **B-C-D-E.** Quantifications de l'aire (B) et de la longueur (C) des myotubes, de la distance moyenne des noyaux au centroïde des myotubes (D) ainsi que de la distance moyenne entre noyaux adjacents (E) classifiées selon le contenu en noyau des myotubes analysés. Les boîtes à moustaches grises correspondent à la condition AMPK-WT et les blanches à la condition AMPK-KO. n(AMPK-WT)=401 ; n(AMPK-KO)=313.

## 2) Étude du rôle de l'AMPK sur la phosphorylation de NuMA1

De façon à approfondir cette hypothèse, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées. Pour cela, le plasmide de surexpression de la protéine humaine NuMA1, *hNuMA1*-WT (Haren et Merdes, 2002), a été muté sur le site hypothétique de phosphorylation, S1853, de l'AMPK, (Schaffer et al., 2015). Ainsi, deux plasmides ont été générés :

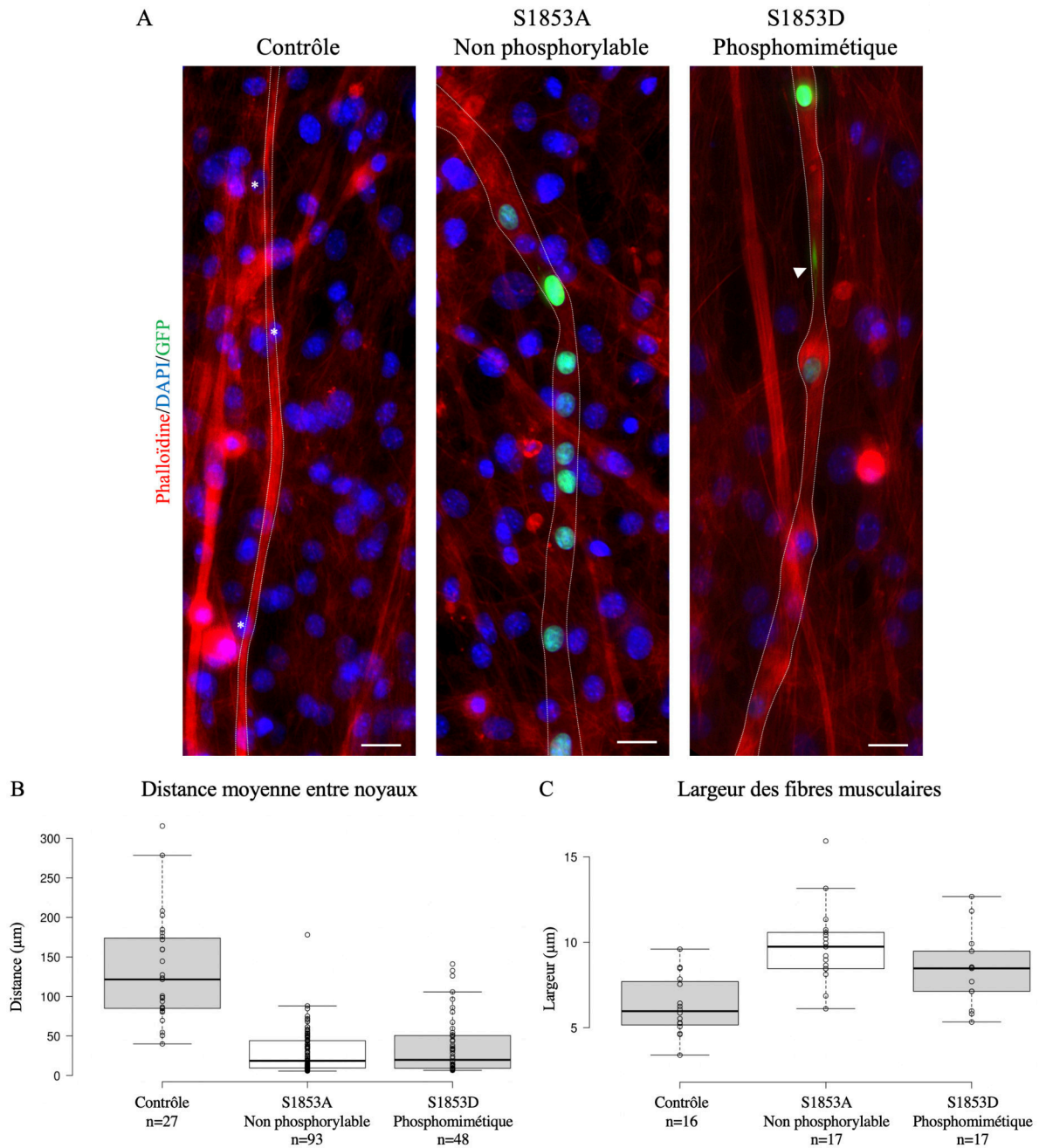
- Un plasmide phosphomimétique S1853D pour lequel la Sérine a été remplacée par un acide aspartique. Ce plasmide mime donc la phosphorylation constitutive de NuMA1 sur la position 1853.
- Un plasmide non phosphorylable S1853A dans lequel la Sérine est remplacée par une Alanine.

Ces plasmides ont été transfectés dans des cellules primaires qui ont été maintenues en différenciation 10 jours *in vitro* afin d'obtenir des fibres musculaires matures. Les cultures cellulaires ont été fixées, immunomarquées puis analysées.

La première observation que nous avons pu faire est relative à la localisation subcellulaire des différentes formes de la protéine NuMA1 surexprimée. Alors que la forme non phosphorylable de la protéine se localise exclusivement dans les noyaux des fibres musculaires, la forme phosphomimétique de NuMA1 se localise à la fois dans les noyaux et dans le cytoplasme (Fig.60A). Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse selon laquelle la fraction cytoplasmique de NuMA1 serait dans un état phosphorylé, potentiellement par l'AMPK, et permettrait ainsi de réguler son action sur la dynamique des MTs.

Que ce soit en conditions de surexpression de la forme non phosphorylable de NuMA1 ou de la forme phosphomimétique, les distances entre noyaux (Fig.60B) ainsi que les largeurs (Fig.60C) des fibres musculaires sont drastiquement diminuées. Toutefois, il ne s'agit que d'une unique expérience avec un nombre de fibres musculaires analysées réduit. Ce résultat préliminaire nécessite d'être confirmé par la répétition de cette expérience. De plus, une condition dans laquelle la forme non mutée de *hNuMA1*-WT est surexprimée devra être ajoutée à l'expérience comme contrôle. Cela permettra de conclure quant à un potentiel effet du site de phosphorylation S1853 de NuMA1 par l'AMPK.

Ces résultats préliminaires ne permettent pas de conclure quant au rôle de l'AMPK sur la phosphorylation de NuMA1. Toutefois, ces résultats soutiennent notre hypothèse.



**Figure 60 :** Effet de la surexpression *hNuMA1*-WT phosphomimétique et non phosphorylable sur des fibres musculaires matures *in vitro*. **A.** Immunomarquage de fibres musculaires matures en condition contrôle (gauche), de surexpression de *hNuMA1*-WT non phosphorylable (milieu) et phosphomimétique (droite) après 10 jours de différenciation *in vitro*. Les fibres sont marquées pour l'actine (phalloïdine, en rouge) et les noyaux (DAPI, en bleu), et le marquage vert correspond aux deux plasmides mutés surexprimant *hNuMA1*-WT. \* indique la position des noyaux périphériques dans la condition contrôle. Les lignes pointillées délimitent le pourtour des fibres musculaires. La tête de flèche blanche indique une fraction cytoplasmique de la surexpression *hNuMA1*-WT phosphomimétique. Les barres d'échelle représentent 20µm. **B-C.** Quantifications de la distance moyenne entre noyaux adjacents (B) et de la largeur (C) des fibres musculaires.



## PUBLICATION 3 :

SH3KBP1-dependant scaffolding of endoplasmic reticulum governs myonuclear organization and controls myofibers homeostasis in skeletal muscle

*Alexandre Guiraud\*, Emilie Christin\*, Nathalie Couturier\*, Carole Kretz-Remy, Alexandre Janin, Alireza Ghasemizadeh, Anne-Cécile Durieux, David Arnould, Romero NB, Bui MT, Laura Julien, Marc Bitoun, Buchman VL et Vincent Gache*



1 **SH3KBP1-dependant scaffolding of endoplasmic reticulum governs**  
2 **myonuclear spatial organization and controls cell architecture of**  
3 **skeletal muscle myofibers.**

4  
5  
6 **Alexandre Guiraud<sup>1\*</sup>, Emilie Christin<sup>1\*</sup>, Nathalie Couturier<sup>1\*</sup>, Carole Kretz-Remy<sup>1</sup>,**  
7 **Alexandre Janin<sup>1</sup>, Alireza Ghasemizadeh<sup>1</sup>, Anne-Cécile Durieux<sup>2</sup>, David Arnould<sup>2</sup>, Romero**  
8 **NB<sup>3</sup>, Bui MT<sup>3</sup>, Laura Julien<sup>4</sup>, Marc Bitoun<sup>4</sup>, Buchman VL<sup>5</sup> and Vincent Gache<sup>1</sup>**

9  
10 \* Contribute equally

11 1-U1217, UMR 5310, INMG, INSERM, CNRS, Claude Bernard University Lyon 1, France.

12 2- Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université de Lyon, Université Jean  
13 Monnet, Saint Etienne, France.

14 3- Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Sorbonne University, Groupe  
15 Hospitalier Universitaire La Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

16 4- Sorbonne Université, INSERM, , Institute of Myology, Centre of Research in Myology, UMRS  
17 974, F-75013, Paris, France.

18 5- School of Biosciences, Cardiff University, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK  
19

20 **Summary**

21  
22 Myonuclei are actively positioned throughout muscular development. Guiraud, Christin, Couturier *et al* show that  
23 SH3KBP1 scaffolds the ER through Calnexin interaction and controls myonuclei motion during early steps of muscle  
24 fibers formation. Besides SH3KBP1 participates in cell fusion and T-tubules formation/maintenance in mature  
25 skeletal muscle fibers and contributes to slow-down CNM-like phenotypes.

26  
27 **Abstract**

28  
29 The building block of skeletal muscle is the multinucleated muscle fiber, formed by the fusion of hundreds of  
30 mononucleated precursor cells, myoblasts. In the normal course of muscle fiber development or regeneration,  
31 myonuclei are actively positioned throughout muscular development and adopt special localization in mature  
32 fibers: regular spacing along muscle fibers periphery, raising the notion of MyoNuclear Domains (MNDs). There is



33 now growing support for a direct connection between myonuclear positioning and normal function of muscles, but  
34 how myonuclei affects muscle function remains poorly characterized.  
35 To identify new factors regulating forces applied on myonuclei in muscles fibers, we performed a siRNA screen and  
36 identified SH3KBP1 as a new factor controlling myonuclear positioning in early phases of myofibers formation.  
37 Depletion of SH3KBP1 induces a reset of MNDs establishment in mature fibers reflected by a dramatic reduction in  
38 pairwise distance between myonuclei. We show that SH3KBP1 scaffolds Endoplasmic Reticulum (ER) in myotubes  
39 that in turn controls myonuclei velocity and localization and thus myonuclear domains settings. Additionally, we  
40 show that in later phases of muscle maturation, SH3KBP1 contributes to the formation and maintenance of  
41 Sarcoplasmic Reticulum (SR) and Transverse-tubules (T-tubules). We also demonstrate that in muscle fibers,  
42 GTPase dynamin-2 (DNM2) binds to SH3 domains of SH3KBP1. Interestingly, we observed that *Sh3kbp1* mRNA is up  
43 regulated in a mouse model harboring the most frequent mutation for Autosomal Dominant CentroNuclear  
44 Myopathy (AD-CNM): *Dnm2*<sup>+/*R465W*</sup>. SH3KBP1 thus appears as a compensation mechanism in this CNM model since  
45 its depletion contributes to an increase of CNM-like phenotypes (reduction of muscle fibers Cross-section Areas  
46 (CSA) and increase in slow fibers content).  
47 Altogether our results identify SH3KBP1 as a new regulator of myonuclear domains establishment in the early phase  
48 of muscle fibers formation through ER scaffolding and later in myofibers integrity through T-tubules  
49 scaffolding/maintenance.

50

## 51 Introduction

52

53 The building block of skeletal muscle is the multinucleated muscle fiber, formed by the fusion of hundreds of  
54 specialized cells, myoblasts, and in which positioning of nuclei (“myonuclei”) is finely regulated. In the normal  
55 course of muscle development or regeneration, myonuclei actively localize themselves and adopt specific position in  
56 mature myofibers in which they are regularly spaced at the periphery of myofibers (Bruusgaard et al., 2003). This  
57 precise myonuclei spatial organization gives rise to the notion of MyoNuclear Domains (MNDs) in which each  
58 myonucleus controls genes expression in its surrounding cytoplasm and guaranties muscle function (Gundersen,  
59 2016). MNDs settings mainly depend on muscle fibers ability to maintain a defined distance between myonuclei in a  
60 cytoplasmic-adapted context related to myofibers type, size and age (Bruusgaard et al., 2006; Qaisar and Larsson,  
61 2014; Liu et al., 2009). During the first steps of muscle fibers formation, myonuclei have been shown to move and  
62 position using mainly microtubule network reorganization (Tassin et al., 1985; Gimpel et al., 2017) and an interplay  
63 between microtubule associated proteins (MAPs) such as MAP7 (Metzger et al., 2012) and molecular motors,  
64 including dynein and kinesins (Gache et al., 2017). This dynamic of myonuclei contributes to precocious alignment  
65 of myonuclei in immature fibers. Although comprehension of mechanisms involved in myonuclear positioning  
66 during myofibers formation has recently progressed, how mispositioning of myonuclei affects muscle function still  
67 remains an open question.

68 Abnormal myonuclei internalization in muscle fibers that are not directly linked to excessive regenerative process is  
69 the hallmark of a group of humans myopathies called Centronuclear Myopathies (CNMs)(Romero and Bitoun, 2011;  
70 Jungbluth et al., 2007). The majority of defective proteins implicated in CNMs are involved in various aspects of  
71 membrane trafficking and remodeling and are relevant to essential cellular processes including endocytosis,

72 intracellular vesicle trafficking and autophagy (Romero and Laporte, 2013). To date, the main proteins implicated in  
73 CNMs are phosphatidylinositol phosphatase Myotubularin coded by *MTM1* gene (Laporte et al., 1996); GTPase  
74 dynamin-2 involved in endocytosis and cell motility, and coded by *DNM2* gene (Bitoun et al., 2005); amphiphysin-2  
75 nucleocytoplasmic adaptor protein, coded by *BIN1* gene (Nicot et al., 2007) and the principal sarcoplasmic reticulum  
76 calcium release channel, ryanodine receptor 1, coded by *RYR1* gene (Wilmshurst et al., 2010).

77 Myonuclei spatial organization can contribute to muscle fibers functionality as growing evidences support a direct  
78 connection between myonuclear positioning and normal function of muscles (Metzger et al., 2012; Falcone et al.,  
79 2014; Janin and Gache, 2018; Robson et al., 2016). Additionally, T-tubule organization and efficiency are highly  
80 impacted in CNM (Chin et al., 2015; Al-Qusairi et al., 2009). Finally, besides abnormal nuclear positioning and T-  
81 tubules abnormalities, altered autophagy is frequently described in CNM (Jungbluth and Gautel, 2014).

82 SH3KBP1, also known as Ruk/CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) is a ubiquitously expressed adaptor  
83 protein, involved in multiple cellular processes including signal transduction, vesicle-mediated transport and  
84 cytoskeleton remodeling (Havrylov et al., 2010; Buchman et al., 2002). SH3KBP1 protein is composed of three SH3  
85 domains at the N-terminus followed by a proline-rich (PR) domain, a serine-rich (SR) domain, and a C-terminus  
86 coiled-coil (CC) domain. Functions of SH3KBP1 as an adaptor protein are mainly linked to endocytosis trafficking  
87 and degradative pathway through the recruitment of Cbl (E3 ubiquitin ligase), endophilin and dynamin (Schroeder  
88 et al., 2010; Sun et al., 2015; Zhang et al., 2009). SH3KBP1 protein is also associated with several compartments  
89 involved in membrane trafficking such as the Golgi complex and is mainly concentrated in COPI-positive  
90 subdomains (Havrylov et al., 2008). The role of SH3KBP1 during the formation of muscle fibers has never been  
91 investigated.

92 In the present study, we show that the adaptor protein SH3KBP1, through its N-terminus part, is able to scaffold  
93 endoplasmic reticulum (ER) probably *via* an interaction with Calnexin. SH3KBP1 also governs myonuclei motion  
94 and spatial organization as well as myoblast fusion. Additionally, we observed that SH3KBP1 interacts with  
95 Dynamin 2 (DNM2) and organizes T-tubule formation in skeletal muscle. Moreover, its down-regulation contributes  
96 to an increase of CNM-like phenotypes in a mouse model expressing the most frequent mutation causing autosomal  
97 dominant centronuclear myopathy (AD-CNM).

98

## 99 **Results**

100 **SH3KBP1 is required for precocious myonuclear positioning steps and controls fusion parameters during**  
101 **muscle fiber formation.**

102

103 To identify new factors that contribute to myonuclear spreading and alignment in muscle fibers, we performed a  
104 large siRNA screen on candidates expected to affect myonuclei repartition in nascent myotubes. Briefly, primary  
105 myoblasts were isolated from young pups and induced to differentiate *in vitro* for 3 days before analysis (Falcone et  
106 al., 2014) (Fig.1A). This cell culture technique leads to an accumulation of heterogeneous myotubes regarding  
107 myonuclei number and myotubes length (Blondelle et al., 2015). To precisely characterize the early steps of  
108 myonuclei positioning in myotubes, we developed an image-J® plugin that automatically extracts different myotubes  
109 parameters (such as myotubes lengths/areas and myonucleus localization). Data were then classified and analyzed

110 according to myonuclei content using a homemade program in R-Studio® (Fig.1D-F). This analysis allowed us to  
111 track myonuclei accretion during elongation of myotubes in a window from 3 to 11 myonuclei per myotubes.  
112 Isolated murine myoblasts were then treated with short interfering RNA (siRNA) targeting either a scrambled  
113 sequence or candidate genes. Among candidates from the siRNA screen, efficient *sh3kbp1* depletion appears to  
114 strongly modify myonuclear positioning (Fig1. B-C, Fig.S1A). In control condition, we observed a nearly linear  
115 relation between addition of myonuclei into myotubes and expansion of myotubes length, with an average of nearly  
116 10 % increase of length after each myonucleus accretion (Fig. 1D). In *sh3kbp1* depleted myotubes, length repartition  
117 is homogenously extended to an increase of 46.8% ±3.3 in myotubes containing up to 11 myonuclei (Fig. 1D).  
118 Quantification of the mean distance between all myonuclei inside myotubes indicate a burst of spacing (+103.5%  
119 ±11.6, data not shown) concomitantly with an escape from the center of myotubes reflected by (i) the mean distance  
120 between myotube centroid and each myonuclei (DMcM) (+111.5% ±12.5) (Fig. 1E) and (ii) the Myonuclei Spreading  
121 Graphic (MSG) representation (Fig. 1F). MSG shows statistical probability to find one myonucleus along the all  
122 length of myotubes and allow the extraction of “statistical clustering zones” (colors code in Fig. 1F) that we estimate  
123 as four zones in the case of scramble myotubes *versus* eight zones in *sh3kbp1* depleted myotubes (Fig. 1F). Thus,  
124 *sh3kbp1* depleted myotubes failed to homogeneously spread myonuclei along myotubes length that tends to  
125 accumulate at myotubes tips (Fig. 1C, arrows). Overall, these data suggest that for a defined myonuclei content in  
126 myotubes, SH3KBP1 acts as “anti-elongation” factor and contributes to myonuclei spreading in myotubes.

127 Myoblasts/myotubes elongation and alignment is a key process that controls myoblast/myotubes fusion (Louis et  
128 al., 2008). As *sh3kbp1* depletion led to myotubes length increase, we wondered if fusion aspects were modified  
129 during differentiation. Indeed, myotubes elongation can contribute to increase myotubes/myoblast contacts that  
130 thus will modulate membrane fusion and ultimately modify myonuclei accretion speed (Kim et al., 2015). We  
131 evaluated fusion capacity of primary myoblasts isolated from young pups after *in vitro* differentiation induction  
132 (Fig.S1B-G). After 3 days of differentiation, isolated myoblasts treated with siRNA targeting *sh3kbp1* mRNA are  
133 similarly stained for myosin heavy chain antibodies compare to control cells treated with siRNA scramble  
134 sequences, indicating normal myoblast commitment into muscle differentiation process (Fig. S1B-D). Fusion index  
135 was increased in *Sh3kbp1* depleted myotubes, assessed by the total number of myonuclei in myotubes (Fig. S2E) and  
136 the average number of myonuclei per myotube (Fig. S2F). Accordingly, in *sh3kbp1* depleted conditions, distribution  
137 of myotubes with respect to myonuclei content revealed much more myotubes with ≥10 nuclei when compared to  
138 controls (Fig. S2G). Altogether, this data suggests that *sh3kbp1* acts also as an “anti-fusion” factor as expected for an  
139 anti-elongation factor.

#### 140 **SH3KBP1 governs myonuclei velocity that contributes to myonuclei positioning in mature myofibers.**

141  
142 To investigate the role of *sh3kbp1* in late steps of differentiation, primary mouse myotubes were maintained in  
143 differentiation media for 5 to 10 days as previously described (Pimentel et al., 2017; Falcone et al., 2014) Fig. 2A. In  
144 5-day differentiated myofibers, myonuclei clustering and velocity was addressed (Fig. 2B-F). First, we observed  
145 twice more myonuclei clustered in myotubes treated with shRNA targeting *sh3kbp1* gene compared to control,  
146 confirming a role of *sh3kbp1* on myonuclei spreading (Fig. 2B & E, white asterisk). As myonuclei within myofibers  
147 have different behaviors (Gache et al., 2017), we next investigated the impact of *sh3kbp1* depletion on myonuclei

148 movements in 5-day differentiated myofibers. Myoblasts were transfected with RFP-lamin-chromobody® to  
149 visualize myonuclei concomitantly with shRNA targeting scramble or *Sh3kbp1*, both GFP-tagged. Myotubes  
150 containing both constructions (GFP and RFP-lamin-chromobody®) were selected for fewer analyses (Fig.2C-F). After  
151 5 days of differentiation, myonuclei were tracked every 20 minutes for a time period of 14 hours (Fig. 2E).  
152 Myonuclei displacements parameters were analyzed using SkyPad method (Cadot et al., 2014). We found that in  
153 control condition, myonuclei are in motion during nearly 35 % of the time (a movement is defined as a displacement  
154 more than 30  $\mu\text{m}$ ) at a median speed of  $0.232 \pm 0,014 \mu\text{m}/\text{min}$ . Depletion of *sh3kbp1* increased from more than 20%  
155 the percentage of time myonuclei are in motion of and by more than 30% median speed that reach  $0.313 \pm 0,014$   
156  $\mu\text{m}/\text{min}$  outside myonuclei clusters (Fig.2C-D). Indeed, because of high myonuclei concentration inside myonuclei  
157 clusters, we could not technically access to myonuclei motion and speed. To further investigate the implication of  
158 *sh3kbp1* in late steps of differentiation, primary mouse myotubes were maintained in differentiation media for 10  
159 days as previously described (Pimentel et al., 2017) (Fig. 2G). In these maturation conditions, myonuclei are  
160 compressed between myofiber plasma membrane and contractile apparatus and adopt a flatten architecture all  
161 along myofibers length (Roman et al., 2017). This long-term differentiation approach allow to confirm that *sh3kbp1*  
162 controls myonuclear positioning during maturation of myofibers as *sh3kbp1* depletion using either siRNA or shRNA  
163 caused a significant reduction in the mean distance between adjacent myonuclei (Fig. 2G-H). Additionally, *Sh3kbp1*  
164 depletion significantly reduce by more than 30 % myofibers width (Fig. 2I). These results suggest that SH3KBP1  
165 contributes to nuclear spreading and to the reduction of myonuclei movements and motion during muscle fibers  
166 maturation.

167 Next, we focused on the expression of both SH3KBP1 protein and *Sh3kbp1* mRNA in the time course of *in vitro*  
168 myotubes formation using C2C12 cells. These analyses showed a slight enhancement of SH3KBP1 production during  
169 early stages of myotubes formation (Fig. 3A). These results were confirmed using RT-qPCR techniques where a two-  
170 fold increase was observed in mRNA expression at the onset of differentiation step (Fig3B-C). To confirm *Sh3kbp1*  
171 functions during muscle cell differentiation, we stably knocked-down *Sh3kbp1* mRNA expression in C2C12 cells  
172 using a small hairpin interfering RNA (shRNA) (Fig. 3D). As observed in primary cells, after 3 days of differentiation,  
173 myoblasts entered the “muscle differentiation program”, illustrated by the detection of myosin heavy chain-positive  
174 (MHC+) cells (Fig. 3E, day3). Although intensity of staining is reduced, we do not observe any alteration of myotubes  
175 size repartition in *Sh3kbp1* knocked-down compared to control conditions (Fig. S2A). After 6 days of differentiation,  
176 we clearly see a breaking event in fusion capacity correlated with *Sh3kbp1* knockdown (Fig. 3E). In control  
177 conditions, myonuclei spread along thin myotubes length while *Sh3kbp1* knockdown gives rise to huge myotubes  
178 with clustered myonuclei areas (Fig. 3E, day6). Distribution of myotubes with respect to their myonuclei content  
179 reveals also a significant increase in the number of myotubes with high myonuclei content compared to controls  
180 (Fig. S2B). In control condition, we observed a limited accumulation of clustered myonuclei along myotubes length,  
181 with a majority of clusters containing 4 to 6 myonuclei (Fig. 3F). On the opposite, in *Sh3kbp1* knockdown, we  
182 observe a clear increase in the proportion of clusters containing more than 15 myonuclei (Fig. 3F). To address the  
183 specificity of myonuclei clustering phenotype in *Sh3kbp1* depleted conditions, we re-expressed full-length SH3KBP1  
184 proteins in *Sh3kbp1* depleted murine myotubes and show that we rescue even better than in control the number of  
185 clustered myonuclei by myotubes (Fig. S2C-D). Together, these results show that *Sh3kbp1* is essential during  
186 myotube formation, both in primary myoblasts and in C2C12 cell cultures, to control myoblasts fusion and

187 myonuclear positioning during skeletal muscle formation.

188 **SH3KBP1 is an endoplasmic reticulum scaffolding protein that interacts with ER72 and Calnexin.**

189 Several studies show that SH3KBP1 is distributed between different membrane trafficking compartments such as  
190 the Golgi Complex (Havrylov et al., 2008). The three SH3 domains localized in the N-terminal part of SH3KBP1 are  
191 responsible for its high capacity to interact with diverse regulatory partners (Havrylov et al., 2009) while the C-  
192 terminus part, containing a coiled-coil domain allows its targeting to endosomal membranes (Zhang et al., 2009). As  
193 no role of SH3KBP1 was previously described in skeletal muscle, we analyzed its localization during the time course  
194 of muscle formation using both C2C12 myoblast cell line and murine primary myoblasts (Fig. 4 A-B). In growing  
195 conditions, SH3KBP1 is localized in the cytoplasm with an apparent higher concentration at the vicinity of nuclei  
196 both in primary and in C2C12 myoblasts and some dots inside nucleus are also visible (Fig. 4A-B). During early  
197 myotubes formation, SH3KBP1 seems to spread along myotubes length, exhibit a weak perinuclear accumulation  
198 and myonuclei still exhibits dots inside myonuclei (Fig. 4A-B, Day3 and Day2). In 5 days differentiation C2C12  
199 myotubes, perinuclear accumulation of SH3KBP1 is stronger and we still observe some accumulation inside some  
200 myonucleus as dots or line (Fig. 4A, Day5). In primary myoblasts induced to differentiate into “mature-like” fibers  
201 organized with myonuclei at periphery, SH3KBP1 was still detected at myonuclei vicinity but more accumulated at  
202 the interface between myonuclei “bottom” and muscle fiber interior and it also exhibited longitudinal/transversal  
203 staining (Fig. 4B, Day10). We thus wondered what kind of compartments could be controlled by SH3KBP1. To  
204 answer this question, we used stable C2C12 cell-line depleted for *Sh3kbp1* to investigate altered compartment  
205 phenotypes (Fig. 4C-D). We observed that, even if myonuclei are clustered in myotubes depleted for *Sh3kbp1*, Golgi  
206 marker RCAS1 was still mainly localized around myonuclei, as previously described for Golgi elements (Fig.  
207 4C)(Ralston et al., 1999). On the contrary, the ER marker ERP72 that showed perinuclear localization in control  
208 myotubes was completely dispersed in *Sh3kbp1-depleted* myotubes (Fig. 4D). This result indicates a role for  
209 *Sh3kbp1* in the upkeep of ERP72-containing ER specifically at the vicinity of myonuclei, independently of Golgi  
210 complex architecture.

211 ERP72 (also called PDIA4) is a disulfide isomerase that acts as a folding chaperone for newly synthesized secretory  
212 proteins in the ER compartment (Sato et al., 2005). Endogenous ERP72 co-immunoprecipitated with exogenous  
213 full-length GFP-tagged SH3KBP1 (Fig. 4E-G). Using a panel of SH3KBP1 deletion mutants, we determined that ERP72  
214 interacts with the C-terminal part of SH3KBP1, independently of its C-terminus coiled-coil domain (Fig. 4E-G).  
215 ERP72 is described as an intraluminal ER protein that interacts with calnexin ER-chaperone (Penga et al., 2014).  
216 Interestingly, the C-terminus part of Calnexin is cytosolic and thus could be the cytoplasmic linker between  
217 SH3KBP1 and ERP72-containing Endoplasmic Reticulum (Wada et al., 1991). We next tested if SH3KBP1 physically  
218 interacts with Calnexin (Fig. 4E-G) and observed that endogenous Calnexin, as ERP72, co-immunoprecipitated with  
219 exogenous full-length GFP-tagged SH3KBP1 constructs. In addition, we also identified the C-terminal part of  
220 SH3KBP1, independently of the C-terminus coiled-coil domain as the Calnexin-interacting domain (Fig. 4E-G).  
221 Therefore, Proline-and Serine-Rich domains of SH3KBP1 mediate the interaction with ERP72-positive ER through  
222 Calnexin binding.

223

## 224 SH3KBP1 progressively accumulates at the Z-line and interacts with DNM2.

225 We next investigated SH3KBP1 localization *in vivo*, in mature myofibers from adult skeletal muscle. SH3KBP1  
226 accumulated specifically at the vicinity of myonuclei, forming a “cage” around myonuclei in *Tibialis Anterior* (TA)  
227 muscle (Fig. 5A-B, asterisks). This staining was confirmed in human muscle biopsies where we observed that  
228 myonuclei are positive for SH3KBP1 (Fig. S3G). In TA longitudinal section, SH3KBP1 exhibited a striated pattern at  
229 the I-band/Z-line zone, in between the staining of the voltage-dependent calcium channel, DHPR $\alpha$ , which labels T-  
230 tubules and forms a doublet band indicating that SH3KBP1 does not colocalize with DHPR $\alpha$  but follow, in a close  
231 proximity, T-tubules structures (Fig. 5C-E). To determine domains of SH3KBP1 responsible for this particular  
232 localization, we next tested *in vitro* expression of full-length SH3KBP1 or associated fragments into primary  
233 myoblasts induced to differentiate into “mature-like” fibers with peripheral myonuclei and proper sarcomere  
234 organization, reflected by striated actin staining (Fig. 5F-G). In this myofibers, full-length SH3KBP1 was present as  
235 small aggregation patches close to myonuclei, combined with striated pattern and accumulated at the Z-line with no  
236 overlap with actin staining (Fig. 5F-G, SH3KBP1-FL). N-terminus fragment of SH3KBP1 containing SH3 domains was  
237 only present as striated patterns with no particular accumulation at myonuclei vicinity, while the C-terminus  
238 SH3KBP1 fragments strongly accumulated at the periphery of muscle fibers, at the vicinity of myonuclei and at the  
239 Z-line with striated patterns (Fig. 5F). Numerous proteins accumulate at the I-band/Z-line zone and participate in  
240 myofibers structuration (Burgoyne et al., 2015). Among them, Dynamin 2 (DNM2), a large GTPase implicated in  
241 cytoskeleton regulation and endocytosis, was previously described in HeLa cells as a SH3KBP1 interacting protein,  
242 through its proline-rich domain (Schroeder et al., 2010). To this end, we expressed, in C2C12 cells, full-length GFP-  
243 tagged-DNM2 with fragments of FLAG-tagged SH3KBP1 and immunoprecipitated SH3KBP1 constructs. This  
244 experiment confirmed that DNM2 interacts with SH3KBP1 through its N-terminal part (Fig. 5H-I). Therefore, in  
245 mature myotubes, SH3KBP1 accumulate at the Z-line where it forms a protein complex with DNM2.

## 246 SH3KBP1 is required in mature fibers for the maintenance of T-tubules.

247 We next assessed the impact of *Sh3kbp1* depletion on internal cell architecture. To this end, we used our *in vitro*  
248 model assay on mature fibers using primary myoblasts (Fig. 6A). Myofibrillogenesis in *Sh3kbp1* depletion condition  
249 was normal after 10 days of differentiation, reflected by F-actin staining (Fig. 6B). In control condition, we also  
250 observed that DHPR $\alpha$  staining which labels T-tubule, forms transversal doublet bands alternatively with actin  
251 staining (Fig. 6A). Quantification of the staining indicated that in control conditions, using either siRNA or shRNA  
252 scramble, nearly 30% of formed myofibers exhibit a transversal DHPR $\alpha$  staining, reflecting formation of mature T-  
253 tubules (Fig. 6A & C). On the contrary, in *Sh3kbp1*-depleted myofibers, DHPR $\alpha$  staining is much more punctuated,  
254 indicating the absence of mature T-tubules aligned with sarcomere structures (Fig. 6B) and suggesting a role of  
255 SH3KBP1 in T-tubule formation. Indeed, in *Sh3kbp1*-myofibers, we observed a drop of myofibers with transversal  
256 staining of DHPR $\alpha$  to nearly 5% of myofibers, correlating with an increase in random DHPR $\alpha$  staining as dots along  
257 myofibers (Fig. 6C, Fig. S2E). To confirm these results we depleted *Sh3kbp1* from mature myofibers using shRNA  
258 electroporation technique directly in TA skeletal muscle of two-month-old mice (Fig. 6D). First, after 15 days of  
259 *Sh3kbp1* inhibition, an atrophic muscle fiber effect was observed in electroporated TA muscles fibers, reflected by a  
260 35% decrease of the mean muscle fibers cross section area in *Sh3kbp1* fibers compared to controls (Fig. 6F), an  
261 effect that we previously observed *in vitro* (Fig. 2I). Moreover, T-tubule architecture appears perturbed in *Sh3kbp1*

262 fibers, illustrated by an unequal DHPR $\alpha$  staining along fibers (Fig. 6D). Together, these results show that Sh3kbp1  
263 contribute to T-tubule formation and maintenance in skeletal muscle fibers.

#### 264 *Sh3kbp1* is up regulated in a murine model of AD-CNM and inhibits CNM phenotypes.

265 Our data show that *Sh3kbp1* controls myonuclei dynamics and reticulum spatial organization and interacts with  
266 DNM2 which is mutated in dominant centronuclear myopathy characterized by myonuclear centralization (Romero  
267 and Bitoun, 2011). Heterozygous AD-CNM-Knock-In-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mouse model (KI-*Dnm2*<sup>R465W/+</sup>) progressively  
268 develop muscle atrophy, impairment of contractile properties, histopathological abnormalities including slight  
269 disorganization of T-tubules and reticulum, and elevated cytosolic calcium concentration (Durieux et al., 2010). We  
270 first analyzed *Sh3kbp1* mRNA expression in TA skeletal muscle during mice development and aging (Fig. 7A). To our  
271 surprise, *Sh3kbp1* mRNA was progressively reduced from more than 30 % in 8 months old mice compare to 2  
272 months old mice (Fig. 7A), suggesting a progressive loss of SH3KBP1 pool during aging. More interestingly, we also  
273 showed that in this KI-*Dnm2*<sup>R465W/+</sup> model, *Sh3kbp1* mRNA is significantly up-regulated during the first 4 months of  
274 mice development (Fig. 7A), suggesting a compensation mechanism, that can explain the limited ratio of atrophic  
275 fibers and absence of centralized myonuclei in this CNM model (Durieux et al., 2010). To address the role of  
276 SH3KBP1 in long-term muscle homeostasis in both wild type and KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice, we investigated *in vivo*  
277 depletion of Sh3kbp1 protein. Down-regulation of *Sh3kbp1* was achieved using intramuscular TA muscle injections  
278 of an AAV cognate vector expressing shRNA targeting *Sh3kbp1* mRNA (AAV-shSh3kbp1) either in wild type or KI-  
279 *Dnm2*<sup>R465W</sup> mice at 5 weeks of age, an age where muscle mass is nearly fully developed. This allowed addressing the  
280 role of *Sh3kbp1* specifically in adult skeletal muscle during the first three months of mice development and  
281 specifically in a period where we observed *Sh3kbp1* mRNA up-regulation in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> model (Fig. 7A). In wild  
282 type mice, *Sh3kbp1* mRNA level was decreased by 2.7 fold compared to PBS-injected muscles (Fig. S3A, WT). In KI-  
283 *Dnm2*<sup>R465W</sup> mice, *Sh3kbp1* mRNA levels showed a 5.4 fold decrease compared to PBS-injected TA-muscles (Fig. S3A,  
284 WT, KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup>). No significant change of body weight was observed between AAV-shSh3kbp1-injected and PBS-  
285 injected conditions in both genotypes (Fig. S3B). However, a significant decrease in absolute force (g) developed by  
286 TA muscles specifically in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice depleted for *Sh3kbp1* was observed (Fig. 7D) suggesting a specific  
287 impact of *Sh3kbp1* down-regulation in the KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice model. Interestingly, we observed a significant  
288 decrease of TA muscle mass of about 20%, when *Sh3kbp1* is depleted in both WT and KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice (Fig. 7E).  
289 Cross-sectional areas of TA-muscle fibers were determined using transverse sections stained with laminin  
290 antibodies to define muscle fibers border (Fig. 7B-C). Global decrease in median myofibers area was observed in  
291 AAV-shSh3kbp1 injected TA-muscles compared to control muscles in WT (-30%) and KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> (-20%) mice  
292 (Fig. 7F). Analysis of muscle fibers area repartition showed a significant increase in atrophic fibers in AAV-  
293 shSh3kbp1 injected muscles (Fig. S3C). Additionally, we observed a significant reduction of about 25% in the total  
294 number of fibers specifically in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> model depleted for *Sh3kbp1* (Fig. S3D). DNM2-CNM patients exhibit a  
295 predominance of type 1 muscle fibers (Romero and Bitoun, 2011). Thus, we investigated the ratio of slow fiber types  
296 in AAV-shSh3kbp1 injected TA-muscles, reflected by the expression of myosin heavy chain type 1 (Fig. 7C-D & G). In  
297 wild type conditions, slow fiber type accounted for 5 % of total muscle fibers. We observed that in AAV-shSh3kbp1  
298 injected muscles, this ratio was slightly increased to reach 6.4 % of total muscle fibers, which is the same as what  
299 was observed in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice (Fig. 7G). However, when *Sh3kbp1* is depleted in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> muscle, this

300 ratio increases drastically to reach 12% of total fibers (Fig. 7G). In the Knock-in mouse model, DNM2 mutation leads  
301 to autophagy impairment (Rabai et al., 2019; Durieux et al., 2010). During autophagosome formation, LC3-I  
302 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) is converted to LC3-II by conjugation to  
303 phosphatidylethanolamine lipid. To assess the impact of *Sh3kbp1* depletion on autophagy, LC3-II positive fibers was  
304 determined in *Sh3kbp1* depleted fibers in both WT and KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice. We observed an increase in number of  
305 LC3-II positive fibers in both genotypes but more pronounced in KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice (Fig. 7H). Our *in vitro* data show  
306 that *Sh3kbp1* depletion increase fusion and alter myonuclei spreading (Fig. 1-3). We thus investigate the impact on  
307 the number of myonuclei and the ratio of internalized myonuclei by fibers in *Sh3kbp1* depleted myofibers but did  
308 not find any evidence for alteration compare to control conditions (Fig. S3E-F). Altogether, our data suggest that  
309 *Sh3kbp1* mRNA increase observed in AD-CNM model could be an attempt of compensatory mechanism as  
310 normalization of *Sh3kbp1* expression intensified muscle phenotype.

## 311 Discussion

312 Myonuclei movement's during muscle cell formation have been related to the activity of numerous microtubule  
313 binding proteins such as Motors and Maps (Gache et al., 2017). In immature myotubes, microtubules are organized  
314 into antiparallel arrays between adjacent myonuclei and contribute to the polarization/elongation of myotubes,  
315 alignment of myonuclei and ultimately organization of myosin filaments during sarcomere formation (Pizon et al.,  
316 2005; Metzger et al., 2012; Wang et al., 2013). This new orientation/architecture of the microtubule network  
317 directly influences myoblasts/myotubes fusiform shape, as microtubule network forces are applied at the extremity  
318 of polarized myotubes and also in-between myonuclei (Metzger et al., 2012); it also contributes to myonuclei  
319 spreading along myotubes length (Tassin et al., 1985). This precise myonuclei organization in muscle fibers gives  
320 rise to the formation of so-called "MyoNuclear Domains" (MNDs) wherein each myonucleus is responsible for gene  
321 expression in its surrounding cytoplasm and guaranties functional integrity of muscles (Qaisar, 2012; Liu et al.,  
322 2009). However, regulation of processes involved in myonuclei positioning in developing muscle fibers, not directly  
323 linked to the microtubule network, are still unknown.

324  
325 The present study demonstrates that a protein related to the endoplasmic reticulum (ER) network controls both  
326 myotubes elongation and myonuclei localization/spreading in developing myofibers, two processes that are closely  
327 linked as they both depends on microtubule network organization. Early steps of myonuclei positioning in  
328 myotubes depend on an interplay between microtubules, microtubules-associated-proteins such as MAP4, MAP7  
329 and motors proteins such as Dynein and Kif5B (Gimpel et al., 2017; Mogessie et al., 2015; Metzger et al., 2012; Cadot  
330 et al., 2012; Wang et al., 2013; Wilson and Holzbaur, 2014a). This process also depends on myonuclei membrane  
331 associated components such as Nesprin-1 or AKAP9 (Gimpel et al., 2017; Wilson and Holzbaur, 2014b; Doñate  
332 Puertas et al., 2018). Here, we show that SH3KBP1 depletion leads to longer and thinner myotubes without  
333 significant alteration of the microtubules network compared to control (Fig. 1-3 & data not shown). We find that the  
334 C-terminus part of SH3KBP1 is associated with ERP72-positive ER probably through its binding to Calnexin (Fig. 4E-  
335 G). This association scaffolds ERP72-associated ER specifically at myonuclei vicinity, without affecting Golgi  
336 apparatus integrity (Fig. 4A-D). Recently, ER has been implicated in governing both microtubule alignment and  
337 cytoplasmic streaming (Kimura et al., 2017). Kimura *et al* propose that local cytoplasmic flow generated along



338 microtubules is transmitted to neighboring regions through the ER and in turn, aligns microtubules and self-  
339 organizes the collective cytoplasmic flow. SH3KBP1, by shaping and maintaining ER clustering during myofibers  
340 development could contribute to prevent microtubules network anchoring at the nucleus membrane and thus local  
341 microtubule network organization. In this view, SH3KBP1, during myoblasts fusion process could disorganize  
342 parallel microtubules organization and thus decrease forces applied on myotubes tips extremity. This phenomenon  
343 could lead to the control of myotubes length, but also of both myonuclei motility and velocity (Fig. 2).  
344 SH3KBP1 staining is diffuse in dividing cells, while it progressively accumulates at the vicinity of myonuclei during  
345 differentiation process (Fig. 4). A few proteins have been shown to form a flexible perinuclear shield that can  
346 protect myonuclei from extrinsic forces (Wang et al., 2015; Ghasemizadeh et al., 2019). To note, recent data show  
347 that disruption of one component of this perinuclear shield, MACF1 protein, increases myonuclei velocity  
348 (Ghasemizadeh et al., 2019). Consequently, SH3KBP1 probably belongs to the group of proteins that contribute to  
349 the stability of this perinuclear shield through the maintenance of ER at the vicinity of myonuclei. In accordance  
350 with this preferential localization at the proximity of myonuclei, SH3KBP1 staining in transversal *Tibialis Anterior*  
351 muscle section is very intense at myonucleus site whereas nuclei outside the fiber remains negative (Fig. 5A-B). In  
352 human muscle biopsies, this localization around myonuclei is maintained even in centralized nuclei from CNM  
353 patient (Fig. S3G). The three SH3 domains of SH3KBP1 have been shown to cluster multiple proteins and protein  
354 complexes that can also contributes to the stability of those interactions. Havrylov *et al* identified using mass  
355 spectrometry, few microtubule-binding-proteins such as MAP7 and MAP4 that can potentially interact with SH3  
356 domains of SH3KBP1 and have already been shown to control myonuclei positioning in myotubes (Metzger et al.,  
357 2012; Mogessie et al., 2015; Havrylov et al., 2009). However, we failed to confirm the interaction of SH3KBP1 with  
358 either MAP7 or MAP4 in muscle cells (data not shown). Alternatively, SH3KBP1 also interacts with dynamin-2  
359 (DNM2) and has been shown to participate in dynamics instability of microtubules (Tanabe and Takei, 2009) and  
360 microtubule nucleation (Thompson et al., 2004). The failure of recruiting DNM2 at the right place during myotubes  
361 formation after SH3KBP1 depletion could also contribute to the aberrant myonuclei spreading (Fig. 1). Interestingly,  
362 in CNM-KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mouse model, Fongy *et al* show that myonuclei move and spread properly in heterozygous  
363 myotubes but hypothesize a defect in nuclear anchoring at the periphery (Fongy et al., 2019). Several studies  
364 pointed the importance of cytoskeleton, including MAPs, microtubules and intermediate filaments, in the nuclear  
365 anchorage in mature muscle (Ghasemizadeh et al., 2019; Roman et al., 2017). SH3KBP1 dependent ER-scaffolding  
366 could participate in myonuclei anchoring at the periphery of myofibers and thus in the recruitment and stabilization  
367 of a network of proteins at the vicinity of myonuclei. This hypothesis is supported by our data showing an increase  
368 in the percentage of the time in motion of myonuclei, in the absence of SH3KBP1 (Fig. 2D), correlated with the  
369 strong staining of myonuclei in mouse and human models (Fig. 5A & S3G).

370

371 In mature myofibers, SH3KBP1 depletion leads to more aggregated myonuclei phenotype, suggesting that a failure  
372 in the early phases of myonuclear positioning is difficult to compensate (Fig.2G). Interestingly, *sh3kbp1* depletion in  
373 long-term primary myofibers culture induces a reduction in myofibers width (Fig. 2I). These results are confirmed  
374 *in vivo* as *sh3kbp1* down regulation in *Tibialis Anterior* muscle reduce from more than 30% the average cross section  
375 areas of myofibers (Fig. 6E-F & 7F). Moreover, SH3KBP1-depleted mature myofibers show disorganized perinuclear  
376 endoplasmic reticulum (ER) (Fig 4). Of interest, ER is one initiation site for autophagic process and ER selective  
377 autophagy (called ER-phagy or reticulophagy) has been described to control ER shape and dynamics through ER-

378 phagy receptors that address ER portions to the autophagosomes (Grumati et al., 2018). SH3KBP1 depletion  
379 increases the number of LC3II positives myofibers in *Tibialis Anterior* muscle (Fig. 7H), suggesting a possible  
380 increase of autophagosomes number. Additionally, SH3KBP1 interacts with dynamin-2 (Fig. 5-G), which is also  
381 involved in the autophagic lysosome reformation (Schulze et al., 2013). This autophagy-dependent modulation of  
382 muscle homeostasis could first explain the decrease of Cross Section Area and myofibers width that we observed  
383 and ultimately the reduction of muscle myofibers (Fig. 2I, 7E-F & S3C). Interestingly, autophagy genes have been  
384 involved in muscle myonuclei positioning during *Drosophila* metamorphosis (Fujita et al., 2017). Whether this  
385 process is involved in SH3KBP1-dependent myonuclei positioning will be the subject of further investigations.

386

387 SH3KBP1 depletion shows that T-tubule formation is dramatically impaired both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 6).  
388 Myofibrils provide the contractile force under the control of the 'excitation-contraction coupling' system that  
389 includes two membranous organelles: the sarcoplasmic reticulum (SR) and Transverse (T)-tubules (Al-Qusairi and  
390 Laporte, 2011). These two-membrane systems are structurally associated to form the triads of skeletal muscle cells.  
391 SR is a complex network of specialized smooth endoplasmic reticulum, essential to transmit the electrical impulse as  
392 well as in the storage of calcium ions. SR is built from the formation and maturation of two distinct and functionally  
393 related domains: the longitudinal SR and the junctional SR that together wrap the contractile apparatus. T-tubule  
394 network is continuous with the muscle cell plasma membrane (PM) and begins from the invagination of PM in a  
395 repeated pattern at each sarcomere (Barone et al., 2015). These two-membrane systems are structurally associated  
396 to maintain their typical organization in muscle cells. SH3KBP1 depletion seems to alter more specifically junctional  
397 SR rather than longitudinal SR as it specifically alters transversal organization of T-tubules (Fig. 6A-C). One  
398 hypothesis, recently suggested by Quon *et al*, is that non-vesicular lipid transport and lipid biosynthesis could  
399 intersect at ER-PM membrane contact sites and would serve as a nexus, coordinating requirements in the PM for  
400 lipids with their production in the ER (Quon et al., 2018).

401

402 Autosomal dominant CNM is caused by heterozygous mutations in the *DNM2* gene, which encodes the Dynamin 2  
403 (DNM2) GTPase enzyme (Romero, 2010). *DNM2*-related autosomal dominant (AD)-CNM was initially characterized  
404 as a slowly progressing muscle weakness affecting distal muscles with onset in early adulthood. DNM2-R465W  
405 missense mutation represents the most frequent mutation in humans and a knock-in (KI) mouse model expressing  
406 this mutation has been generated that develops a progressive muscle weakness (Durieux et al., 2010). Expressing  
407 DNM2-R465W mutation in mice leads to contractile impairment that precedes muscle atrophy and structural  
408 disorganization that mainly affects both mitochondria and endo/sarcoplasmic reticulum. Interestingly, CNM- KI-  
409 *Dnm2*<sup>R465W</sup> mouse model exhibits twice more *Sh3kbp1* mRNA amount in the first 4 months than control mice before  
410 normalization after 8 months (Fig. 7A). Of note, this increase is concomitant with transient transcriptional activation  
411 of both ubiquitin-proteasome and autophagy pathways at 2 months of age in the TA muscle of the KI-Dnm2 mice  
412 (Durieux et al., 2010). One can hypothesize that this elevated amount of *sh3kbp1* is one of the factors that limits  
413 activation of autophagy pathway activation and thus slows-down CNM associated phenotype. In accordance with  
414 this hypothesis, we find that *sh3kbp1* depletion increase CNM phenotype (Fig. 7D-H). In conclusion, increased  
415 amount of SH3KBP1 could delay the CNM phenotype development by stabilizing Triads and the braking of the  
416 autophagy response.

417

418 Finally, our data show that *Sh3kbp1* depletion increases fusion events in transfected primary myoblasts and stable  
419 cell line. *In vivo*, when *Sh3kbp1* is depleted from mature myofibers in a period of time characterized by minimal  
420 myonuclei accretion in muscle fibers, we observe a tendency to slightly increase the percentage of myonuclei per  
421 myofibers in both WT and KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> conditions (Fig. S3E). These data suggest that SH3KBP1 could contribute to  
422 fusion efficiency by a still unknown mechanism. The role of ER on myoblast fusion is poorly documented and its  
423 effect seems to be more indirectly linked to pathways related to physiologic ER stress signaling and SARC (stress-  
424 activated response to Ca<sup>2+</sup>) body formation more than a direct impact on myoblast fusion (Bohnert et al., 2017;  
425 Nakanishi et al., 2007; 2015). Alternatively, our *in vitro* data suggest that the global microtubule network  
426 organization is not changed but that dynamics of organelles related to microtubules pathways are improved,  
427 reflected by the increase of myonuclei dynamics in the absence of SH3KBP1 (Fig. 2A-F). There is also no evidence of  
428 a clear specific role of microtubules network on the fusion potential, however, the modification of microtubule  
429 dynamics/orientation by different MAPs are known to alter fusion potential (Mogessie et al., 2015; Straube and  
430 Merdes, 2007; Cadot et al., 2012). Fusion processes require remodeling of both membranes and actin cytoskeleton  
431 polymerization at the site where two membrane will fuse (Sampath et al., 2018). One can hypothesize that SH3KBP1  
432 could contribute to the fusion process through the control of membrane remodeling on specific PM-ER sites.  
433 Incidentally, we noticed that in absence of SH3KBP1, myotubes are longer, increasing consequently the fusiform  
434 shape of cells (Fig. 1D). As fusion mainly occurs at the tips of myotubes (Cadot et al., 2015; 2012), this increase of  
435 myotubes polarization could contribute to accumulate proteins involved in fusion specifically at the tips of  
436 myotubes and consequently favor fusion capacity.

437

438 Altogether these data are in agreement with an involvement of *Sh3kbp1* in muscle fibers formation and  
439 maintenance. In the present study, we show that the adaptor protein SH3KBP1, through its N-terminus part, is able  
440 to scaffold ER *via* an interaction with Calnexin. SH3KBP1 also governs myonuclei motion and spatial organization as  
441 well as myoblast fusion. Additionally, we observed that SH3KBP1 interacts with DNM2 and organizes T-tubule  
442 formation in skeletal muscle; moreover, its down-regulation contributes to an increase of the CNM-like phenotype in  
443 the most frequent mutation model (KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup>) of autosomal dominant centronuclear myopathy. Altogether, our  
444 data suggest that SH3KBP1 increase observed in AD-CNM model could be an attempt of compensatory mechanism  
445 in CNM- KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> model and could be used as a preventing factor in the development of CNM phenotype.

446

## 447 **Figures**

448 **Figure 1: Myonuclear positioning during primary myotubes formation is controlled by *sh3kbp1*.** (A) Scheme  
449 of sequential steps in order to obtain immature myotubes from primary myoblasts. siRNAs were transfected 24  
450 hours before myoblasts fusion. (B-C) Representative immunofluorescence staining of myosin heavy chain (green)  
451 and myonuclei (red) in primary myotubes treated for scramble (B) or a pool of 2 individual siRNAs targeting  
452 *Sh3kbp1* mRNA (C) after 3 days of differentiation, white arrows indicate “tips-aggregated myonuclei”. Scale Bar:  
453 150µm. (D-E) Myotubes lengths and Mean distances between each myonuclei and myotube’s centroid (DMcM)  
454 ranked by myonuclei content per myotubes were quantified after 3 days of differentiation in cells treated with a  
455 scramble or *Sh3kbp1* siRNAs. Data from three independent experiments were combined. Scramble siRNA cells

456 (n=1010) and *Sh3kbp1* siRNA cells (n=1093), Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001. Center lines show the medians; box  
457 limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the  
458 interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. (F) Myonuclei Spreading  
459 Graph (MSG) represents statistical spatial distribution of myonuclei along myotubes in scramble and in *Sh3kbp1*  
460 siRNA-treated myotubes; white-line represents the mean value of the statistical frequency.

461

462 **Figure 2: Myonuclei localization and motion are affected in *sh3kbp1* depleted primaries myofibers and lead**  
463 **to myonuclei aggregation.** (A) Scheme of sequential steps in order to obtain mature myofibers from primary mice  
464 myoblasts. siRNAs or shRNA were transfected during precocious steps of myoblasts fusion. (B-F) Primary myoblasts  
465 were treated with scramble or *Sh3kbp1* shRNA tagged with GFP (Green) and co-transfected with RFP-lamin-  
466 chromobody® (red) and were induced to differentiate for 5 days into myofibers. (B-D) Quantification of myonuclei  
467 clustering by myotubes (B), myonuclei time in motion (C) and myonuclei speed (D) were quantified using SkyPad  
468 analysis (Cadot et al., 2014). Data from three independent experiments were combined. Unpaired t-test, \*\*\*p <  
469 0.001, \*\*p < 0.01. (E) Representative immunofluorescence staining of RFP-lamin-chromobody® (red) and shRNA  
470 tagged with GFP (Green) in primary myotubes treated with scramble or *Sh3kbp1* shRNA after 5 days of  
471 differentiation into myofibers. Scale Bar: 150µm. (Asterisks represents myonuclei clustering) (F) Frames from a 16h  
472 time-lapse movie in two channels (shRNA in green and lamin-chromobody® in red) of primary myotubes. In the  
473 first frame (on the left), myofibers are selected in white, which corresponds to the region used to create the adjacent  
474 kymograph. Scale Bar: 30µm. (Asterisks 1-5 are examples of individual myonuclei tracking). (G) Four representative  
475 images of 10 days differentiated myofibers transfected with either scramble or *Sh3kbp1* shRNA tagged with GFP,  
476 shRNA (Green) myonuclei (red). Scale Bar: 10µm. (Asterisks are individual myonuclei) (H-I) Quantification of the  
477 mean distance between pairwise myonuclei (H) and mean myofibers width (I) in 10 days differentiated myofibers  
478 treated with scramble siRNA or shRNA, a pool of 2 individual siRNAs or an individual shRNAs targeting *Sh3kbp1*.  
479 Data from three independent experiments were combined. Center lines show the medians; box limits indicate the  
480 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the  
481 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

482

483 **Figure 3: SH3KBP1 is induced during myotubes differentiation and controls myonuclei aggregation in C2C12**  
484 **cells.** (A) Western blot analysis of SH3KBP1 protein expression in total protein extracts from proliferating (P) or  
485 differentiating C2C12 cells for up to 5 days. C2C12 differentiation is assessed by Myogenin expression and Tubulin is  
486 used as loading control. (B-C) qRT-PCR analysis of *Sh3kbp1* (B) and *Myogenin* (C) gene expression level relative to  
487 *CycloB*, *Gapdh*, *GusB*, *Rpl41* and *Tbp* gene in proliferating C2C12 cells (P) or differentiating C2C12 cells for up to 5  
488 days. (D) Representative western blots analysis of SH3KBP1 protein down-regulation in stable cell line  
489 constitutively expressing shRNA construct targeting *Sh3kbp1*. Tubulin is used as loading control. (E) Representative  
490 immunofluorescence staining of myosin heavy chain (green) and myonuclei (red) in 3 or 6 days cultured C2C12  
491 stable cell lines expressing scramble shRNA or shRNA targeting *Sh3kbp1*. Zooms 1 & 2 are magnifications of images  
492 in white dots rectangle in 6 days old myotubes. Scale bars, 150 µm and 15 µm in zoom. (F) Quantification of the  
493 number of myonuclei by clusters in C2C12 cells stable cell line expressing scramble shRNA or shRNA targeting  
494 *Sh3kbp1* after 5 days of differentiation. Data from three independent experiments were combined. Unpaired t-test,  
495 \*\*\*p < 0.001, \*p < 0.05. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as

496 determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles,  
497 outliers are represented by dots.

498 **Figure 4: SH3KBP1 is localized near and inside myonuclei and controls ERP72 positives Endoplasmic**  
499 **reticulum through Calnexin interaction during *in vitro* muscle fibers differentiation.** (A-B) Representative  
500 immunofluorescent staining of SH3KBP1 (green), Actin (Red) and myonuclei (blue) in the course of myotube  
501 formation in C2C12 cells line in proliferation (P) or after 2 and 5 days of differentiation (A) or in the course of  
502 myofibers formation in primary myoblast cultures in proliferation (P) or after 3 and 10 days of differentiation (B).  
503 Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . (C-D) Representative Immunofluorescent staining of Golgi Marker (RCAS1, for receptor binding  
504 cancer antigen expressed on SiSo cells, red) (C) and Endoplasmic Reticulum (ERP72, for Endoplasmic reticulum  
505 resident protein 72, red) (D) and myonuclei (blue) in 6 days cultured C2C12 stable cell line expressing either  
506 scramble shRNA or shRNA targeting *Sh3kbp1* gene (GFP-shRNA). Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . (E) Scheme of SH3KBP1  
507 constructs, labeled with GFP in the N-terminus part, used for immunoprecipitation assay in (F-G). FL: full length. (F)  
508 Representative western blot with indicated antibodies (right) in C2C12s expressing GFP-SH3KBP1 constructs (top).  
509 (G) Representative western blot with indicated antibodies (right) of GFP-SH3KBP1 constructs immunoprecipitation  
510 using C2C12 expressing indicated constructs (top). Blots were repeated more than 3 times.

511

512 **Figure 5: SH3KBP1 is localized near myonuclei and at I-band/Z-line zone in muscle fibers *in vivo* and**  
513 **interact with DNM2.** (A-B) Representative images of *Tibialis Anterior* muscle transversals cross-section stained for  
514 SH3KBP1 (green) and myonuclei (red). Asterisks show myonuclei inside myofibers. Scale bars, 150  $\mu\text{m}$ . (C-E)  
515 Representative images of *Tibialis Anterior* muscle longitudinal cross-section stained for SH3KBP1 (red) and  
516 DHPR1 $\alpha$ , for DyHydroPyridine Receptor alpha (green). Scale bars, 150  $\mu\text{m}$ . (F) Representative immunofluorescent  
517 staining of long term expression of SH3KBP1 constructs (listed in Fig. 4E) in green (GFP-constructs), Actin (red) and  
518 myonuclei (blue) in 10 days differentiated primary myofibers. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . (G) Line scan of the yellow boxes to  
519 visualize transversal organization of SH3KBP1 (green) and actin (red) staining. (H) Western blot with indicated  
520 antibodies (right) in C2C12 cells expressing Flag-SH3KBP1 constructs (top) and GFP-DNM2. (I) Representative  
521 western blot with indicated antibodies (right) of DNM2-GFP constructs immunoprecipitation using C2C12  
522 expressing indicated constructs (top).

523

524 **Figure 6: SH3KBP1 controls T-tubule organization during muscle fibers formation and in mature myofibers.**  
525 (A-B) Representative immunofluorescent image of DHPR1- $\alpha$  (green), Actin (red) and myonuclei (blue) staining in  
526 10 days cultured primary myotubes after scramble siRNA (A) or *Sh3kbp1* siRNA (B) transfection. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .  
527 (C) Quantification of DHPR- $\alpha$  staining aspects in mature myofibers treated with either scramble siRNA, a pool of 2  
528 individual siRNAs targeting *Sh3kbp1* mRNA, scramble shRNA or an individual shRNA targeting *Sh3kbp1* mRNA. Data  
529 from three independent experiments were combined. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01. Details for different  
530 categories are available in Fig. S2E. (D-E) Representative images of transversals (left) cross-section of *Tibialis*  
531 *Anterior* muscle electroporated with scramble or an individual shRNAs targeting *Sh3kbp1* and stained for GFP  
532 (green) and myonuclei (blue). Scale bars, 50  $\mu\text{m}$  (F) Quantification of muscle fibers electroporated with scramble or  
533 an individual shRNAs targeting *Sh3kbp1*. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th  
534 percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th  
535 percentiles, outliers are represented by dots. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001. (G-H) Representative images of

536 longitudinal cross-section of *Tibialis Anterior* muscle electroporated with scramble or an individual shRNAs  
537 targeting *Sh3kbp1* and stained for GFP and DHPR- $\alpha$ . Scale bars, 20  $\mu$ m.

538

539 **Figure 7: *sh3kbp1* silencing worsened CNM phenotype in KI-DNM2<sup>R465W</sup> mice model.** (A) qRT-PCR analysis of  
540 *Sh3kbp1* gene expression relative to *Nat10* gene *Tibialis Anterior* muscles from WT or KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice at 1, 2, 4  
541 and 8 months of age. Non-parametric one-way Anova used for statistical significance \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.  
542 (B-C) Representative images of *Tibialis Anterior* muscle cross-section from WT or KI- *Dnm2*<sup>R465W</sup> mice at the age of 4  
543 months, injected with either PBS or AAV cognate vector expressing shRNA targeting *SH3KBP1* mRNA (Sh3kbp1-  
544 shRNA) for 3 months and stained for Dapi (Blue), Laminin (green) and MyHC (red). Scale Bars = 150  $\mu$ m. (D-H)  
545 Quantification of Absolute force (P0) (D), *Tibialis Anterior* muscle mass (E), mean cross-sectioned myofibers areas  
546 (F), percentage of slow fibers (MHC1 positives) (G) and percentage of LC3II-positive fibers (H) of *Tibialis Anterior*  
547 muscles from WT or KI- *Dnm2*<sup>R465W</sup> mice at the age of 4 months, injected with either PBS or AAV cognate vector  
548 expressing shRNA targeting *SH3KBP1* mRNA (Sh3kbp1-shRNA) for 3 months. Data from at least 4 mice in each  
549 condition were combined. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. Center lines show the medians; box  
550 limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the  
551 interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots.

552

553 **Supplementary figure 1: SH3KBP1 affects myoblast fusion.** (A) Representative western blot analysis of  
554 SH3KBP1 protein expression in total protein extracts from differentiating primary myotubes treated with scramble  
555 or siRNA (#1 & #2) or a pool of siRNA targeting *SH3KBP1* mRNA. Loading control is tubulin. (B-C) Representative  
556 immunofluorescent images of 3 days of primary differentiated myotubes stained for myosin heavy chain (green)  
557 and myonuclei (red) and treated with scramble (B) or with a pool of 2 individual *Sh3kbp1* siRNAs. Scale Bar: 50 $\mu$ m.  
558 (D-G) Quantification of differentiation index (percentage of nuclei in Myosin Heavy Chain positives cells) (D), Fusion  
559 index (percentage of nuclei inside myotubes) (E), Average number of nuclei by myotubes (F) and distribution of  
560 myotubes classified depending on the number of nuclei in myotubes (G). Data from three independent experiments  
561 were combined. Unpaired t-test, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th  
562 and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th  
563 and 75th percentiles, outliers are represented by dots.

564

565 **Supplementary figure 2: SH3KBP1 affects myoblast fusion and localization of myonuclei in C2C12 cells.** (A-B)  
566 Distribution of 3 days differentiated C2C12 myotubes formed from stable cell line expressing either scramble or  
567 *Sh3kbp1* shRNAs and classified depending on nuclei content inside myotubes after (A) 3 days or (B) 5 days of  
568 differentiation. (C) Representatives immunofluorescent staining of myosin heavy chain (green) and myonuclei (red)  
569 in stable cell line expressing *Sh3kbp1* shRNA (top) or co-transfected with full-length SH3KBP1 (bottom) after 5 days  
570 of differentiation. Scale Bar: 50 $\mu$ m. (D) Quantification of the percentage of nuclei by clusters in stable cell line  
571 expressing *Sh3kbp1* shRNA and co-transfected with mCherry or full-length SH3KBP1 plasmid. Data from three  
572 independent experiments were combined. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. Center lines show the  
573 medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times

574 the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. (E) Representatives  
575 immunofluorescent categories of staining for DHPR-alpha in 10 days differentiated myofibers. Scale Bar: 2µm.

576

577 **Supplementary figure 3: *sh3kbp1* silencing worsened CNM phenotype in KI-DNM2<sup>R465W</sup> mice model.** (A) qRT-  
578 PCR analysis of *Sh3kbp1* gene expression relative to *Nat10* gene in 4 months *Tibialis Anterior* muscles from WT or  
579 KI- *Dnm2*<sup>R465W</sup> mice injected with either PBS or AAV cognate vector expressing shRNA targeting *SH3KBP1* mRNA  
580 (*Sh3kbp1*-shRNA). \*\*\*p < 0.001. (B-F) Quantification of total body mass (B), distribution of cross-sectioned  
581 myofibers areas (C), number of fibers by muscles (D), number of myonuclei by fiber (E) and number of internalized  
582 myonuclei (F) in *Tibialis Anterior* muscles from WT or KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice at the age of 4 months, injected with  
583 either PBS or AAV cognate vector expressing shRNA targeting *SH3KBP1* mRNA (AAV-SH3KBP1) for 3 months. Data  
584 from at least 4 mice in each condition were combined. Unpaired t-test, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. Center  
585 lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers  
586 extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots. (G)  
587 Immunofluorescent staining of SH3KBP1, Actin and nuclei in two control human patient and in two patients  
588 expressing DN2-R465W point mutation.

589

## 590 **Materials and methods**

591

### 592 **Cell culture**

593 Primary myoblasts were collected from wild type C57BL6 mice as described before (Falcone et al., 2014; Pimentel et al.,  
594 2017). Briefly, Hindlimb muscles from 6 days pups were extracted and digested with collagenase (Sigma, C9263-1G) and  
595 dispase (Roche, 04942078001). After a pre-plating step to discard contaminant cells such as fibroblasts, myoblasts were  
596 cultured on matrigel coated-dish (Corning, 356231) and induced to differentiate in myotubes for 2-3 days in differentiation  
597 media (DM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-122) + 1% penicillin-streptomycin (Gibco,  
598 15140-122)). Myotubes were then covered by a concentrated layer of matrigel and maintained for up to 10 days in long  
599 differentiation culture medium (LDM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-122) + 0.1% Agrin  
600 + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)) until the formation of mature and contracting myofibers. LDM was  
601 changed every two days.

602 Mouse myoblast C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM (Gibco, 41966029) + 15%  
603 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, 10270-106) + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)) and were plated on 0.1%  
604 matrigel-coated dishes for 1-2 days before differentiation. Differentiation was induced by switching to differentiation  
605 media (DMEM + 1% horse serum).

### 606 **Cell transfection**

607 For C2C12 cells, 3 different siRNAs Silencer per gene were transfected using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher  
608 Scientifics, 11668-019) at the final concentration of 10 nM, following manufacturer instructions, 2 days before  
609 differentiation. For shRNA cDNA (Geneocopia) transfection, Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019)  
610 was used following manufacturer instructions.

611 For primary cells, siRNA were transfected using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) at the final  
612 concentration of 2 nM. shRNA (GeneCopia), Eb1 or RFP-Lamin-chromobody (Chromotek) cDNA were transfected using  
613 Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientifics, L3000-008). For the list of siRNA, shRNA and DNA constructs, refer to  
614 supplementary table 1.

615

### 616 **Protein sample preparation**

617 For primary cultured cells or C2C12 cell lines, cells were harvested, using Trypsin for 5min at 37°C and centrifuged at  
618 1500RPM for 5min at 4°C. Cell pellets were diluted and incubated in the optimal volume of RIPA lysis buffer containing  
619 phosphatases inhibitors (Sigma, P5726-5mL) and proteases inhibitors (Sigma, P8340) for 10min at 4°C. Following a  
620 sonication and a centrifugation at 12000RPM for 10min at 4°C, protein samples were collected for further uses. The  
621 concentration of proteins was determined using BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientifics, 23225) as described by  
622 the manufacturer.

623

### 624 **Western blot**

625 To carry out western blots, the same amount of sample were loaded in 6% acrylamide gels and were migrated at 130V for  
626 10min followed by 160V for 90min. iBlot 2 mini slacks (Thermo Fisher Scientifics, IB23002) semi-dry system was used to  
627 transfer the proteins to nitrocellulose membranes. Membranes were then saturated in 5% milk in TBS for 1h at room  
628 temperature (RT) and were incubated in primary antibodies in 5% milk in TBS over night at 4°C. Following washes by  
629 0.1% Tween-20-1X TBS, the membranes were incubated in HRP conjugated secondary antibodies in 5% milk in TBST for  
630 1h at room temperature (RT). Following washes by 0.1% Tween-20-1X TBS the detection of the target proteins was carried  
631 out using Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientifics, 34095) and ChemiDoc imaging system (BioRad).

632

### 633 **Antibodies**

634 Cells were fixed in 4%PFA in PBS for 20min at 37°C followed by washes with PBS and permeabilization with 0.5%  
635 Triton-X100 in PBS for 5min at RT. Following washes with PBS, cells were saturated with 1% BSA in PBS for 30min at  
636 37°C and incubated in primary antibodies over night at 4°C. Following washes with 0.05% Triton-X100 in PBS, cells were  
637 incubated in secondary antibodies or dyes for 2hrs at RT followed by washes with 0.05% Triton-X100 in PBS and a last  
638 wash in PBS. Cultured myofibers were imaged using either Z1-AxioObserver (Zeiss) or confocal SP5 microscope (Leica).  
639 For the list of antibodies and dilution, refer to supplementary table 2.

640

### 641 **Video-Microscopy**

642 Time-lapse images were acquired using Z1-AxioObserver (Zeiss) with intervals of 20 minutes. Final videos were analyzed  
643 using Metamorph (Zeiss) and SkyPad plugin as described before (Cadot et al., 2014).

644



## 645 **Adeno-Associated Virus production and *in vivo* transduction**

646 A cassette containing the small hairpin (sh) RNA under the control of H1 RNA polymerase III promoter was inserted in a  
647 pSMD2 expression plasmid. AAV vectors (serotype 1) were produced in HEK293 cells after transfection of the pSMD2-  
648 shRNA plasmid, the pXX6 plasmid coding for viral helper genes essential for AAV production and the pRepCap plasmid  
649 (p0001) coding for AAV1 capsid as described previously (Riviere et al, 2006). Viral particles were purified on iodixanol  
650 gradients and concentrated on Amicon Ultra-15 100K columns (Merck-Millipore). The concentration of viral genomes  
651 (vg/ml) was determined by quantitative real-time PCR on a LightCycler480 (Roche diagnostic, France) by using TaqMan  
652 probe. A control pSMD2 plasmid was tenfold serially diluted (from  $10^7$  to  $10^1$  copies) and used as a control to establish the  
653 standard curve for absolute quantification. Male wild type and heterozygous KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> mice were injected under  
654 isoflurane anesthesia. Two intramuscular injections of 30  $\mu$ l within 24h interval were performed using 29G needle in TA  
655 muscles corresponding to  $10^{11}$  viral genomes per muscle. All of the experiments and procedures were conducted in  
656 accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard – Lyon 1 and in  
657 accordance with French and European legislation on animal experimentation and approved by the ethics committee  
658 CECCAPP and the French ministry of research.

659

## 660 **Muscle contractile properties**

661 The isometric contractile properties of TA muscles were studied *in situ* on mice anesthetized with 60 mg/kg pentobarbital.  
662 The distal tendon of the TA muscle was attached to a lever arm of a servomotor system (305B Dual-Mode Lever, Aurora  
663 Scientific). The sciatic nerve was stimulated by a bipolar silver electrode using a supramaximal (10 V) square wave pulse  
664 of 0.1 ms duration. Absolute maximal isometric tetanic force was measured during isometric contractions in response to  
665 electrical stimulation (frequency of 25–150 Hz; train of stimulation of 500 ms). All isometric contraction measurements  
666 were made at optimal muscle length. Force are expressed in grams (1 gram = 9.8 mNewton). Mice were sacrificed by  
667 cervical dislocation and TA muscles were weighted. Specific maximal force was calculated by dividing absolute force by  
668 muscle weight.

## 669 **RNA extraction**

670 After the addition of Trizol (Sigma, T9424-200mL) on each sample, lysing matrix D and fast prep system (MPbio, 6913-  
671 100) were used for sample digestion and pre-RNA extraction. In order to extract RNA, samples were incubated in  
672 chloroform for 5min at RT, centrifuged for 15min at 12000 rcf at 4°C and incubated in the tubes containing isopropanol  
673 (precipitation of RNA) for 10min at RT. following a centrifuge of samples for 15min at 12000rcf at 4°C, samples were  
674 washed 2 times with 70% ethanol and the final RNA pellets were diluted in ultra-pure RNase free water (Invitrogen,  
675 10977-035). RNA concentration was calculated using Nanodrop (ThermoFisher Scientific).

## 676 **RT-q-PCR on cells**

677 Goscript Reverse Transcriptase System (Promega, A5001) was used, as described by the manufacturer to produce the  
678 cDNA. Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)(Roche, 04913914001) and CFX Connect™ Real-Time PCR

679 Detection System (BioRad) were used to carry out the quantitative PCR using the following primer sets. The CT of target  
680 genes were normalized on 3 control genes. For the list of primers used, refer to supplementary table 1.

### 681 **RT-q-PCR on muscle samples**

682 50 longitudinal sections (12  $\mu\text{m}$ ) of TA muscles were cut and used for RNA isolation and RT-qPCR. Total RNA was  
683 extracted from muscle by using NucleoSpin (Macherey-Nagel). RNA (200 ng) was reverse transcribed using Reverse  
684 Transcription Core Kit (Eurogentec). Real-time PCR was performed in a 20  $\mu\text{L}$  final volume using the Takyon No Rox  
685 SYBR kit (Eurogentec). Fluorescence intensity was recorded using a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
686 and the data analyzed using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method of analysis. Reference gene 18s was used to normalize the expression level of  
687 the gene of interest as previously described (Pfaffl et al., 2001). The selected forward and reverse primer sequences are  
688 listed in Table 1. Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 5.0 (La Jolla). Data were analyzed for normal  
689 distribution using Shapiro-Wilk test. Non-parametric one-way Anova ( $n = 4-6$ ) was used to determine transcripts  
690 expression level. Primers were designed using Primer 3 software from gene sequences obtained from Genebank. Primer  
691 specificity was determined using a BLAST search. For the list of primers used, refer to supplementary table 1.

692

### 693 **Histological staining and analysis**

694 *Tibialis anterior* muscles were collected, embedded in tragacanth gum, and quickly frozen in isopentane cooled in liquid  
695 nitrogen. Cross-sections (10 $\mu\text{m}$  thick) were obtained from the middle portion of frozen muscles and processed for  
696 histological, immunohistochemical, enzymohistochemical analyses according to standard protocols. The fibre cross-  
697 sectional area and the number of centrally nucleated fibers were determined using Laminin and Dapi-stained sections.  
698 Fluorescence microscopy and transmission microscopy were performed using Axioimager Z1 microscope with CP  
699 Achromat 5x/0.12, 10x/0.3 Ph1, or 20x/0.5 Plan NeoFluar objectives (Zeiss). Images were captured using a charge-  
700 coupled device monochrome camera (Coolsnap HQ, Photometrics) or color camera (Coolsnap colour) and MetaMorph  
701 software. For all imaging, exposure settings were identical between compared samples. Fiber number and size, central  
702 nuclei and peripheral myonuclei were calculated using ImageJ software.

### 703 **Quantification methods for myonuclei spreading in myotubes**

704 Quantifications in immature myotubes were assessed using an homemade analysis tool. An image analysis performed in  
705 ImageJ® software is combined with a statistical analysis in RStudio® software. This provides quantifications of  
706 parameters, ranked by myonuclei content per myotubes, regarding phenotype of myotubes (area, length) and their  
707 respective myonuclei positioning compare to centroid of myotubes (DMcM).

708 MSG diagrams were obtained through the normalization of lengths of all analyzed myotubes (independently to their  
709 myonuclei content) to 100%. White lines represent myonuclei density curves assessing the statistical frequency for  
710 myonuclei positioning along myotubes. Each color group reflects statistical estimation of myonuclei clustering along  
711 myotubes.

712

### 713 **Acknowledgements**

714 We thank the Penn Vector Core, Gene Therapy Program (University of Pennsylvania, Philadelphia, US) for providing  
715 pAAV1 plasmid (p0001), and Sofia Benkhelifa-Ziyyat for AAV production.

716

## 717 **Additional information**

718

### 719 **Competing interests**

720

### 721 **Funding**

722

### 723 **Author contributions**

724

### 725 **Author ORCIDs**

726 Marc: 0000-0002-4188-7918

727

## 728 **References**

729 Al-Qusairi, L., and J. Laporte. 2011. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal  
730 muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle*. 1:26. doi:10.1186/2044-  
731 5040-1-26.

732 Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H.  
733 Beggs, B. Allard, J.-L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, and A. Buj-Bello. 2009. T-tubule  
734 disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking  
735 myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:18763–18768.  
736 doi:10.1073/pnas.0900705106.

737 Barone, V., D. Randazzo, V. Re, V. Sorrentino, and D. Rossi. 2015. Organization of junctional  
738 sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *Journal of muscle research*  
739 *and cell motility*. 36:501–515. doi:10.1007/s10974-015-9421-5.

740 Bitoun, M., S. Maugenre, P.-Y. Jeannet, E. Lacène, X. Ferrer, P. Laforêt, J.-J. Martin, J. Laporte,  
741 H. Lochmüller, A.H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N.B. Romero, and P. Guicheney. 2005.  
742 Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature genetics*.  
743 37:1207–1209. doi:10.1038/ng1657.

744 Blondelle, J., Y. Ohno, V. Gache, S. Guyot, S. Storck, N. Blanchard-Gutton, I. Barthélémy, G.  
745 Walmsley, A. Rahier, S. Gadin, M. Maurer, L. Guillaud, A. Prola, A. Ferry, G. Aubin-  
746 Houzelstein, J. Demarquoy, F. Relaix, R.J. Piercy, S. Blot, A. Kihara, L. Tiret, and F. Pilot-  
747 Storck. 2015. HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes  
748 myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol*. 7:429–440.  
749 doi:10.1093/jmcb/mjv049.

750 Bohnert, K.R., J.D. McMillan, and A. Kumar. 2017. Emerging roles of ER stress and unfolded  
751 protein response pathways in skeletal muscle health and disease. *J. Cell. Physiol*.

- 752 233:67–78. doi:10.1002/jcp.25852.
- 753 Bruusgaard, J.C., K. Liestøl, and K. Gundersen. 2006. Distribution of myonuclei and  
754 microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *Journal of*  
755 *Applied Physiology*. 100:2024–2030. doi:10.1152/jappphysiol.00913.2005.
- 756 Bruusgaard, J.C., K. Liestøl, M. Ekmark, K. Kollstad, and K. Gundersen. 2003. Number and  
757 spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *The*  
758 *Journal of Physiology*. 551:467–478. doi:10.1113/jphysiol.2003.045328.
- 759 Buchman, V.L., C. Luke, E.B. Borthwick, I. Gout, and N. Ninkina. 2002. Organization of the  
760 mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene*. 295:13–17.  
761 doi:10.1016/S0378-1119(02)00821-1.
- 762 Burgoyne, T., E.P. Morris, and P.K. Luther. 2015. Three-Dimensional Structure of Vertebrate  
763 Muscle Z-Band: The Small-Square Lattice Z-Band in Rat Cardiac Muscle. *Journal of*  
764 *molecular biology*. 427:3527–3537. doi:10.1016/j.jmb.2015.08.018.
- 765 Cadot, B., V. Gache, and E.R. Gomes. 2014. Fast, multi-dimensional and simultaneous  
766 kymograph-like particle dynamics (SkyPad) analysis. *PLoS ONE*. 9:e89073.  
767 doi:10.1371/journal.pone.0089073.
- 768 Cadot, B., V. Gache, and E.R. Gomes. 2015. Moving and positioning the nucleus in skeletal  
769 muscle - one step at a time. *Nucleus*. 6:373–381. doi:10.1080/19491034.2015.1090073.
- 770 Cadot, B., V. Gache, E. Vasyutina, S. Falcone, C. Birchmeier, and E.R. Gomes. 2012. Nuclear  
771 movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is  
772 regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep*. 13:741–749.  
773 doi:10.1038/embor.2012.89.
- 774 Chin, Y.-H., A. Lee, H.-W. Kan, J. Laiman, M.-C. Chuang, S.-T. Hsieh, and Y.-W. Liu. 2015.  
775 Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and  
776 lead to T-tubule fragmentation. *Hum. Mol. Genet*. 24:5542–5554.  
777 doi:10.1093/hmg/ddv285.
- 778 Doñate Puertas, R., G. Millat, I. Ernens, V. Gache, S. Chauveau, E. Morel, E. Christin, N.  
779 Couturier, Y. Devaux, and P. Chevalier. 2018. Atrial Structural Remodeling Gene  
780 Variants in Patients with Atrial Fibrillation. *Biomed Res Int*. 2018:4862480–12.  
781 doi:10.1155/2018/4862480.
- 782 Durieux, A.-C., A. Vignaud, B. Prudhon, M.T. Viou, M. Beuvin, S. Vassilopoulos, B. Fraysse, A.  
783 Ferry, J. Lainé, N.B. Romero, P. Guicheney, and M. Bitoun. 2010. A centronuclear  
784 myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice.  
785 *Hum. Mol. Genet*. 19:4820–4836. doi:10.1093/hmg/ddq413.
- 786 Falcone, S., W. Roman, K. Hnia, V. Gache, N. Didier, J. Laine, F. Aurade, I. Marty, I. Nishino, N.  
787 Charlet-Berguerand, N.B. Romero, G. Marazzi, D. Sassoon, J. Laporte, and E.R. Gomes.  
788 2014. N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning  
789 and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of  
790 centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med*. 6:1455–1475.  
791 doi:10.15252/emmm.201404436.

- 792 Fongy, A., S. Falcone, J. Lainé, B. Prudhon, A. Martins-Bach, and M. Bitoun. 2019. Nuclear  
793 defects in skeletal muscle from a Dynamin 2-linked centronuclear myopathy mouse  
794 model. *Scientific Reports*. 9:1580. doi:10.1038/s41598-018-38184-0.
- 795 Fujita, N., W. Huang, T.-H. Lin, J.-F. Groulx, S. Jean, J. Nguyen, Y. Kuchitsu, I. Koyama-Honda,  
796 N. Mizushima, M. Fukuda, and A.A. Kiger. 2017. Genetic screen in *Drosophila* muscle  
797 identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *Elife*.  
798 6:e23367. doi:10.7554/eLife.23367.
- 799 Gache, V., E.R. Gomes, and B. Cadot. 2017. Microtubule motors involved in nuclear  
800 movement during skeletal muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell*. mbc.E16-06-0405.  
801 doi:10.1091/mbc.E16-06-0405.
- 802 Ghasemizadeh, A., E. Christin, A. Guiraud, N. Couturier, V. Risson, E. Girard, C. Jagla, C. Soler,  
803 L. Laddada, C. Sanchez, F. Jaque, A. Garcia, M. Lanfranchi, V. Jacquemond, J. Gondin, J.  
804 Courchet, L. Schaeffer, and V. Gache. 2019. Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei  
805 and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities.  
806 *bioRxiv*. 12:636464. doi:10.1101/636464.
- 807 Gimpel, P., Y.L. Lee, R.M. Sobota, A. Calvi, V. Koullourou, R. Patel, K. Mamchaoui, F. Nedelec,  
808 S. Shackleton, J. Schmoranzler, B. Burke, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. Nesprin-1 $\alpha$ -  
809 Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is  
810 Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Current biology: CB*.  
811 doi:10.1016/j.cub.2017.08.031.
- 812 Grumati, P., I. Dikic, and A. Stolz. 2018. ER-phagy at a glance. *J. Cell. Sci.* 131:jcs217364.  
813 doi:10.1242/jcs.217364.
- 814 Gundersen, K. 2016. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and  
815 hypertrophy. *Journal of Experimental Biology*. 219:235–242. doi:10.1242/jeb.124495.
- 816 Havrylov, S., F. Ichioka, K. Powell, E.B. Borthwick, J. Baranska, M. Maki, and V.L. Buchman.  
817 2008. Adaptor protein Ruk/CIN85 is associated with a subset of COPI-coated  
818 membranes of the Golgi complex. *Traffic*. 9:798–812. doi:10.1111/j.1600-  
819 0854.2008.00724.x.
- 820 Havrylov, S., M. Jolanta Redowicz, and V.L. Buchman. 2010. Emerging Roles of Ruk/CIN85  
821 in Vesicle-Mediated Transport, Adhesion, Migration and Malignancy. *Traffic*. 11:721–  
822 731. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01061.x.
- 823 Havrylov, S., Y. Rzhpetskyy, A. Malinowska, L. Drobot, and M.J. Redowicz. 2009. Proteins  
824 recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome Sci*.  
825 7:21. doi:10.1186/1477-5956-7-21.
- 826 Janin, A., and V. Gache. 2018. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and  
827 Skeletal Muscles. *Front Physiol*. 9:97. doi:10.3389/fphys.2018.01277.
- 828 Jungbluth, H., and M. Gautel. 2014. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies.  
829 *Front Aging Neurosci*. 6:339. doi:10.3389/fnagi.2014.00339.
- 830 Jungbluth, H., H. Zhou, C.A. Sewry, S. Robb, S. Treves, M. Bitoun, P. Guicheney, A. Buj-Bello,

- 831 C. Bönnemann, and F. Muntoni. 2007. Centronuclear myopathy due to a de novo  
832 dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene.  
833 *Neuromuscular Disorders*. 17:338–345. doi:10.1016/j.nmd.2007.01.016.
- 834 Kim, J.H., P. Jin, R. Duan, and E.H. Chen. 2015. Mechanisms of myoblast fusion during muscle  
835 development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32:162–170. doi:10.1016/j.gde.2015.03.006.
- 836 Kimura, K., A. Mamane, T. Sasaki, K. Sato, J. Takagi, R. Niwayama, L. Hufnagel, Y. Shimamoto,  
837 J.-F. Joanny, S. Uchida, and A. Kimura. 2017. Endoplasmic-reticulum-mediated  
838 microtubule alignment governs cytoplasmic streaming. *Nat. Cell Biol.* 19:399–406.  
839 doi:10.1038/ncb3490.
- 840 Laporte, J., L.J. Hu, C. Kretz, J.L. Mandel, P. Kioschis, J.F. Coy, S.M. Klauck, A. Poustka, and N.  
841 Dahl. 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative  
842 tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature genetics*. 13:175–182.  
843 doi:10.1038/ng0696-175.
- 844 Liu, J.-X., A.-S. Höglund, P. Karlsson, J. Lindblad, R. Qaisar, S. Aare, E. Bengtsson, and L.  
845 Larsson. 2009. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle  
846 fibres from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. *Experimental*  
847 *physiology*. 94:117–129. doi:10.1113/expphysiol.2008.043877.
- 848 Louis, M., N. Zanou, M. Van Schoor, and P. Gailly. 2008. TRPC1 regulates skeletal myoblast  
849 migration and differentiation. *J. Cell. Sci.* 121:3951–3959. doi:10.1242/jcs.037218.
- 850 Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K.  
851 Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal  
852 muscle function. *Nature*. 484:120–124. doi:10.1038/nature10914.
- 853 Mogessie, B., D. Roth, Z. Rahil, and A. Straube. 2015. A novel isoform of MAP4 organises the  
854 paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife*. 4:e05697.  
855 doi:10.7554/eLife.05697.
- 856 Nakanishi, K., K. Kakiguchi, S. Yonemura, A. Nakano, and N. Morishima. 2015. Transient Ca  
857 <sup>2+</sup>depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast  
858 differentiation. *The FASEB Journal*. 29:2137–2149. doi:10.1096/fj.14-261529.
- 859 Nakanishi, K., N. Dohmae, and N. Morishima. 2007. Endoplasmic reticulum stress increases  
860 myofiber formation in vitro. *The FASEB Journal*. 21:2994–3003. doi:10.1096/fj.06-  
861 6408com.
- 862 Nicot, A.-S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H.  
863 Kingston, J.-M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J.-L. Mandel, and J. Laporte. 2007.  
864 Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause  
865 autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 39:1134–1139.  
866 doi:10.1038/ng2086.
- 867 Penga, L., M.I. Rasmussen, A. Chailyana, G. Houenb, and P. Højrupa. 2014. Probing the  
868 structure of human protein disulfide isomerase by chemical cross-linking combined  
869 with mass spectrometry. *J Proteomics*. 108:1–16. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.037.

- 870 Pimentel, M.R., S. Falcone, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. In Vitro Differentiation of Mature  
871 Myofibers for Live Imaging. *Journal of visualized experiments: JoVE*. e55141–e55141.  
872 doi:10.3791/55141.
- 873 Pizon, V., F. Gerbal, C.C. Diaz, and E. Karsenti. 2005. Microtubule-dependent transport and  
874 organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J*.  
875 24:3781–3792. doi:10.1038/sj.emboj.7600842.
- 876 Qaisar, R. 2012. Myonuclear Organization and Regulation of Muscle Contraction in Single  
877 Muscle Fibres: Effects of Ageing, Gender, Species, Endocrine Factors and Muscle Size. 1–  
878 64.
- 879 Qaisar, R., and L. Larsson. 2014. What determines myonuclear domain size? *Indian J*.  
880 *Physiol. Pharmacol.* 58:1–12.
- 881 Quon, E., Y.Y. Sere, N. Chauhan, J. Johansen, D.P. Sullivan, J.S. Dittman, W.J. Rice, R.B. Chan, G.  
882 Di Paolo, C.T. Beh, and A.K. Menon. 2018. Endoplasmic reticulum-plasma membrane  
883 contact sites integrate sterol and phospholipid regulation. *PLoS Biol.* 16:e2003864–41.  
884 doi:10.1371/journal.pbio.2003864.
- 885 Rabai, A., L. Reisser, B. Reina-San-Martin, K. Mamchaoui, B.S. Cowling, A.-S. Nicot, and J.  
886 Laporte. 2019. Allele-Specific CRISPR/Cas9 Correction of a Heterozygous DNMT  
887 Mutation Rescues Centronuclear Myopathy Cell Phenotypes. *Mol Ther Nucleic Acids*.  
888 16:246–256. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.019.
- 889 Ralston, E., Z. Lu, and T. Ploug. 1999. The organization of the Golgi complex and  
890 microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J. Neurosci.* 19:10694–10705.
- 891 Robson, M.I., J.I. de Las Heras, R. Czapiewski, P. Lê Thành, D.G. Booth, D.A. Kelly, S. Webb,  
892 A.R.W. Kerr, and E.C. Schirmer. 2016. Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle  
893 Nuclear Membrane Proteins Enhances Repression of Critical Developmental Genes  
894 during Myogenesis. *Mol. Cell.* 62:834–847. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.035.
- 895 Roman, W., J.P. Martins, F.A. Carvalho, R. Voituriez, J.V.G. Abella, N.C. Santos, B. Cadot, M.  
896 Way, and E.R. Gomes. 2017. Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear  
897 movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 152:1376–33.  
898 doi:10.1038/ncb3605.
- 899 Romero, N.B. 2010. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscular*  
900 *disorders: NMD.* 20:223–228. doi:10.1016/j.nmd.2010.01.014.
- 901 Romero, N.B., and J. Laporte. 2013. Centronuclear Myopathies. 14. Wiley-Blackwell, Oxford,  
902 UK. 11 pp.
- 903 Romero, N.B., and M. Bitoun. 2011. Centronuclear myopathies. *Semin Pediatr Neurol.*  
904 18:250–256. doi:10.1016/j.spn.2011.10.006.
- 905 Sampath, S.C., S.C. Sampath, and D.P. Millay. 2018. Myoblast fusion confusion: the  
906 resolution begins. 1–10. doi:10.1186/s13395-017-0149-3.
- 907 Satoh, M., A. Shimada, H. Keino, A. Kashiwai, N. Nagai, S. Saga, and M. Hosokawa. 2005.

- 908 Functional characterization of 3 thioredoxin homology domains of ERp72. *Cell Stress*  
909 *Chaperones*. 10:278–284. doi:10.1379/CSC-116R.1.
- 910 Schroeder, B., S.G. Weller, J. Chen, D. Billadeau, and M.A. McNiven. 2010. A Dyn2-CIN85  
911 complex mediates degradative traffic of the EGFR by regulation of late endosomal  
912 budding. *EMBO J*. 29:3039–3053. doi:10.1038/emboj.2010.190.
- 913 Schulze, R.J., S.G. Weller, B. Schroeder, E.W. Krueger, S. Chi, C.A. Casey, and M.A. McNiven.  
914 2013. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal  
915 tubules in hepatocytes. *J. Cell Biol*. 203:315–326. doi:10.1083/jcb.201306140.
- 916 Straube, A., and A. Merdes. 2007. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and  
917 is required for myoblast elongation and fusion. *Current biology: CB*. 17:1318–1325.  
918 doi:10.1016/j.cub.2007.06.058.
- 919 Sun, Y., N.T. Leong, T. Wong, and D.G. Drubin. 2015. A Pan1/End3/Sla1 complex links  
920 Arp2/3-mediated actin assembly to sites of clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol.*  
921 *Cell*. 26:3841–3856. doi:10.1091/mbc.E15-04-0252.
- 922 Tanabe, K., and K. Takei. 2009. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and  
923 is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J. Cell Biol*. 185:939–948.  
924 doi:10.1083/jcb.200803153.
- 925 Tassin, A.M., M. Paintrand, E.G. Berger, and M. Bornens. 1985. The Golgi apparatus remains  
926 associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J. Cell Biol*.  
927 101:630–638.
- 928 Thompson, H.M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer, and M.A. McNiven. 2004. Dynamin 2 binds  
929 gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat. Cell Biol*. 6:335–342.  
930 doi:10.1038/ncb1112.
- 931 Wada, I., D. Rindress, P.H. Cameron, W.J. Ou, J.J. Doherty, D. Louvard, A.W. Bell, D. Dignard,  
932 D.Y. Thomas, and J.J. Bergeron. 1991. SSR alpha and associated calnexin are major  
933 calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*.  
934 266:19599–19610.
- 935 Wang, S., A. Reuveny, and T. Volk. 2015. Nesprin provides elastic properties to muscle  
936 nuclei by cooperating with spectraplakins and EB1. *J. Cell Biol*. 209:529–538.  
937 doi:10.1083/jcb.201408098.
- 938 Wang, Z., J. Cui, W.M. Wong, X. Li, W. Xue, R. Lin, J. Wang, P. Wang, J.A. Tanner, K.S.E. Cheah,  
939 W. Wu, and J.-D. Huang. 2013. Kif5b controls the localization of myofibril components  
940 for their assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development*. 140:617–  
941 626. doi:10.1242/dev.085969.
- 942 Wilmshurst, J.M., S. Lillis, H. Zhou, K. Pillay, H. Henderson, W. Kress, C.R. Müller, A. Ndong, V. Cloke,  
943 T. Cullup, E. Bertini, C. Boennemann, V. Straub, R. Quinlivan, J.J. Dowling, S. Al-Sarraj,  
944 S. Treves, S. Abbs, A.Y. Manzur, C.A. Sewry, F. Muntoni, and H. Jungbluth. 2010.  
945 RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei.  
946 *Annals of neurology*. 68:717–726. doi:10.1002/ana.22119.



- 947 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2014a. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus  
948 to drive nuclear distribution in muscle cells. *Development*. 142:218–228.  
949 doi:10.1242/dev.114769.
- 950 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2014b. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus  
951 to drive nuclear distribution in muscle cells. *Development*. 142:218–228.  
952 doi:10.1242/dev.114769.
- 953 Zhang, J., X. Zheng, X. Yang, and K. Liao. 2009. CIN85 associates with endosomal membrane  
954 and binds phosphatidic acid. *Cell Research*. 19:733–746. doi:10.1038/cr.2009.51.
- 955

Figure 1

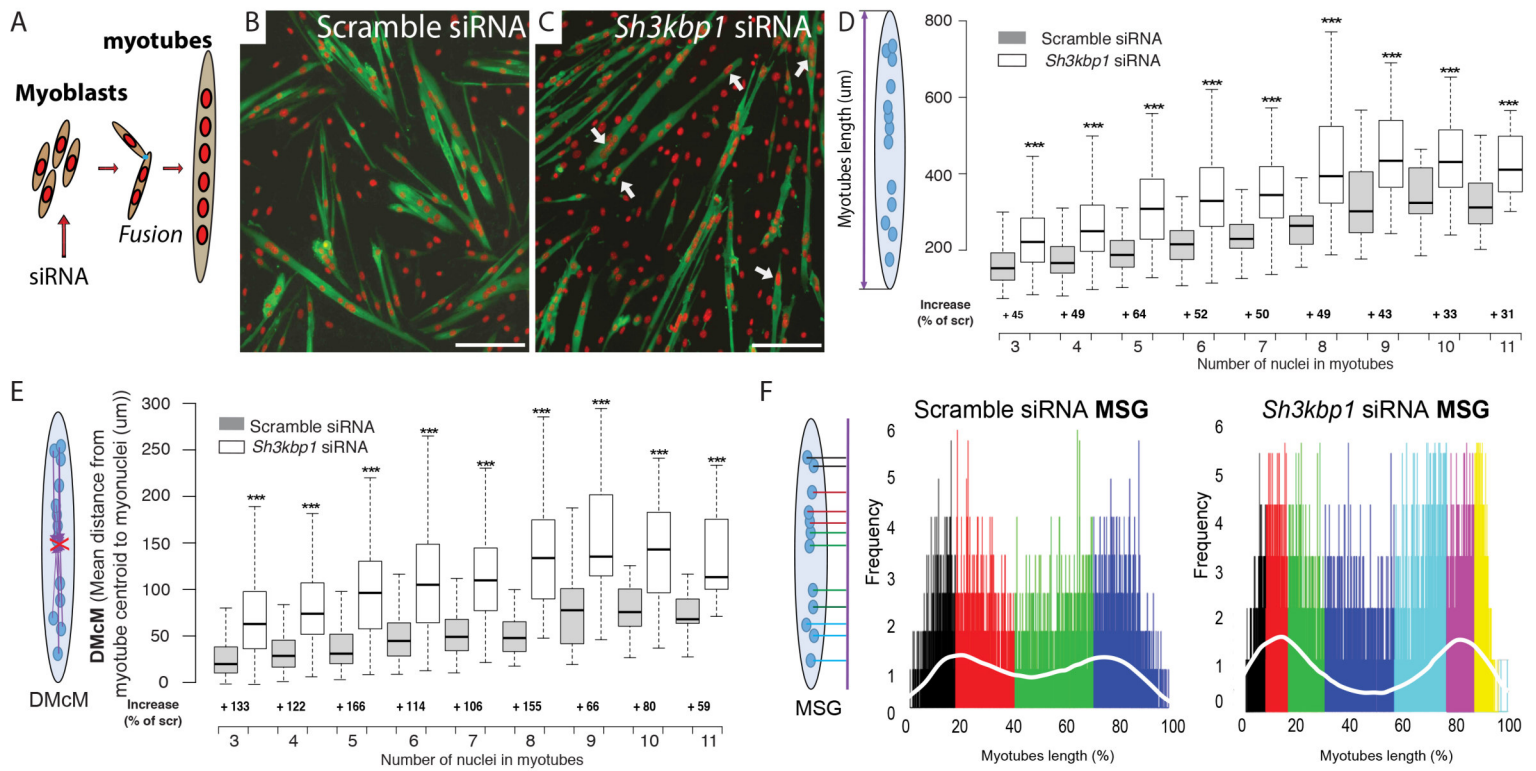


Figure 2

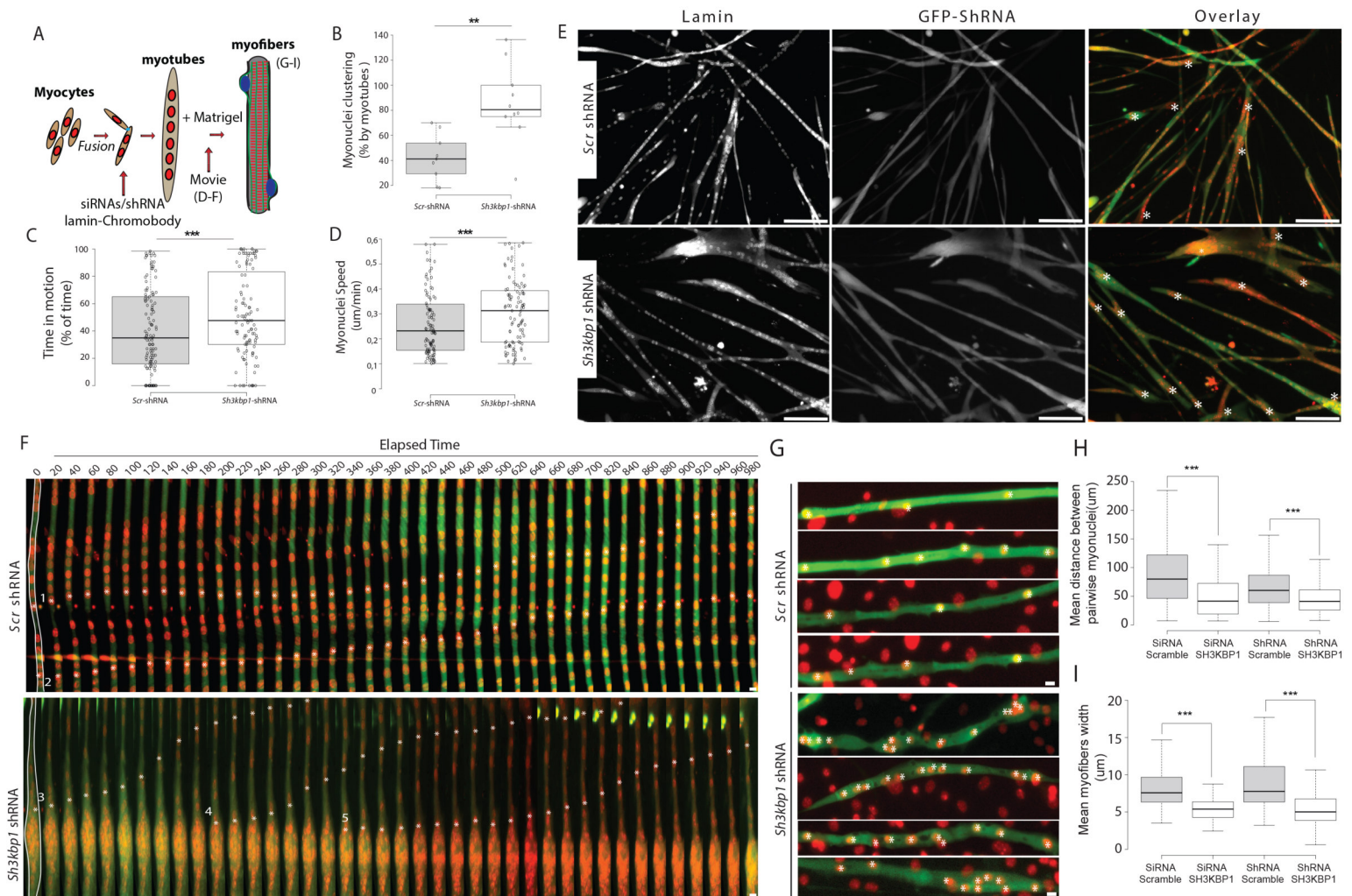


Figure 3

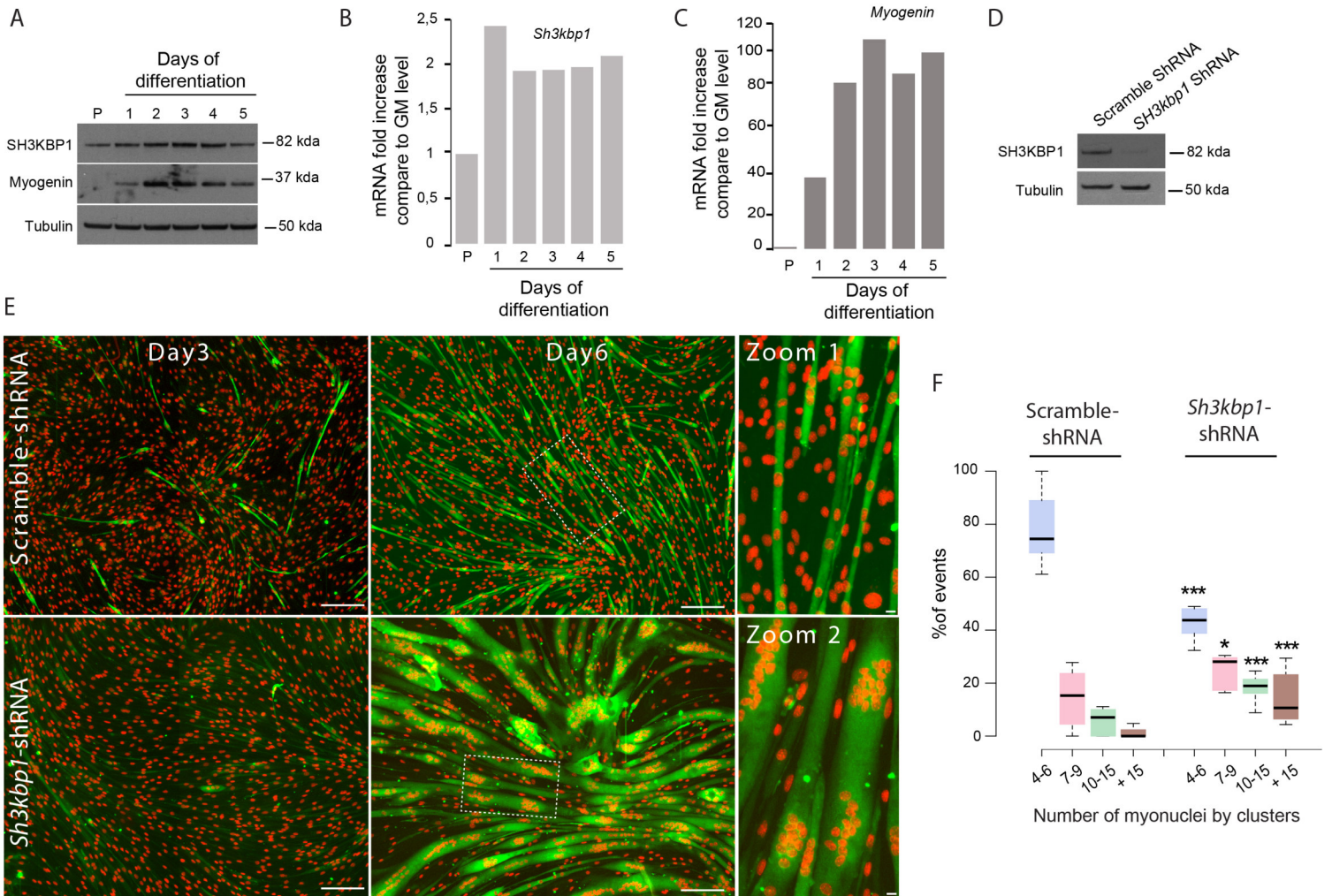


Figure 4

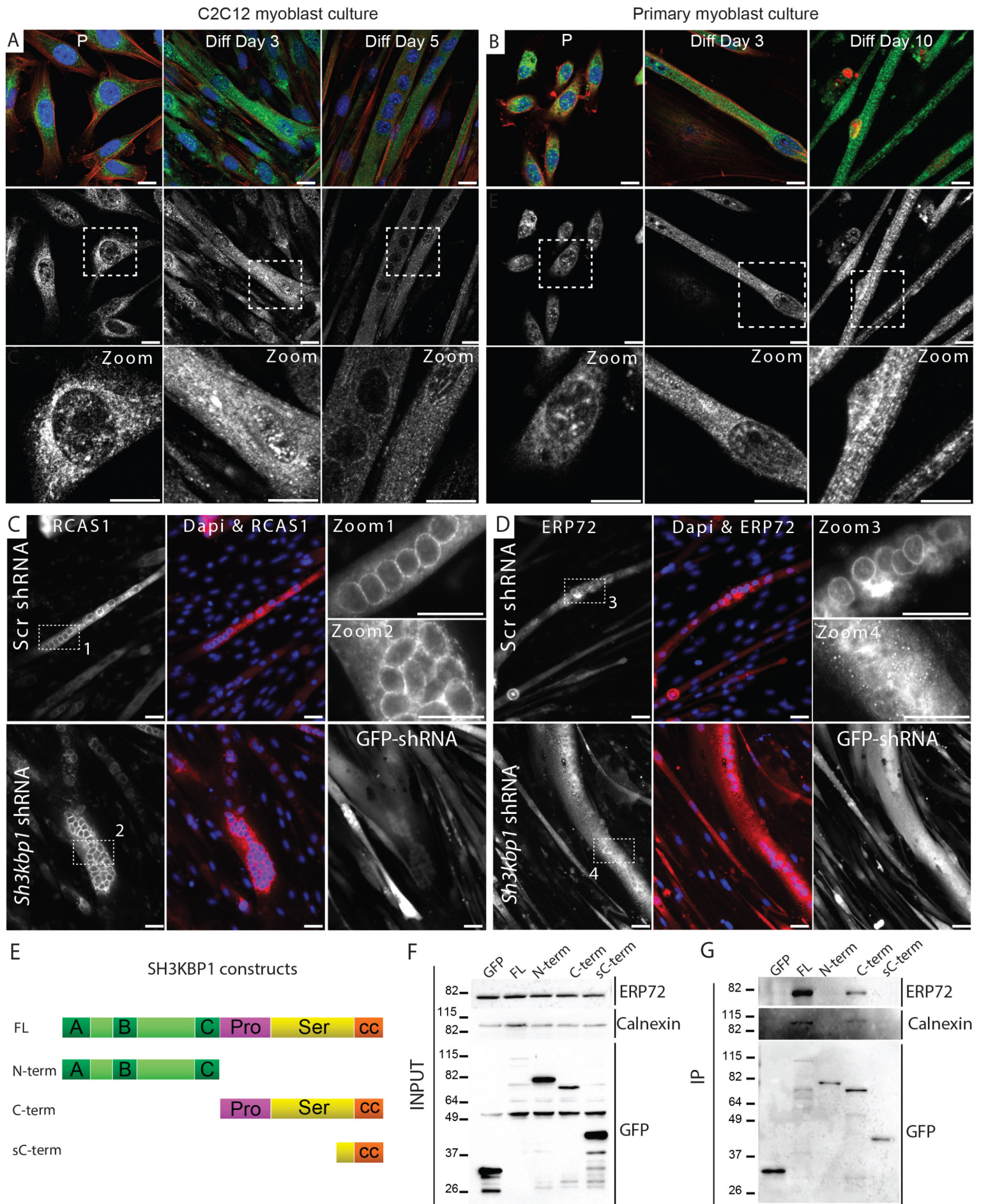


Figure 5

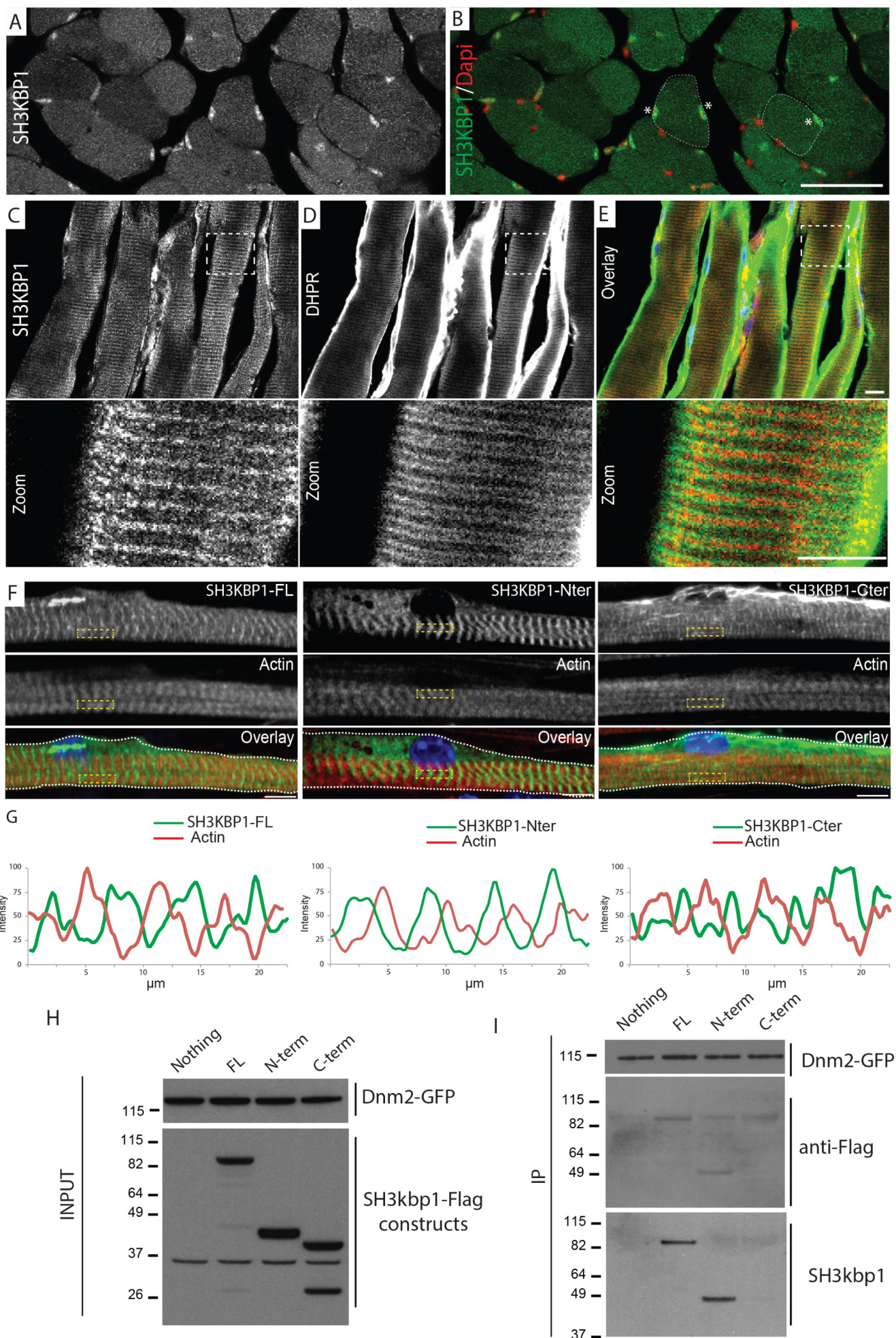


Figure 6

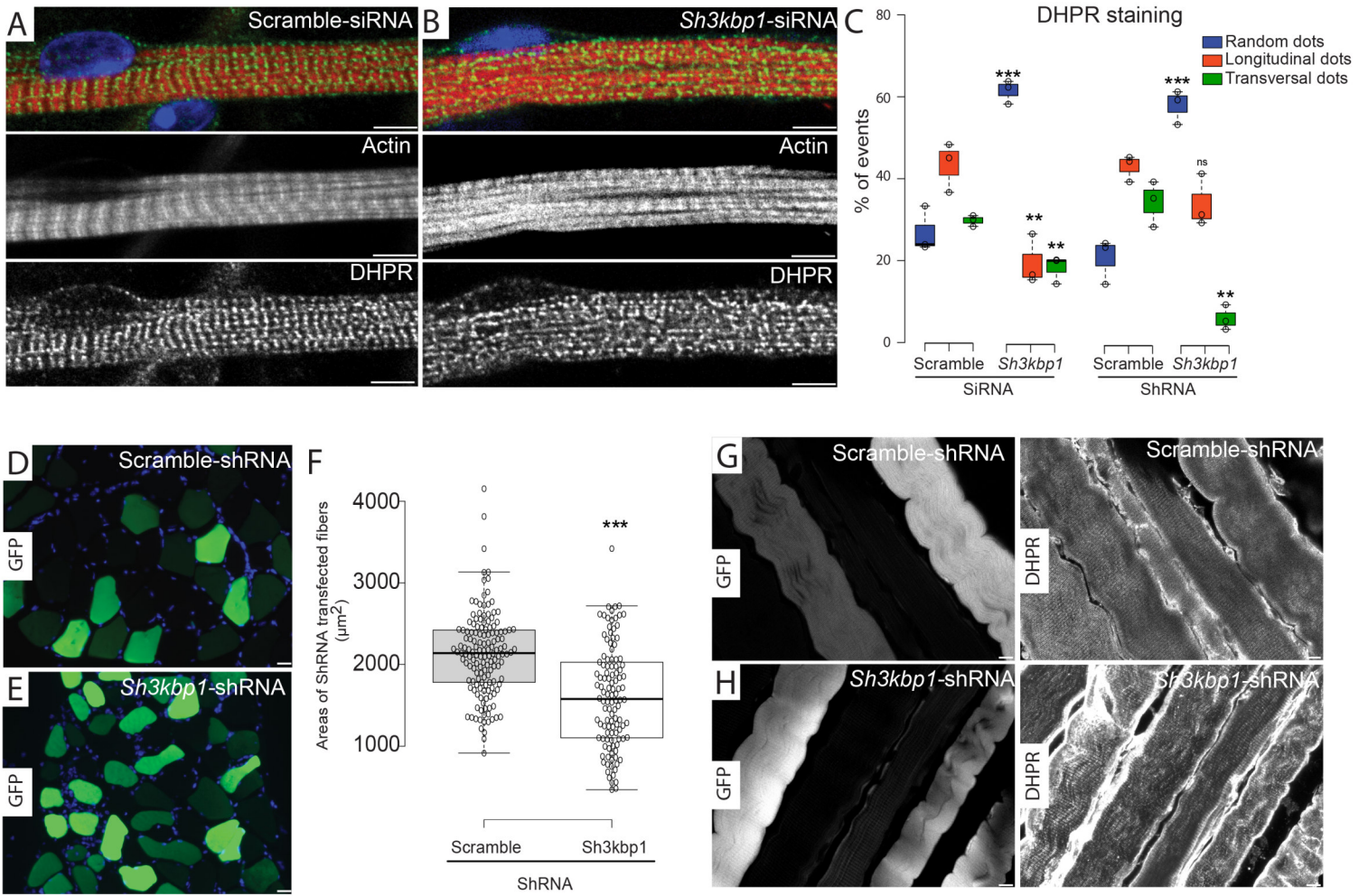
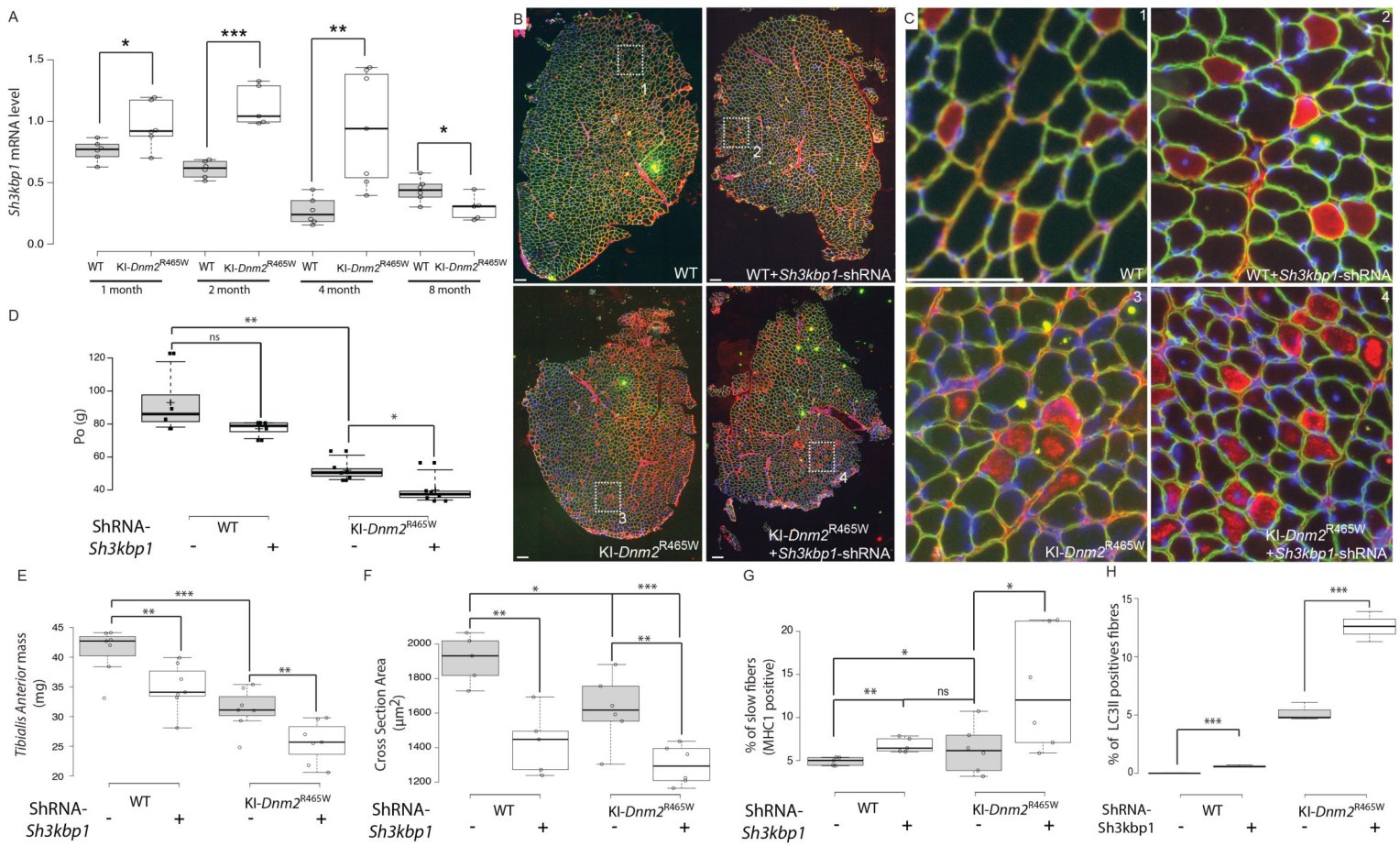
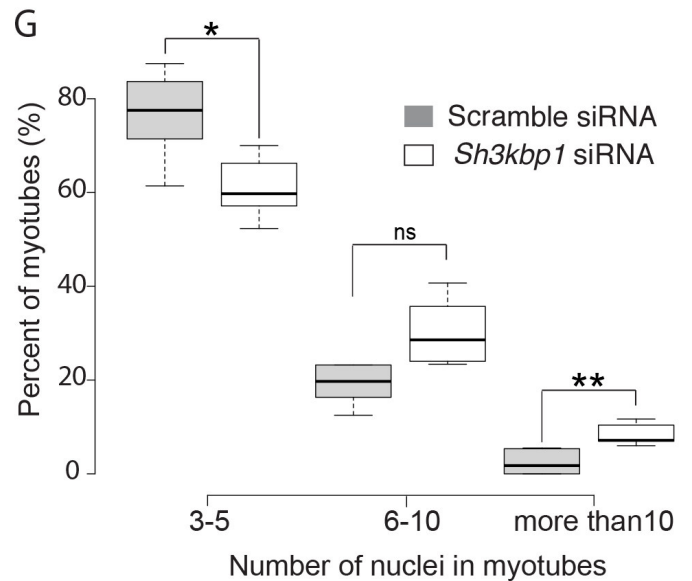
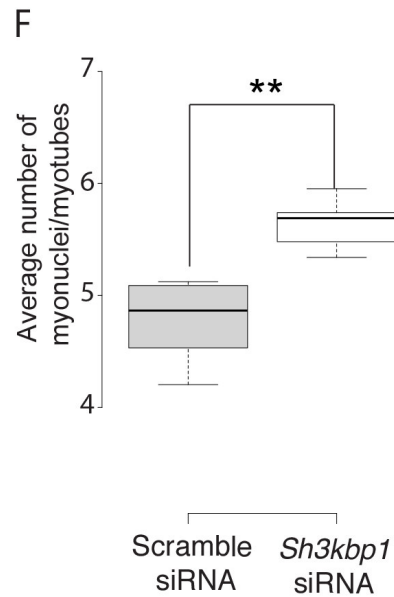
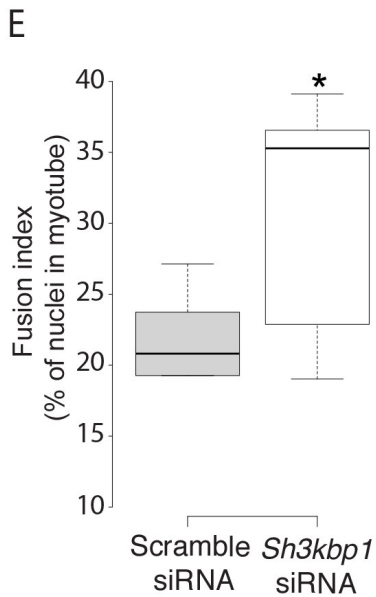
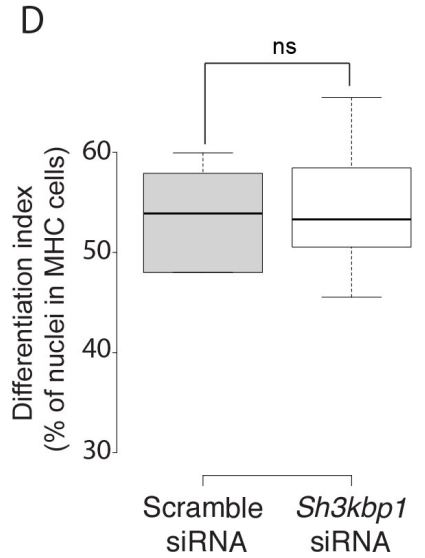
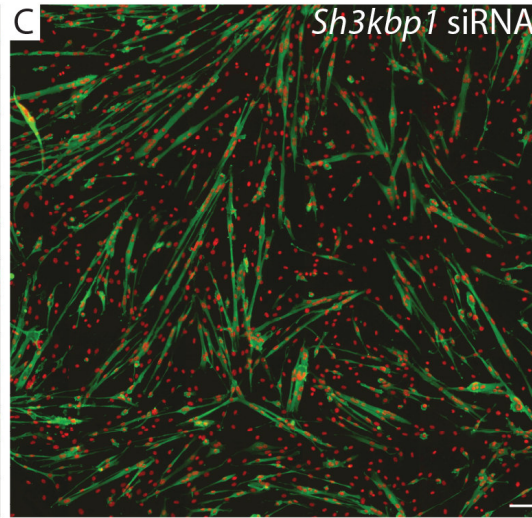
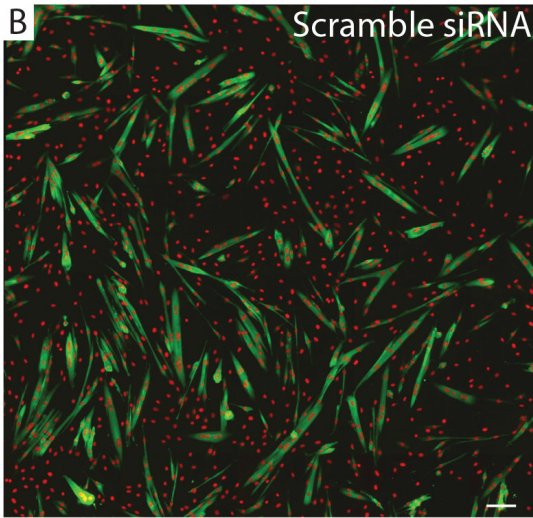
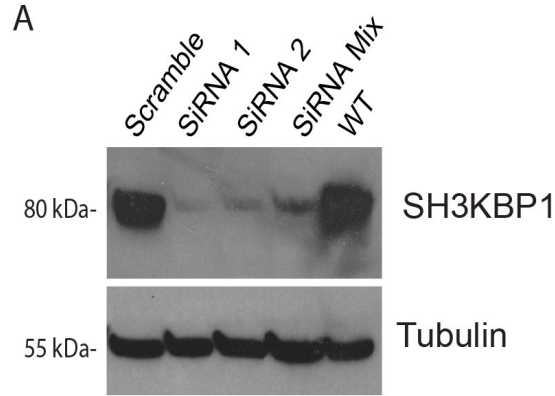


Figure 7

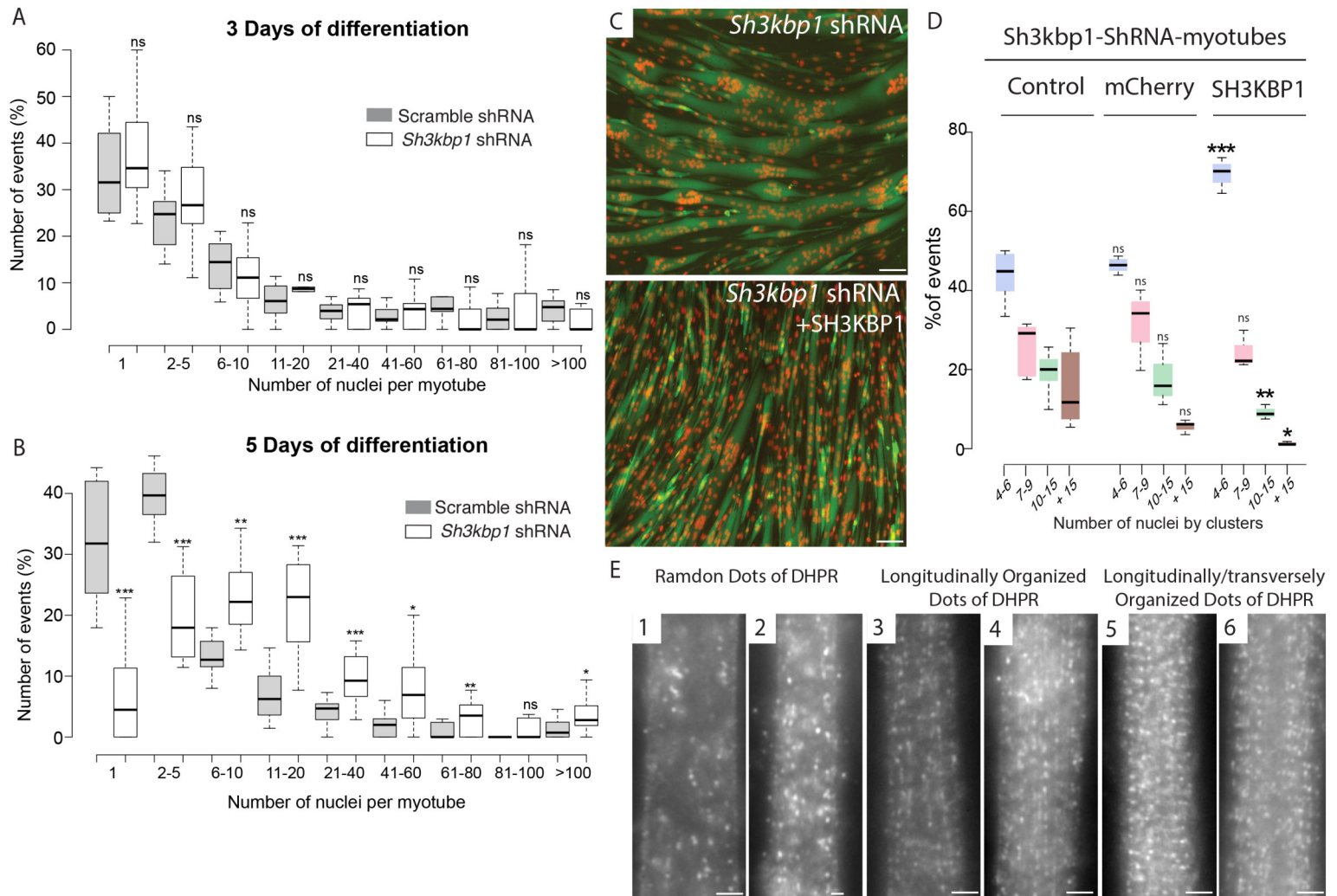




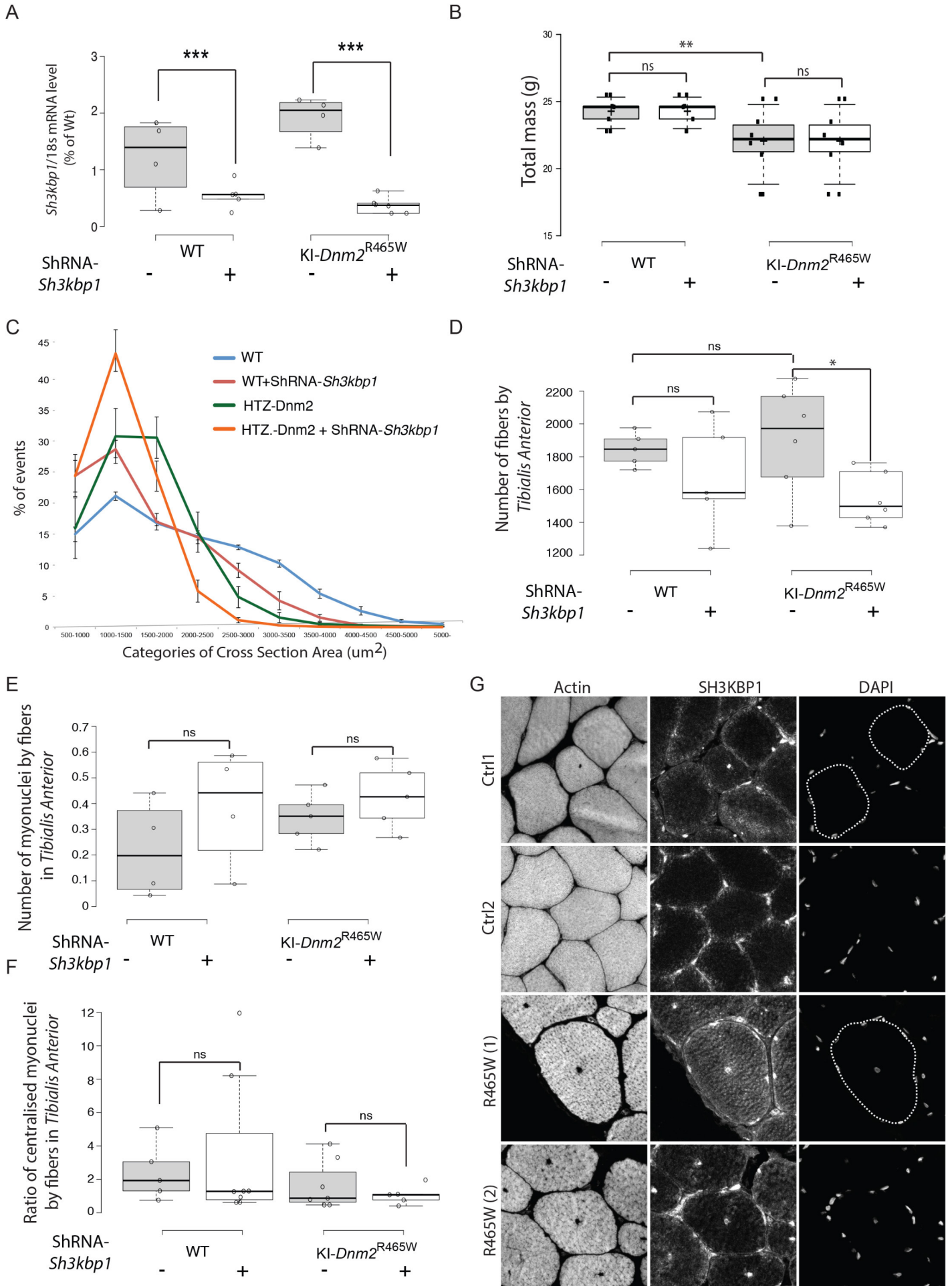
# Supplementary Figure 1



## Supplementary Figure 2



# Supplementary Figure 3



## Supplementary Table 1

### siRNA/shRNA sequence

| siRNA      | Sense oligonucleotide sequence | Anti-Sense oligonucleotide sequence |
|------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| SH3KBP1 #1 | GGUUGUAGGAGAGGUAGAGtt          | CUCUACCUCUCCUACAACc                 |
| SH3KBP1 #2 | GGUUUUGACUCUGUGAUUtt           | AUAUCACAGAGUCAAAACc                 |
| SH3KBP1 #3 | GGUCGAUUGAAGUGGAAAAtt          | UUUUCACUCAAUCGACc                   |
| shRNA      | Clone Name                     | Target Sequence                     |
| SH3KBP1    | MSH032547-2-CU6(OS308398)      | ttacctccagctacatcaa                 |

### DNA constructs

| Name                     | Company/collaborators |
|--------------------------|-----------------------|
| SH3KBP1-Full length-GFP  | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1-Full length-M2   | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1-C-terminal-GFP   | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1- C-terminal -M2  | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1- N-terminal -GFP | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1-N-terminal -M2   | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1- CC -GFP         | Buchman VL Lab Gift   |
| SH3KBP1-CC -M2           | Buchman VL Lab Gift   |
| DNM2-GFP                 | Laporte J Lab Gift    |

### Primers sequences

| Primers   | Sequence              |
|-----------|-----------------------|
| SH3KBP1 F | AATACCGGTTCTTCCTCGGC  |
| SH3KBP1 R | CATCCTCCACCAACTCGGAC  |
| Gusb F    | GAGGATTGCCAACGAAACCG  |
| Gusb R    | GTGTCTGGGGACCACCTTTGA |
| GAPDH F   | AACTTTGGCATTGTGGAAGG  |
| GAPDH R   | ACACATTGGGGGTAGGAACA  |
| RpL4 F    | GCCATGAGAGCGAAGTGG    |
| RpL4 R    | CTCCTGCAGGCGTCGTAG    |

|         |         |                                |
|---------|---------|--------------------------------|
| 18 s    | Forward | CGC CGC TAG AGG TGA AAT C      |
|         | Reverse | CCA GTC GGC ATC GTT TAT GG     |
| Sh3Kbp1 | Forward | CCA TGC ACG ATG TAT CCA GTG    |
|         | Reverse | GTC GTT CTC CTC GTT TAT TGG TT |

## Supplementary Table 2

| <b>Antibody or Dye</b>   | <b>Species and Utility</b> | <b>Dilution Factor</b> | <b>Manufacturer and Reference</b>    |
|--|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Anti-SH3KBP1   | Rabbit                     | 1:100                  | Sigma- HPA003355                     |
| Anti-SH3KBP1 (Cin85 H-300)   | Rabbit                     | 1:1000                 | Santa Cruz, sc-48746                 |
| Anti-SH3KBP1<br>(SETA/Cin85/Ruk/SH3KBP1 Antibody<br>clone 179.1.E1) 05-731 | Mouse                      | 1:1000                 | Merck 05-731                         |
| Anti- $\alpha$ -Tubulin  | Mouse - primary            | 1:1000                 | Sigma<br>T6074-200uL                 |
| Anti-myogenin (F5D)  | Mouse                      | 1:100                  | Santa Cruz sc-12732                  |
| Anti-RCAS1 (D2B6N)   | Rabbit                     | 1:200                  | Cell Signaling #12290                |
| Anti-ERP72 ( <u>D70D12</u> )   | Rabbit                     | 1:100                  | Cell Signaling #5033                 |
| Anti-laminin   | Rat                        | 1:200                  | Sigma                                |
| Anti-GFP (3H9)   | Rat                        | 1:1000                 | Chromotek                            |
| Anti-Flag M2   | Mouse                      | 1:1000                 | Sigma F1804                          |
| Anti-Calnexin (C5C9)   | Rabbit                     | 1:100                  | Cell Signaling #2679                 |
| Anti-LC3II/LC3I  | Rabbit - primary           | 1:250                  | Sigma L7543                          |
| Anti-Myosin skeletal slow  | Mouse                      | 1:100                  | Sigma M8421                          |
| MF20   | Mouse-primary              | 1:10                   | DSHB                                 |
| Anti-DHPR  | Rabbit                     | 1:10                   | DSHB (IIID5E1)                       |
| Dapi-brilliant blue  | Dye                        | 1:50000                | Thermo Fisher Scientifics<br>D1306   |
| Phalloidin-Alexa Fluor 647   | Dye                        | 1:100                  | Thermo Fisher Scientifics<br>A22287  |
| Anti-mouse-HRP   | Goat - secondary           | 1:3000                 | Invitrogen<br>62-6520                |
| Anti-rabbit-HRP  | Goat -<br>secondary        | 1:3000                 | Invitrogen<br>65-6120                |
| Anti-rat-<br>Alexa Fluor 488   | Donkey -<br>secondary      | 1:500                  | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21208 |
| Anti-rabbit-<br>Alexa Fluor 647  | Goat -<br>secondary        | 1:500                  | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21245 |
| Anti-mouse-<br>Alexa Fluor 647   | Goat -<br>secondary        | 1:500                  | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21240 |

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES



Dans l'ensemble, ce travail basé sur une approche biochimique a permis d'identifier de nouveaux régulateurs du positionnement des noyaux au cours de la différenciation des fibres musculaires striées squelettiques. Ces travaux ont identifié pour la première fois un rôle de la protéine Zbtb8a dans le domaine de la biologie musculaire. D'autre part, ils ont permis de mettre en évidence un rôle cytoplasmique microtubules-dépendant de la protéine mitotique NuMA1 au cours de la différenciation musculaire. Enfin, une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la protéine SH3KBP1 au cours de la myogenèse a été développée.

#### *Identification de régulateurs du positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire*

Dans cette étude, nous avons mis en place une approche biochimique de façon à identifier les protéomes microtubules -dépendants et -indépendants exprimés d'une part dans les myotubes et, d'autre part dans les myofibres matures. Cette approche nous a permis de sélectionner un total de 479 protéines, dont le rôle sur le processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire a été discriminé à l'aide d'un criblage ARN interférents utilisant des siRNAs.

Cette approche a permis de mettre en évidence une expression différentielle des protéines au cours de la myogenèse. En effet, les protéomes diffèrent entre les phases précoces (myotubes) et les phases tardives (myofibres) de différenciation musculaire, démontrant ainsi une spécialisation en termes d'expression protéique pour chacune des étapes de la différenciation musculaire considérée.

Soutenant ces observations, nous avons pu identifier des protéines dont l'inhibition d'expression affecte le positionnement des noyaux, soit dans les phases précoces, soit dans les phases tardives de la différenciation musculaire, ou encore dans les deux étapes.

L'implication de divers moteurs moléculaires dans ce processus a déjà été mise en évidence (Metzger et al., 2012 ; Gache et al., 2017). Toutefois, nos travaux ont montré que des protéines associées aux microtubules qui ne présentent pas d'activité motrice, mais également des protéines qui n'ont de prime abord pas de lien direct avec les microtubules, participent également au processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire. Ces résultats permettent donc d'étendre le champ d'investigation quant à la régulation protéique du positionnement des noyaux au cours de la myogenèse.



## *Rôle de la protéine Zbtb8a dans le positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire*

L'implication de la protéine Zbtb8a dans le processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire a été mise en exergue grâce au crible ARN interférents mené sur myotubes primaires. Cette protéine est peu étudiée ; en effet seules deux études ont été publiées et ont démontré son rôle dans la prolifération cellulaire (Kim et al., 2013) et dans l'apparition de cancers (Wu et al., 2013). Notre travail a pu mettre en évidence un nouveau rôle de cette protéine : son implication dans le processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire.

Sa localisation stratégique au niveau de l'enveloppe nucléaire des myotubes a soulevé plusieurs hypothèses quant au rôle qu'elle pourrait jouer dans le processus de positionnement des noyaux au cours de la myogenèse. En effet, l'interface entre le noyau et le cytoplasme est le lieu où les éléments du cytosquelette s'ancrent au noyau, notamment grâce au complexe LINC. C'est donc dans cette région spécifique que les forces exercées par les MTs et les autres éléments du cytosquelette sont transmises au noyau (Maniotis et al., 1997 ; Alam et al., 2015 ; Crisp et Burke, 2008).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que Zbtb8a, ainsi localisée, pourrait être un nouveau membre actif du complexe LINC. En effet, le complexe LINC a déjà été montré pour réguler la taille du noyau (Lammerding et al., 2006 ; Werger et al., 2015 ; Broers et al., 2004 ; Dahl et al., 2004 ; Lammerding et al., 2004) mais également la prolifération cellulaire (Redwood, 2011). Cette hypothèse est renforcée par les résultats que nous avons obtenus concernant l'effet de Zbtb8a sur la taille des noyaux des myotubes mais également par les travaux de Kim et al. (2013) qui ont montré le rôle de cette protéine sur la prolifération cellulaire.

Dans le cas où la protéine Zbtb8a ferait bien partie du complexe LINC, elle contribuerait pleinement à l'ancrage du cytosquelette au noyau. De plus, une atteinte de l'intégrité du complexe LINC entraîne des défauts dans la transmission des forces entre le noyau et le cytosquelette (Lombardi et al., 2011). Ainsi, Zbtb8a participerait directement à la transmission des forces du cytosquelette au noyau dans les cellules musculaires, ce qui *in fine* permettrait de réguler leur déplacement et leur positionnement au cours de la différenciation musculaire.

Le rôle régulateur de Zbtb8a sur la forme des noyaux pourrait passer par d'autres mécanismes. En effet, la variation de la forme du noyau a été associée à une modification de sa rigidité (Stephens et al., 2018). Ainsi, indépendamment de l'ancrage des éléments du cytosquelette au noyau, Zbtb8a pourrait réguler la rigidité du noyau et ainsi moduler l'efficacité de la transmission des forces appliquées aux noyaux.

De plus, Zbtb8a pourrait également contribuer à l'organisation intranucléaire en régulant la condensation de la chromatine. Ainsi, nous pouvons penser que l'inhibition d'expression de Zbtb8a dans les myotubes entraîne une décondensation de la chromatine. En effet, la décondensation de la chromatine a été montrée pour augmenter la déformabilité nucléaire (Spasgnol et Dahl, 2016 ; Spasgnol et al., 2016 ; Chalut et al., 2012 ; Dahl et al., 2005 ; Stephens

et al., 2017). Ce rôle de Zbtb8a aurait donc pour conséquence une régulation de la forme des noyaux et de leur positionnement dans les fibres musculaires en développement.

Par ailleurs, les cinétiques de différenciation musculaire réalisées aux niveaux transcriptomique et protéique ont permis de mettre en évidence l'importance de la protéine Zbtb8a dans les premières étapes de la différenciation musculaire. Étant donné que cette protéine a été décrite pour être un facteur de transcription, nous pouvons imaginer que Zbtb8a va permettre d'activer la transcription de gènes nécessaires à la différenciation musculaire.

Les résultats préliminaires obtenus quant au rôle de Zbtb8a au cours de la différenciation musculaire ne permettent pas d'exclure un rôle cytoplasmique de cette protéine. Ainsi, nous pouvons conjecturer que la protéine Zbtb8a puisse être cytoplasmique. En effet, il est possible que Zbtb8a participe à l'ancrage des extrémités négatives des MTs aux noyaux.

Bien que les résultats obtenus n'appuient pas cette hypothèse, nous ne pouvons pas exclure l'idée selon laquelle Zbtb8a s'associerait dans la longueur des MTs, telles les MAPs, pour réguler leur dynamique au sein du cytoplasme.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ne permettent pas de conclure quant au mécanisme d'action de la protéine Zbtb8a dans les cellules musculaires. Ils ont toutefois permis de soulever de nombreuses questions. En effet, toutes ces hypothèses sont autant de mécanismes potentiels qui permettraient d'expliquer l'implication de la protéine Zbtb8a dans la forme et le positionnement des noyaux au cours de la myogenèse. Davantage d'expériences seront nécessaires pour écarter ou valider certaines de ces conjectures.

### *Le rôle cytoplasmique en lien avec les microtubules de la protéine NuMA1*

L'une des découvertes majeures de ce travail est l'identification d'un rôle cytoplasmique de la protéine NuMA1 dans le domaine de la biologie musculaire. En effet, le rôle de cette protéine, très étudié dans le contexte des divisions cellulaires, a été démontré tout au long de la différenciation musculaire.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de NuMA1 dans le cytoplasme des cellules musculaires en différenciation. En effet, NuMA1 régule la dynamique des MTs en stabilisant et en orientant les MTs dans l'axe longitudinal des myotubes. Ce rôle microtubules-dépendant contribue à l'espacement et à la répartition homogène des noyaux dans les phases précoces de développement musculaire. Ce rôle sur le positionnement des noyaux s'est avéré être conservé jusque dans les phases tardives de différenciation, et même au-delà puisque nous avons pu mettre en évidence l'importance de NuMA1 dans le maintien périphérique des noyaux dans les fibres musculaires matures *in vivo*.

La localisation dynamique de NuMA1 entre les noyaux et le cytoplasme au cours de la différenciation musculaire a posé l'hypothèse d'une régulation différentielle de NuMA1 entre ces deux compartiments. Un tel mécanisme a déjà pu être observé dans les cellules en division,

où l'état de phosphorylation de NuMA1 dans le cytoplasme permet de réguler son activité aux pôles du fuseau (Radulescu et Cleveland, 2010). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la forme cytoplasmique, associée aux MTs, de la protéine NuMA1 dans les cellules musculaires se trouverait dans un état phosphorylé, alors que la forme nucléaire se trouverait dans un état déphosphorylé. Ainsi, la forme phosphorylée de NuMA1 permettrait d'augmenter son affinité avec les MTs et de réguler leur dynamique. C'est dans ce contexte que nous avons émis une hypothèse complémentaire : l'état phosphorylé de NuMA1 serait une conséquence de l'activité kinase de l'AMPK. Des expériences préliminaires ont été menées et permettent de conforter cette hypothèse. Toutefois, des expériences complémentaires seront nécessaires pour la valider.

De plus, nos travaux ont démontré l'importance de NuMA1 dans le maintien de la forme nucléaire. Ce résultat soulève toutefois une interrogation : ce rôle est-il régulé par la fraction cytoplasmique ou par la fraction nucléaire de la protéine, ou encore grâce à une action équilibrée entre ces deux fractions ? En effet, ce résultat pourrait être une conséquence de l'activité cytoplasmique de NuMA1. La régulation de la dynamique microtubulaire par NuMA1 permettrait une transmission efficace des forces des MTs au noyau, qui modèleraient ainsi la forme de ce-dernier. Mais, ce résultat pourrait également être la conséquence d'un rôle nucléaire de NuMA1. En effet, il a été montré que NuMA1 pourrait être responsable de l'organisation du génome (Radulescu et Cleveland, 2010).

Les expériences réalisées *in vivo* ont soulevé de nombreuses questions. Les expériences d'inhibition d'expression de NuMA1 dans les fibres matures montrent que deux semaines d'expression des plasmides sont suffisantes pour induire une diminution de la taille des fibres musculaires, une modification de l'architecture du réseau de MTs ainsi qu'un défaut dans le positionnement des noyaux.

Il a été montré que les MTs servent de support au réseau de mitochondries (Rappaport et al., 1998 ; Kuznetsov et al., 2013 ; Anesti et Scorrano, 2006). Nous pouvons donc supposer que NuMA1, en régulant l'architecture du réseau de MTs, participe au maintien d'un mitochondriome fonctionnel dans les fibres musculaires et contribue ainsi à la fourniture en énergie des fibres musculaires.

Les défauts observés en absence d'expression de NuMA1 dans les fibres musculaires matures lèvent également la question de la fonctionnalité de ces fibres musculaires. Cependant, la méthode d'électroporation ne permet pas de réaliser des tests de force sur les muscles car le taux d'électroporation est limité. Il faudrait alors générer une lignée de souris pour laquelle l'expression de NuMA1 serait inhibée spécifiquement dans le muscle et de manière inductible, de façon à ne pas interférer avec les divisions cellulaires requises durant le développement embryonnaire.

Par ailleurs, les défauts observés *in vivo* dans des fibres dépourvues d'expression de NuMA1 sont très similaires aux défauts observables chez un sujet sarcopénique : atrophie musculaire et défaut de positionnement des noyaux (Lexell et al., 1986). Des atteintes du mitochondriome sont également observées chez le sujet sarcopénique (Sebastian et al., 2016), mais ce paramètre reste à être étudié dans nos conditions. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'activité de NuMA1

au cours du temps, de façon à identifier sa potentielle implication dans des pathologies telle que la sarcopénie.

Notre approche *in vivo* a également permis d'identifier NuMA1 à la JNM et son rôle dans le maintien de l'intégrité de cette structure. L'activité de NuMA1 dans cette région spécialisée reste à être étudiée. Toutefois, nous pouvons envisager que son rôle soit associé à celui de la Dynéine. En effet, celle-ci est nécessaire aux regroupements des récepteurs à acétylcholine, de la tyrosine kinase MuSK et de la Rapsyn qui permettent la fonctionnalité de la JNM (Vilmont et al., 2016). Des défauts d'intégrité de la JNM peuvent être observés dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique (ALS). Nous pouvons ainsi conjecturer que la protéine NuMA1 pourrait être impliquée dans des pathologies neurodégénératives de type ALS.

Dans l'ensemble, les travaux menés sur la protéine NuMA1 ont permis d'identifier son rôle cytoplasmique dans des cellules post-mitotiques que sont les fibres musculaires. Nous avons pu mettre en évidence son activité microtubules-dépendante au cours de la myogenèse et dans les fibres musculaires matures, ainsi qu'un rôle spécialisé au niveau de la JNM. Des études supplémentaires permettront de définir le rôle de NuMA1 à la JNM.

Par ailleurs, une récente publication de Torii et al. (2020) a pour la première fois mis en évidence un rôle de NuMA1 dans le processus d'endocytose dans des neurones post-mitotiques. Dans ce contexte, il ne fait plus aucun doute que le rôle cytoplasmique de NuMA1 n'est pas limité aux divisions cellulaires et que d'autres études permettront d'identifier ces rôles complémentaires dans les années à venir.

### *La protéine SH3KBP1*

La réalisation du criblage ARN interférents utilisant des siRNAs a permis d'identifier le rôle de la protéine SH3KBP1 dans le processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire.

En effet, le rôle de cette protéine, impliquée dans l'endocytose et le recrutement de la dynamine (Schroeder et al., 2010 ; Sun et al., 2015 ; Zhang et al., 2009), n'a jamais été étudié dans le processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire. Dans nos travaux, nous avons pu démontrer l'importance de cette protéine adaptatrice, et plus particulièrement de sa partie C-terminale, dans l'organisation du réticulum endoplasmique grâce à une protéine intermédiaire, la Calnexine.

Nos travaux ont pu mettre en évidence le rôle de cette protéine dans la fusion des myoblastes. Le processus de fusion requiert un processus d'adhésion cellule-cellule qui implique des protéines associées aux membranes ainsi qu'un remodelage de l'actine (Sampath et al., 2018). Schmidt et al., (2003) ont démontré le rôle de SH3KBP1 dans l'interaction avec les éléments du cytosquelette, tels que les filaments d'actine et les microtubules, mais également dans la modulation de l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, SH3KBP1 interagit avec la protéine c-Cbl qui permet de recruter SH3KBP1 et d'initier l'endocytose (Take et al., 2000). Ces éléments ont permis de soulever l'hypothèse selon laquelle SH3KBP1 pourrait être recrutée au niveau de le

membrane plasmique lors des événements de fusion. Cette localisation stratégique lui permettrait alors de contribuer aux remodelages membranaires, du réseau d'actine ainsi qu'à l'adhésion entre myoblastes, favorisant et régulant ainsi le processus de fusion.

Nous avons également pu montrer que SH3KBP1 contrôle la capacité des noyaux à se mouvoir au sein des myotubes en différenciation. Ce rôle passerait potentiellement par la régulation de la dynamique des MTs, qui en polymérisant exercent des forces sur les noyaux, permettant ainsi de les déplacer au sein des cellules en différenciation. Ainsi, une perspective que nous pourrions envisager serait d'étudier le rôle de la protéine sur la dynamique du réseau de MTs.

De plus, nos travaux ont montré que SH3KBP1, en interagissant avec la protéine Dynamine-2 (DNM2), participe aux étapes terminales de maturation des fibres musculaires en organisant les tubules transverses. Ce rôle ainsi que son lien avec le réticulum sarcoplasmique, nous ont amenés à penser que SH3KBP1 pourrait participer au couplage excitation-contraction, contribuant ainsi à la fonctionnalité musculaire.

Finalement, nous avons observé que l'inhibition de l'expression de SH3KBP1 dans des fibres musculaires matures *in vivo* entraîne un phénotype similaire à celui observé dans un modèle murin de myopathie centronucléaire KI-DNM2<sup>R465W</sup> qui génère une forme autosomale dominante de la pathologie. La majorité des protéines altérées dans les myopathies centronucléaires ont un rôle dans le remodelage membranaire et sont essentielles à différents processus cellulaires, tels que l'endocytose, le trafic vésiculaire ou encore l'autophagie (Romero et Bitoun, 2011). Ainsi, il est possible que la protéine SH3KBP1 participe à la pathogenèse des myopathies centronucléaires.

Dans l'ensemble, mon travail de thèse a apporté une meilleure compréhension du processus de positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire, notamment grâce à l'identification de nouveaux régulateurs de ce processus. L'identification des protéines NuMA1 et SH3KBP1 ont pu montrer que la régulation du positionnement des noyaux au cours de la différenciation musculaire est un processus complexe qui fait intervenir des protéines à la localisation intracellulaire et aux fonctions diverses.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

- Abad PC, Lewis J, Mian IS, et al. NuMA influences higher order chromatin organization in human mammary epithelium. *Mol Biol Cell*. 2007;18(2):348–361. doi:10.1091/mbc.e06-06-0551
- Abmayr SM, Pavlath GK. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*. 2012;139(4):641–656. doi:10.1242/dev.068353
- Adams BA, Tanabe T, Mikami A, Numa S, Beam KG. Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature*. 1990;346(6284):569–572. doi:10.1038/346569a0
- Adamopoulos A, Landskron L, Heidebrecht T, et al. Crystal structure of the tubulin tyrosine carboxypeptidase complex VASH1-SVBP. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(7):567–570. doi:10.1038/s41594-019-0254-6
- Aillaud C, Bosc C, Peris L, et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science*. 2017;358(6369):1448–1453. doi:10.1126/science.aao4165
- Aillaud C, Bosc C, Saoudi Y, et al. Evidence for new C-terminally truncated variants of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins. *Mol Biol Cell*. 2016;27(4):640–653. doi:10.1091/mbc.E15-03-0137
- Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature*. 2010;467(7312):218–222. doi:10.1038/nature09324
- Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(12):711–726. doi:10.1038/nrm4084
- Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):309–322. doi:10.1038/nrm2369
- Alam SG, Lovett D, Kim DI, Roux KJ, Dickinson RB, Lele TP. The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci*. 2015;128(10):1901–1911. doi:10.1242/jcs.161703
- Anesti V, Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):692–699. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.013
- Arce CA, Rodriguez JA, Barra HS, Caputo R. Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem*. 1975;59(1):145–149. doi:10.1111/j.1432-1033.1975.tb02435.x
- Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):91–103. doi:10.1038/nrm2618
- Auld AL, Folker ES. Nucleus-dependent sarcomere assembly is mediated by the LINC complex. *Mol Biol Cell*. 2016;27(15):2351–2359. doi:10.1091/mbc.E16-01-0021
- Azevedo M, Schulman VK, Folker E, Balakrishnan M, Baylies M. Imaging Approaches to Investigate Myonuclear Positioning in *Drosophila*. *Methods Mol Biol*. 2016;1411:291–312. doi:10.1007/978-1-4939-3530-7\_19

## B

- Bachman JF, Klose A, Liu W, et al. Prepubertal skeletal muscle growth requires Pax7-expressing satellite cell-derived myonuclear contribution. *Development*. 2018;145(20):dev167197. Published 2018 Oct 25. doi:10.1242/dev.167197
- Banerjee I, Zhang J, Moore-Morris T, et al. Targeted ablation of nesprin 1 and nesprin 2 from murine myocardium results in cardiomyopathy, altered nuclear morphology and inhibition of the



- biomechanical gene response. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004114. Published 2014 Feb 20. doi:10.1371/journal.pgen.1004114
- Barboro P, D'Arrigo C, Mormino M, et al. An intranuclear frame for chromatin compartmentalization and higher-order folding. *J Cell Biochem.* 2003;88(1):113–120. doi:10.1002/jcb.10378
- Barlan K, Gelfand VI. Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(5):a025817. Published 2017 May 1. doi:10.1101/cshperspect.a025817
- Barnes JM, Przybyla L, Weaver VM. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J Cell Sci.* 2017;130(1):71–82. doi:10.1242/jcs.191742
- Barresi R, Di Blasi C, Negri T, et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet.* 2000;37(2):102–107. doi:10.1136/jmg.37.2.102
- Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(15):5723–5728. doi:10.1073/pnas.1323842111
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2):a008342. Published 2012 Feb 1. doi:10.1101/cshperspect.a008342
- Berezney R, Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;60(4):1410–1417. doi:10.1016/0006-291x(74)90355-6
- Berns MW, Rattner JB, Brenner S, Meredith S. The role of the centriolar region in animal cell mitosis. A laser microbeam study. *J Cell Biol.* 1977;72(2):351–367. doi:10.1083/jcb.72.2.351
- Bertrand AT, Ziaei S, Ehret C, et al. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 13):2873–2884. doi:10.1242/jcs.144907
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, et al. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell.* 2002;13(11):4013–4028. doi:10.1091/mbc.02-03-0046
- Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(6):725–730. doi:10.1016/s0955-0674(00)00159-9
- Böhm J, Biancalana V, Malfatti E, et al. Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain.* 2014;137(Pt 12):3160–3170. doi:10.1093/brain/awu272
- Bone CR, Starr DA. Nuclear migration events throughout development. *J Cell Sci.* 2016;129(10):1951–1961. doi:10.1242/jcs.179788
- Bonne G, Mercuri E, Muchir A, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol.* 2000;48(2):170–180
- Bottenberg W, Sanchez-Soriano N, Alves-Silva J, Hahn I, Mende M, Prokop A. Context-specific requirements of functional domains of the Spectraplaklin Short stop in vivo. *Mech Dev.* 2009;126(7):489–502. doi:10.1016/j.mod.2009.04.004
- Bowman SK, Neumüller RA, Novatchkova M, Du Q, Knoblich JA. The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell.* 2006;10(6):731–742. doi:10.1016/j.devcel.2006.05.005
- Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell.* 2012;10(5):504–514. doi:10.1016/j.stem.2012.04.001
- Brinkley BR, Cox SM, Pepper DA, Wible L, Brenner SL, Pardue RL. Tubulin assembly sites and the organization of cytoplasmic microtubules in cultured mammalian cells. *J Cell Biol.* 1981;90(3):554–562. doi:10.1083/jcb.90.3.554

- Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, et al. Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2004;13(21):2567–2580. doi:10.1093/hmg/ddh295
- Brown A, Li Y, Slaughter T, Black MM. Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J Cell Sci.* 1993;104 ( Pt 2):339–352.
- Bruusgaard JC, Gundersen K. In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1450–1457. doi:10.1172/JCI34022
- Bruusgaard JC, Liestøl K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol.* 2003;551(Pt 2):467–478. doi:10.1113/jphysiol.2003.045328
- Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol.* 2007;330(6-7):530–533. doi:10.1016/j.crv.2007.03.015
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(4):1189–1192. doi:10.1073/pnas.81.4.1189
- Bulinski JC, Gundersen GG. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* 1991;13(6):285–293. doi:10.1002/bies.950130605
- Burden SJ. The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev.* 1998;12(2):133–148. doi:10.1101/gad.12.2.133
- Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a009167. Published 2013 May 1. doi:10.1101/cshperspect.a009167
- Buxboim A, Swift J, Irianto J, et al. Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr Biol.* 2014;24(16):1909–1917. doi:10.1016/j.cub.2014.07.001

## C

- Cabrić M, James NT. Morphometric analyses on the muscles of exercise trained and untrained dogs. *Am J Anat.* 1983;166(3):359–368. doi:10.1002/aja.1001660309
- Cadot B, Gache V, Gomes ER. Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time. *Nucleus.* 2015;6(5):373–381. doi:10.1080/19491034.2015.1090073
- Cadot B, Gache V, Gomes ER. Fast, multi-dimensional and simultaneous kymograph-like particle dynamics (SkyPad) analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e89073. Published 2014 Feb 19. doi:10.1371/journal.pone.0089073
- Cadot B, Gache V, Vasyutina E, Falcone S, Birchmeier C, Gomes ER. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* 2012;13(8):741–749. doi:10.1038/embor.2012.89
- Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. Posttranslational modifications of alpha-tubulin: acetylated and detyrosinated forms in axons of rat cerebellum. *J Cell Biol.* 1987;104(6):1569–1574. doi:10.1083/jcb.104.6.1569
- Capco DG, Wan KM, Penman S. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell.* 1982;29(3):847–858. doi:10.1016/0092-8674(82)90446-9
- Capers CR. Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960;7(3):559–566. doi:10.1083/jcb.7.3.559
- Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2063–2076. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.033

- Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct.* 1997;22(1):103–116. doi:10.1247/csf.22.103
- Carlsson L, Li Z, Paulin D, Thornell LE. Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp Cell Res.* 1999;251(1):213–223. doi:10.1006/excr.1999.4569
- Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(1):18–24. doi:10.1016/s0955-0674(01)00289-7
- Caudron N, Arnal I, Buhler E, Job D, Valiron O. Microtubule nucleation from stable tubulin oligomers. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50973–50979. doi:10.1074/jbc.M209753200
- Chalut KJ, Höpfler M, Lautenschläger F, et al. Chromatin decondensation and nuclear softening accompany Nanog downregulation in embryonic stem cells. *Biophys J.* 2012;103(10):2060–2070. doi:10.1016/j.bpj.2012.10.015
- Chambliss AB, Khatau SB, Erdenberger N, et al. The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci Rep.* 2013;3:1087. doi:10.1038/srep01087
- Chandramouly G, Abad PC, Knowles DW, Lelièvre SA. The control of tissue architecture over nuclear organization is crucial for epithelial cell fate. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 9):1596–1606. doi:10.1242/jcs.03439
- Chang CC, Huang TL, Shimamoto Y, Tsai SY, Hsia KC. Regulation of mitotic spindle assembly factor NuMA by Importin- $\beta$ . *J Cell Biol.* 2017;216(11):3453–3462. doi:10.1083/jcb.201705168
- Chang W, Worman HJ, Gundersen GG. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol.* 2015;208(1):11–22. doi:10.1083/jcb.201409047
- Chapman MA, Zhang J, Banerjee I, et al. Disruption of both nesprin 1 and desmin results in nuclear anchorage defects and fibrosis in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2014;23(22):5879–5892. doi:10.1093/hmg/ddu310
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 2000;346 Pt 3(Pt 3):659–669.
- Chhabra ES, Higgs HN. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1110–1121. doi:10.1038/ncb1007-1110
- Chug H, Trakhanov S, Hülsmann BB, Pleiner T, Görlich D. Crystal structure of the metazoan Nup62•Nup58•Nup54 nucleoporin complex. *Science.* 2015;350(6256):106–110. doi:10.1126/science.aac7420
- Cleveland DW. NuMA: a protein involved in nuclear structure, spindle assembly, and nuclear reformation. *Trends Cell Biol.* 1995;5(2):60–64. doi:10.1016/s0962-8924(00)88947-3
- Cleveland DW, Kirschner MW, Cowan NJ. Isolation of separate mRNAs for alpha- and beta-tubulin and characterization of the corresponding in vitro translation products. *Cell.* 1978;15(3):1021–1031. doi:10.1016/0092-8674(78)90286-6
- Collins MA, Mandigo TR, Camuglia JM, et al. Emery-Dreifuss muscular dystrophy-linked genes and centronuclear myopathy-linked genes regulate myonuclear movement by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell.* 2017;28(17):2303–2317. doi:10.1091/mbc.E16-10-0721
- Compton DA, Luo C. Mutation of the predicted p34cdc2 phosphorylation sites in NuMA impair the assembly of the mitotic spindle and block mitosis. *J Cell Sci.* 1995;108 ( Pt 2):621–633.
- Compton DA, Cleveland DW. NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(3):343–346. doi:10.1016/0955-0674(94)90024-8
- Compton DA, Cleveland DW. NuMA is required for the proper completion of mitosis. *J Cell Biol.* 1993;120(4):947–957. doi:10.1083/jcb.120.4.947

- Compton DA, Szilak I, Cleveland DW. Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol.* 1992;116(6):1395–1408. doi:10.1083/jcb.116.6.1395
- Coombes C, Yamamoto A, McClellan M, et al. Mechanism of microtubule lumen entry for the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase enzyme  $\alpha$ TAT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(46):E7176–E7184. doi:10.1073/pnas.1605397113
- Corthésy-Theulaz I, Pauloin A, Pfeffer SR. Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J Cell Biol.* 1992;118(6):1333–1345. doi:10.1083/jcb.118.6.1333
- Costoya JA. Functional analysis of the role of POK transcriptional repressors. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007;6(1):8–18. doi:10.1093/bfgp/elm002
- Couwenbergs C, Labbé JC, Goulding M, Marty T, Bowerman B, Gotta M. Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *J Cell Biol.* 2007;179(1):15–22. doi:10.1083/jcb.200707085
- Crisp M, Burke B. The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture. *FEBS Lett.* 2008;582(14):2023–2032. doi:10.1016/j.febslet.2008.05.001

## D

- Dahl KN, Kahn SM, Wilson KL, Discher DE. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 20):4779–4786. doi:10.1242/jcs.01357
- Dahl KN, Engler AJ, Pajeroski JD, Discher DE. Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J.* 2005;89(4):2855–2864. doi:10.1529/biophysj.105.062554
- D'Alessandro M, Hnia K, Gache V, et al. Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Dev Cell.* 2015;35(2):186–198. doi:10.1016/j.devcel.2015.09.018
- Davidson PM, Denais C, Bakshi MC, Lammerding J. Nuclear deformability constitutes a rate-limiting step during cell migration in 3-D environments. *Cell Mol Bioeng.* 2014;7(3):293–306. doi:10.1007/s12195-014-0342-y
- Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei--lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends Cell Biol.* 2014;24(4):247–256. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.004
- Dellaire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 2004;26(9):963–977. doi:10.1002/bies.20089
- De Vos WH, Houben F, Kamps M, et al. Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Hum Mol Genet.* 2011;20(21):4175–4186. doi:10.1093/hmg/ddr344
- Denker A, Rizzoli SO. Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci.* 2010;2:135. Published 2010 Oct 5. doi:10.3389/fnsyn.2010.00135
- Dialynas G, Speese S, Budnik V, Geyer PK, Wallrath LL. The role of *Drosophila* Lamin C in muscle function and gene expression. *Development.* 2010;137(18):3067–3077. doi:10.1242/dev.048231
- Dionne MA, Howard L, Compton DA. NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1999;42(3):189–203. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1999)42:3<189::AID-CM3>3.0.CO;2-X
- Dogterom M, Koenderink GH. Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):38–54. doi:10.1038/s41580-018-0067-1

- Doñate Puertas R, Millat G, Ernens I, et al. Atrial Structural Remodeling Gene Variants in Patients with Atrial Fibrillation. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4862480. Published 2018 Sep 10. doi:10.1155/2018/4862480
- Dorner D, Vlcek S, Foeger N, et al. Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol.* 2006;173(1):83–93. doi:10.1083/jcb.200511149
- Doxsey SJ, Stein P, Evans L, Calarco PD, Kirschner M. Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell.* 1994;76(4):639–650. doi:10.1016/0092-8674(94)90504-5
- Driscoll TP, Cosgrove BD, Heo SJ, Shurden ZE, Mauck RL. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys J.* 2015;108(12):2783–2793. doi:10.1016/j.bpj.2015.05.010
- Du Q, Macara IG. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell.* 2004;119(4):503–516. doi:10.1016/j.cell.2004.10.028
- Du Q, Taylor L, Compton DA, Macara IG. LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr Biol.* 2002;12(22):1928–1933. doi:10.1016/s0960-9822(02)01298-8
- Du Q, Stukenberg PT, Macara IG. A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol.* 2001;3(12):1069–1075. doi:10.1038/ncb1201-1069
- Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1027–1059. doi:10.1002/cphy.c140068
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179–183. Published 2011 Jun 8. doi:10.1038/nature10137
- Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell.* 2000;5(1):141–151. doi:10.1016/s1097-2765(00)80410-4

## E

- Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, et al. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell.* 2007;12(6):917–930. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.002
- Egner IM, Bruusgaard JC, Gundersen K. Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development.* 2016;143(16):2898–2906. doi:10.1242/dev.134411
- Eipper BA. Properties of rat brain tubulin. *J Biol Chem.* 1974;249(5):1407–1416.
- Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell.* 2017;171(6):1397–1410.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.10.008
- Endo A, Moyori A, Kobayashi A, Wong RW. Nuclear mitotic apparatus protein, NuMA, modulates p53-mediated transcription in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):e713. Published 2013 Jul 4. doi:10.1038/cddis.2013.239
- Englander LL, Rubin LL. Acetylcholine receptor clustering and nuclear movement in muscle fibers in culture. *J Cell Biol.* 1987;104(1):87–95. doi:10.1083/jcb.104.1.87
- Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol.* 1993;120(3):725–732. doi:10.1083/jcb.120.3.725
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991;66(6):1121–1131. doi:10.1016/0092-8674(91)90035-w

- Espigat-Georger A, Dyachuk V, Chemin C, Emorine L, Merdes A. Nuclear alignment in myotubes requires centrosome proteins recruited by nesprin-1. *J Cell Sci.* 2016;129(22):4227–4237. doi:10.1242/jcs.191767
- Estrada B, Maeland AD, Gisselbrecht SS, Bloor JW, Brown NH, Michelson AM. The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev Biol.* 2007;307(2):328–339. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.045

## F

- Fahrenkrog B, Aeby U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(10):757–766. doi:10.1038/nrm1230
- Falcone S, Roman W, Hnia K, et al. N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1455–1475. doi:10.15252/emmm.201404436
- Fedorchak GR, Kaminski A, Lammerding J. Cellular mechanosensing: getting to the nucleus of it all. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014;115(2-3):76–92. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.009
- Ferhat L, Cook C, Kuriyama R, Baas PW. The nuclear/mitotic apparatus protein NuMA is a component of the somatodendritic microtubule arrays of the neuron. *J Neurocytol.* 1998;27(12):887–899. doi:10.1023/a:1006949006728
- Findeisen P, Mühlhausen S, Dempewolf S, et al. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol.* 2014;6(9):2274–2288. Published 2014 Aug 27. doi:10.1093/gbe/evu187
- Fitts RH. The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(2):551–558. doi:10.1152/jappphysiol.01200.2007
- Fleming ES, Temchin M, Wu Q, Maggio-Price L, Tirnauer JS. Spindle misorientation in tumors from APC(min/+) mice. *Mol Carcinog.* 2009;48(7):592–598. doi:10.1002/mc.20506
- Flory MR, Davis TN. The centrosomal proteins pericentrin and kendrin are encoded by alternatively spliced products of one gene. *Genomics.* 2003;82(3):401–405. doi:10.1016/s0888-7543(03)00119-8
- Folker ES, Schulman VK, Baylies MK. Translocating myonuclei have distinct leading and lagging edges that require kinesin and dynein. *Development.* 2014;141(2):355–366. doi:10.1242/dev.095612
- Folker ES, Schulman VK, Baylies MK. Muscle length and myonuclear position are independently regulated by distinct Dynein pathways. *Development.* 2012;139(20):3827–3837. doi:10.1242/dev.079178
- Franzini-Armstrong C. Functional implications of RyR-DHPR relationships in skeletal and cardiac muscles. *Biol Res.* 2004;37(4):507–512. doi:10.4067/s0716-97602004000400003
- Fridolfsson HN, Ly N, Meyerzon M, Starr DA. UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Dev Biol.* 2010;338(2):237–250. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.004

# G

- Gache V, Gomes ER, Cadot B. Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation. *Mol Biol Cell*. 2017;28(7):865–874. doi:10.1091/mbc.E16-06-0405
- Gache V, Waridel P, Luche S, Shevchenko A, Popov AV. Purification and mass spectrometry identification of microtubule-binding proteins from *Xenopus* egg extracts. *Methods Mol Med*. 2007;137:29–43. doi:10.1007/978-1-59745-442-1\_3
- Gaglio T, Saredi A, Compton DA. NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J Cell Biol*. 1995;131(3):693–708. doi:10.1083/jcb.131.3.693
- Galli M, Muñoz J, Portegijs V, et al. aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1132–1138. Published 2011 Aug 21. doi:10.1038/ncb2315
- Gallini S, Carminati M, De Mattia F, et al. NuMA Phosphorylation by Aurora-A Orchestrates Spindle Orientation. *Curr Biol*. 2016;26(4):458–469. doi:10.1016/j.cub.2015.12.051
- Garvalov BK, Zuber B, Bouchet-Marquis C, et al. Luminal particles within cellular microtubules. *J Cell Biol*. 2006;174(6):759–765. doi:10.1083/jcb.200606074
- Gehmlich K, Haren L, Merdes A. Cyclin B degradation leads to NuMA release from dynein/dynactin and from spindle poles. *EMBO Rep*. 2004;5(1):97–103. doi:10.1038/sj.embor.7400046
- Gerace L, Comeau C, Benson M. Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J Cell Sci Suppl*. 1984;1:137–160. doi:10.1242/jcs.1984.supplement\_1.10
- Gerace L, Blobel G. Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1982;46 Pt 2:967–978. doi:10.1101/sqb.1982.046.01.090
- Gerace L, Blum A, Blobel G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol*. 1978;79(2 Pt 1):546–566. doi:10.1083/jcb.79.2.546
- Gimpel P, Lee YL, Sobota RM, et al. Nesprin-1 $\alpha$ -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Curr Biol*. 2017;27(19):2999–3009.e9. doi:10.1016/j.cub.2017.08.031
- Ghasemizadeh, A., Christin, E., Guiraud, A., Couturier, N., Risson, V., Girard, E., Jagla, C., Soler, C., Laddada, L., Sanchez, C., Jaque, F., Garcia, A., Lanfranchi, M., Jacquemond, V., Gondin, J., Courchet, J., Schaeffer, L., Gache, V., 2019. Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities. preprint - bioRxiv. doi:10.1101/636464
- Godin JD, Humbert S. Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(6):852–856. doi:10.1016/j.biocel.2011.03.009
- Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(10):713–726. doi:10.1038/nrm2026
- González-Granado JM, Silvestre-Roig C, Rocha-Perugini V, et al. Nuclear envelope lamin-A couples actin dynamics with immunological synapse architecture and T cell activation. *Sci Signal*. 2014;7(322):ra37. Published 2014 Apr 22. doi:10.1126/scisignal.2004872
- Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(6):a022608. Published 2018 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect.a022608
- Gould RR, Borisy GG. The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol*. 1977;73(3):601–615. doi:10.1083/jcb.73.3.601
- Grady RM, Starr DA, Ackerman GL, Sanes JR, Han M. Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(12):4359–4364. doi:10.1073/pnas.0500711102
- Gribbon C, Dahm R, Prescott AR, Quinlan RA. Association of the nuclear matrix component NuMA with the Cajal body and nuclear speckle compartments during transitions in transcriptional

- activity in lens cell differentiation. *Eur J Cell Biol.* 2002;81(10):557–566. doi:10.1078/0171-9335-00275
- Grifone R, Demignon J, Houbbron C, et al. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development.* 2005;132(9):2235–2249. doi:10.1242/dev.01773
- Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M. Cleavage of the nuclear matrix protein NuMA during apoptosis. *Exp Cell Res.* 1997;233(1):21–24. doi:10.1006/excr.1997.3557
- Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M. NuMA: a bipartite nuclear location signal and other functional properties of the tail domain. *Exp Cell Res.* 1996;225(1):207–218. doi:10.1006/excr.1996.0171
- Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, et al. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):376–381. doi:10.1038/ncb2927
- Gull K. Protist tubulins: new arrivals, evolutionary relationships and insights to cytoskeletal function. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(4):427–432. doi:10.1016/s1369-5274(00)00230-7
- Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC. Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol.* 1989;109(5):2275–2288. doi:10.1083/jcb.109.5.2275
- Gundersen GG, Worman HJ. Nuclear positioning. *Cell.* 2013;152(6):1376–1389. doi:10.1016/j.cell.2013.02.031
- Gundersen K. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *J Exp Biol.* 2016;219(Pt 2):235–242. doi:10.1242/jeb.124495
- Gundersen K, Bruusgaard JC. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost?. *J Physiol.* 2008;586(11):2675–2681. doi:10.1113/jphysiol.2008.154369
- Gupta KK, Alberico EO, Näthke IS, Goodson HV. Promoting microtubule assembly: A hypothesis for the functional significance of the +TIP network. *Bioessays.* 2014;36(9):818–826. doi:10.1002/bies.201400029
- Gupta KK, Li C, Duan A, et al. Mechanism for the catastrophe-promoting activity of the microtubule destabilizer Op18/stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(51):20449–20454. doi:10.1073/pnas.1309958110

## H

- Hack AA, Cordier L, Shoturma DI, Lam MY, Sweeney HL, McNally EM. Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(19):10723–10728. doi:10.1073/pnas.96.19.10723
- Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.* 1993;72 Suppl:99–121. doi:10.1016/s0092-8674(05)80031-5
- Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* 1977;73(2):147–150. doi:10.1016/0014-5793(77)80968-x
- Harada T, Swift J, Irianto J, et al. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J Cell Biol.* 2014;204(5):669–682. doi:10.1083/jcb.201308029
- Harborth J, Wang J, Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M. Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J.* 1999;18(6):1689–1700. doi:10.1093/emboj/18.6.1689
- Haren L, Merdes A. Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 9):1815–1824.



- Harr JC, Luperchio TR, Wong X, Cohen E, Wheelan SJ, Reddy KL. Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J Cell Biol.* 2015;208(1):33–52. doi:10.1083/jcb.201405110
- Hatch EM, Hetzer MW. Nuclear envelope rupture is induced by actin-based nucleus confinement. *J Cell Biol.* 2016;215(1):27–36. doi:10.1083/jcb.201603053
- Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, Ross JL. Mechanics of microtubules [published correction appears in *J Biomech.* 2011 Jun 3;44(9):1829–30]. *J Biomech.* 2010;43(1):23–30. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.005
- Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci.* 2000;113 ( Pt 12):2299–2308.
- Ho CY, Jaalouk DE, Vartiainen MK, Lammerding J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature.* 2013;497(7450):507–511. doi:10.1038/nature12105
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 1987;51(6):919–928. doi:10.1016/0092-8674(87)90579
- Howald H. Transformations morphologiques et fonctionnelles des fibres musculaires, provoquées par l'entraînement [Morphologic and functional transformation of muscle fibers induced by training]. *Rev Med Suisse Romande.* 1984;104(10):757–769.
- Howes SC, Alushin GM, Shida T, Nachury MV, Nogales E. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell.* 2014;25(2):257–266. doi:10.1091/mbc.E13-07-0387
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002;417(6887):455–458. doi:10.1038/417455a
- Huber F, Boire A, López MP, Koenderink GH. Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:39–47. doi:10.1016/j.ceb.2014.10.005
- Hueschen CL, Galstyan V, Amouzgar M, Phillips R, Dumont S. Microtubule End-Clustering Maintains a Steady-State Spindle Shape. *Curr Biol.* 2019;29(4):700–708.e5. doi:10.1016/j.cub.2019.01.016
- Hueschen CL, Kenny SJ, Xu K, Dumont S. NuMA recruits dynein activity to microtubule minus-ends at mitosis. *Elife.* 2017;6:e29328. Published 2017 Nov 29. doi:10.7554/eLife.29328
- Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve.* 2006;33(4):445–461. doi:10.1002/mus.20440
- Huxley HE, Kress M. Crossbridge behaviour during muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil.* 1985;6(2):153–161. doi:10.1007/bf00713057
- Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science.* 1969;164(3886):1356–1365. doi:10.1126/science.164.3886.1356
- Huxley HE. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957;3(5):631–648. doi:10.1083/jcb.3.5.631
- Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* 1954;173(4412):973–976. doi:10.1038/173973a0
- Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature.* 1954;173(4412):971–973. doi:10.1038/173971a0
- Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell.* 1992;3(10):1155–1167. doi:10.1091/mbc.3.10.1155

# I

- Ihalainen TO, Aires L, Herzog FA, Schwartlander R, Moeller J, Vogel V. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat Mater*. 2015;14(12):1252–1261. doi:10.1038/nmat4389
- Ikegami S, Harada A, Hirokawa N. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett*. 2000;279(3):129–132. doi:10.1016/s0304-3940(99)00964-7
- Infante C, Ramos-Morales F, Fedriani C, Bornens M, Rios RM. GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein [published correction appears in *J Cell Biol* 2002 Aug 5;158(3):593]. *J Cell Biol*. 1999;145(1):83–98. doi:10.1083/jcb.145.1.83
- Ivorra C, Kubicek M, González JM, et al. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C [published correction appears in *Genes Dev*. 2006 Mar 15;20(6):747]. *Genes Dev*. 2006;20(3):307–320. doi:10.1101/gad.349506
- Izumi Y, Ohta N, Hisata K, Raabe T, Matsuzaki F. Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol*. 2006;8(6):586–593. doi:10.1038/ncb1409

# J

- Jahed Z, Soheilypour M, Peyro M, Mofrad MR. The LINC and NPC relationship - it's complicated!. *J Cell Sci*. 2016;129(17):3219–3229. doi:10.1242/jcs.184184
- Janin A, Gache V. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles. *Front Physiol*. 2018;9:1277. Published 2018 Sep 7. doi:10.3389/fphys.2018.01277
- Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions [published online ahead of print, 2020 Feb 27]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;10.1038/s41580-020-0214-3. doi:10.1038/s41580-020-0214-3
- Jayaraman S, Chittiboyina S, Bai Y, et al. The nuclear mitotic apparatus protein NuMA controls rDNA transcription and mediates the nucleolar stress response in a p53-independent manner. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(20):11725–11742. doi:10.1093/nar/gkx782
- Jevsek M, Jaworski A, Polo-Parada L, et al. CD24 is expressed by myofiber synaptic nuclei and regulates synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6374–6379. doi:10.1073/pnas.0601468103
- Jiang C, Wen Y, Kuroda K, Hannon K, Rudnicki MA, Kuang S. Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2014;7(8):997–1004. doi:10.1242/dmm.015917
- Jin M, Pomp O, Shinoda T, et al. Katanin p80, NuMA and cytoplasmic dynein cooperate to control microtubule dynamics. *Sci Rep*. 2017;7:39902. Published 2017 Jan 12. doi:10.1038/srep39902
- Jørgensen SB, Viollet B, Andreelli F, et al. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2004;279(2):1070–1079. doi:10.1074/jbc.M306205200
- Jovanovic-Talisman T, Zilman A. Protein Transport by the Nuclear Pore Complex: Simple Biophysics of a Complex Biomachine. *Biophys J*. 2017;113(1):6–14. doi:10.1016/j.bpj.2017.05.024

- Jungbluth H, Treves S, Zorzato F, et al. Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(3):151–167. doi:10.1038/nrneurol.2017.191
- Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:26. Published 2008 Sep 25. doi:10.1186/1750-1172-3-26

## K

- Kaisto T, Metsikkö K. Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp Cell Res.* 2003;289(1):47–57. doi:10.1016/s0014-4827(03)00231-3
- Kallajoki M, Weber K, Osborn M. A 210 kDa nuclear matrix protein is a functional part of the mitotic spindle; a microinjection study using SPN monoclonal antibodies. *EMBO J.* 1991;10(11):3351–3362.
- Keeling MC, Flores LR, Dodhy AH, Murray ER, Gavara N. Actomyosin and vimentin cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization. *Sci Rep.* 2017;7(1):5219. Published 2017 Jul 12. doi:10.1038/s41598-017-05467-x
- Kelly KF, Daniel JM. POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* 2006;16(11):578–587. doi:10.1016/j.tcb.2006.09.003
- Kempf T, Bischoff FR, Kalies I, Ponstingl H. Isolation of human NuMA protein. *FEBS Lett.* 1994;354(3):307–310. doi:10.1016/0014-5793(94)01151-6
- Kerr JP, Robison P, Shi G, et al. Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nat Commun.* 2015;6:8526. Published 2015 Oct 8. doi:10.1038/ncomms9526
- Khairallah RJ, Shi G, Sbrana F, et al. Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal.* 2012;5(236):ra56. Published 2012 Aug 7. doi:10.1126/scisignal.2002829
- Khatau SB, Bloom RJ, Bajpai S, et al. The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration. *Sci Rep.* 2012;2:488. doi:10.1038/srep00488
- Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, et al. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(45):19017–19022. doi:10.1073/pnas.0908686106
- Kim MK, Jeon BN, Koh DI, et al. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A gene (CDKN1A) by the repressor BOZF1 through inhibition of p53 acetylation and transcription factor Sp1 binding. *J Biol Chem.* 2013;288(10):7053–7064. doi:10.1074/jbc.M112.416297
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell.* 2008;135(2):334–342. doi:10.1016/j.cell.2008.10.002
- Kirby TJ, Lammerding J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat Cell Biol.* 2018;20(4):373–381. doi:10.1038/s41556-018-0038-
- Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell.* 1986;45(3):329–342. doi:10.1016/0092-8674(86)90318-1
- Kirschner MW. Microtubule assembly and nucleation. *Int Rev Cytol.* 1978;54:1–71. doi:10.1016/s0074-7696(08)60164-3
- Kiyomitsu T, Cheeseman IM. Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase [published correction appears in *Cell.* 2013 Sep 12;154(6):1401]. *Cell.* 2013;154(2):391–402. doi:10.1016/j.cell.2013.06.010
- Kiyomitsu T, Cheeseman IM. Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat Cell Biol.* 2012;14(3):311–317. Published 2012 Feb 12. doi:10.1038/ncb2440

- Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):849–860. doi:10.1038/nrm3010
- Kodama A, Karakesisoglou I, Wong E, Vaezi A, Fuchs E. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* 2003;115(3):343–354. doi:10.1016/s0092-8674(03)00813-4
- Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(11):709–721. Published 2011 Oct 12. doi:10.1038/nrm3209
- Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, et al. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol.* 2008;181(4):667–681. doi:10.1083/jcb.200711058
- Kotak S, Busso C, Gönczy P. NuMA interacts with phosphoinositides and links the mitotic spindle with the plasma membrane. *EMBO J.* 2014;33(16):1815–1830. doi:10.15252/embj.201488147
- Kotak S, Busso C, Gönczy P. NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function. *EMBO J.* 2013;32(18):2517–2529. doi:10.1038/emboj.2013.172
- Kotak S, Gönczy P. Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25(6):741–748. doi:10.1016/j.ceb.2013.07.008
- Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2008;2(1):22–31. doi:10.1016/j.stem.2007.12.012
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007;129(5):999–1010. doi:10.1016/j.cell.2007.03.044
- Kubben N, Voncken JW, Konings G, et al. Post-natal myogenic and adipogenic developmental defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus.* 2011;2(3):195–207. doi:10.4161/nucl.2.3.15731
- Kudryashova E, Kramerova I, Spencer MJ. Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1764–1776. doi:10.1172/JCI59581
- Kuznetsov AV, Javadov S, Guzun R, Grimm M, Saks V. Cytoskeleton and regulation of mitochondrial function: the role of beta-tubulin II. *Front Physiol.* 2013;4:82. Published 2013 Apr 22. doi:10.3389/fphys.2013.00082

## L

- Lammerding J. Mechanics of the nucleus. *Compr Physiol.* 2011;1(2):783–807. doi:10.1002/cphy.c100038
- Lammerding J, Fong LG, Ji JY, et al. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25768–25780. doi:10.1074/jbc.M513511200
- Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, et al. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest.* 2004;113(3):370–378. doi:10.1172/JCI19670
- Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):605–612. doi:10.1038/nrm1172
- Lander ES. Splitting schizophrenia. *Nature.* 1988;336(6195):105–106. doi:10.1038/336105a0
- Lander AD, Kimble J, Clevers H, et al. What does the concept of the stem cell niche really mean today?. *BMC Biol.* 2012;10:19. Published 2012 Mar 9. doi:10.1186/1741-7007-10-19
- Le HQ, Ghatak S, Yeung CY, et al. Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat Cell Biol.* 2016;18(8):864–875. doi:10.1038/ncb3387
- Lecuit T, Lenne PF. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(8):633–644. doi:10.1038/nrm2222

- Lee JS, Hale CM, Panorchan P, et al. Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophys J*. 2007;93(7):2542–2552. doi:10.1529/biophysj.106.102426
- Lee M, Paik SK, Lee MJ, et al. Drosophila Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development. *Dev Biol*. 2009;330(2):250–262. doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.019
- Lee S, Kolodziej PA. Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension. *Development*. 2002;129(5):1195–1204.
- Lei K, Zhang X, Ding X, et al. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10207–10212. doi:10.1073/pnas.0812037106
- Leikina E, Defour A, Melikov K, et al. Annexin A1 Deficiency does not Affect Myofiber Repair but Delays Regeneration of Injured Muscles. *Sci Rep*. 2015;5:18246. Published 2015 Dec 15. doi:10.1038/srep18246
- Leikina E, Gamage DG, Prasad V, et al. Myomaker and Myomerger Work Independently to Control Distinct Steps of Membrane Remodeling during Myoblast Fusion. *Dev Cell*. 2018;46(6):767–780.e7. doi:10.1016/j.devcel.2018.08.006
- Lelièvre SA, Weaver VM, Nickerson JA, et al. Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14711–14716. doi:10.1073/pnas.95.25.14711
- Lepper C, Fan CM. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. 2010;48(7):424–436. doi:10.1002/dvg.20630
- Lewis SA, Gu W, Cowan NJ. Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell*. 1987;49(4):539–548. doi:10.1016/0092-8674(87)90456-9
- Lexell J, Downham D, Sjöström M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. *J Neurol Sci*. 1986;72(2-3):211–222. doi:10.1016/0022-510x(86)90009-2
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry*. 1985;24(2):473–478. doi:10.1021/bi00323a034
- Li L, Xiong WC, Mei L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:159–188. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034255
- Li F, Hu Y, Qi S, Luo X, Yu H. Structural basis of tubulin detyrosination by vasohibins. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(7):583–591. doi:10.1038/s41594-019-0242-x
- Liao S, Rajendraprasad G, Wang N, et al. Molecular basis of vasohibins-mediated detyrosination and its impact on spindle function and mitosis [published correction appears in Cell Res. 2019 Sep;29(9):778]. *Cell Res*. 2019;29(7):533–547. doi:10.1038/s41422-019-0187-y
- Lieber RL, 2002. Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity (ed. Lippincott Williams & Wilkins)
- Lin HH, Hsu HL, Yeh NH. Apoptotic cleavage of NuMA at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification. *J Biomed Sci*. 2007;14(5):681–694. doi:10.1007/s11373-007-9165-3
- Liu Q, Pante N, Misteli T, et al. Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J Cell Biol*. 2007;178(5):785–798. doi:10.1083/jcb.200704108
- Liu W, Ralston E. A new directionality tool for assessing microtubule pattern alterations. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2014;71(4):230–240. doi:10.1002/cm.21166
- Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission

between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26743–26753. doi:10.1074/jbc.M111.233700

- Luduenã RF, Banerjee A. 2008. The isotypes of tubulin: distribution and functional significance. In *Cancer Drug Discovery and Development: The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology* (ed. A. T. Fojo), pp. 123-175. Totowa, NJ: Humana Press.
- Lydersen BK, Pettijohn DE. Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus: distribution in a human/hamster hybrid cell. *Cell*. 1980;22(2 Pt 2):489–499. doi:10.1016/0092-8674(80)90359-1

## M

- Maartens AP, Brown NH. The many faces of cell adhesion during *Drosophila* muscle development. *Dev Biol*. 2015;401(1):62–74. doi:10.1016/j.ydbio.2014.12.038
- Maekawa T, Leslie R, Kuriyama R. Identification of a minus end-specific microtubule-associated protein located at the mitotic poles in cultured mammalian cells. *Eur J Cell Biol*. 1991;54(2):255–267.
- Magid A, Law DJ. Myofibrils bear most of the resting tension in frog skeletal muscle. *Science*. 1985;230(4731):1280–1282. doi:10.1126/science.4071053
- Makhija E, Jokhun DS, Shivashankar GV. Nuclear deformability and telomere dynamics are regulated by cell geometric constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(1):E32–E40. doi:10.1073/pnas.1513189113
- Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(3):849–854. doi:10.1073/pnas.94.3.849
- Maraldi NM, Lattanzi G, Sabatelli P, Ognibene A, Squarzoni S. Functional domains of the nucleus: implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002;12(9):815–823. doi:10.1016/s0960-8966(02)00067-6
- Martin SG. Role and organization of the actin cytoskeleton during cell-cell fusion. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;60:121–126. doi:10.1016/j.semcdb.2016.07.025
- Matsumura S, Hamasaki M, Yamamoto T, et al. ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. *Nat Commun*. 2012;3:626. Published 2012 Jan 17. doi:10.1038/ncomms1634
- Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 3):508–518. doi:10.1242/jcs.02760
- McIntosh JR. Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9):a023218. Published 2016 Sep 1. doi:10.1101/cshperspect.a023218
- Meissner G, Lu X. Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor interactions in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biosci Rep*. 1995;15(5):399–408. doi:10.1007/bf01788371
- Melcon G, Kozlov S, Cutler DA, et al. Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*. 2006;15(4):637–651. doi:10.1093/hmg/ddi479
- Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet*. 2019;394(10213):2025–2038. doi:10.1016/S0140-6736(19)32910-1
- Merdes A, Heald R, Samejima K, Earnshaw WC, Cleveland DW. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol*. 2000;149(4):851–862. doi:10.1083/jcb.149.4.851

- Merdes A, Cleveland DW. The role of NuMA in the interphase nucleus. *J Cell Sci.* 1998;111 ( Pt 1):71–79.
- Merdes A, Cleveland DW. Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol.* 1997;138(5):953–956. doi:10.1083/jcb.138.5.953
- Merdes A, Ramyar K, Vechio JD, Cleveland DW. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell.* 1996;87(3):447–458. doi:10.1016/s0092-8674(00)81365-3
- Metzger T, Gache V, Xu M, et al. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature.* 2012;484(7392):120–124. Published 2012 Mar 18. doi:10.1038/nature10914
- Mihailovska E, Raith M, Valencia RG, et al. Neuromuscular synapse integrity requires linkage of acetylcholine receptors to postsynaptic intermediate filament networks via rapsyn-plectin 1f complexes. *Mol Biol Cell.* 2014;25(25):4130–4149. doi:10.1091/mbc.E14-06-1174
- Millay DP, O'Rourke JR, Sutherland LB, et al. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature.* 2013;499(7458):301–305. doi:10.1038/nature12343
- Mogessie B, Roth D, Rahil Z, Straube A. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife.* 2015;4:e05697. Published 2015 Apr 21. doi:10.7554/eLife.05697
- Mogilner A, Wollman R, Civelekoglu-Scholey G, Scholey J. Modeling mitosis. *Trends Cell Biol.* 2006;16(2):88–96. doi:10.1016/j.tcb.2005.12.007
- Moreno NS, Liu J, Haas KM, et al. The nuclear structural protein NuMA is a negative regulator of 53BP1 in DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(19):10475. doi:10.1093/nar/gkz802
- Moritz M, Zheng Y, Alberts BM, Oegema K. Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J Cell Biol.* 1998;142(3):775–786. doi:10.1083/jcb.142.3.775
- Moss FP. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. *Am J Anat.* 1968;122(3):555–563. doi:10.1002/aja.1001220308
- Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2020;12(1):e1462. doi:10.1002/wsbm.1462

## N

- Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bönnemann CG. Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012;12(2):165–174. doi:10.1007/s11910-012-0255-x
- Nguyen-Ngoc T, Afshar K, Gönczy P. Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2007;9(11):1294–1302. doi:10.1038/ncb1649
- Nickerson JA, Krockmalnic G, Wan KM, Penman S. The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4446–4450. doi:10.1073/pnas.94.9.4446
- Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, et al. Vasohibins encode tubulin dephosphorylating activity. *Science.* 2017;358(6369):1453–1456. doi:10.1126/science.aao5676
- Nipper RW, Siller KH, Smith NR, Doe CQ, Prehoda KE. Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(36):14306–14311. doi:10.1073/pnas.0701812104

North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 2003;11(2):437–444. doi:10.1016/s1097-2765(03)00038-8

## O

Oddoux S, Randazzo D, Kenea A, Alonso B, Zaal KJM, Ralston E. Misplaced Golgi Elements Produce Randomly Oriented Microtubules and Aberrant Cortical Arrays of Microtubules in Dystrophic Skeletal Muscle Fibers. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:176. Published 2019 Sep 18. doi:10.3389/fcell.2019.00176

Oddoux S, Zaal KJ, Tate V, et al. Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J Cell Biol*. 2013;203(2):205–213. doi:10.1083/jcb.201304063

Ohata H, Miyazaki M, Otomo R, et al. NuMA is required for the selective induction of p53 target genes. *Mol Cell Biol*. 2013;33(12):2447–2457. doi:10.1128/MCB.01221-12

Okumura M, Natsume T, Kanemaki MT, Kiyomitsu T. Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *Elife*. 2018;7:e36559. Published 2018 May 31. doi:10.7554/eLife.36559

Osmanagic-Myers S, Dechat T, Foisner R. Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes Dev*. 2015;29(3):225–237. doi:10.1101/gad.255968.114

Ozawa R, Hayashi YK, Ogawa M, et al. Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol*. 2006;168(3):907–917. doi:10.2353/ajpath.2006.050564

## P

Pancaroglu R, Van Petegem F. Calcium Channelopathies: Structural Insights into Disorders of the Muscle Excitation-Contraction Complex. *Annu Rev Genet*. 2018;52:373–396. doi:10.1146/annurev-genet-120417-031311

Paturle L, Wehland J, Margolis RL, Job D. Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry*. 1989;28(6):2698–2704. doi:10.1021/bi00432a050

Paul, D.M., Mantell, J., Borucu, U., Coombs, J., Surrige, K.J., Squire, J., Verkade, P., Dodding, M.P., 2019. In situ cryo-electron tomography reveals filamentous actin within the microtubule lumen. preprint - bioRxiv. doi:10.1101/844043

Pavlath GK, Rich K, Webster SG, Blau HM. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature*. 1989;337(6207):570–573. doi:10.1038/337570a0

Pease JC, Tirnauer JS. Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 7):1007–1016. doi:10.1242/jcs.081406

Percival JM, Froehner SC. Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies?. *Traffic*. 2007;8(3):184–194. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00523.x

Percival JM, Gregorevic P, Odom GL, Banks GB, Chamberlain JS, Froehner SC. rAAV6-microdystrophin rescues aberrant Golgi complex organization in mdx skeletal muscles. *Traffic*. 2007;8(10):1424–1439. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00622.x



- Peris L, Wagenbach M, Lafanechère L, et al. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1159–1166. doi:10.1083/jcb.200902142
- Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):500–509. doi:10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7
- Pirovano L, Culurgioni S, Carminati M, et al. Hexameric NuMA:LGN structures promote multivalent interactions required for planar epithelial divisions. *Nat Commun.* 2019;10(1):2208. Published 2019 May 17. doi:10.1038/s41467-019-09999-w
- Pollard TD, Goldman RD. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(7):a030288. Published 2018 Jul 2. doi:10.1101/cshperspect.a030288
- Price HM. The skeletal muscle fiber in the light of electron microscope studies. A review. *Am J Med.* 1963;35:589–605. doi:10.1016/0002-9343(63)90131-1
- Prins KW, Humston JL, Mehta A, Tate V, Ralston E, Ervasti JM. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol.* 2009;186(3):363–369. doi:10.1083/jcb.200905048
- Prosser SL, Pelletier L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(3):187–201. doi:10.1038/nrm.2016.162
- Prota AE, Magiera MM, Kuijpers M, et al. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol.* 2013;200(3):259–270. doi:10.1083/jcb.201211017
- Przewoźniak M, Czaplicka I, Czerwińska AM, et al. Adhesion proteins--an impact on skeletal myoblast differentiation. *PLoS One.* 2013;8(5):e61760. Published 2013 May 6. doi:10.1371/journal.pone.0061760
- Puckelwartz M, McNally EM. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Handb Clin Neurol.* 2011;101:155–166. doi:10.1016/B978-0-08-045031-5.00012-8
- Puckelwartz MJ, Kessler E, Zhang Y, et al. Disruption of nesprin-1 produces an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet.* 2009;18(4):607–620. doi:10.1093/hmg/ddn386

## Q

- Qaisar R, Larsson L. What determines myonuclear domain size?. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2014;58(1):1–12.

## R

- Radulescu AE, Cleveland DW. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 2010;20(4):214–222. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.003
- Raff EC, Hoyle HD, Popodi EM, Turner FR. Axoneme beta-tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms. *Curr Biol.* 2008;18(12):911–914. doi:10.1016/j.cub.2008.05.031
- Rahkila P, Väänänen K, Saraste J, Metsikkö K. Endoplasmic reticulum to Golgi trafficking in multinucleated skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* 1997;234(2):452–464. doi:10.1006/excr.1997.3633
- Rajgor D, Shanahan CM. Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:e5. Published 2013 Jul 5. doi:10.1017/erm.2013.6
- Ralston E. Changes in architecture of the Golgi complex and other subcellular organelles during myogenesis. *J Cell Biol.* 1993;120(2):399–409. doi:10.1083/jcb.120.2.399

- Ralston E, Lu Z, Ploug T. The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci*. 1999;19(24):10694–10705. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-24-10694.1999
- Ralston E, Ploug T, Kalhovde J, Lomo T. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J Neurosci*. 2001;21(3):875–883. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-03-00875.2001
- Ramdas NM, Shivashankar GV. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization. *J Mol Biol*. 2015;427(3):695–706. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.008
- Ramkumar A, Jong BY, Ori-McKenney KM. ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Dev Dyn*. 2018;247(1):138–155. doi:10.1002/dvdy.24599
- Randazzo D, Khalique U, Belanto JJ, et al. Persistent upregulation of the  $\beta$ -tubulin tubb6, linked to muscle regeneration, is a source of microtubule disorganization in dystrophic muscle [published correction appears in *Hum Mol Genet*. 2019 Jun 1;28(11):1930]. *Hum Mol Genet*. 2019;28(7):1117–1135. doi:10.1093/hmg/ddy418
- Rappaport L, Oliviero P, Samuel JL. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol Cell Biochem*. 1998;184(1-2):101–105.
- Razafsky D, Hodzic D. Nuclear envelope: positioning nuclei and organizing synapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;34:84–93. doi:10.1016/j.ceb.2015.06.001
- Rebeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners?. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48:28–38. doi:10.1016/j.biocel.2013.12.001
- Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, et al. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*. 1994;266(5191):1688–1691. doi:10.1126/science.7992051
- Redwood AB, Perkins SM, Vanderwaal RP, et al. A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*. 2011;10(15):2549–2560. doi:10.4161/cc.10.15.16531
- Reidy MA, Bowyer DE. Scanning electron microscopy of arteries. The morphology of aortic endothelium in haemodynamically stressed areas associated with branches. *Atherosclerosis*. 1977;26(2):181–194. doi:10.1016/0021-9150(77)90101-0
- Renthal R, Schneider BG, Miller MM, Ludueña RF. Beta IV is the major beta-tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1993;25(1):19–29. doi:10.1002/cm.970250104
- Rizzoli SO, Betz WJ. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(1):57–69. doi:10.1038/nrn1583
- Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, et al. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science*. 2016;352(6284):aaf0659. doi:10.1126/science.aaf0659
- Robson SJ, Burgoyne RD. Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated alpha-tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1989;12(4):273–282. doi:10.1002/cm.970120408
- Rodríguez Cruz PM, Sewry C, Beeson D, et al. Congenital myopathies with secondary neuromuscular transmission defects; a case report and review of the literature. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(12):1103–1110. doi:10.1016/j.nmd.2014.07.005
- Roll-Mecak A. Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions?. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;37:11–19. doi:10.1016/j.semedb.2014.09.026
- Roll-Mecak A, McNally FJ. Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(1):96–103. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.001
- Roman W, Gomes ER. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;82:51–56. doi:10.1016/j.semedb.2017.11.005

- Roman W, Martins JP, Carvalho FA, et al. Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2017;19(10):1189–1201. doi:10.1038/ncb3605
- Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(4):223–228. doi:10.1016/j.nmd.2010.01.014
- Romero NB, Bitoun M. Centronuclear myopathies. *Semin Pediatr Neurol.* 2011;18(4):250–256. doi:10.1016/j.spn.2011.10.006
- Rossi SG, Vazquez AE, Rotundo RL. Local control of acetylcholinesterase gene expression in multinucleated skeletal muscle fibers: individual nuclei respond to signals from the overlying plasma membrane. *J Neurosci.* 2000;20(3):919–928. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-03-00919.2000
- Roux KJ, Crisp ML, Liu Q, et al. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2194–2199. doi:10.1073/pnas.0808602106

## S

- Sampath SC, Sampath SC, Millay DP. Myoblast fusion confusion: the resolution begins. *Skelet Muscle.* 2018;8(1):3. Published 2018 Jan 31. doi:10.1186/s13395-017-0149-3
- Sanchez-Soriano N, Travis M, Dajas-Bailador F, Gonçalves-Pimentel C, Whitmarsh AJ, Prokop A. Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 14):2534–2542. doi:10.1242/jcs.046268
- Saredi A, Howard L, Compton DA. Phosphorylation regulates the assembly of NuMA in a mammalian mitotic extract. *J Cell Sci.* 1997;110 ( Pt 11):1287–1297.
- Saredi A, Howard L, Compton DA. NuMA assembles into an extensive filamentous structure when expressed in the cell cytoplasm. *J Cell Sci.* 1996;109 ( Pt 3):619–630.
- Sbalzarini IF, Koumoutsakos P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J Struct Biol.* 2005;151(2):182–195. doi:10.1016/j.jsb.2005.06.002
- Schaedel L, Triclin S, Chrétien D, et al. Lattice defects induce microtubule self-renewal. *Nat Phys.* 2019;15(8):830–838. doi:10.1038/s41567-019-0542-4
- Schaffer BE, Levin RS, Hertz NT, et al. Identification of AMPK Phosphorylation Sites Reveals a Network of Proteins Involved in Cell Invasion and Facilitates Large-Scale Substrate Prediction. *Cell Metab.* 2015;22(5):907–921. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.009
- Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet Muscle.* 2011;1(1):28. Published 2011 Aug 17. doi:10.1186/2044-5040-1-28
- Schiaffino S. Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J.* 2018;285(20):3688–3694. doi:10.1111/febs.14502
- Schirmer EC, Foisner R. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2167–2179. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.012
- Schmidt MHH, Chen B, Randazzo LM, Bogler O. SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 14):2845–2855. doi:10.1242/jcs.00522
- Schnackenberg BJ, Khodjakov A, Rieder CL, Palazzo RE. The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9295–9300. doi:10.1073/pnas.95.16.9295

- Schroeder B, Weller SG, Chen J, Billadeau D, McNiven MA. A Dyn2-CIN85 complex mediates degradative traffic of the EGFR by regulation of late endosomal budding. *EMBO J*. 2010;29(18):3039–3053. doi:10.1038/emboj.2010.190
- Schultheiss T, Lin ZX, Ishikawa H, Zamir I, Stoeckert CJ, Holtzer H. Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J Cell Biol*. 1991;114(5):953–966. doi:10.1083/jcb.114.5.953
- Schwartz LM, Brown C, McLaughlin K, Smith W, Bigelow C. The myonuclear domain is not maintained in skeletal muscle during either atrophy or programmed cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;311(4):C607–C615. doi:10.1152/ajpcell.00176.2016
- Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE Jr, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*. 2001;11(8):579–586. doi:10.1016/s0960-9822(01)00153-1
- Seale P, Sabourin LA, Gargis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000;102(6):777–786. doi:10.1016/s0092-8674(00)00066-0
- Sébastien M, Giannesini B, Aubin P, et al. Deletion of the microtubule-associated protein 6 (MAP6) results in skeletal muscle dysfunction. *Skelet Muscle*. 2018;8(1):30. Published 2018 Sep 19. doi:10.1186/s13395-018-0176-8
- Sebastián D, Sorianello E, Segalés J, et al. Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J*. 2016;35(15):1677–1693. doi:10.15252/embj.201593084
- Seldin L, Muroyama A, Lechler T. NuMA-microtubule interactions are critical for spindle orientation and the morphogenesis of diverse epidermal structures. *Elife*. 2016;5:e12504. Published 2016 Jan 14. doi:10.7554/eLife.12504
- Seldin L, Poulson ND, Foote HP, Lechler T. NuMA localization, stability, and function in spindle orientation involve 4.1 and Cdk1 interactions. *Mol Biol Cell*. 2013;24(23):3651–3662. doi:10.1091/mbc.E13-05-0277
- Sewry CA, Wallgren-Pettersson C. Myopathology in congenital myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017;43(1):5–23. doi:10.1111/nan.12369
- Sharp DJ, Ross JL. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 11):2561–2569. doi:10.1242/jcs.101139
- Sherrington CS. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol*. 1906;34(1-2):1–50. doi:10.1113/jphysiol.1906.sp001139
- Shishmarev D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: recent progress and unanswered questions. *Biophys Rev*. 2020;12(1):143–153. doi:10.1007/s12551-020-00610-x
- Silk AD, Holland AJ, Cleveland DW. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J Cell Biol*. 2009;184(5):677–690. doi:10.1083/jcb.200810091
- Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol*. 2006;8(6):594–600. doi:10.1038/ncb1412
- Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):335–344. doi:10.1038/ncb2920
- Solmaz SR, Blobel G, Melcák I. Ring cycle for dilating and constricting the nuclear pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):5858–5863. doi:10.1073/pnas.1302655110
- Solovei I, Wang AS, Thanisch K, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell*. 2013;152(3):584–598. doi:10.1016/j.cell.2013.01.009
- Song Y, Kirkpatrick LL, Schilling AB, et al. Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron*. 2013;78(1):109–123. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.036

- Soppina V, Herbstman JF, Skiniotis G, Verhey KJ. Luminal localization of  $\alpha$ -tubulin K40 acetylation by cryo-EM analysis of fab-labeled microtubules. *PLoS One*. 2012;7(10):e48204. doi:10.1371/journal.pone.0048204
- Spagnol ST, Armiger TJ, Dahl KN. Mechanobiology of Chromatin and the Nuclear Interior. *Cell Mol Bioeng*. 2016;9(2):268–276. doi:10.1007/s12195-016-0444-9
- Spagnol ST, Dahl KN. Spatially Resolved Quantification of Chromatin Condensation through Differential Local Rheology in Cell Nuclei Fluorescence Lifetime Imaging [published correction appears in *PLoS One*. 2016;11(4):e0154639]. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146244. Published 2016 Jan 14. doi:10.1371/journal.pone.0146244
- Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK. Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Arch Neurol*. 1966;14(1):1–14. doi:10.1001/archneur.1966.00470070005001
- Srsen V, Fant X, Heald R, Rabouille C, Merdes A. Centrosome proteins form an insoluble perinuclear matrix during muscle cell differentiation. *BMC Cell Biol*. 2009;10:28. Published 2009 Apr 21. doi:10.1186/1471-2121-10-28
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*. 1996;271(2):611–614. doi:10.1074/jbc.271.2.611
- Staszewska I, Fischer I, Wiche G. Plectin isoform 1-dependent nuclear docking of desmin networks affects myonuclear architecture and expression of mechanotransducers. *Hum Mol Genet*. 2015;24(25):7373–7389. doi:10.1093/hmg/ddv438
- Stephens AD, Banigan EJ, Adam SA, Goldman RD, Marko JF. Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus. *Mol Biol Cell*. 2017;28(14):1984–1996. doi:10.1091/mbc.E16-09-0653
- Stephens AD, Liu PZ, Banigan EJ, et al. Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol Biol Cell*. 2018;29(2):220–233. doi:10.1091/mbc.E17-06-0410
- Stockum A, Snijders AP, Maertens GN. USP11 deubiquitinates RAE1 and plays a key role in bipolar spindle formation. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190513. Published 2018 Jan 2. doi:10.1371/journal.pone.0190513
- Stroud MJ, Banerjee I, Veevers J, Chen J. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex proteins in cardiac structure, function, and disease. *Circ Res*. 2014;114(3):538–548. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301236
- Stroud MJ, Feng W, Zhang J, et al. Nesprin 1 $\alpha$ 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2017;216(7):1915–1924. doi:10.1083/jcb.201612128
- Stuwe T, Bley CJ, Thierbach K, et al. Architecture of the fungal nuclear pore inner ring complex. *Science*. 2015;350(6256):56–64. doi:10.1126/science.aac9176
- Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, et al. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*. 1999;147(5):913–920. doi:10.1083/jcb.147.5.913
- Sun Y, Leong NT, Wong T, Drubin DG. A Pan1/End3/Sla1 complex links Arp2/3-mediated actin assembly to sites of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2015;26(21):3841–3856. doi:10.1091/mbc.E15-04-0252
- Susman RD, Quijano-Roy S, Yang N, et al. Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2010;20(4):229–237. doi:10.1016/j.nmd.2010.02.016
- Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*. 2013;341(6149):1240104. doi:10.1126/science.1240104
- Szebenyi G, Bollati F, Bisbal M, et al. Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr Biol*. 2005;15(20):1820–1826. doi:10.1016/j.cub.2005.08.069

- Szyk A, Deaconescu AM, Spector J, et al. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell*. 2014;157(6):1405–1415. doi:10.1016/j.cell.2014.03.061
- Szyk A, Piszczek G, Roll-Mecak A. Tubulin tyrosine ligase and stathmin compete for tubulin binding in vitro. *J Mol Biol*. 2013;425(14):2412–2414. doi:10.1016/j.jmb.2013.04.017
- Szyk A, Deaconescu AM, Piszczek G, Roll-Mecak A. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(11):1250–1258. Published 2011 Oct 23. doi:10.1038/nsmb.2148

## T

- Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med*. 2009;266(4):372–389. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x
- Tajbakhsh S, Cossu G. Establishing myogenic identity during somitogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7(5):634–641. doi:10.1016/s0959-437x(97)80011-1
- Tajik A, Zhang Y, Wei F, et al. Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater*. 2016;15(12):1287–1296. doi:10.1038/nmat4729
- Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(2):321–328. doi:10.1006/bbrc.2000.2147
- Tassin AM, Maro B, Bornens M. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol*. 1985;100(1):35–46. doi:10.1083/jcb.100.1.35
- Tassin AM, Paintrand M, Berger EG, Bornens M. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J Cell Biol*. 1985;101(2):630–638. doi:10.1083/jcb.101.2.630
- Thiam HR, Vargas P, Carpi N, et al. Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat Commun*. 2016;7:10997. Published 2016 Mar 15. doi:10.1038/ncomms10997
- Thornton GK, Woods CG. Primary microcephaly: do all roads lead to Rome?. *Trends Genet*. 2009;25(11):501–510. doi:10.1016/j.tig.2009.09.011
- Thornton C, Snowden MA, Carling D. Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12443–12450. doi:10.1074/jbc.273.20.12443
- Tian G, Cowan NJ. Tubulin-specific chaperones: components of a molecular machine that assembles the  $\alpha/\beta$  heterodimer. *Methods Cell Biol*. 2013;115:155–171. doi:10.1016/B978-0-12-407757-7.00011-6
- Torii T, Ogawa Y, Liu CH, et al. NuMA1 promotes axon initial segment assembly through inhibition of endocytosis. *J Cell Biol*. 2020;219(2):e201907048. doi:10.1083/jcb.201907048
- Toughiri R, Li X, Du Q, Bieberich CJ. Phosphorylation of NuMA by Aurora-A kinase in PC-3 prostate cancer cells affects proliferation, survival, and interphase NuMA localization. *J Cell Biochem*. 2013;114(4):823–830. doi:10.1002/jcb.24421
- Tousson A, Zeng C, Brinkley BR, Valdivia MM. Centrophilin: a novel mitotic spindle protein involved in microtubule nucleation. *J Cell Biol*. 1991;112(3):427–440. doi:10.1083/jcb.112.3.427
- Tovey CA, Conduit PT. Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes and beyond. *Essays Biochem*. 2018;62(6):765–780. Published 2018 Dec 7. doi:10.1042/EBC20180028

- Tsujino A, Maertens C, Ohno K, et al. Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7377–7382. doi:10.1073/pnas.1230273100
- Tsukahara T, Tsujino S, Arahata K. CDNA microarray analysis of gene expression in fibroblasts of patients with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2002;25(6):898–901. doi:10.1002/mus.10085
- Tucker JB, Meats M. Microtubules and control of insect egg shape. *J Cell Biol*. 1976;71(1):207–217. doi:10.1083/jcb.71.1.207

## V

- Valenzuela-Fernández A, Cabrero JR, Serrador JM, Sánchez-Madrid F. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol*. 2008;18(6):291–297. doi:10.1016/j.tcb.2008.04.003
- Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Rutter WJ, Kirschner MW, Cleveland DW. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by alpha and beta tubulin mRNAs. *Nature*. 1981;289(5799):650–655. doi:10.1038/289650a0
- Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(14):2069–2084. doi:10.1007/PL00000837
- Vallee RB, Borisy GG. The non-tubulin component of microtubule protein oligomers. Effect on self-association and hydrodynamic properties. *J Biol Chem*. 1978;253(8):2834–2845.
- Verlhac MH. Mother centrioles are kicked out so that starfish zygote can grow. *J Cell Biol*. 2016;212(7):759–761. doi:10.1083/jcb.201602053
- Vidi PA, Liu J, Salles D, et al. NuMA promotes homologous recombination repair by regulating the accumulation of the ISWI ATPase SNF2h at DNA breaks. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(10):6365–6379. doi:10.1093/nar/gku296
- Vidi PA, Chandramouly G, Gray M, et al. Interconnected contribution of tissue morphogenesis and the nuclear protein NuMA to the DNA damage response. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 2):350–361. doi:10.1242/jcs.089177
- Vilmont V, Cadot B, Vezin E, Le Grand F, Gomes ER. Dynein disruption perturbs post-synaptic components and contributes to impaired MuSK clustering at the NMJ: implication in ALS. *Sci Rep*. 2016;6:27804. Published 2016 Jun 10. doi:10.1038/srep27804
- Viswanadha R, Sale WS, Porter ME. Ciliary Motility: Regulation of Axonemal Dynein Motors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(8):a018325. Published 2017 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect.a018325
- Volk T, Wang S. Protection of muscle nuclei. *Oncotarget*. 2015;6(27):23046–23047. doi:10.18632/oncotarget.5240
- von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*. 2012;22(11):602–609. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.008

# W

- Wang D, Villasante A, Lewis SA, Cowan NJ. The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol.* 1986;103(5):1903–1910. doi:10.1083/jcb.103.5.1903
- Wang N, Bosc C, Ryul Choi S, et al. Structural basis of tubulin detyrosination by the vasohibin-SVBP enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(7):571–582. doi:10.1038/s41594-019-0241-y
- Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):75–82. doi:10.1038/nrm2594
- Wang S, Reuveny A, Volk T. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by cooperating with spectraplakins and EB1. *J Cell Biol.* 2015;209(4):529–538. doi:10.1083/jcb.201408098
- Wang Y, Nagarajan M, Uhler C, Shivashankar GV. Orientation and repositioning of chromosomes correlate with cell geometry-dependent gene expression. *Mol Biol Cell.* 2017;28(14):1997–2009. doi:10.1091/mbc.E16-12-0825
- Wang Z, Cui J, Wong WM, et al. Kif5b controls the localization of myofibril components for their assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development.* 2013;140(3):617–626. doi:10.1242/dev.085969
- Wakelam MJ. The fusion of myoblasts. *Biochem J.* 1985;228(1):1–12. doi:10.1042/bj2280001
- Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol.* 2005;7(1):48–55. doi:10.1038/ncb1206
- Wheeler MA, Davies JD, Zhang Q, et al. Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res.* 2007;313(13):2845–2857. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.025
- Wheeler MT, Allikian MJ, Heydemann A, Hadhazy M, Zarnegar S, McNally EM. Smooth muscle cell-extrinsic vascular spasm arises from cardiomyocyte degeneration in sarcoglycan-deficient cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2004;113(5):668–675. doi:10.1172/JCI20410
- Wheeler MT, Korcarz CE, Collins KA, et al. Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1063–1071. doi:10.1016/S0002-9440(10)63193-8
- Wu JH, Feng YJ, Sun ZJ, et al. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2013;16(12):1199–1202.
- Wiese C, Wilde A, Moore MS, Adam SA, Merdes A, Zheng Y. Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science.* 2001;291(5504):653–656. doi:10.1126/science.1057661
- Wiese C, Zheng Y. Gamma-tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9(2):250–259. doi:10.1016/S0959-440X(99)80035-9
- Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, et al. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol.* 2005;171(5):799–810. doi:10.1083/jcb.200506083
- Wilson MH, Bray MG, Holzbaur EL. Methods for Assessing Nuclear Rotation and Nuclear Positioning in Developing Skeletal Muscle Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1411:269–290. doi:10.1007/978-1-4939-3530-7\_18
- Wilson MH, Holzbaur EL. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells. *Development.* 2015;142(1):218–228. doi:10.1242/dev.114769
- Wilson MH, Holzbaur EL. Opposing microtubule motors drive robust nuclear dynamics in developing muscle cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 17):4158–4169. doi:10.1242/jcs.108688



- Winter L, Kuznetsov AV, Grimm M, Zeöld A, Fischer I, Wiche G. Plectin isoform P1b and P1d deficiencies differentially affect mitochondrial morphology and function in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2015;24(16):4530–4544. doi:10.1093/hmg/ddv184
- Winter L, Wiche G. The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):77–93. doi:10.1007/s00401-012-1026-0
- Wong RW, Blobel G, Coutavas E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(52):19783–19787. doi:10.1073/pnas.0609582104

## Y

- Yablonka-Reuveni Z, Anderson JE. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Dev Dyn.* 2006;235(1):203–212. doi:10.1002/dvdy.20602
- Yang CH, Lambie EJ, Snyder M. NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J Cell Biol.* 1992;116(6):1303–1317. doi:10.1083/jcb.116.6.1303
- Yang CH, Snyder M. The nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. *Mol Biol Cell.* 1992;3(11):1259–1267. doi:10.1091/mbc.3.11.1259
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93(1):23–67. doi:10.1152/physrev.00043.2011
- Young A, Dichtenberg JB, Purohit A, Tuft R, Doxsey SJ. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(6):2047–2056. doi:10.1091/mbc.11.6.2047
- Yumoto N, Kim N, Burden SJ. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature.* 2012;489(7416):438–442. doi:10.1038/nature11348

## Z

- Zaal KJ, Reid E, Mousavi K, et al. Who needs microtubules? Myogenic reorganization of MTOC, Golgi complex and ER exit sites persists despite lack of normal microtubule tracks. *PLoS One.* 2011;6(12):e29057. doi:10.1371/journal.pone.0029057
- Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2816–2833. doi:10.1093/hmg/ddm238
- Zhang T, Zaal KJ, Sheridan J, Mehta A, Gundersen GG, Ralston E. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 9):1401–1409. doi:10.1242/jcs.039255
- Zhang W, Coldefy AS, Hubbard SR, Burden SJ. Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK). *J Biol Chem.* 2011;286(47):40624–40630. doi:10.1074/jbc.M111.279307
- Zhang J, Zheng X, Yang X, Liao K. CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Res.* 2009;19(6):733–746. doi:10.1038/cr.2009.51

- Zheng Z, Wan Q, Meixiong G, Du Q. Cell cycle-regulated membrane binding of NuMA contributes to efficient anaphase chromosome separation. *Mol Biol Cell*. 2014;25(5):606–619. doi:10.1091/mbc.E13-08-0474
- Zhong Z, Wilson KL, Dahl KN. Beyond lamins other structural components of the nucleoskeleton. *Methods Cell Biol*. 2010;98:97–119. doi:10.1016/S0091-679X(10)98005-9
- Zuela N, Zwerger M, Levin T, Medalia O, Gruenbaum Y. Impaired mechanical response of an EDMD mutation leads to motility phenotypes that are repaired by loss of prenylation. *J Cell Sci*. 2016;129(9):1781–1791. doi:10.1242/jcs.184309
- Zullo JM, Demarco IA, Piqué-Regi R, et al. DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*. 2012;149(7):1474–1487. doi:10.1016/j.cell.2012.04.035
- Zwerger M, Jaalouk DE, Lombardi ML, et al. Myopathic lamin mutations impair nuclear stability in cells and tissue and disrupt nucleo-cytoskeletal coupling. *Hum Mol Genet*. 2013;22(12):2335–2349. doi:10.1093/hmg/ddt079
- Zwerger M, Roschitzki-Voser H, Zbinden R, et al. Altering lamina assembly reveals lamina-dependent and -independent functions for A-type lamins. *J Cell Sci*. 2015;128(19):3607–3620. doi:10.1242/jcs.171843



## AUTRES PUBLICATIONS



## PUBLICATION 4 :

Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities

*Alireza Ghasemizadeh, Emilie Christin, Alexandre Guiraud, Nathalie Couturier, Valérie Risson, Emmanuelle Girard, Christophe Jagla, Cedric Soler, Lilia Laddada, Colline Sanchez, Francisco Jaque, Audrey Garcia, Marine Lanfranchi, Vincent Jacquemond, Julien Gondin, Julien Courchet, Laurent Schaeffer et Vincent Gache*



# Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities

Alireza Ghasemizadeh<sup>1</sup>, Emilie Christin<sup>1</sup>, Alexandre Guiraud<sup>1</sup>, Nathalie Couturier<sup>1</sup>, Valérie Risson<sup>1</sup>, Emmanuelle Girard<sup>1</sup>, Christophe Jagla<sup>2</sup>, Cedric Soler<sup>2</sup>, Lilia Laddada<sup>2</sup>, Colline Sanchez<sup>1</sup>, Francisco Jaque<sup>1</sup>, Audrey Garcia<sup>1</sup>, Marine Lanfranchi<sup>1</sup>, Vincent Jacquemond<sup>1</sup>, Julien Gondin<sup>1</sup>, Julien Courchet<sup>1</sup>, Laurent Schaeffer<sup>1</sup> and Vincent Gache<sup>3</sup>.

1 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine, Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08, France.

2 GReD Laboratory, Clermont-Auvergne University, INSERM U1103, CNRS, UMR6293, 63000 Clermont-Ferrand, France.

3 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine, Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08, France. [vincent.gache@inserm.fr](mailto:vincent.gache@inserm.fr)

## Abstract

Skeletal muscle is made from multinuclear myofiber, where myonuclei are positioned at the periphery or clustered below neuromuscular junctions (NMJs). While mispositioned myonuclei are the hallmark of numerous muscular diseases, the molecular machinery maintaining myonuclei positioning in mature muscle is still unknown. Here, we identified microtubule-associated protein MACF1 as an evolutionary conserved regulator of myonuclei positioning, in vitro and in vivo, controlling the “microtubule code” and stabilizing the microtubule dynamics during myofibers maturation, preferentially at NMJs. Specifically, MACF1 governs myonuclei motion, mitochondria positioning and structure and acetylcholine receptors (AChRs) clustering. Macf1-KO in young and adult mice decreases muscle excitability and causes evolutionary myonuclei positioning alterations in adult mice, paralleled with high mitochondria content and improved resistance to fatigue. We present MACF1 as a primary actor of the maintenance of synaptic myonuclei and AChRs clustering, peripheral myonuclei positioning and mitochondria organization through the control of microtubule network dynamics in muscle fibers.

## Introduction

Throughout muscle development, myonuclei actively position themselves and adapt special localization in mature myofibers where myonuclei are regularly spaced along muscle fibers and localized at the periphery (Roman and Gomes, 2017). The density of myonuclei along myofibers' length remains relatively constant with the exception of immediately below the neuromuscular junction (NMJ) where about 5-6 myonuclei (synaptic myonuclei) are clustered (Manhart et al., 2018; Ravel-Chapuis et al., 2007; Bruusgaard et al., 2006). Failure in extra-



48 synaptic myonuclei patterning has been linked to different myopathies and muscle weakness  
49 (Metzger et al., 2012; Roman et al., 2017; Falcone et al., 2014; Collins et al., 2017; Perillo and  
50 Folker, 2018). This precise organization of myonuclei is correlated with particular myonuclei  
51 shape in muscle fibers, the alteration of which has recently emerged as potentially contributing  
52 to several muscular diseases (Norton and Phillips-Cremins, 2017; Cho et al., 2017; Puckelwartz  
53 et al., 2009; Méjat et al., 2009; Janin and Gache, 2018).

54 Proteins localized inside myonuclei such as Lamin A/C, Emerin or Nuclear Envelope Proteins  
55 (NEPs), that couple the nuclear lamina to cytoskeleton through the “Linker of Nucleoskeleton  
56 and Cytoskeleton” (LINC) complex, play critical roles in the maintenance of myonuclei shape  
57 and localization (Chang et al., 2015; Lee and Burke, 2017; Levy et al., 2018; Mattioli et al.,  
58 2011). Additionally, molecular motors, Microtubule-Associated Proteins (MAPs), in interaction  
59 with actin/microtubule networks are also involved in myonuclei localization during muscle  
60 formation (Gache et al., 2017; Rivero et al., 2009; Casey et al., 2003; Metzger et al., 2012).  
61 Most importantly, this precise localization and shape, determined by mechanical forces  
62 emanating from different cytoskeletons networks, acts directly on myonuclei-triggered  
63 chromatin organization and gene expression (Ramdas and Shivashankar, 2015; Robson et al.,  
64 2016; Chojnowski et al., 2015; Kirby and Lammerding, 2018). Still, how late positioning of  
65 myonuclei in myofibers is set and how it regulates signaling within cells that contributes to  
66 different pathways to maintain muscle integrity are still poorly understood.

67 To identify proteins involved in the late positioning of myonuclei, we used primary  
68 myotubes/myofibers culture and identified MACF1 (Microtubule Actin Cross Factor 1) as a  
69 regulator of myonuclei positioning in late phases of myofiber maturation. MACF1 is a member  
70 of the plakin family. It is a large protein composed of multiple domains capable of interacting  
71 with actin filaments and microtubules that helps stabilizing them towards adhesion structures in  
72 a variety of tissues (Kodama et al., 2003; Sanchez-Soriano et al., 2009). In addition, other  
73 supporting evidences have shown a role of MACF1 in myonuclei position. The *C. elegans*  
74 orthologous, VAB-10 and the *Drosophila* orthologous, Shot, are essential for nuclei migration  
75 in distal tip cells of the somatic gonad and myotendinous junction formation respectively (Kim  
76 et al., 2011; Lee and Kolodziej, 2002; Bottenberg et al., 2009). Nevertheless, a duplication of  
77 *MACF1* gene (inducing a decrease in the total amount of MACF1 protein) has been linked to a  
78 new neuromuscular disease (Jørgensen et al., 2014). Also important in this respect, it was  
79 recently proposed that Shot/MACF1 participates in the formation and maintenance of a  
80 perinuclear shield in the muscle of *drosophila* larvae, contributing once again in myonuclei  
81 localization (Wang et al., 2015).

82 Here, we demonstrate *in vitro* and *in vivo* that MACF1 is implicated in the maintenance of  
83 myonuclei patterning in myofibers, starting at the NMJs, and controlling both myonuclei and  
84 mitochondria dynamics through the regulation of microtubules.

85  
86

## 87 Results

88

89 **MACF1 is not required in precocious myonuclei positioning but is essential during**  
90 **myofibers maturation in the maintenance of myonuclei localization.**

91

92 To identify new factors that contribute specifically to myonuclei spreading in myofibers, we  
93 purified proteins able to bind to microtubules, stabilized with Taxol<sup>®</sup>, from 3 days mouse  
94 primary myotubes (Fig1A). The major Microtubule Associated Protein (MAP) identified by  
95 mass-spectrometry using this protocol revealed the significant presence of MACF1/ACF7  
96 protein, a member of the plakin family (Supplementary Fig1A-B). Although MACF1 is initially

97 described to be predominantly expressed in neurons and muscle (Bernier et al., 2000), its role  
98 during muscle fibers formation and behavior is poorly understood. Published work suggests  
99 that plakin family members play specific roles through the regulation of placement and  
100 function of specific organelles such as nucleus, mitochondria, Golgi apparatus, and  
101 sarcoplasmic reticulum (Boyer et al., 2010). Mouse *Macf1* mRNA was previously show to  
102 increase steadily during myogenesis (Sun et al., 1999) and MACF1 was proposed to contribute  
103 in muscle fiber to form a flexible perinuclear shield in collaboration with two other MAPs  
104 named EB1 and Nesprin (Wang et al., 2015). We confirmed the increase of *Macf1* mRNA and  
105 MACF1 protein during early steps of myotubes formation (3 to 5 days of differentiation) using  
106 RT-qPCR and Western blotting on mouse myoblast C2C12 cells (Supplementary Fig1C-D).

107 We first addressed the role of MACF1 in early steps of myotubes formation (Fig1A). Briefly,  
108 isolated murine myoblasts were treated with either short interfering RNA (siRNA) or small  
109 hairpin RNA (shRNA) targeting either a scrambled sequence or the *Macf1* gene to obtain a  
110 strong reduction of MACF1 expression after 3 or 10 days of differentiation (Fig1B-C). Primary  
111 myoblasts were then induced *in vitro* to form myotubes that were fixed and analyzed after 3  
112 days of differentiation (Fig1D-E). At this step, myoblasts have fused together and formed  
113 immature myofibers (myotubes) characterized by myonuclei alignment in the middle of  
114 myotubes, mainly organized by an interplay between MAP7, Kif5b and microtubules (Metzger  
115 et al., 2012). Surprisingly at this early step of differentiation, MACF1 down-regulation had no  
116 impact on parameters related to myotubes architecture, reflected by myotubes areas and/or  
117 length according to myonuclei content (Supplementary Fig1E-F). Additionally, myonuclei  
118 repartition reflected by the mean distance of each myonuclei from myotubes centroid or by the  
119 statistical repartition of myonuclei along the length of myotubes, was not affected by the down  
120 regulation of MACF1 (Fig1F-H). These results were confirmed in C2C12 myoblasts cells,  
121 treated with either siRNA or shRNA targeting *Macf1* and induced to form myotubes  
122 (Supplementary Fig1G-J). This suggested that for a defined myonuclei content in myotubes,  
123 MACF1 does not act as an early “anti-elongation” factor and is not involved in the process that  
124 contributes to the early equilibrium in force spreading emanating on myonuclei in myotubes  
125 (Manhart et al., 2018).

126 To further investigate the implication of MACF1 in late steps of differentiation, primary mice  
127 myotubes were maintained in differentiation media for 10 days as previously described  
128 (Pimentel et al., 2017; Falcone et al., 2014), covered by matrigel<sup>®</sup> and supplemented with  
129 neural Agrin (Fig1A). In these conditions of maturation, myonuclei are compressed between  
130 the membrane of the myofiber and sarcomere structure, adopt a flatten architecture and spread  
131 all along myofibers (Roman et al., 2017). This long-term differentiation approach allowed the  
132 identification of MACF1 as a regulator of myonuclear positioning in the maturation steps of  
133 developing myofibers (Fig1I-J). Actually, MACF1 depletion caused a 40% decrease of the  
134 mean distance between adjacent myonuclei using either each of 3 individual siRNA or a pool  
135 of individual siRNAs (Fig1K). We confirmed this data with an alternative approach using 4  
136 individual shRNA or a pool of these 4 shRNAs (Fig1K) and observed a 30% decrease in the  
137 mean distance between myonuclei.

138 Altogether, these results suggests that MACF1 is progressively expressed and accumulates  
139 during early steps of differentiation processes without implication in the precocious  
140 microtubules-dependent localization of myonuclei, yet during myofibers maturation steps,  
141 MACF1 gets involved in the maintenance of the distance between adjacent myonuclei.

142 **MACF1 controls Myonuclei shape, microtubule network, mitochondria localization and**  
143 **AChRs clustering in mature myofibers.**

144  
145 MACF1 is a member of the plakin family (Gong et al., 2001; Goryunov and Liem, 2016),  
146 composed of multiple domains interacting with and stabilizing both actin filaments and  
147 microtubules network (Supplementary Fig1B) in variety of tissues (Kodama et al., 2003;  
148 Sanchez-Soriano et al., 2009). To further investigate the specific roles of MACF1 in mature  
149 myofibers, we analyzed the structure of actin and microtubule cytoskeleton networks (Fig2A).  
150 The structure of sarcomeres reflected by actin and alpha-actinin staining did not seem to be  
151 affected in the absence of MACF1, as evidenced by the proper peripheral localization of  
152 myonuclei (Fig2A)(Roman et al., 2017). However, the microtubule network was slightly  
153 altered all along myofibers with a net architectural modification at the vicinity of myonuclei  
154 (Fig2A). To discard an effect of the absence of MACF1 on the global shape of myofibers, we  
155 analyzed the width of each individual myofiber and did not observe significant differences  
156 between scrambled and *macf1* si/shRNA treated myofibers (Fig2B).

157 The obvious phenotype regarding myonuclei aspect was an increase of the apparent sphericity  
158 of myonuclei (Fig2C). We measured the mean feret diameter of each myonuclei compressed  
159 between myofibrils network and the external membrane (Roman et al., 2017) and observed that  
160 in mature myofibers, the mean length of myonuclei was decreased by 11 and 16% in the  
161 absence of MACF1, using siRNA and shRNA strategies respectively, compared to control  
162 conditions (Fig2C).

163 We also addressed the structure and localization of the mitochondrial network in the presence  
164 or absence of MACF1, as revealed by a Cytochrome-C staining in mature myofibers (Fig2A-  
165 B). In myofibers treated with scrambled siRNA, mitochondria lined up in the bulk of  
166 myofibers, in-between myofibrils, where they followed the microtubule network. However in  
167 *Macf1* siRNA/shRNA treated myofibers, we observed a 30% increase of mitochondria  
168 fragmentation (Fig2D). Furthermore unlike in control condition where mitochondria clustered  
169 in the vicinity of myonuclei with a preference for both extremities of polarized myonuclei  
170 (Fig2A, purple arrows), we observed a loss of mitochondria localization at the periphery of  
171 myonuclei upon MACF1 knock-down (Fig2E). These results confirmed a role of MACF1 in  
172 muscles specifically related to microtubule network alteration, as myonuclei and mitochondria  
173 localization were both affected.

174 Interestingly, the MACF1-dependent microtubule network in charge of both transmitted forces  
175 on myonuclei and mitochondria localization, occurred specifically during the maturation  
176 process and especially on extracellular matrix treated and Agrin stimulated myofibers. The use  
177 of Agrin in this system is known to induce clustering of acetylcholine receptors (AChRs), a  
178 synaptic receptor expressed locally at NMJs (Lin et al., 2005; Schmidt et al., 2012; Vilmont et  
179 al., 2016) (Fig 2A, green arrows). Thus, we next focused on AChRs clustering and found that  
180 even though the proportion of myofibers expressing AChRs was not changed (Fig2F), the  
181 ability of myofibers to efficiently cluster AChRs was highly affected resulting in a drop of at  
182 least 20% in this clustering ability, determined by the presence of cluster larger than 8  $\mu$ m  
183 (Fig2G). To confirm these results on the potential role of MACF1 on AChRs clustering  
184 specifically at the neuromuscular junction, we used the muscle specific driver (*Mef2-GAL4*) to  
185 express RNAi against *Drosophila Shot* (*Macf1* orthologous) as described previously (Wang et  
186 al., 2015). Immunostaining against Shot confirmed a preferential localization of the protein  
187 around myonuclei and showed a significant reduction of protein level around myonuclei in  
188 Shot-KD larval muscles (Supplementary Fig2A-B). In accordance with our *in vitro* system, we  
189 found that actives zones of synaptic button and post-synaptic terminals were decreased in Shot-  
190 KD larval muscles (Supplementary Fig2C-D).

191 Altogether, these results suggest that MACF1 is implicated in late steps of the myofibers  
192 maturation process by maintaining microtubule related spreading of both myonuclei and  
193 mitochondria and by controlling AChRs clustering at the NMJs.

#### 194 **MACF1 controls myonuclei dynamics in a microtubule dependent manner.**

195  
196 MACF1 was previously shown to regulate microtubule polymerization (Ka and Kim, 2016;  
197 Alves-Silva et al., 2012; Wang et al., 2015). We tested whether in our system microtubule  
198 dynamics were changed using the tracking of fluorescently tagged EB1. As expected, EB1  
199 localization at the tips of microtubule was not dependent on the presence of MACF1, however  
200 the velocity of EB1 was increased by 20% when MACF1 was down-regulated, confirming the  
201 role of MACF1 in the regulation of microtubule polymerization (Fig3A-B; Supplementary  
202 movie 1-2). As myonuclei use preferentially the microtubule network to move longitudinally  
203 along myotubes (Gache et al., 2017; Metzger et al., 2012), we next investigated the impact of  
204 the increase in microtubule dynamicity on myonuclei movements in mature myofibers. Just  
205 before fusion occurs, myoblasts were transfected with lamin-chromobody® to allow the  
206 visualization of myonuclei concomitantly with shRNA targeting either scramble sequence or  
207 *Macf1* with a GFP reporter to select myotubes containing both construction (shRNA and lamin-  
208 chromobody®) (Fig3C, Supplementary movie 3-4). In 5-day differentiated myofibers (already  
209 covered by matrigel® and supplemented with neural Agrin), myonuclei were tracked every 15  
210 minutes for a time period of 14 hours. Myonuclei displacements parameters were analyzed  
211 using SkyPad method (Cadot et al., 2014). In control condition, myonuclei moved during 32 %  
212 of the time at a median speed of 0,16 µm/min, resulting in a displacement of 24 µm after 14  
213 hours (more than twice the distance between 2 myonuclei) mainly in the same direction  
214 (persistence of 0,98). Interestingly in the absence of MACF1, the median velocity of myonuclei  
215 was not significantly changed (Fig3D). On the other hand, the percentage of time that  
216 myonuclei spent in motion was doubled to reach 66% of the time (Fig3E). Similarly, the  
217 median duration of pause was 530 minutes in the control condition while it fell to 330 minutes  
218 in the absence of MACF1 (Fig3F). Interestingly, we also observed a decreased tendency in the  
219 persistence of the movement of myonuclei (persistence is 0,68 in absence of MACF1). All in  
220 all, in the absence of MACF1, myonuclei travelled twice more distance than in control  
221 condition with a mean distance of 44 µm in 14 hours (Fig3G). This result suggests that  
222 MACF1, through the increase of microtubule dynamics, increase the movements of myonuclei  
223 that will induce a reduction of the distance between adjacent myonuclei.

224

#### 225 **MACF1 conditional muscle-KO adult mice exhibit myonuclei mislocalization.**

226

227 To further investigate the role played by MACF1 in skeletal muscles development, we used a  
228 conditional *Macf1* knockout mouse line in which exons 6 and 7 of the *Macf1* gene are floxed  
229 (Goryunov et al., 2010). Homozygous mice were then crossed with mice carrying the Cre-  
230 recombinase expression under the control of the Human Skeletal muscle Actin (HSA)(Miniou  
231 et al., 1999). Briefly, mice carrying two floxed alleles of *Macf1* (*Macf1*<sup>f/f</sup>) were crossed with  
232 heterozygous mice for *Macf1* (*Macf1*<sup>f/-</sup>) that carried Hsa::Cre transgene (Hsa::Cre; *Macf1*<sup>f/-</sup>),  
233 generating the conditional mutant (Hsa::Cre; *Macf1*<sup>f/f</sup> referred as *Macf1*<sup>f/f</sup> Cre+) and control  
234 mice (WT; *Macf1*<sup>f/f</sup> referred as *Macf1*<sup>f/f</sup> Cre-) (Supplementary Fig3A-B). We quantified the  
235 loss of *Macf1* by measuring the amount of MACF1 mRNA and protein in muscle tissue lysates  
236 (Supplementary Fig3C-D). MACF1 levels were reduced by more than half in muscle tissue,  
237 indicating that MACF1 is efficiently removed from myofibers in *Macf1* muscle-conditional  
238 mutant mice. We can attribute the remaining presence of MACF1 proteins from other tissues  
239 such as fibroblasts, motoneurons and schawnn cells. Mice were born at Mendelian frequencies

240 and appeared indistinguishable from WT littermates (data not shown). The comparative global  
241 body weight evolution of conditional mutant (*Macfl<sup>fl/fl</sup> Cre+*) and control mice (*Macfl<sup>fl/fl</sup> Cre-*)  
242 did not show any apparent problems in growing and maturation phase (Supplementary Fig3E).  
243

244 Myonuclei localization in different type of muscles was studied using a histological staining  
245 approach in muscle cross-section. Laminin staining was used to determine the limit of each  
246 myofiber and Dapi to detect myonuclei (Fig4A). We observed a dramatic delocalization of  
247 myonuclei in 12-month-adult muscle fibers revealed by the presence of myonuclei in the center  
248 or dispatched in the myofibers rather than at the periphery in the *Tibialis Anterior*, *Soleus* and  
249 *Gastrocnemius* with a respective increase of 275, 153 and 230% of the delocalization index  
250 (Fig4B, Supplementary Fig3F). Interestingly, no significant delocalization of myonuclei was  
251 observed in 3- and 8- month-adult mice (Fig4B). At the fiber level, no significant alteration was  
252 detected in the distribution of myofibers cross-sectional area (CSA) in 3-months-adult mice in  
253 the *Tibialis Anterior* (Fig4C). Nonetheless, we observed a shift of myofibers repartition to a  
254 smaller CSA sizes in 8-month mice (Fig4D) and this shift was maintained in 12-month-adult  
255 mice (Fig4E). The change in myonuclei positioning was not associated with an alteration in the  
256 total number of myofibers per muscle (Supplementary Fig3G) or with a massive regeneration  
257 process as evidenced by the absence of staining for embryonic myosin heavy chain in  
258 myofibers with mispositioned myonuclei (data not shown). We confirmed the accumulation of  
259 mislocalized myonuclei in myofibers from 12-month-adult mice, using single isolated  
260 myofibers from the *Tibialis Anterior* or *Extensor Digitorum Longus* muscles (Fig4F-G, green  
261 arrows). Altogether, these results demonstrate that MACF1 is implicated in the maintenance of  
262 myonuclei localization in muscle myofibers of adult mice that is not associated to a  
263 regeneration process. This role for MACF1 seems to be a long-term process since no  
264 significant myonuclei mis-localization is observed in younger mice.  
265

266 **MACF1 muscle-KO mice exhibit early neuromuscular junction alteration with a reset of**  
267 **the related “muscle-microtubule code”.**  
268

269 Our *in vitro* results suggested that MACF1 is implicated in myonuclei spreading in an  
270 Agrin/NMJ dependent manner (Fig1-2). Thus, we wondered if in our *in vivo* conditional mutant  
271 model, synaptic AChRs clustering size and density were impacted by the absence of MACF1.  
272 To address this question, we isolated individual’s myofibers from the *Tibialis Anterior* and the  
273 *Extensor Digitorum Longus* muscles and visualized AChRs clustering using bungarotoxin  
274 staining in 12-months-adult mice (Fig5A). In this condition, we found that the size of synaptic  
275 AChRs clusters was highly diminished in both muscles. To determine if the fragmentation of  
276 NMJ-related AChRs was an early process, we isolated individual’s myofibers from the *Rectus*  
277 *Lateralis* muscle, known to be multi-innervated, allowing an access to multiple NMJs, from 4-  
278 months-young mice (Fig 5B). In this muscle, NMJs were much more fragmented in  
279 conditionally mutant mice compared to control mice reflected by the doubling of individual  
280 clusters stained for AChRs (Fig5C). Accordingly we measured a reduction of myonuclei  
281 associated with the NMJs, with a mean value of 5 myonuclei in control mice (*Macfl<sup>fl/fl</sup> Cre-*) as  
282 compared to 3 in mutant mice (*Macfl<sup>fl/fl</sup> Cre+*) (Fig5D). These data further demonstrate that  
283 MACF1 is required to maintain neuromuscular synapses integrity through AChRs clustering in  
284 young and adult mice and this alteration seems to precede myonuclei disorganization in  
285 myofibers.  
286

287 MACF1 contains a microtubule-binding domain (MTB) in the C-terminus part (Supplementary  
288 Fig1B) and has been shown to modulate microtubule dynamics through the interaction with  
289 different partners such as CLAPS2, EB1, CAMSAP3, Nesprin, Map1B, ErbB2 (Ryan et al.,

290 2012; Ka et al., 2014; Drabek et al., 2006; Noordstra et al., 2016; Wang et al., 2015; Zaoui et al., 2010). In addition, microtubules are subjected to a variety of post-translational modifications (PTMs). A combination of different  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin isoforms and PTMs are referred as the “tubulin code” (Nieuwenhuis and Brummelkamp, 2019). Among these different PTMs, Tubulin de-tyrosination is associated with longer-lived microtubules, whereas more dynamic microtubules are found to be mainly tyrosinated (Bulinski and Gundersen, 1991). To see if MACF1 plays a role in the correct formation of tubulin code, we addressed changes in microtubule tyrosination/de-tyrosination status in conditionally mutant mice compared to control mice (Fig5E). In *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-* muscle, tyrosinated-tubulin was found to locate preferentially at the vicinity of myonuclei along myofibers. No particular enrichment was found close to the AChRs clusters at the NMJ (Fig5E, top). Nonetheless, de-tyrosinated-tubulin was found at the vicinity of myonuclei with a noticeable enrichment at the NMJ, close to the AChRs clusters (Fig5E, top). In conditionally mutant mice (*Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+*), although myonuclei shape was changed, tyrosinated-tubulin was still found at the vicinity of myonuclei associated with few aggregates along myofibers, but this time, the presence of tyrosinated-tubulin was enriched at the vicinity of AChRs clusters. In the same perspective, de-tyrosinated-tubulin was highly reduced both around myonuclei and near AChRs clusters (Fig5E, bottom). These data show that MACF1 plays a role in the maintenance of the pool of de-tyrosinated-tubulin which consequently stabilizes the microtubule network at both the vicinity of myonuclei and at the NMJs.

### 310 311 **Adult MACF1 muscle-KO mice exhibit increased myofibers with high mitochondria** 312 **content.**

313  
314 Our *in vitro* results suggested that MACF1 is implicated in mitochondria spreading and fragmentation in muscle fibers (Fig2A, D-E). Since skeletal muscles are composed of a functional and metabolic continuum of slow (type I) and fast fibers (types IIa and IIx), we first questioned whether there were changes in the mitochondrial pool in adult conditional mice. We measured the intensity of succinate dehydrogenase staining, indicative of mitochondrial activity and found a significant increase in the number of fibers with positive succinate dehydrogenase staining in *Tibialis Anterior* muscle in conditionally mutant mice (*Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+*) compared to control mice, while no effect was observed in *Soleus* muscle (Fig6A-B). Quantification of proteins comprising the electron transport chain was then performed on *Gastrocnemius* muscles and our results confirmed an increase in total amount of mitochondria (Tom20 relative to actin) and no changes in protein contents from the electron transport chain (CI, II, III, IV and V relative to Tom20) (Fig6C). The intensity of succinate dehydrogenase staining is commonly used to discriminate slow and fast fibers. Since our quantification suggests a change in the repartition of slow/fast fibers in *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+* muscle, we next investigated if the proportion of slow fibers was changed in conditional mutant mice (*Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+*). Cross-sections of 12-month-adult muscles from the *Tibialis Anterior*, *Soleus* and *Gastrocnemius* were analyzed for slow myosin content and no alteration of the proportion in each muscle type was observed compared to control mice (Fig6D-E). We then used electron microscopy to visualize the ultrastructure of mitochondria in *Tibialis Anterior* muscle of *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+* mice (Fig6F). This approach confirmed an apparent increase in mitochondria content in muscle fibers associated with the presence of spherical mitochondria in-between myofibrils and close to myonuclei (Fig6F). All together, these data show that MACF1 is involved in the maintenance of mitochondria architecture in muscle fibers and that the loss of MACF1 is associated with a redistribution of mitochondrial content dependent on muscle type.

337  
338

339 **Muscle fibers from MACF1-KO mice show muscle function defects and increased fatigue**  
340 **resistance but preserved excitation-contraction coupling.**  
341

342 To see if the observed alterations have any impact on muscle force of our MACF1 muscle-KO  
343 mice, we examined the muscle performance in *Macfl* conditional KO mutant mice. We used a  
344 strictly non-invasive experimental setup offering the possibility to stimulate the Hindlimb  
345 muscles to record the force production concomitantly. For both *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre- and *Macfl<sup>fl/fl</sup>*  
346 Cre+ mice, we assessed the force production from the Hindlimb muscles in response to various  
347 incremental stimulation frequencies (i.e., from 1 to 100 Hz) in order to obtain the force-  
348 frequency relation. In young 4-months-old mice, we observed a large rightward shift of the  
349 force–frequency relation in conditional *Macfl* KO mice (Fig7A), suggesting an alteration of the  
350 excitation-contraction coupling process. Interestingly, this shift was maintained in adult mice  
351 but in a less significant manner indicating compensation mechanisms to thwart the loss of  
352 efficiency in response to motoneurons stimulation. As the absolute maximal force developed by  
353 *Macfl* conditional KO mice was not changed compared to control mice (data not shown), we  
354 next questioned the fatigability of those muscles. In accordance with the increased SDH  
355 staining, we found that in both young and old mice, *Macfl* conditional KO mice are more  
356 resistant to fatigue compared to control mice (Fig7B). We then used electron microscopy to  
357 study the ultrastructure of muscle in *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ mice and analyzed sarcomeres, transverse  
358 tubules (T-tubules) and sarcoplasmic reticulum (SR) organization (Fig7C). We found that  
359 global muscle organization reflected by sarcomeric structure (myofibrils) is not dependent on  
360 MACF1. However, T-tubules and the SR appeared severely affected in some myofibers  
361 (Fig7C) confirming a possible direct modification of excitation-contraction coupling in muscle  
362 of the *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ mice. To test this possibility, we compared voltage-activated SR Ca<sup>2+</sup>  
363 release in *Flexor Digitalis Brevis* (FDB) muscle fibers isolated from conditional *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+  
364 mice and control mice. Confocal staining using di-8-aneppps showed an overall comparable  
365 structure of T-tubule network in *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre- and in *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ FDB muscle fibers (Fig7D-  
366 top, & -middle panels). However, some isolated muscle fibers exhibited strong alteration of T-  
367 tubule orientation without perturbation in T-tubules density or sarcomere length (Fig7D-  
368 Bottom panel, E-G). We next tested if SR Ca<sup>2+</sup> release amplitude and kinetics are affected in  
369 *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ muscles fibers. Figure 7H shows rhod-2 Ca<sup>2+</sup> transients elicited by membrane  
370 depolarizing steps of increasing amplitude in a *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre- and in a *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ fibers. As  
371 routinely observed under these conditions (Kutchukian et al., 2017), transients in control fibers  
372 exhibit a fast early rising phase upon depolarization followed by a slower phase at low and  
373 intermediate voltages and by slowly decaying phase for the largest depolarizing steps. As  
374 shown in figure 7I, rhod-2 transients from *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ fibers exhibit an overall similar time-  
375 course, not distinguishable from control muscle fibers. In each tested fiber, the rate of SR Ca<sup>2+</sup>  
376 release was calculated from the rhod-2 Ca<sup>2+</sup> transients. Traces for the calculated rate of SR Ca<sup>2+</sup>  
377 release corresponding to the transients shown in figure 7I are shown in figure 7J. In both fibers,  
378 the rate exhibits a similar early peak, the amplitude of which increases with the amplitude of  
379 the pulse, followed by a spontaneous decay down to a low level. The SR Ca<sup>2+</sup> release peak  
380 amplitude was similar in *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre- and in a *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ muscle fibers for all voltages  
381 (Fig7J) and the time to reach the peak was also not affected in the *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ muscle fibers  
382 (Fig.7K, values not shown). Mean values for maximal rate of SR Ca<sup>2+</sup> release (Max d[Ca<sub>tot</sub>]/dt),  
383 mid-activation voltage (V<sub>0.5</sub>) and slope factor (k) of the voltage-dependence were statistically  
384 unchanged in *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ muscle fibers compared to control fibers (Fig7K). Accordingly,  
385 there was also no change in the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel activity of the dihydropyridine  
386 receptor (also referred to as Ca<sub>v</sub>1.1, the voltage-sensor of excitation-contraction coupling) in  
387 fibers from *Macfl<sup>fl/fl</sup>* Cre+ mice (not shown). All in all, these data show that muscle from *Macfl*  
388 conditional mutant mice exhibit delay in excitability in response to nerve stimulation and

389 although the T-tubule network organization seems affected in some myofibers, the global  
390 efficiency of SR-Ca<sup>2+</sup> release seems not engaged. Interestingly, muscles from *Macf1*  
391 conditional mice display a higher resistance to fatigue compared to muscles of control mice.

## 392 393 Discussion

394  
395 Different mechanisms control myonuclei positioning during muscle fiber formation (Roman  
396 and Gomes, 2017; Starr, 2017; Manhart et al., 2018). Early steps of myonuclei positioning in  
397 immature fibers (myotubes) depend on an interplay between microtubule, microtubule-  
398 associated-proteins and motors proteins such as MAP4, MAP7, Dynein and Kif5b (Gimpel et  
399 al., 2017; Mogessie et al., 2015; Metzger et al., 2012; Cadot et al., 2012; Wang et al., 2013;  
400 Wilson and Holzbaur, 2014). This process also depends on myonuclei membrane associated  
401 components such as Nesprin-1 or AKAP9 (Wilson and Holzbaur, 2015; Gimpel et al., 2017). In  
402 mature myofibers, myonuclei are found at the periphery of fibers and reach this localization by  
403 a process dependent on actin network, contraction and myonuclei rigidity (Roman et al., 2017).  
404 However, processes involved in maintenance of myonuclei at the periphery of muscle fibers are  
405 still unknown.

406  
407 The present study is the first to demonstrate that a protein related to the microtubule network  
408 controls and maintains peripheral myonuclei localization in mature myofibers. Here, we show  
409 that MACF1 is progressively accumulated at the onset of myotubes formation, with no evident  
410 implication in early steps of myonuclei spreading or myotubes elongation but remarkable  
411 actions in maturation steps to set the distance between adjacent myonuclei (Fig1-2).  
412 Accordingly, conditionally mutant mice (*Macf1<sup>ff</sup>Cre+*) exhibit a strong decrease in peripheral  
413 myonuclei, but surprisingly, this alteration becomes significant only at 12-months of age  
414 (Fig4). This alteration comes after a slight reduction in myonuclear domains in myofibers  
415 reflected by a decrease in the mean diameter of myofibers in 8-month-adult mice. These data  
416 suggest a complex interplay between factors that maintain peripheral myonuclei localization  
417 and demonstrate that the absence of MACF1 contributes to a long-term modification of this  
418 equilibrium that breaks in 12 month-adult *Macf1<sup>ff</sup>Cre+* mice.

419  
420 It has already been shown that atrophy can result from a progressive alteration of NMJs  
421 (Bonaldo and Sandri, 2013). In fact, in our *in vivo* model, the first alterations in myonuclei  
422 localization occurred at the NMJs in 4-month-adult mice (Fig5). This is in accordance with  
423 results from our *in vitro* system, where myonuclei disruption in myofibers occurs when  
424 myofibers are stimulated with extra-cellular matrix and neural Agrin, which seems to be the  
425 starting point of myonuclei positioning alteration in myofibers. Myonuclei clustering beneath  
426 the NMJ is known to be dependent on proteins of the LINC complex such as Nesprin and Sun  
427 proteins and implicated myonuclei rigidity, as mutation or depletion of Lamin A/C leads also to  
428 aberrant and fragile NMJs with myonuclei lying out of it (Razafsky and Hodzic, 2015; Méjat et  
429 al., 2009). In the present study, we show that MACF1 contributes in a first instance to synaptic  
430 myonuclei clustering at the NMJs. This property seems to be related to the control of MACF1  
431 on microtubule dynamics and stability (Fig3 & 5). Microtubule dynamics and associated MAPs  
432 (Claps2, Clip170) and motors (Dynein) mediate microtubule capture at the vicinity of synaptic  
433 myonuclei and seem to be crucial for the stabilization of acetylcholine receptors (AChRs) and  
434 Musk (muscle-specific receptor tyrosine kinase) at the post-synaptic region (Basu et al., 2015;  
435 Vilmont et al., 2016; Schmidt et al., 2012; Basu et al., 2014). Here, we found that MACF1  
436 controls myonuclei-related “microtubule code” affecting the ratio between tyrosinated and non-  
437 tyrosinated tubulin and thus longer-lived microtubules at the vicinity of myonuclei (Bulinski  
438 and Gundersen, 1991). Interestingly, our observations point to a strong influence of MACF1 at



439 axons endplates to control myonuclei clustering and microtubule organization dynamics and  
440 this make sense as this site is known to strongly accumulates microtubule network (Ralston et  
441 al., 2001). Synaptic alteration in the local “microtubule code” can itself drive changes in forces  
442 applied locally on synaptic myonuclei, independently of myonuclei membrane proteins, and  
443 contribute to the NMJ integrity. Interestingly, extra-synaptic myonuclei are affected by this  
444 change of dynamics after the synaptic myonuclei, suggesting a different pool of proteins  
445 controlling myonuclei localization between synaptic and extra-synaptic myonuclei.  
446

447 Genetic inactivation of *Macf1* redistributes microtubule dynamic equilibrium, which acts on  
448 diverse pathways that control muscle functionality. MACF1 directly affects NMJ integrity  
449 through the control of AChRs clustering (Fig2 & 4). We observe an early failure in the capacity  
450 to cluster AChRs *in vitro* in mature myofibers (Fig2). This effect is confirmed in conditionally  
451 mutant mice (*Macf1<sup>ff</sup> Cre+*), which exhibit failure in AChRs clustering at the contact with  
452 motoneurons. This specific alteration of NMJ integrity is most likely responsible for the  
453 decrease in muscle performance (Fig5). This possibility is reinforced by the facts that first,  
454 myofibril genesis is not impacted either *in vitro* in mature *Macf1*-KD myofibers or *in vivo* in  
455 mutant mice (*Macf1<sup>ff</sup> Cre+*) and second, there is no alteration in SR-Ca<sup>2+</sup> release even though  
456 the overall structure of T-tubule network seems to be affected in few myofibers (Fig7). In  
457 contrast, we observed, in our *in vitro* model, an alteration in the organization of the  
458 mitochondrial network (Fig2). This modification is translated in the conditional mutant mice  
459 into a strong increase of mitochondria with shape alteration, mainly smaller and rounder (Fig6).  
460 Interestingly, we also observe an increase in the number of oxidative fibers by muscle and it  
461 appears to be dependent on muscle type, without changes in myofibers typology according to  
462 myosin type expression (fast or slow muscle fibers). This alteration in oxidative fibers content  
463 is correlated with an increase of the resistance to fatigue (Fig6). This effect of MACF1 down-  
464 expression on mitochondria organization is consistent with a number of previous observations,  
465 namely, microtubule network, through molecular motors such as Kif5b and Dynein, previously  
466 shown to control mitochondrial movements in myoblasts (iqbal and Hood, 2014). Additionally,  
467 MACF1 was shown to affect mitochondria localization through nuclear positioning in oocyte  
468 egg (Escobar-Aguirre et al., 2017). Interestingly, the interplay between actin branching and  
469 microtubule acetylation has been recently pointed out as a mitochondrial distribution keeper in  
470 fibroblasts cells (Shi et al., 2019). Increase in microtubule dynamic run against stabilization of  
471 microtubules partners, but even worse, it can contribute to the delocalization of few MAPs that  
472 preferentially bind to stable microtubule (Gache et al., 2010). Among them, DNM2, is a MAP  
473 that preferentially associate with stable microtubules (Tanabe and Takei, 2009). The absence of  
474 MACF1 could contribute to the release of DNM2 clustered on stable microtubule and  
475 consequently trigger mitochondria fission in mutant mice (*Macf1<sup>ff</sup> Cre+*) (Kraus and Ryan,  
476 2017). Alternatively, increase in microtubule dynamic instability directly impact local  
477 concentration of free tubulin (Gache et al., 2005) whereas free available tubulin-βII was shown  
478 to affect mitochondrial metabolism and organization (Kumazawa et al., 2014; Guzun et al.,  
479 2011; Guerrero et al., 2009). In this perspective, MACF1 could command mitochondria shape  
480 and functionality through the control of microtubule dynamics in muscle fibers.  
481

482 Various diseases can directly affect NMJs integrity, resulting in a progressive disconnection  
483 between muscles and motoneurons. Two of the most common laminopathies, Limb-Girdle  
484 Muscular Dystrophy (LGMD) and Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD), which affect  
485 striated skeletal muscles, typically lead to a disproportion of fiber size, myonuclei aggregation  
486 along myofibers and dispersion under NMJs (Chojnowski et al., 2015). Conversely  
487 pathological mechanisms affecting presynaptic site can similarly lead to synaptic myonuclei  
488 dispersion as is the case in MotoNeuron Diseases (MNDs), such as Amyotrophic Lateral

489 Sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative condition characterized by progressive motoneuron  
490 denervation and muscle atrophy associated with synaptic myonuclei dispersion (Geevasinga et  
491 al., 2016). Additionally, there are several conditions where peripheral myonuclei localization is  
492 affected. For example, in a heterogeneous group of inherited muscle diseases, CentroNuclear  
493 Myopathies (CNMs), are defined pathologically by an abnormal localization of myonuclei in  
494 the center of muscle fibers (Jungbluth and Gautel, 2014). But unlike many myopathies, CNMs  
495 are not linked to excessive degeneration/regeneration processes. Genes implicated in various  
496 forms of CNMs as well as encode proteins that participate in different aspect of membrane  
497 remodeling and trafficking such as Mtm1, Amphiphysin-2/BIN1, Dynamin-2 and Hacd1 have  
498 been already identified (Laporte et al., 1996; Bitoun et al., 2005; Muller et al., 2003;  
499 Muhammad et al., 2013). In addition, in the case of Sarcopenia, peripheral myonuclei are also  
500 progressively lost (Edström et al., 2007; Malatesta et al., 2009; Brooks et al., 2009). Altogether,  
501 MACF1 will be a perfect candidate, from the postsynaptic muscle view, to investigate the basis  
502 of motoneuron diseases and the “de-peripherization” of myonuclei in skeletal muscle in various  
503 types of myopathies.

504

## 505 **Figures legend**

506

### 507 **Figure 1: MACF1 is an essential regulator of myonuclei positioning in mature myofibers.**

508 (A) Schema of sequential steps in order to obtain immature myotubes and mature myofibers  
509 from primary myoblasts. siRNA/shRNA were transfected in early phases of myotubes fusion.  
510 (B). Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts of primary  
511 myoblast not treated (WT), treated with 3 individual siRNAs (#952, #954, #958) or a pool of 3  
512 individual siRNAs targeting *Macf1* after 3 days of differentiation. Tubulin is used as “loading  
513 control”. (C) Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts of  
514 primary myoblast treated with a pool of 3 individual siRNAs or a pool of 4 shRNAs targeting  
515 *Macf1* after 11 days of differentiation. HSP90 is used as “loading control”. (D-E)  
516 Representative images of immunofluorescence staining from 3 individual experiments  
517 presenting Myosin Heavy Chain (green, MHC) and myonuclei (red) in primary myotubes  
518 treated with scramble (D) or a pool of 3 individual siRNAs targeting *Macf1* (E) after 3 days of  
519 differentiation. Scale Bar = 150  $\mu$ m. (F) Mean distances between each myonuclei and  
520 myotube’s centroid ranked by myonuclei content per myotubes were quantified after 3 days of  
521 differentiation in cells treated with a scramble or a pool of 3 individual *Macf1* siRNAs. (G-H)  
522 Myonuclei Spreading Graph (MSG) represents statistical spatial distribution of myonuclei  
523 along myotubes in scramble (G) and in *Macf1* siRNA-treated myotubes (H). In F-H, 3  
524 individual experiments, n=170 for scramble and n=365 for SiRNA *Macf1* conditions. (I-J)  
525 Representative images of 10 days differentiated myofibers stained, for DiHydroPyridine  
526 Receptor (green) and Dapi (red) in cells treated with scramble siRNA (I) or a pool of 3  
527 individual siRNAs targeting *Macf1* (J). Scale Bar= 50  $\mu$ m. (K) Mean distance between adjacent  
528 myonuclei in primary myotubes treated with scramble, 3 individual siRNAs (#952, #954, #958)  
529 or a pool of 3 individual siRNA targeting *Macf1* and in primary myotubes treated with  
530 scramble, 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a pool of 4 individual shRNAs targeting  
531 *Macf1* after 10 days of differentiation from 3 individual experiments with at least n=400 by  
532 conditions.

533

### 534 **Figure 2: MACF1 control myonuclei shape, microtubule integrity, mitochondria**

535 **localization and AChRs clustering in mature myofibers.** (A) Representative images of 10  
536 days differentiated myofibers, stained, from the top to the bottom respectively, for Tyrosinated-  
537 Tubulin (green), Alpha-actinin (green), Actin (red), Cytochrome-C (green) and acetylcholine  
538 receptor (Green) in cells treated with scramble siRNA (left panels) or a pool of 3 individual

539 siRNAs targeting *Macf1* (right panel). Myonuclei are stained in blue or red. Scale Bar= 20  $\mu$ m.  
540 (B) Myofibers width (3 individual experiments with at least n=190 by conditions) and (C)  
541 myonuclei ferret (3 individual experiments with at least n=170 by conditions) in primary  
542 myotubes treated with scramble, 3 individual siRNAs (#952, #954, #958) or a pool of 3  
543 individual siRNAs targeting *Macf1* and in primary myotubes treated with scramble, 4  
544 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10  
545 days of differentiation. (D) Mitochondria fragmentation (2 individual experiments with at least  
546 n=800 by conditions) and (E) distribution around myonuclei (2 individual experiments with at  
547 least n=30 by conditions) in cells treated with scramble siRNA/shRNA, a pool of 3 individual  
548 siRNAs or a pool of 4 individuals shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. (F)  
549 Percentage of myofibers expressing immunofluorescence staining for acetylcholine receptors in  
550 primary myotubes treated with scramble shRNA, 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a  
551 pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. 3 individual  
552 experiments with at least n=130 by conditions. (G) Acetylcholine receptors (AChR) clustering  
553 distribution in cells treated with scramble shRNA or 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a  
554 pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. 3 individual  
555 experiments with at least n=130 by condition. Error bars, s.e.m. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p <  
556 0.05.

557  
558 **Figure 3: MACF1 controls microtubules and myonuclei dynamics.** (A) Representative  
559 images of primary myotubes transfected with EB1-GFP with either scramble or a pool of 3  
560 individual siRNAs targeting *Macf1* (#952, #954, #958) showing colored comets. (B)  
561 Quantification of EB1 comets speed in myoblasts treated with scramble or a pool of 3  
562 individual siRNAs targeting *Macf1* in primary myotubes after 3 days of differentiation. At least  
563 200 comets were mapped per condition from 3 independent experiments. Error bars, s.e.m.  
564 \*\*\*p < 0.001. (C) Representatives frames from a 14h time-lapse movie in two channels  
565 (shRNA in green and lamin-chromobody® in red) of primary myotubes in the presence of  
566 Agrin and covered by matrigel. In the first frame (on the left), myofibers are selected in white,  
567 which corresponds to the region used to create the adjacent kymograph. Primary myotubes  
568 were treated with scramble or a pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 5 days of  
569 differentiation. 3 individual experiments with at least n=200 by conditions. Speed (D), Time in  
570 motion (E), Duration of pauses (F) and Distance crossed by myonuclei (G) were quantified  
571 using SkyPad analysis (Cadot et al., 2014). \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

572  
573 **Figure 4: muscle specific MACF1 knockout presents myonuclei organization failure.** (A)  
574 Representative images of Tibialis Anterior muscle cross-section from *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-* and *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+*  
575 mice at the age of 8 and 12 months-old, stained for Dapi (red) and Laminin (green).  
576 Example of myofibers with mis-localized myonuclei are stamped by white arrows. Scale Bar =  
577 150  $\mu$ m. (B) Quantification of the percentage of myofibers with mis-localized myonuclei in 3,  
578 8 and 12 months-old *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-* and *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+* in *Tibialis Anterior*, *Soleus* and  
579 *Gastrocnemius* muscles. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. Distribution of cross-sectioned  
580 myofibers areas from the *Tibialis Anterior* in 3 (C), 8 (D) and 12 (E) months-old *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-*  
581 and *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+* mice. Representative images of *Tibialis Anterior* (F) or *Extensor Digitorum*  
582 *Longus* (G) extracted myofibers stained for Dapi (blue) and Phalloidin (purple) from 12  
583 months-old *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-* and *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre+* mice. Mis-localized myonuclei are stamped by  
584 green arrows. At least 3 mice per condition were analyzed. Scale Bar = 150  $\mu$ m.

585  
586 **Figure 5: muscle specific MACF1 knockout mice display NMJ integrity failure in parallel**  
587 **with the loss of dynamic microtubules.** (A) Representative images of *Tibialis Anterior* (Top)  
588 or *Extensor Digitorum Longus* (Bottom) extracted myofibers from 12 months-old *Macf1<sup>fl/fl</sup> Cre-*

589 and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice stained for Dapi (blue), Phalloidin (purple) and Bungarotoxin (green).  
590 Scale Bar = 150  $\mu$ m. (B) Representative images of extracted myofibers from *Rectus Lateralis*  
591 muscle stained for Dapi (blue), presynaptic markers (Neurofilament & Synaptic vesicles 2  
592 (red)) and Bungarotoxin (green) from 4 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice. Scale  
593 Bar = 150  $\mu$ m. (C) Quantification of NMJ (bungarotoxin staining) fragmentation. (D)  
594 Quantification of myonuclei number under Bungarotoxin staining. \*\*\*p < 0.001. At least 3  
595 mice per condition were used, n=37. (E) Representative images of *Tibialis Anterior* extracted  
596 myofibers stained for Tyrosinated-Tubulin or de-Tyrosinated-Tubulin. In the overlay  
597 Tyrosinated-Tubulin (blue), de-Tyrosinated-Tubulin (green) and Bungarotoxin (red) from 12  
598 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice.  
599

600 **Figure 6: muscle specific MACF1 knockout affects mitochondrial content and structure.**  
601 (A) Representative images of transversal cross section of *Tibialis Anterior* muscle from 12  
602 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice stained Succinate DeHydrogenase activity.  
603 Scale Bar = 150  $\mu$ m. (B) Quantification of the Succinate DeHydrogenase activity relative to  
604 myofibers repartition in conditional mutant mice compare to control, \*\*p < 0.01. (C) Western  
605 blot analysis of OXPHOS proteins, TOM20 and Actin expressions in total *Gastrocnemius*  
606 muscles protein extracts from 12 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice. (D)  
607 Representative images of transversal cross section of *Tibialis Anterior* muscle from 12 months-  
608 old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice stained for slow myosin (red) and laminin (green).  
609 Scale Bar = 150  $\mu$ m. (E) Quantification of the percentage of myofibers with slow myosin  
610 expression in 12 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> in *Tibialis Anterior*, *Soleus* and  
611 *Gastrocnemius* muscles. (F) Representative electronic microscopy images of myofibrils and  
612 mitochondria organization of *Tibialis Anterior* muscles from 12 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and  
613 *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice. Scale Bar = 1  $\mu$ m.  
614

615 **Figure 7: muscle specific *Macfl* knockout affects muscle functions and T-tubule**  
616 **formation but not RS Ca<sup>2+</sup> release.** (A) Force production from the *Hindlimb* muscles in  
617 young (4 months) and adult (12 months) *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice in response to  
618 various incremental stimulation frequencies (from 1 to 100 Hz). \*\*p < 0.01, \*p < 0.05. (B)  
619 Quantification of the fatigue index from the *Hindlimb* muscles in young (4 months) and adult  
620 (12 months) *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup>. \*p < 0.05. (C) Representative electronic  
621 microscopy images of myofibrils and T-tubule organization of *Tibialis Anterior* muscles from  
622 12 months-old *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice. Scale Bar = 0,5  $\mu$ m. (D) Representatives  
623 fluorescence images of di-8-anepps staining of the T-tubule network in a *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and  
624 *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice muscle fibers. Quantification of T-tubule density index (E), Sarcomere  
625 length (F) and T-Tubules orientation (G) in a *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> mice muscle  
626 fibers. (H) Representative rhod-2 Ca<sup>2+</sup> transients in a *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and in a *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> fiber  
627 in response to 0.5s long depolarizing pulses from -80mV to the range of indicated values, with  
628 intervals of 10 mV. (I) Corresponding Ca<sup>2+</sup> release flux (d[CaTot]/dt) traces calculated as  
629 described in the Methods. (J) Mean voltage-dependence of the peak rate of SR Ca<sup>2+</sup> release in  
630 *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>-</sup> and in a *Macfl*<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> fibers. (K) Inset shows the mean values for maximal rate,  
631 half velocity and k index of SR Ca<sup>2+</sup> release in the two groups of fibers, as assessed from  
632 Boltzmann fits to data from each fiber.  
633

634 **Supplementary figure 1: MACF1 expression in myotubes and myofibers.** (A) Table  
635 showing mass spectrometry identification of MACF1 and Kif4b in 3 days-old primary  
636 myotubes. (B) Schematic representation of MACF1 already identified domains. ABD is the  
637 “Actin Binding Domain” and MBD is the “Microtubule Binding Domain”. (C) QRT-PCR  
638 analysis of *Macfl* gene expression level relative to *Hprt1* and *Gapdh* gene in proliferating

639 C2C12 cells (GM) and after 1, 3, or 5 days of differentiation. Data's means are  $\pm$  SEM (n=3).  
640 (D) Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts from  
641 proliferating cells (GM) to differentiating C2C12 myotubes after 1, 3, or 5 days of  
642 differentiation in cells treated with either Scramble shRNA (control) or a pool of 4 individual  
643 shRNAs targeting *Macf1* gene. Tubulin is used as "loading control". Myotubes Area (E) and  
644 myotubes length (F) ranked by myonuclei content per myotubes were quantified after 3 days of  
645 differentiation in cells treated with a scramble or a pool of 3 individual *Macf1* siRNAs. In E-H,  
646 3 individual experiments, n=170 for scramble and n=365 for SiRNA *Macf1* conditions. (G-J)  
647 Immunofluorescence staining of Myosin Heavy Chain (green) and myonuclei (red) in 5-days  
648 old C2C12 myotubes treated with scramble siRNA (G) or a pool of 3 individual siRNAs  
649 targeting *Macf1* (H) and in C2C12 myotubes treated with scramble shRNA (I) or a pool of 4  
650 individual shRNAs targeting *Macf1* (J). Scale Bar = 50  $\mu$ m.

651  
652 **Supplementary figure 2: MACF1/Shot in myotubes and myofibers.** (A-B) Larval muscles  
653 labeled with Shot (Green), Dapi (blue) and Phalloidin (red) in WT (left) or RNAi treated  
654 muscle-targeting *Shot* (right panel). (C) Larval muscles labeled with Discs-Large, Dlg (Green),  
655 Dapi (blue) and Phalloidin (red) in WT (left) or RNAi treated muscle targeting *Shot* (right  
656 panel). (D) Larval muscles labeled with Bruchpilot, BRP (Green), Dapi (blue) and Phalloidin  
657 (red) in WT (left) or RNAi treated muscle targeting *Shot* (right panel). Scale Bar = 50  $\mu$ m.

658  
659 **Supplementary figure 3: Muscle specific *Macf1* knockout mice.** (A) Schema of the strategy  
660 used to generate mouse muscle specific *Macf1* knockout mouse model (B) Mutant mice  
661 carrying a Cre transgene under the control of the Human Skeletal Actin (HSA) promoter  
662 confirmed by genomic PCR. (C) Total MACF1 expression is reduced by Half-fold in  
663 *Gastrocnemius* muscle lysates. Mean  $\pm$  SEM values from three independent experiments. \*\*\*p  
664 < 0.001. (D) Dot blot assay for MACF1 expression in Heart, Brain and *Gastrocnemius* lysates  
665 from *Macf1<sup>flf</sup>* Cre- and *Macf1<sup>flf</sup>* Cre+ (E) Evolution of *Macf1<sup>flf</sup>* Cre- and *Macf1<sup>flf</sup>* Cre+ body mass  
666 of mice during 12 month (n=4). (F) Representative images of *Gastrocnemius* and *Soleus*  
667 muscle cross-section in 8 and 12 months-old *Macf1<sup>flf</sup>* Cre- and *Macf1<sup>flf</sup>* Cre+ mice <sup>f</sup> stained for  
668 Dapi (red) and Laminin (green). Example of myofibers with mis-localized myonuclei are  
669 stamped by white arrow. Scale Bar = 150  $\mu$ m. (G) Quantification of the total number of  
670 myofibers in 3, 8 and 12 months-old *Macf1<sup>flf</sup>* Cre- and *Macf1<sup>flf</sup>* Cre+ mice from in *Tibialis*  
671 *Anterior*, *Soleus* and *Gastrocnemius* muscles.

672  
673 **Video legend**

674  
675 **Movie 1.** EB1 comets velocity in primary myotubes transfected with EB1-GFP and scrambled  
676 siRNA. Picture were recorded every 500 ms. Movie correspond to Figure 3A Scramble.

677  
678 **Movie 2.** EB1 comets velocity in primary myotubes transfected with EB1-GFP and a pool of 3  
679 individual siRNAs (#952, #954, #958) targeting *Macf1*. Picture were recorded every 500 ms.  
680 Movie correspond to Figure 3A MACF1 siRNA.

681 **Movie 3.** Nuclear movements in primary myotubes transfected with a scrambled shRNA  
682 (green) and lamin-chromobody® (red). Picture were recorded every 15 min. Movie correspond  
683 to Figure 3C sh-Scramble.

684  
685 **Movie 4.** Nuclear movements in primary myotubes transfected with a pool of 4 individual  
686 shRNAs targeting *Macf1* (green) and lamin-chromobody® (red). Picture were recorded every  
687 15 min. Movie correspond to Figure 3C sh-MACF1.

688

## 689 **Materials and methods**

690

### 691 **Cell culture**

692

693 Primary myoblasts were collected from wild type C57BL6 mice as described before (Falcone et  
694 al., 2014; Pimentel et al., 2017). Briefly, Hindlimb muscles from 6 days pups were extracted  
695 and digested with collagenase (Sigma, C9263-1G) and dispase (Roche, 04942078001). After a  
696 pre-plating step to discard contaminant cells such as fibroblasts, myoblasts were cultured on  
697 matrigel coated-dish (Corning, 356231) and induced to differentiate in myotubes for 2-3 days  
698 in differentiation media (DM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-  
699 122) + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)). Myotubes were then covered by a  
700 concentrated layer of matrigel and maintained for up to 10 days in long differentiation culture  
701 medium (LDM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-122) + 0.1%  
702 Agrin + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)) until the formation of mature and  
703 contracting myofibers. LDM was changed every two days.

704 Mouse myoblast C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM  
705 (Gibco, 41966029) + 15% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, 10270-106) + 1% penicillin-  
706 streptomycin (Gibco, 15140-122))) and were plated on 0.1% matrigel-coated dishes for 1-2  
707 days before differentiation. Differentiation was induced by switching to differentiation media  
708 (DMEM + 1% horse serum).

### 709 **Production of wild type Agrin recombinant proteins**

710 For production of recombinant proteins, the stably transfected HEK293-EBNA cell lines were  
711 grown to about 80 % confluence and were transferred to expression medium without FBS.  
712 Conditioned medium containing secreted proteins was collected every 3 days and replaced with  
713 fresh expression media for 12 days. Conditioned medium was centrifuged at 2,000xg for 10  
714 min to pellet the cells before storing at -20°C. After thawing, recombinant proteins were  
715 purified from conditioned media by HPLC, on a HiTRAP ImaC HP column (GE Healthcare,  
716 17-0920-03), eluted with imidazol and desalted on silica column with PBS (HiPrep  
717 26/10Desalting, GE Healthcare) or on a Vivaspin column (Vivaspin Sartorius). The absolute  
718 concentration of soluble Agrins was estimated on a coomassie blue stained gel by comparison  
719 with a known amount of a commercial purified Agrin.

### 720 **Cell transfection**

721

722 For C2C12 cells, 3 different siRNAs Silencer per gene were transfected in cells using  
723 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) at the final concentration of 10  
724 nM, following manufacturer instructions, 2 days before differentiation. For shRNA cDNA  
725 (Geneocopia), we used Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) was used  
726 following manufacturer instructions as well.

727

728 For primaries cells, siRNA were transfected using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher  
729 Scientifics, 11668-019) at the final concentration of 2nM. shRNA (Geneocopia), Eb1 or RFP-  
730 Lamin-chromobody (Chromotek) cDNA were transfected in cells using Llipofectamine 3000  
731 (ThermoFisher Scientifics, L3000-008).

732

| siRNA | Sense oligonucleotide sequence | Anti-Sense oligonucleotide sequence |
|-------|--------------------------------|-------------------------------------|
|-------|--------------------------------|-------------------------------------|

|              |                            |                        |
|--------------|----------------------------|------------------------|
| MACF1 #952   | GAGUUUCAAAAAGAACCUUAtt     | UAAGGUUCUUUUGAAACUCtt  |
| MACF1 #954   | CAAUACAGCUGAAAAAGUUtt      | AACUUUUUCAGCUGUAUUGgg  |
| MACF1 #958   | GGAUGAAAUUAAUACUCGAtt      | UCGAGUAUUAAUUUCAUCCat  |
| <b>shRNA</b> | <b>Clone Name</b>          | <b>Target Sequence</b> |
| MACF1 #1     | MSH071923-1-CU6 (OS398499) | GCACATCAATGATCTCTATGA  |
| MACF1 #2     | MSH071923-2-CU6 (OS398500) | GCAGGTGAAGCTAGTGAATAT  |
| MACF1 #3     | MSH071923-3-CU6 (OS398501) | GCAGATTGCAAACAAGATACA  |
| MACF1 #4     | MSH071923-4-CU6 (OS398502) | GCTAAAGAATATCCGACTACT  |

733

734

### **Protein sample preparation**

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

### **Western blot and dot blot analysis**

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

### **Primary cells immunofluorescence staining**

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

### **Isolation of mono-myofibers and immunofluorescence staining**

774  
 775 Following the dissection of the whole muscle from the mice, TA or EDL muscle blocks were  
 776 fixed in 4%PFA in PBS for 2H at RT. After washes, 30 to 50 mono-myofibers were isolated  
 777 per staining from each muscle. Myofibers were then permeabilized using 0.5% Triton-X100 in  
 778 PBS for 5min at RT and saturated in 1% BSA in PBS for 30min at RT. Based on the  
 779 experiments, myofibers were incubated in desired primary antibodies at 4°C over night.  
 780 Following washes with 0.05% Triton-X100 in PBS, myofibers were incubated in secondary  
 781 antibodies or dyes for 2H at RT followed by washes with 0.05% Triton-X100 in PBS and a last  
 782 wash in PBS. Myofibers were mounted on slides using fluromount Aqueous mounting (Sigma,  
 783 F4680-25mL) and kept at 4°C or -20°C. Slides were analyzed using confocal SP5 microscope  
 784 (Leica) or TI-Eclipse (Nikon).

785  
 786 **Antibodies**

787

| Antibody or Dye                        | Species and Utility | Dilution Factor | Manufacturer and Reference            |
|--|---------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Anti-Cytochrome-C                      | Mouse - primary     | 1:300           | Cell Signaling Technologies<br>12963S |
| Anti-MACF1                             | Rabbit - primary    | 1:100           | Santa Cruz<br>SC-68430                |
| Anti-TOM20                             | Rabbit - primary    | 1:1000          | Cell Signaling Technologies<br>D8T4N  |
| Anti-OXPHOS                            | Mouse - primary     | 1:1000          | Abcam<br>Ab110413                     |
| Anti- $\alpha$ -Tubulin                | Mouse - primary     | 1:1000          | Sigma<br>T6074-200uL                  |
| Anti-HSP90                             | Mouse - primary     | 1:1000          | Enzo life<br>SPA830                   |
| Anti-Tyrosinated Tubulin               | Rat - primary       | 1:100           | Andrieux's Lab gift                   |
| Anti-deTyrosinated Tubulin             | Rabbit - primary    | 1:100           | Andrieux's Lab gift                   |
| MF20                                   | Mouse-primary       | 1:10            | DSHB                                  |
| Dapi-brilliant blue                    | Dye                 | 1:50000         | Thermo Fisher Scientifics<br>D1306    |
| $\alpha$ -Bungarotoxin-Alexa Flour 488 | Dye                 | 1:1000          | Thermo Fisher Scientifics<br>B13422   |
| $\alpha$ -Bungarotoxin-Alexa Flour 555 | Dye                 | 1:200           | Thermo Fisher Scientifics<br>B35451   |
| Phalloidin-Alexa Flour 647             | Dye                 | 1:100           | Thermo Fisher Scientifics<br>A22287   |
| Anti-mouse-HRP                         | Goat - secondary    | 1:3000          | Invitrogen<br>62-6520                 |
| Anti-rabbit-HRP                        | Goat - secondary    | 1:3000          | Invitrogen<br>65-6120                 |
| Anti-rat-Alexa Flour 488               | Donkey - secondary  | 1:500           | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21208  |
| Anti-rabbit-Alexa Flour 647            | Goat - secondary    | 1:500           | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21245  |



|                            |                  |       |                                      |
|----------------------------|------------------|-------|--------------------------------------|
| Anti-mouse-Alexa Flour 647 | Goat - secondary | 1:500 | Thermo Fisher Scientifics<br>A-21240 |
|----------------------------|------------------|-------|--------------------------------------|

788

## 789 **Video-Microscopy**

790

791 Time-lapse images were acquired using Z1-AxioObserver (Zeiss) with intervals of 15minutes.  
792 Final videos were analyzed using Metamorph (Zeiss) and SkyPad plugin as described before  
793 (Cadot et al., 2014).

794

## 795 **Electronic-Microscopy**

796

797 Tissues were cut into small pieces and fixed in 2% glutaraldehyde for 2H at 4°C. Samples were  
798 washed three times for 1H at 4°C and post-fixed with 2% OsO<sub>4</sub> 1H at 4°C. Then tissues were  
799 dehydrated with an increasing ethanol gradient (5min in 30%, 50%, 70%, 95%) and 3 times for  
800 10min in absolute ethanol. Impregnation was performed with Epon A (75%) plus Epon B  
801 (25%) plus DMP30 (1,7%). Inclusion was obtained by polymerization at 60°C for 72H.  
802 Ultrathin sections (approximately 70 nm thick) were cut on a UC7 (Leica) ultra-microtome,  
803 mounted on 200 mesh copper grids coated with 1:1,000 polylysine, and stabilized for 1 day at  
804 room temperature (RT) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were  
805 acquired with a Jeol 1400JEM (Tokyo,Japan) transmission electron microscope, 80Kv,  
806 equipped with a Orius 600 camera and Digital Micrograph.

807

## 808 ***Drosophila* model**

809

810 Shot GD9507 UAS-RNAi line from VDRC collection crossed to Mef2-GAL4 driver has been  
811 used to attenuate shot gene expression specifically in muscles. Third instar larvae were  
812 dissected in physiological salt with 25mM EDTA. Body wall muscles were fixed with 4%  
813 formaldehyde in PBS for 15min and then rinsed three times for 5min each in PBS with 0.5%  
814 Tween 20 (PBT). Muscles were blocked for 30min with 20% horse serum in PBT at RT.  
815 Staining was performed by using primary antibodies applied overnight at 4°C and after washing  
816 3 times in PBT secondary antibodies were applied at RT for 1H. The following primary  
817 antibodies were used: anti-Brp1 (1:100; DSHB, Nc82-s), anti-Shot (1:100; DSHB, mAbRod1).

818

## 819 **Mouse model**

820 The following mice have been described previously, mice that carry a loxP-flanked allele of  
821 *Macf1* (Goryunov et al., 2010) and Hsa-Cre transgenic mice (Miniou et al., 1999). All of the  
822 experiments and procedures were conducted in accordance with the guidelines of the local  
823 animal ethics committee of the University Claude Bernard – Lyon 1 and in accordance with  
824 French and European legislation on animal experimentation and approved by the ethics  
825 committee CECCAPP and the French ministry of research. At least 3 *Macf1<sup>fl/fl</sup>* Cre- or Cre+  
826 mice were tested for each experiment.

## 827 **Genotyping of mice**

828

829 In order to extract the DNA, samples (mice tails) were incubated in extraction solution (25mM  
830 NaOH – 0.2mM EDTA) for 30min at 95°C. Following the addition of neutralization solution  
831 (40mM Tris-HCL), samples were centrifuged at 13000RPM for 2min at RT and the DNA were  
832 collected. DNA concentration was evaluated using Nanodrop (ThermoFisher Scientifics). PCR  
833 were carried (Hot Start Taq polymerase (QIAGEN, 1007837), PCR buffer mix (QIAGEN,

834 1005479) DNTP mix (Biolabs, 447)) using following primers. The same amount of PCR  
835 products were then loaded in 2X Agarose-1X TAE gels and were migrated for 2H at 130V.  
836 Results were obtained using GelDoc (BioRad).  
837

| Primer  | Sequence                    |
|---------|-----------------------------|
| MACF1 F | CATCAGAAGAGATCAACCAACC      |
| MACF1 R | AAAGGAAGAGAGGTCCAAGGT       |
| Cre F   | GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG |
| Cre R   | CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCC |
| CD8 F   | GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC     |
| CD8 R   | GCAGACAGAGCTGATTCCTATGTG    |

838

### 839 RNA extraction

840 After the addition of Trizol (Sigma, T9424-200mL) on each sample, lysing matrix D and fast  
841 prep system (MPbio, 6913-100) were used for sample digestion and pre-RNA extraction. In  
842 order to extract RNA, samples were incubated in chloroform for 5min at RT, centrifuged for  
843 15min at 12000 ref at 4°C and incubated in the tubes containing isopropanol (precipitation of  
844 RNA) for 10min at RT. following a centrifuge of samples for 15min at 12000ref at 4°C,  
845 samples were washed 2 times with 70% ethanol and the final RNA pellets were diluted in ultra-  
846 pure RNase free water (Invitrogen, 10977-035). RNA concentration was calculated using  
847 Nanodrop (ThermoFisher Scientific).

### 848 RT-q-PCR

849 Goscript Reverse Transcriptase System (Promega, A5001) was used, as described by the  
850 manufacturer to produce the cDNA. Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)(Roche,  
851 04913914001) and CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) were used to  
852 carry out the quantitative PCR using the following primer sets. The CT of target genes were  
853 normalized on 3 control genes.

| Primers              | Sequence               |
|----------------------|------------------------|
| MACF1 isoforms 1&2 F | AATACCGGTTCTTCCTCGGC   |
| MACF1 isoforms 1&2 R | CATCCTCCACCAACTCGGAC   |
| MACF1 isoform 2 F    | TTGCGTGTGCTGAAGAAGAC   |
| MACF1 isoform 2 R    | GCAGAGTCTTTTGTTCCTGCTG |
| ChRNA F              | TTCCTTCGATGAGCAGAACT   |
| ChRNA R              | GGGCAGCAGGAGTAGAACAC   |
| Gusb F               | GAGGATTGCCAACGAAACCG   |
| Gusb R               | GTGTCTGGGGACCACCTTTGA  |
| GAPDH F              | AACTTTGGCATTGTGGAAGG   |
| GAPDH R              | ACACATTGGGGGTAGGAACA   |
| RpL4 F               | GCCATGAGAGCGAAGTGG     |
| RpL4 R               | CTCCTGCAGGCGTCGTAG     |

854

### 855 Histological staining and analysis

856 *Tibialis anterior*, *Soleus* and *Gastrocnimius* muscles were collected, embedded in tragacanth  
857 gum, and quickly frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Cross-sections (10 $\mu$ m thick)  
858 were obtained from the middle portion of frozen muscles and processed for histological,  
859 immunohistochemical, enzymohistological analysis according to standard protocols. The fibre  
860 cross-sectional area and the number of centrally nucleated fibers were determined using  
861 Laminin and Dapi-stained sections. Fluorescence microscopy and transmission microscopy  
862 were performed using Axioimager Z1 microscope with CP Achromat 5x/0.12, 10x/0.3 Ph1, or  
863 20x/0.5 Plan NeoFluar objectives (Zeiss). Images were captured using a charge- coupled device  
864 monochrome camera (Coolsnap HQ, Photometrics) or color camera (Coolsnap colour) and  
865 MetaMorph software. For all imaging, exposure settings were identical between compared  
866 samples. Fiber number and size, central nuclei and peripheral myonuclei were calculated using  
867 ImageJ software.

### 868 **Succinate DeHydrogenase (SDH) staining and analysis**

869 SDH staining was performed as previously described (NACHLAS et al., 1957). Briefly,  
870 transverse sections (8 $\mu$ m) were cut from the mid-belly of the TA muscles on a cryostat at  
871  $-20^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until SDH staining was performed. The sections were dried at room  
872 temperature for 30min before incubation in a solution made up of 0.2M phosphate buffer (pH  
873 7.4), 0.1M  $\text{MgCl}_2$ , 0.2M Succinic Acid (Sigma) and 2.4mM NitroBlue Tetrazolium (NBT,  
874 Sigma) at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidity chamber for 45min. The sections were then washed in deionized  
875 water for 3min, dehydrated in 50% ethanol for 2min, and mounted for viewing with DPX  
876 mount medium (Electron Microscopy Sciences). Images were acquired as described above.

### 877 **Confocal imaging of T-tubule network**

878  
879 *FDB* muscle fibers were incubated for 30min in the presence of 10 $\mu$ m di-8-anepps in Tyrode  
880 solution. Estimation of the T-tubule density from the di-8-anepps fluorescence was carried out  
881 from a largest possible region of interest excluding the plasma membrane, within each fiber.  
882 For each fiber, two images taken at distinct locations were used. Analysis was carried out with  
883 the ImageJ software (National Institute of Health). Automatic threshold with the Otsu method  
884 was used to create a binary image of the surface area occupied by T-tubules. The “skeletonize”  
885 function was then used to delineate the T-tubule network. T-tubule density was expressed as  
886 the percent of positive pixels within the region. Sarcomere length was estimated from half the  
887 number of fluorescence peaks (T-tubules) along the length of the main axis of a given fiber. To  
888 assess variability in T-tubule orientation, objects within two T-tubule binary images of each  
889 fiber were outlined and particle analysis was performed to determine the angle of all objects  
890 yielding a perimeter larger than an arbitrary value of 10 $\mu$ m. For each fiber, the standard  
891 deviation of angle values was then calculated. This analysis was performed on 10 muscle fibers  
892 from 3 *Mac1f/f Cre-* and from 3 *Mac1f/f Cre+* mice, respectively.

### 893 894 **Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ in voltage-clamped fibers**

895  
896 Single fibers were isolated from *FDB* muscles as described previously (Jacquemond, 1997). In  
897 brief, muscles were incubated for 60min at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence of external Tyrode containing  
898 2 mg/mL collagenase (Sigma, type 1). Single fibers were obtained by triturating the  
899 collagenase-treated muscles within the experimental chamber.

900 Isolated muscle fibers were handled with the silicone voltage-clamp technique (Lefebvre et al.,  
901 2014). Briefly, fibers were partly insulated with silicone grease so that only a short portion (50-  
902 100 $\mu$ m long) of the fiber extremity remained out of the silicone. Fibers were bathed in a  
903 standard voltage-clamp extracellular solution containing (in mM) 140 TEA-methanesulfonate,

904 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 4-aminopyridine, 10 HEPES and 0.002 tetrodotoxin. An RK-400 patch-  
905 clamp amplifier (Bio-Logic, Claix) was used in whole-cell configuration in combination with  
906 an analog-digital converter (Axon Instruments, Digidata 1440A) controlled by pClamp 9  
907 software (Axon Instruments). Voltage-clamp was performed with a micropipette filled with a  
908 solution containing (in mM) 120 K-glutamate, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 5 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine, 5.5 MgCl<sub>2</sub>,  
909 15 EGTA, 6 CaCl<sub>2</sub>, 0.1 rhod-2, 5 glucose, 5 HEPES. The tip of the micropipette was inserted  
910 through the silicone within the insulated part of the fiber and was gently crushed against the  
911 bottom of the chamber to ease intracellular equilibration and decrease the series resistance.  
912 Intracellular equilibration of the solution was allowed for 30min before initiating  
913 measurements. Membrane depolarizing steps of 0.5s duration were applied from -80mV.  
914 Confocal imaging was conducted with a Zeiss LSM 5 Exciter microscope equipped with a 63x  
915 oil immersion objective (numerical aperture 1.4). Rhod-2 fluorescence was detected in line-  
916 scan mode (x,t, 1.15 ms per line) above 560nm, upon excitation from the 543nm line of a HeNe  
917 laser. Rhod-2 fluorescence transients were expressed as F/F<sub>0</sub> where F<sub>0</sub> is the baseline  
918 fluorescence. The Ca<sup>2+</sup> release flux (rate of SR Ca<sup>2+</sup> release) was estimated from the time  
919 derivative of the total myoplasmic Ca<sup>2+</sup> ([Catot]) calculated from the occupancy of  
920 intracellular calcium binding sites following a previously described procedure (Kutchukian et  
921 al., 2017).

922

### 923 ***In vivo* force measurements**

924 Mice were initially anesthetized in an induction chamber using 4% isoflurane. The right  
925 *Hindlimb* was shaved before an electrode cream was applied at the knee and heel regions to  
926 optimize electrical stimulation. Each anesthetized mouse was placed supine in a cradle  
927 allowing for a strict standardization of the animal positioning. Throughout a typical experiment,  
928 anesthesia was maintained by air inhalation through a facemask continuously supplied with  
929 1.5% isoflurane. The cradle also includes an electrical heating blanket in order to maintain the  
930 animal at a physiological temperature during anesthesia. Electrical stimuli were delivered  
931 through two electrodes located below the knee and the Achille's tendon. The right foot was  
932 positioned and firmly immobilized through a rigid slipper on a pedal of an ergometer  
933 (NIMPHEA\_Research, AII Biomedical SAS) allowing for the measurement of the force  
934 produced by the Hindlimb muscles (i.e., mainly the *Gastrocnemius* muscle). The right knee  
935 was also firmly maintained using a rigid fixation in order to optimize isometric force  
936 recordings. Monophasic rectangular pulses of 0.2ms were delivered using a constant-current  
937 stimulator (Digitimer DS7AH, maximal voltage: 400V). The force-frequency curves were  
938 determined by stepwise increasing stimulation frequency, with resting periods > 30s between  
939 stimuli in order to avoid effects due to fatigue. For each stimulation train, isometric peak force  
940 was calculated. After a 3-min recovery period, force was assessed during a fatigue protocol  
941 consisting of 30Hz stimulation trains of 0.3s delivered once every second for 180s. The peak  
942 force of each contraction was measured and averaged every 5 contractions. A fatigue index  
943 corresponding to the ratio between the last five and the first five contractions was determined.  
944 Force signal was sampled at 1000Hz using a Powerlab system and Labchart software  
945 (ADInstruments).

### 946 **Quantification methods for myonuclei spreading in myotubes**

947 Quantifications in immature myotubes were assessed using an analysis tool developed in our  
948 team. An image analysis performed in ImageJ® software is combined with a statistical analysis  
949 in RStudio® software. This provides quantifications of parameters, ranked by myonuclei  
950 content per myotubes, regarding phenotype of myotubes (area, length) and their respective  
951 myonuclei positioning compare to centroid of myotubes (DMcM).

952 MSG diagrams were obtained through the normalization of lengths of all analyzed myotubes  
953 (independently to their myonuclei content) to 100%. White lines represent myonuclei density  
954 curves assessing the statistical frequency for myonuclei positioning along myotubes. Each color  
955 group reflects statistical estimation of myonuclei clustering along myotubes.

#### 956 957 **Quantification methods for EB1 Comets**

958 To determine EB1 comets speed, four continuous frame of a time-lapse movie of EB1-GFP  
959 were overlapped, the first two are color-coded in green and the last two are color-coded in red.  
960 Comets length was counted if green and red length were equal, traducing a comets growing in  
961 the same focal plan.

#### 962 **Quantification of mitochondria fragmentation**

963 In order to analyze mitochondria repartition, Cytochrome-C staining was used as representative  
964 of the mitochondrial network in long differentiated myofibers. Representative images were  
965 taken from myofibers and the analysis of images was done using ImageJ® software. One or  
966 several Regions Of Interest (ROI) were selected per image, these regions were set just next-to  
967 or close to myonuclei. Following a threshold determination, the whole information of each  
968 stained particle (representing a single or a group of mitochondria) was extracted from ImageJ  
969 software. The particles with circularity equivalent to 1 were eliminated in order to purify our  
970 results from any unwanted background errors. Particles with feret less than 0.75µm (mean size  
971 of mitochondria) were eliminated to purify our results. Finally, the ratio of number of particles  
972 per area of ROI was calculated.

#### 973 974 **Quantification of AChRs fragmentation**

975 Bungarotoxin staining was used to analyze formation of acetylcholine receptors clusters in  
976 mature myofibers. Representative images were taken from myofibers of each condition as  
977 described before and the analysis of images was done using ImageJ® software. Briefly, a  
978 threshold of 8µm was set as the minimal size for AChRs clusters. Myofibers with at least one  
979 cluster of 8µm or bigger were considered as positive.

#### 980 981 982 **Statistical analysis**

983 The statistical analyses were performed using Student's t test or the Mann-Whitney test  
984 according to samples amount and distribution

#### 985 **References**

- 986  
987 Alves-Silva, J., N. Sanchez-Soriano, R. Beaven, M. Klein, J. Parkin, T.H. Millard, H.J. Bellen, K.J.T.  
988 Venken, C. Ballestrem, R.A. Kammerer, and A. Prokop. 2012. Spectraplakins promote microtubule-  
989 mediated axonal growth by functioning as structural microtubule-associated proteins and EB1-  
990 dependent +TIPs (tip interacting proteins). *J. Neurosci.* 32:9143–9158.  
991 doi:10.1523/JNEUROSCI.0416-12.2012.
- 992 Basu, S., S. Sladeczek, H. Pemble, T. Wittmann, J.A. Slotman, W. van Cappellen, H.R. Brenner, and N.  
993 Galjart. 2014. Acetylcholine Receptor (AChR) Clustering Is Regulated Both by Glycogen Synthase  
994 Kinase 3β (GSK3β)-dependent Phosphorylation and the Level of CLIP-associated Protein 2  
995 (CLASP2) Mediating the Capture of Microtubule Plus-ends. *J. Biol. Chem.* 289:30857–30867.  
996 doi:10.1074/jbc.M114.589457.
- 997 Basu, S., S. Sladeczek, I. Martinez de la Peña y Valenzuela, M. Akaaboune, I. Smal, K. Martin, N. Galjart,

- 998 and H.R. Brenner. 2015. CLASP2-dependent microtubule capture at the neuromuscular junction  
999 membrane requires LL5 $\beta$  and actin for focal delivery of acetylcholine receptor vesicles. *Mol. Biol.*  
1000 *Cell*. 26:938–951. doi:10.1091/mbc.E14-06-1158.
- 1001 Bernier, G., M. Pool, M. Kilcup, J. Alfoldi, Y. De Repentigny, and R. Kothary. 2000. Acf7 (MACF) is an  
1002 actin and microtubule linker protein whose expression predominates in neural, muscle, and lung  
1003 development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of*  
1004 *Anatomists*. 219:216–225. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1041>3.0.CO;2-  
1005 O.
- 1006 Bitoun, M., S. Maugendre, P.-Y. Jeannet, E. Lacène, X. Ferrer, P. Laforêt, J.-J. Martin, J. Laporte, H.  
1007 Lochmüller, A.H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N.B. Romero, and P. Guicheney. 2005. Mutations  
1008 in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 37:1207–1209.  
1009 doi:10.1038/ng1657.
- 1010 Bonaldo, P., and M. Sandri. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models*  
1011 *& mechanisms*. 6:25–39. doi:10.1242/dmm.010389.
- 1012 Bottenberg, W., N. Sanchez-Soriano, J. Alves-Silva, I. Hahn, M. Mende, and A. Prokop. 2009. Context-  
1013 specific requirements of functional domains of the Spectraplakins Short stop in vivo. *Mechanisms of*  
1014 *development*. 126:489–502. doi:10.1016/j.mod.2009.04.004.
- 1015 Boyer, J.G., M.A. Bernstein, and C. Boudreau Larivière. 2010. Plakins in striated muscle. *Muscle Nerve*.  
1016 41:299–308. doi:10.1002/mus.21472.
- 1017 Brooks, N.E., M.D. Schuenke, and R.S. Hikida. 2009. Ageing influences myonuclear domain size  
1018 differently in fast and slow skeletal muscle of rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 197:55–63.  
1019 doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01983.x.
- 1020 Bruusgaard, J.C., K. Liestøl, and K. Gundersen. 2006. Distribution of myonuclei and microtubules in live  
1021 muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *Journal of Applied Physiology*. 100:2024–2030.  
1022 doi:10.1152/jappphysiol.00913.2005.
- 1023 Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules  
1024 during cellular morphogenesis. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and*  
1025 *developmental biology*. 13:285–293. doi:10.1002/bies.950130605.
- 1026 Cadot, B., V. Gache, and E.R. Gomes. 2014. Fast, multi-dimensional and simultaneous kymograph-like  
1027 particle dynamics (SkyPad) analysis. *PLoS ONE*. 9:e89073. doi:10.1371/journal.pone.0089073.
- 1028 Cadot, B., V. Gache, E. Vasyutina, S. Falcone, C. Birchmeier, and E.R. Gomes. 2012. Nuclear movement  
1029 during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and  
1030 Par3. *EMBO Rep*. 13:741–749. doi:10.1038/embor.2012.89.
- 1031 Casey, L.M., H.D. Lyon, and J.B. Olmsted. 2003. Muscle-specific microtubule-associated protein 4 is  
1032 expressed early in myogenesis and is not sufficient to induce microtubule reorganization. *Cell Motil.*  
1033 *Cytoskeleton*. 54:317–336. doi:10.1002/cm.10105.
- 1034 Chang, W., S. Antoku, C. Östlund, H.J. Worman, and G.G. Gundersen. 2015. Linker of nucleoskeleton  
1035 and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes  
1036 in migrating myoblasts. *Nucleus*. 6:77–88. doi:10.1080/19491034.2015.1004947.
- 1037 Cho, S., J. Irianto, and D.E. Discher. 2017. Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling  
1038 relationships. *J. Cell Biol*. 216:305–315. doi:10.1083/jcb.201610042.
- 1039 Chojnowski, A., P.F. Ong, and O. Dreesen. 2015. Nuclear lamina remodelling and its implications for  
1040 human disease. *Cell Tissue Res*. 360:621–631. doi:10.1007/s00441-014-2069-4.
- 1041 Collins, M.A., T.R. Mandigo, J.M. Camuglia, G.A. Vazquez, A.J. Anderson, C.H. Hudson, J.L. Hanron,  
1042 and E.S. Folker. 2017. Emery-Dreifuss muscular dystrophy-linked genes and centronuclear

- 1043 myopathy-linked genes regulate myonuclear movement by distinct mechanisms. *Mol. Biol. Cell.*  
1044 28:2303–2317. doi:10.1091/mbc.E16-10-0721.
- 1045 Drabek, K., M. van Ham, T. Stepanova, K. Draegestein, R. van Horsen, C.L. Sayas, A. Akhmanova, T.  
1046 Ten Hagen, R. Smits, R. Fodde, F. Grosveld, and N. Galjart. 2006. Role of CLASP2 in microtubule  
1047 stabilization and the regulation of persistent motility. *Current biology: CB.* 16:2259–2264.  
1048 doi:10.1016/j.cub.2006.09.065.
- 1049 Edström, E., M. Altun, E. Bergman, H. Johnson, S. Kullberg, V. Ramírez-León, and B. Ulfhake. 2007.  
1050 Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol. Behav.*  
1051 92:129–135. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.040.
- 1052 Escobar-Aguirre, M., H. Zhang, A. Jamieson-Lucy, and M.C. Mullins. 2017. Microtubule-actin  
1053 crosslinking factor 1 (Macf1) domain function in Balbiani body dissociation and nuclear positioning.  
1054 *PLoS genetics.* 13:e1006983. doi:10.1371/journal.pgen.1006983.
- 1055 Falcone, S., W. Roman, K. Hnia, V. Gache, N. Didier, J. Laine, F. Aurade, I. Marty, I. Nishino, N.  
1056 Charlet-Berguerand, N.B. Romero, G. Marazzi, D. Sassoon, J. Laporte, and E.R. Gomes. 2014. N-  
1057 WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in  
1058 skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med.*  
1059 6:1455–1475. doi:10.15252/emmm.201404436.
- 1060 Gache, V., E.R. Gomes, and B. Cadot. 2017. Microtubule motors involved in nuclear movement during  
1061 skeletal muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell.* mbc.E16–06–0405. doi:10.1091/mbc.E16-06-0405.
- 1062 Gache, V., M. Louwagie, J. Garin, N. Caudron, L. Lafanechere, and O. Valiron. 2005. Identification of  
1063 proteins binding the native tubulin dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:35–42.  
1064 doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.138.
- 1065 Gache, V., P. Waridel, C. Winter, A. Juhem, M. Schroeder, A. Shevchenko, and A.V. Popov. 2010.  
1066 *Xenopus* meiotic microtubule-associated interactome. *PLoS ONE.* 5:e9248.  
1067 doi:10.1371/journal.pone.0009248.
- 1068 Geevasinga, N., P. Menon, P.H. Özdinler, M.C. Kiernan, and S. Vucic. 2016. Pathophysiological and  
1069 diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol.*  
1070 doi:10.1038/nrneurol.2016.140.
- 1071 Gimpel, P., Y.L. Lee, R.M. Sobota, A. Calvi, V. Koullourou, R. Patel, K. Mamchaoui, F. Nedelec, S.  
1072 Shackleton, J. Schmoranzler, B. Burke, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. Nesprin-1 $\alpha$ -Dependent  
1073 Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear  
1074 Positioning in Muscle Cells. *Current biology: CB.* doi:10.1016/j.cub.2017.08.031.
- 1075 Gong, T.W., C.G. Besirli, and M.I. Lomax. 2001. MACF1 gene structure: a hybrid of plectin and  
1076 dystrophin. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society.*  
1077 12:852–861.
- 1078 Goryunov, D., and R.K.H. Liem. 2016. Microtubule-Actin Cross-Linking Factor 1. *In* Intermediate  
1079 Filament Associated Proteins. Elsevier. 331–353.
- 1080 Goryunov, D., C.-Z. He, C.-S. Lin, C.L. Leung, and R.K.H. Liem. 2010. Nervous-tissue-specific  
1081 elimination of microtubule-actin crosslinking factor 1a results in multiple developmental defects in  
1082 the mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 44:1–14. doi:10.1016/j.mcn.2010.01.010.
- 1083 Guerrero, K., C. Monge, A. Brückner, Ü. Puurand, L. Kadaja, T. Kaambre, E. Seppet, and V. Saks. 2009.  
1084 Study of possible interactions of tubulin, microtubular network, and STOP protein with  
1085 mitochondria in muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 337:239–249. doi:10.1007/s11010-009-0304-1.
- 1086 Guzun, R., M. Karu-Varikmaa, M. Gonzalez-Granillo, A.V. Kuznetsov, L. Michel, C. Cottet-Rousselle,  
1087 M. Saaremäe, T. Kaambre, M. Metsis, M. Grimm, C. Auffray, and V. Saks. 2011. Mitochondria-  
1088 cytoskeleton interaction: distribution of  $\beta$ -tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochimica et*

- 1089 *biophysica acta*. 1807:458–469. doi:10.1016/j.bbabbio.2011.01.010.
- 1090 iqbal, S., and D.A. Hood. 2014. Cytoskeletal Regulation of Mitochondrial Movements in Myoblasts.  
1091 *Cytoskeleton*. 1–9. doi:10.1002/cm.21188).
- 1092 Jacquemond, V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically  
1093 isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920–928. doi:10.1016/S0006-3495(97)78124-  
1094 4.
- 1095 Janin, A., and V. Gache. 2018. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal  
1096 Muscles. *Front Physiol.* 9:1277. doi:10.3389/fphys.2018.01277.
- 1097 Jungbluth, H., and M. Gautel. 2014. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front Aging*  
1098 *Neurosci.* 6:339. doi:10.3389/fnagi.2014.00339.
- 1099 Jørgensen, L.H., M.-B. Mosbech, N.J. Færgeman, J. Graakjaer, S.V. Jacobsen, and H.D. Schrøder. 2014.  
1100 Duplication in the Microtubule-Actin Cross-linking Factor 1 gene causes a novel neuromuscular  
1101 condition. *Scientific Reports.* 4:65–7. doi:10.1038/srep05180.
- 1102 Ka, M., and W.-Y. Kim. 2016. Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 Is Required for Dendritic  
1103 Arborization and Axon Outgrowth in the Developing Brain. *Molecular Neurobiology.* 53:6018–  
1104 6032. doi:10.1007/s12035-015-9508-4.
- 1105 Ka, M., E.-M. Jung, U. Mueller, and W.-Y. Kim. 2014. MACF1 regulates the migration of pyramidal  
1106 neurons via microtubule dynamics and GSK-3 signaling. *Dev. Biol.* 395:4–18.  
1107 doi:10.1016/j.ydbio.2014.09.009.
- 1108 Kim, H.-S., R. Murakami, S. Quintin, M. Mori, K. Ohkura, K.K. Tamai, M. Labouesse, H. Sakamoto, and  
1109 K. Nishiwaki. 2011. VAB-10 spectraplakins acts in cell and nuclear migration in *Caenorhabditis*  
1110 *elegans*. *Development.* 138:4013–4023. doi:10.1242/dev.059568.
- 1111 Kirby, T.J., and J. Lammerding. 2018. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat.*  
1112 *Cell Biol.* 1. doi:10.1038/s41556-018-0038-y.
- 1113 Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of  
1114 microtubule dynamics. *Cell.* 115:343–354.
- 1115 Kraus, F., and M.T. Ryan. 2017. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial  
1116 fission. *J. Cell. Sci.* 130:2953–2960. doi:10.1242/jcs.199562.
- 1117 Kumazawa, A., H. Katoh, D. Nonaka, T. Watanabe, M. Saotome, T. Urushida, H. Satoh, and H. Hayashi.  
1118 2014. Microtubule Disorganization Affects the Mitochondrial Permeability Transition Pore in  
1119 Cardiac Myocytes. *Circ J.* 78:1206–1215. doi:10.1253/circj.CJ-13-1298.
- 1120 Kutchukian, C., P. Szentesi, B. Allard, D. Trochet, M. Beuvin, C. Berthier, Y. Tourneur, P. Guicheney, L.  
1121 Csernoch, M. Bitoun, and V. Jacquemond. 2017. Impaired excitation-contraction coupling in muscle  
1122 fibres from the dynamin2R465W mouse model of centronuclear myopathy. *The Journal of*  
1123 *Physiology.* 595:7369–7382. doi:10.1113/JP274990.
- 1124 Laporte, J., L.J. Hu, C. Kretz, J.L. Mandel, P. Kioschis, J.F. Coy, S.M. Klauck, A. Poustka, and N. Dahl.  
1125 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine  
1126 phosphatase family conserved in yeast. *Nature genetics.* 13:175–182. doi:10.1038/ng0696-175.
- 1127 Lee, S., and P.A. Kolodziej. 2002. Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules  
1128 during axon extension. *Development.* 129:1195–1204.
- 1129 Lee, Y.L., and B. Burke. 2017. LINC complexes and nuclear positioning. *Seminars in Cell and*  
1130 *Developmental Biology.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.008.
- 1131 Lefebvre, R., S. Pouvreau, C. Collet, B. Allard, and V. Jacquemond. 2014. Whole-cell voltage clamp on

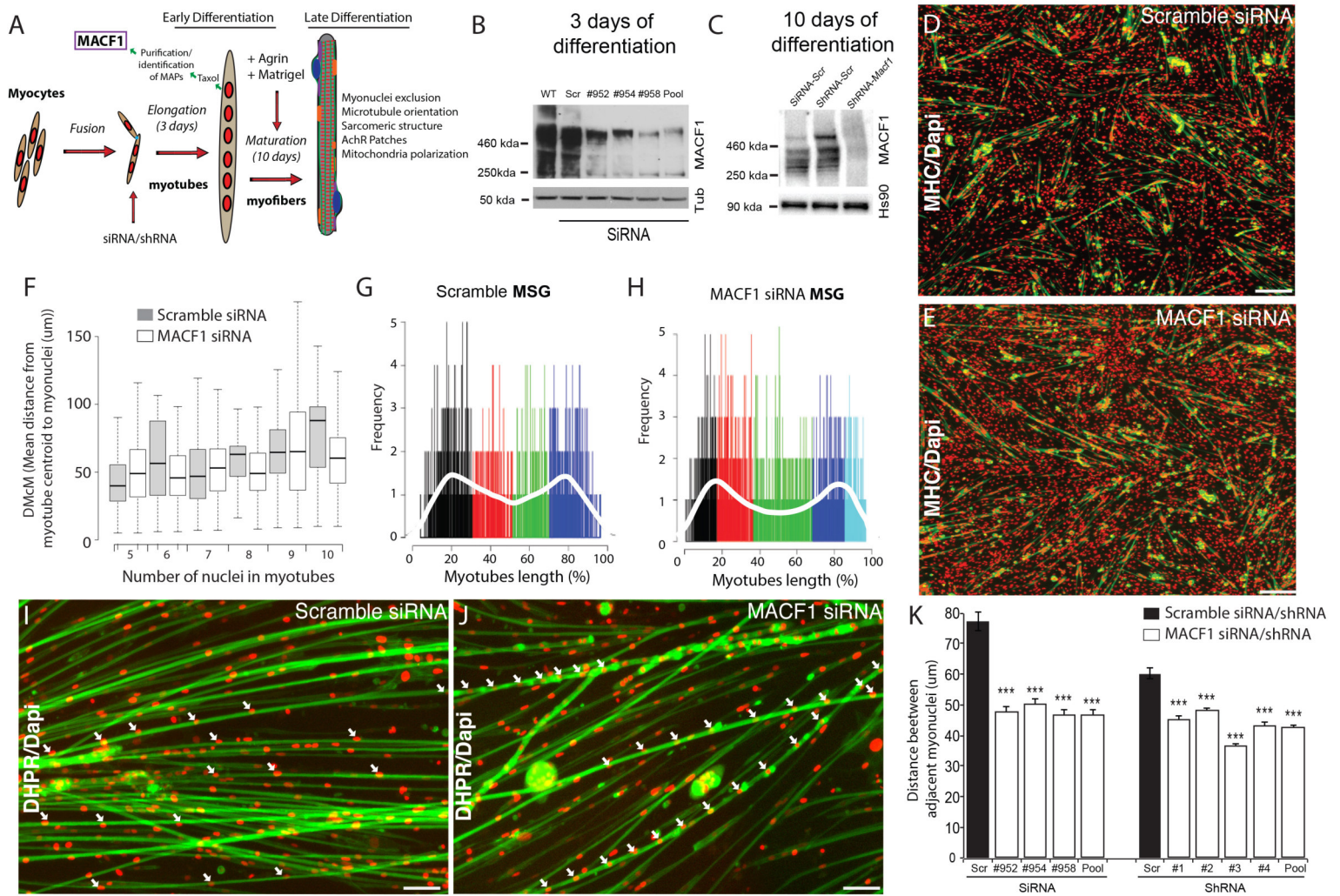


- 1132 skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique. *Methods Mol. Biol.* 1183:159–170.  
1133 doi:10.1007/978-1-4939-1096-0\_9.
- 1134 Levy, Y., J.A. Ross, M. Niglas, V.A. Snetkov, S. Lynham, C.-Y. Liao, M.J. Puckelwartz, Y.-M. Hsu,  
1135 E.M. McNally, M. Alsheimer, S.D. Harridge, S.G. Young, L.G. Fong, Y. Español, C. Lopez-Otin,  
1136 B.K. Kennedy, D.A. Lowe, and J. Ochala. 2018. Prelamin A causes aberrant myonuclear  
1137 arrangement and results in muscle fiber weakness. *JCI Insight.* 3. doi:10.1172/jci.insight.120920.
- 1138 Lin, W., B. Dominguez, J. Yang, P. Aryal, E.P. Brandon, F.H. Gage, and K.-F. Lee. 2005.  
1139 Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-  
1140 dependent mechanism. *Neuron.* 46:569–579. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.002.
- 1141 Malatesta, M., F. Perdoni, S. Muller, C. Zancanaro, and C. Pellicciari. 2009. Nuclei of aged myofibres  
1142 undergo structural and functional changes suggesting impairment in RNA processing. *Eur J*  
1143 *Histochem.* 53:97–106.
- 1144 Manhart, A., S. Windner, M. Baylies, and A. Mogilner. 2018. Mechanical positioning of multiple nuclei  
1145 in muscle cells. *PLoS Comput. Biol.* 14:e1006208. doi:10.1371/journal.pcbi.1006208.
- 1146 Mattioli, E., M. Columbaro, C. Capanni, N.M. Maraldi, V. Cenni, K. Scotlandi, M.T. Marino, L. Merlini,  
1147 S. Squarzoni, and G. Lattanzi. 2011. Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear  
1148 envelope directs nuclear positioning in human muscle. *Cell death and differentiation.* 18:1305–1315.  
1149 doi:10.1038/cdd.2010.183.
- 1150 Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies.  
1151 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function.  
1152 *Nature.* 484:120–124. doi:10.1038/nature10914.
- 1153 Méjat, A., V. Decostre, J. Li, L. Renou, A. Kesari, D. Hantaï, C.L. Stewart, X. Xiao, E. Hoffman, G.  
1154 Bonne, and T. Misteli. 2009. Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-  
1155 Drefuss muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 184:31–44. doi:10.1083/jcb.200811035.
- 1156 Miniou, P., D. Tiziano, T. Frugier, N. Roblot, M. Le Meur, and J. Melki. 1999. Gene targeting restricted  
1157 to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res.* 27:e27.
- 1158 Mogessie, B., D. Roth, Z. Rahil, and A. Straube. 2015. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial  
1159 microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife.* 4:e05697. doi:10.7554/eLife.05697.
- 1160 Muhammad, E., O. Reish, Y. Ohno, T. Scheetz, A. Deluca, C. Searby, M. Regev, L. Benyamini, Y.  
1161 Fellig, A. Kihara, V.C. Sheffield, and R. Parvari. 2013. Congenital myopathy is caused by mutation  
1162 of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22:5229–5236. doi:10.1093/hmg/ddt380.
- 1163 Muller, A.J., J.F. Baker, J.B. DuHadaway, K. Ge, G. Farmer, P.S. Donover, R. Meade, C. Reid, R.  
1164 Grzanna, A.H. Roach, N. Shah, A.P. Soler, and G.C. Prendergast. 2003. Targeted disruption of the  
1165 murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic  
1166 cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Molecular and cellular biology.* 23:4295–4306.
- 1167 NACHLAS, M.M., K.C. TSOU, E. DE SOUZA, C.S. CHENG, and A.M. SELIGMAN. 1957.  
1168 Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl  
1169 substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem.* 5:420–436. doi:10.1177/5.4.420.
- 1170 Nieuwenhuis, J., and T.R. Brummelkamp. 2019. The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and  
1171 Enzymes. *Trends in Cell Biology.* 29:80–92. doi:10.1016/j.tcb.2018.08.003.
- 1172 Noordstra, I., Q. Liu, W. Nijenhuis, S. Hua, K. Jiang, M. Baars, S. Remmelzwaal, M. Martin, L.C.  
1173 Kapitein, and A. Akhmanova. 2016. Control of apico-basal epithelial polarity by the microtubule  
1174 minus-end-binding protein CAMSAP3 and spectraplakins ACF7. *J. Cell. Sci.* 129:4278–4288.  
1175 doi:10.1242/jcs.194878.
- 1176 Norton, H.K., and J.E. Phillips-Cremins. 2017. Crossed wires: 3D genome misfolding in human disease.

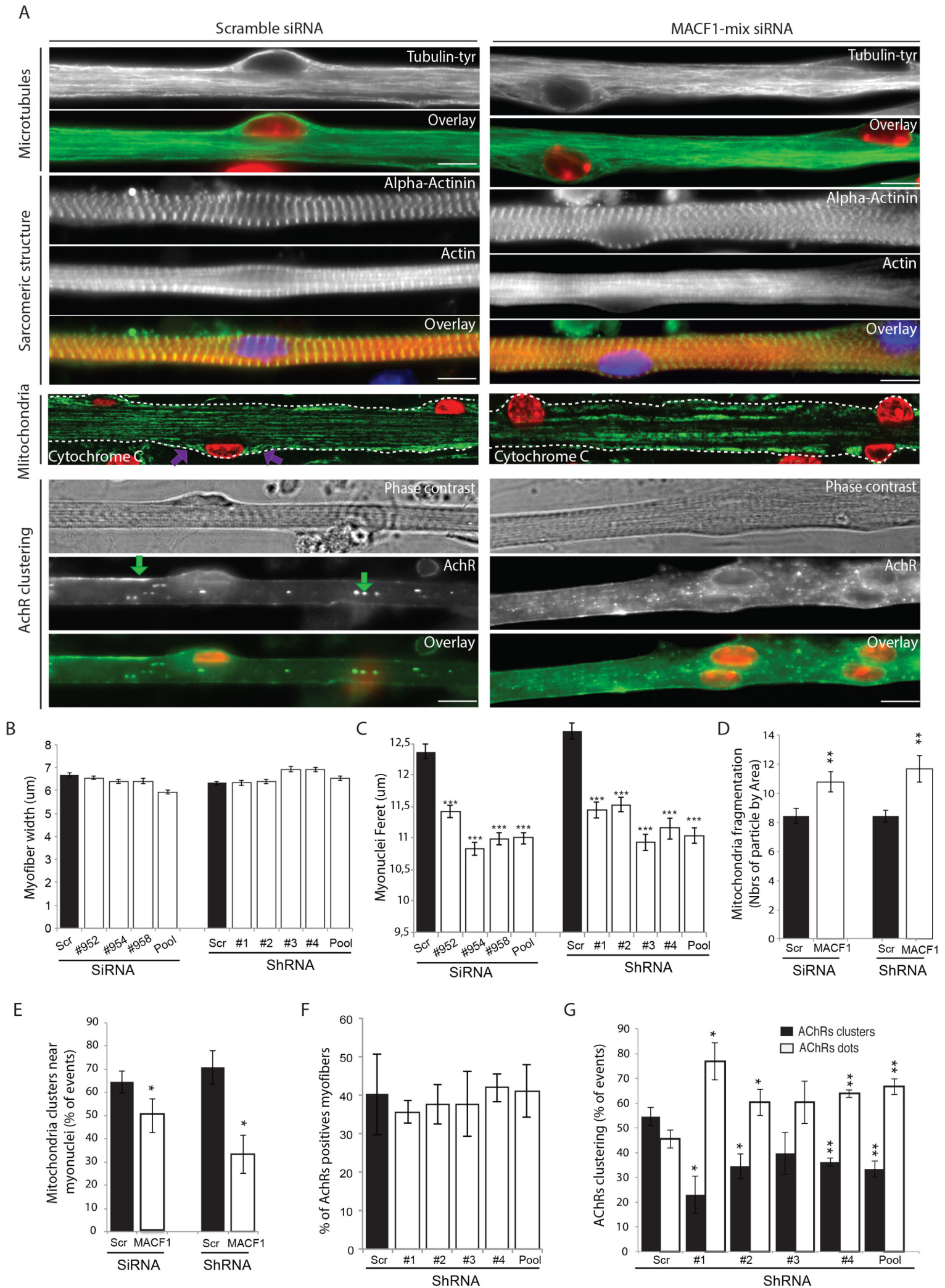
- 1177 *J. Cell Biol.* 216:3441–3452. doi:10.1083/jcb.201611001.
- 1178 Perillo, M., and E.S. Folker. 2018. Specialized Positioning of Myonuclei Near Cell-Cell Junctions. *Front*  
1179 *Physiol.* 9:1531. doi:10.3389/fphys.2018.01531.
- 1180 Pimentel, M.R., S. Falcone, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. In Vitro Differentiation of Mature  
1181 Myofibers for Live Imaging. *Journal of visualized experiments: JoVE.* e55141–e55141.  
1182 doi:10.3791/55141.
- 1183 Puckelwartz, M.J., E. Kessler, Y. Zhang, D. Hodzic, K.N. Randles, G. Morris, J.U. Earley, M. Hadhazy,  
1184 J.M. Holaska, S.K. Mewborn, P. Pytel, and E.M. McNally. 2009. Disruption of nesprin-1 produces  
1185 an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Hum. Mol. Genet.* 18:607–620.  
1186 doi:10.1093/hmg/ddn386.
- 1187 Ralston, E., T. Ploug, J. Kalhovde, and T. Lømo. 2001. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites,  
1188 and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J. Neurosci.* 21:875–  
1189 883.
- 1190 Ramdas, N.M., and G.V. Shivashankar. 2015. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin  
1191 organization. *Journal of molecular biology.* 427:695–706. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.008.
- 1192 Ravel-Chapuis, A., M. Vandromme, J.-L. Thomas, and L. Schaeffer. 2007. Postsynaptic chromatin is  
1193 under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J.* 26:1117–1128.  
1194 doi:10.1038/sj.emboj.7601572.
- 1195 Razafsky, D., and D. Hodzic. 2015. Nuclear envelope: positioning nuclei and organizing synapses.  
1196 *Current opinion in cell biology.* 34:84–93. doi:10.1016/j.ceb.2015.06.001.
- 1197 Rivero, S., J. Cardenas, M. Bornens, and R.M. Rios. 2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the  
1198 Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. 1–13. doi:10.1038/emboj.2009.47.
- 1199 Robson, M.I., J.I. de Las Heras, R. Czapiewski, P. Lê Thành, D.G. Booth, D.A. Kelly, S. Webb, A.R.W.  
1200 Kerr, and E.C. Schirmer. 2016. Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle Nuclear Membrane  
1201 Proteins Enhances Repression of Critical Developmental Genes during Myogenesis. *Mol. Cell.*  
1202 62:834–847. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.035.
- 1203 Roman, W., and E.R. Gomes. 2017. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Seminars in Cell and*  
1204 *Developmental Biology.* doi:10.1016/j.semcd.2017.11.005.
- 1205 Roman, W., J.P. Martins, F.A. Carvalho, R. Voituriez, J.V.G. Abella, N.C. Santos, B. Cadot, M. Way,  
1206 and E.R. Gomes. 2017. Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the  
1207 periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 15:1376–33. doi:10.1038/ncb3605.
- 1208 Ryan, S.D., K. Bhanot, A. Ferrier, Y. De Repentigny, A. Chu, A. Blais, and R. Kothary. 2012.  
1209 Microtubule stability, Golgi organization, and transport flux require dystonin-a2-MAP1B  
1210 interaction. *J. Cell Biol.* 196:727–742. doi:10.1083/jcb.201107096.
- 1211 Sanchez-Soriano, N., M. Travis, F. Dajas-Bailador, C. Gonçalves-Pimentel, A.J. Whitmarsh, and A.  
1212 Prokop. 2009. Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule  
1213 organisation during neuronal growth. *J. Cell. Sci.* 122:2534–2542. doi:10.1242/jcs.046268.
- 1214 Schmidt, N., S. Basu, S. Sladecsek, S. Gatti, J. van Haren, S. Treves, J. Pielage, N. Galjart, and H.R.  
1215 Brenner. 2012. Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular  
1216 junction synaptic membrane. *J. Cell Biol.* 198:421–437. doi:10.1083/jcb.201111130.
- 1217 Shi, P., Y. Wang, Y. Huang, C. Zhang, Y. Li, Y. Liu, T. Li, W. Wang, X. Liang, and C. Wu. 2019.  
1218 Arp2/3-branched actin regulates microtubule acetylation levels and affects mitochondrial  
1219 distribution. *J. Cell. Sci.* 132:jcs226506–10. doi:10.1242/jcs.226506.
- 1220 Starr, D.A. 2017. Muscle Development: Nucleating Microtubules at the Nuclear Envelope. *Current*

- 1221 *biology: CB*. 27:R1071–R1073. doi:10.1016/j.cub.2017.08.030.
- 1222 Sun, Y., J. Zhang, S.K. Kraeft, D. Auclair, M.S. Chang, Y. Liu, R. Sutherland, R. Salgia, J.D. Griffin,  
1223 L.H. Ferland, and L.B. Chen. 1999. Molecular cloning and characterization of human trabeculin-  
1224 alpha, a giant protein defining a new family of actin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274:33522–  
1225 33530.
- 1226 Tanabe, K., and K. Takei. 2009. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired  
1227 in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J. Cell Biol.* 185:939–948. doi:10.1083/jcb.200803153.
- 1228 Vilmont, V., B. Cadot, E. Vezin, F. Le Grand, and E.R. Gomes. 2016. Dynein disruption perturbs post-  
1229 synaptic components and contributes to impaired MuSK clustering at the NMJ: implication in ALS.  
1230 *Scientific Reports*. 6:27804. doi:10.1038/srep27804.
- 1231 Wang, S., A. Reuveny, and T. Volk. 2015. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by  
1232 cooperating with spectraplakins and EB1. *J. Cell Biol.* 209:529–538. doi:10.1083/jcb.201408098.
- 1233 Wang, Z., J. Cui, W.M. Wong, X. Li, W. Xue, R. Lin, J. Wang, P. Wang, J.A. Tanner, K.S.E. Cheah, W.  
1234 Wu, and J.D. Huang. 2013. Kif5b controls the localization of myofibril components for their  
1235 assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development*. 140:617–626.  
1236 doi:10.1242/dev.085969.
- 1237 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2014. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive  
1238 nuclear distribution in muscle cells. *Development*. 142:218–228. doi:10.1242/dev.114769.
- 1239 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2015. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive  
1240 nuclear distribution in muscle cells. *J. Cell. Sci.* 128:e1–e1. doi:10.1242/jcs.167718.
- 1241 Zaoui, K., K. Benseddik, P. Daou, D. Salaün, and A. Badache. 2010. ErbB2 receptor controls microtubule  
1242 capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*  
1243 107:18517–18522. doi:10.1073/pnas.1000975107.
- 1244

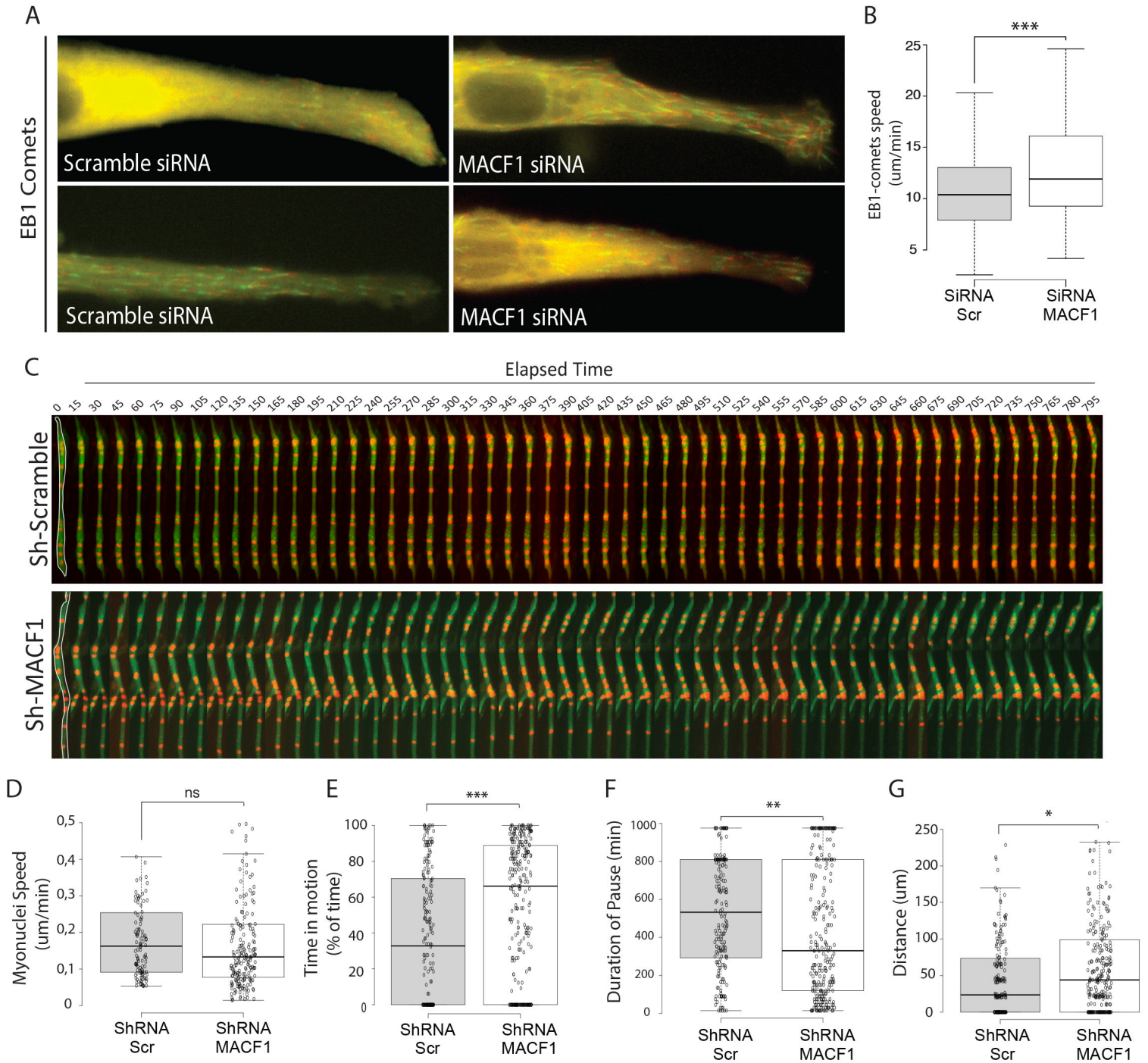
Figure 1



## Figure 2



## Figure 3



## Figure 4

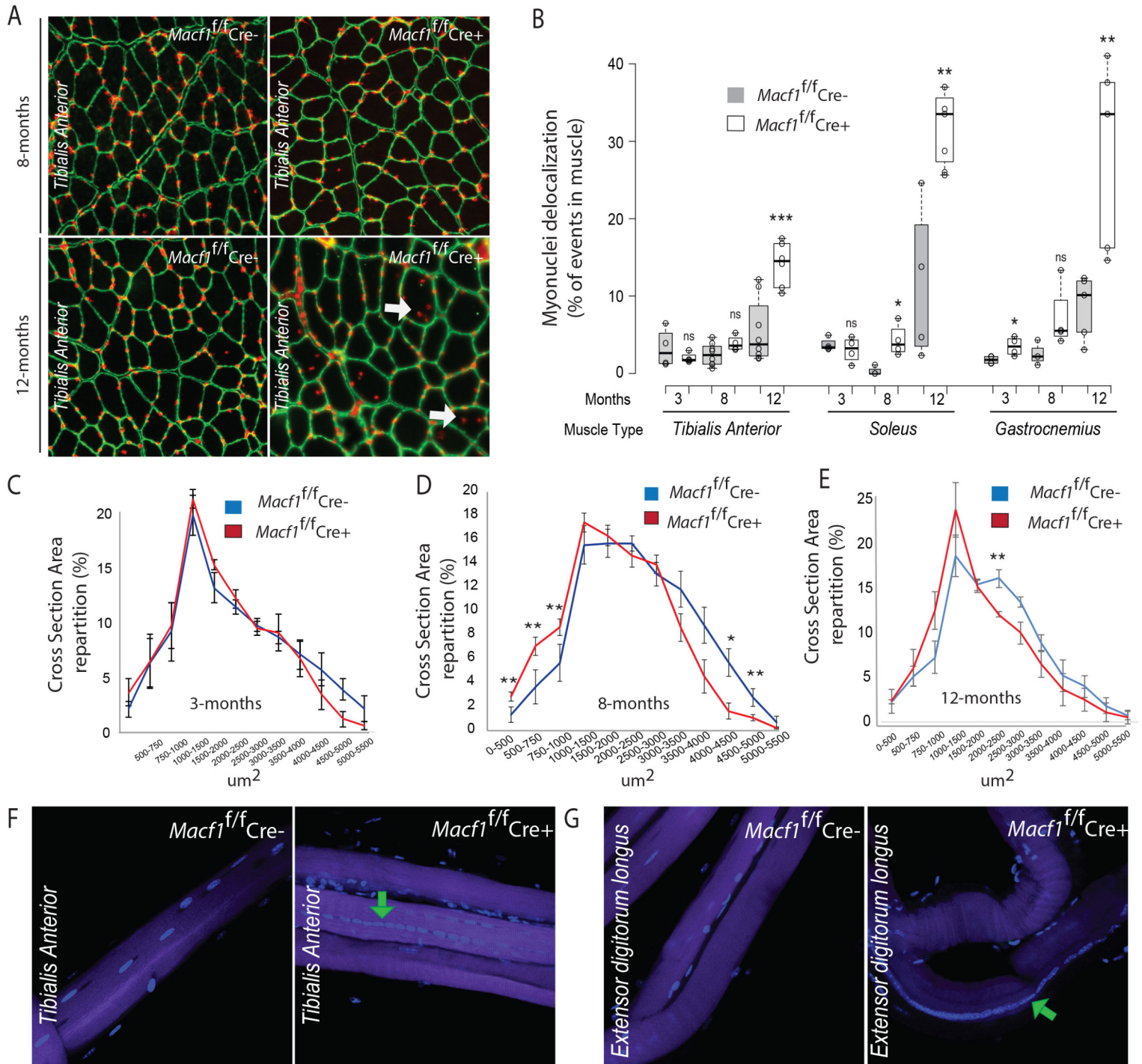
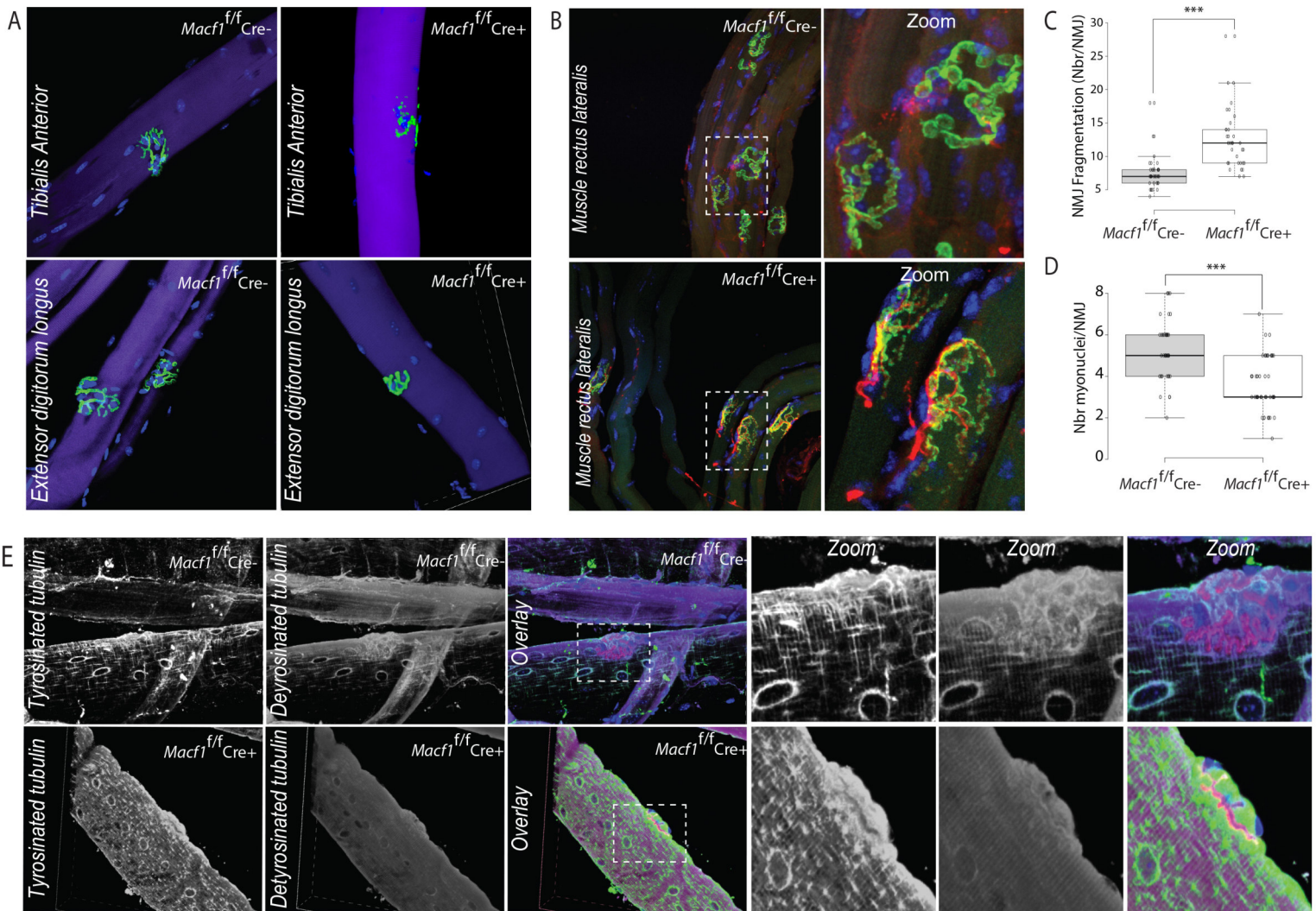
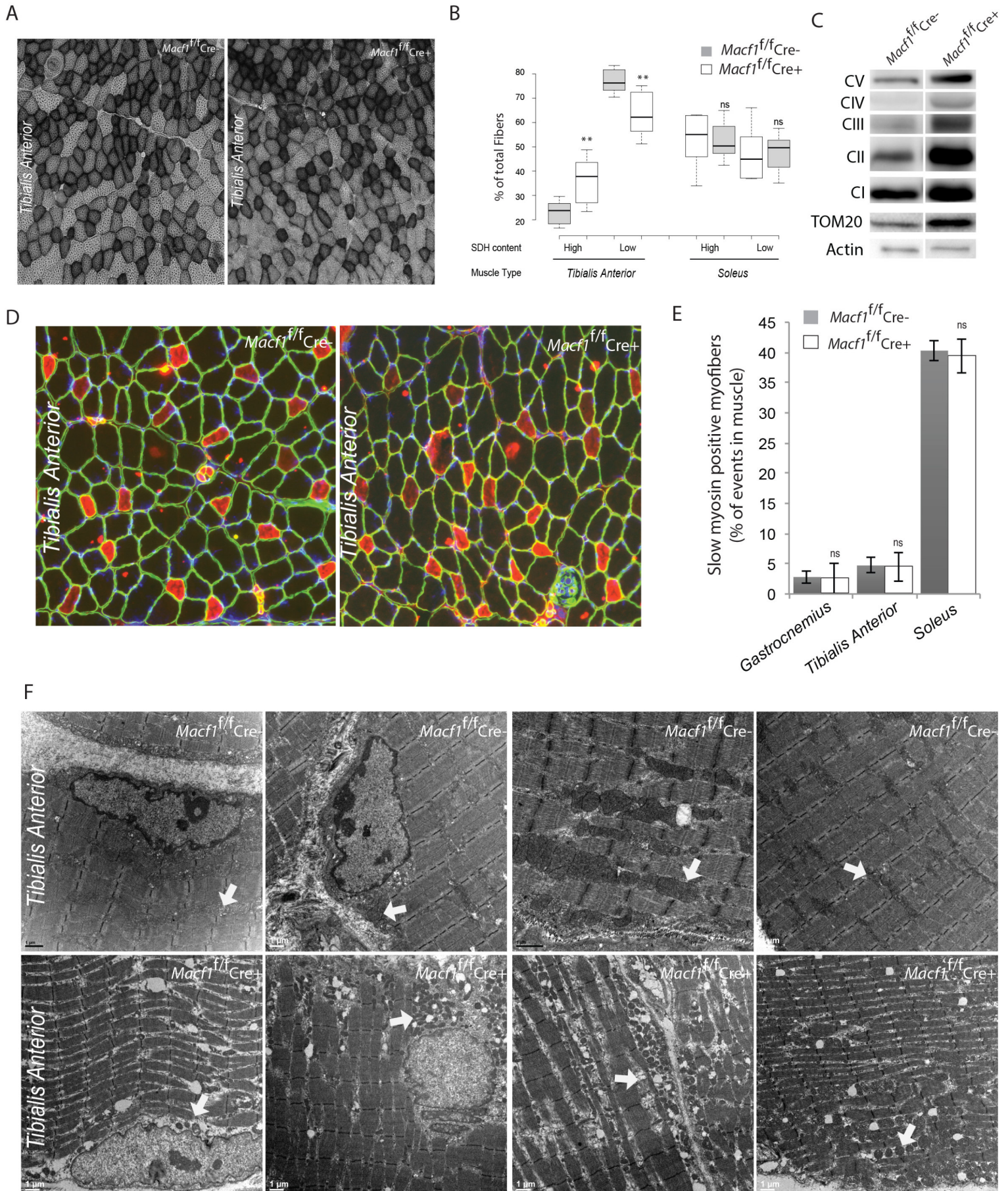


Figure 5

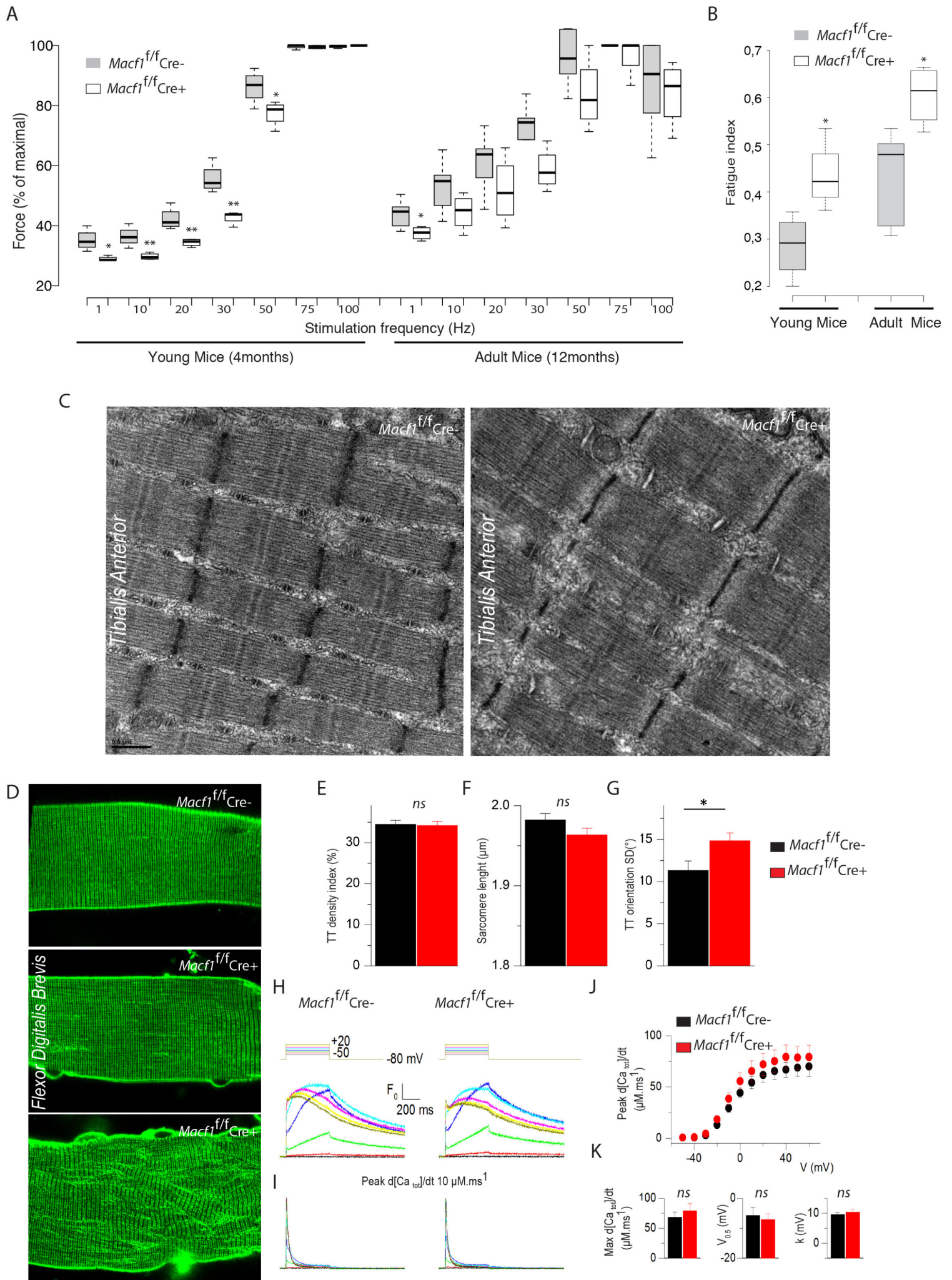




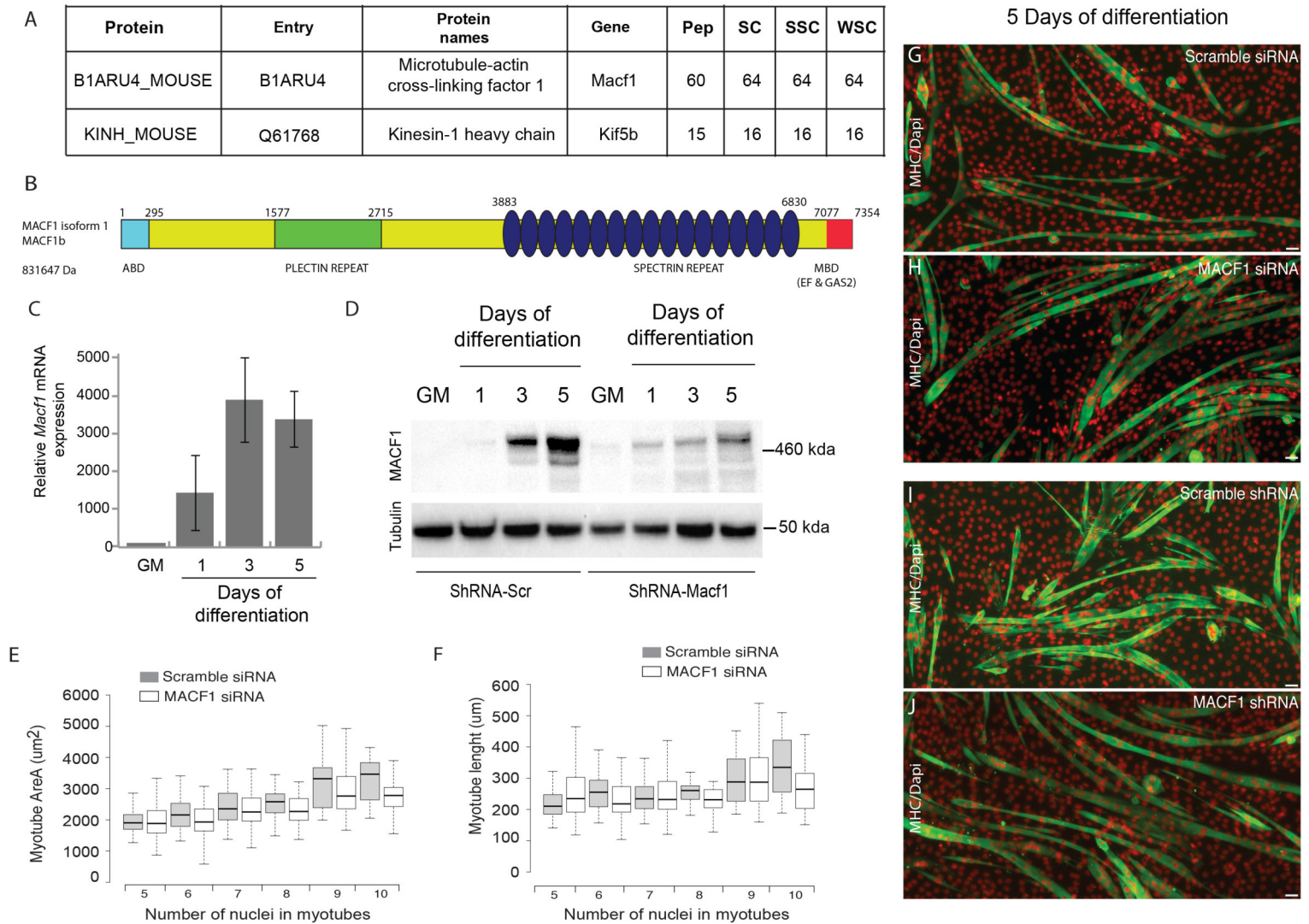
## Figure 6



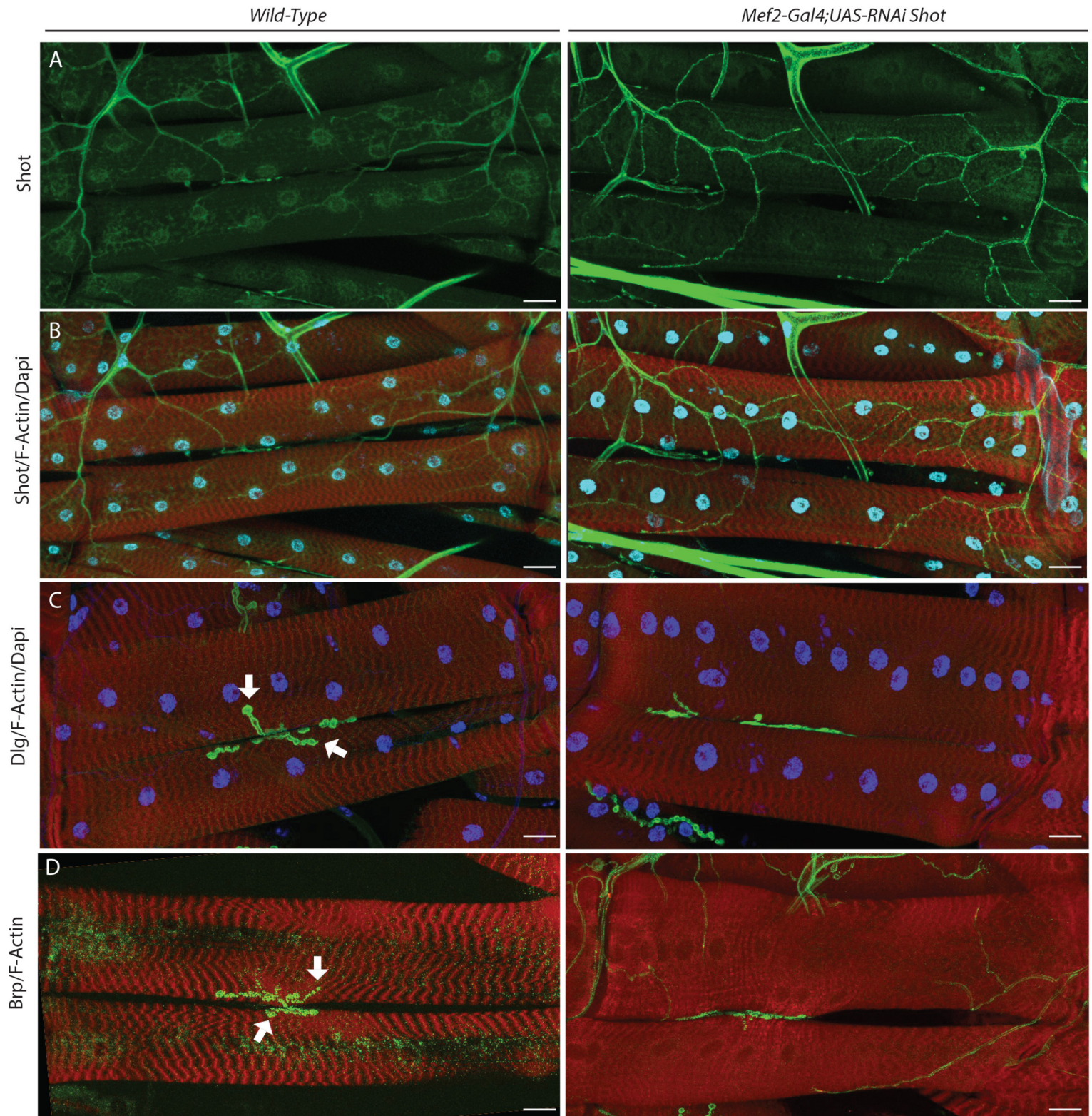
## Figure 7



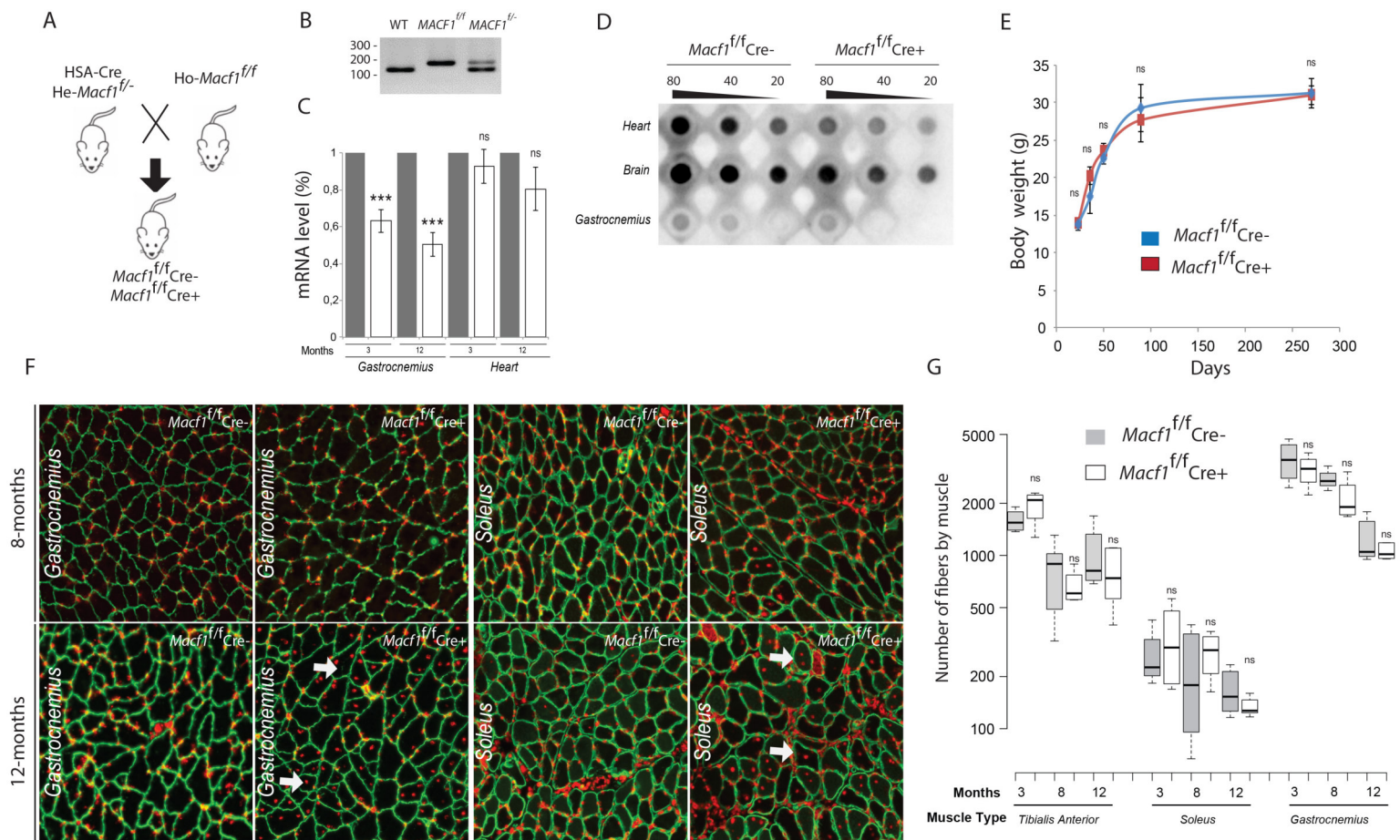
## Supplementary Figure 1



## Supplementary Figure 2



## Supplementary Figure 3



## PUBLICATION 5 :



Atrial structural remodeling gene variants in patient with atrial fibrillation

*Rosa Doñate Puertas, Gilles Millat, Isabelle Ernens, Vincent Gache, Samuel Chauveau, Elodie Morel, Emilie Christin, Nathalie Couturier, Yvan Devaux et Philippe Chevalier*



## Research Article

# Atrial Structural Remodeling Gene Variants in Patients with Atrial Fibrillation

Rosa Doñate Puertas,<sup>1</sup> Gilles Millat,<sup>1,2,3</sup> Isabelle Ernens,<sup>4</sup>  
Vincent Gache,<sup>1</sup> Samuel Chauveau,<sup>5</sup> Elodie Morel,<sup>5</sup> Emilie Christin,<sup>1</sup>  
Nathalie Couturier,<sup>1</sup> Yvan Devaux ,<sup>4</sup> and Philippe Chevalier <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Institut NeuroMyoGène (INMG), UMR CNRS 5310-INSERM U1217/University of Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Cardiogenetics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup>NGS Sequencing Platform for Molecular Diagnosis, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

<sup>5</sup>Rhythmology Unit, Louis Pradel Cardiology Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Correspondence should be addressed to Philippe Chevalier; [philippe.chevalier@chu-lyon.fr](mailto:philippe.chevalier@chu-lyon.fr)

Received 3 May 2018; Revised 30 June 2018; Accepted 17 July 2018; Published 10 September 2018

Academic Editor: Diego Franco

Copyright © 2018 Rosa Doñate Puertas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Atrial fibrillation (AF) is a common arrhythmia for which the genetic studies mainly focused on the genes involved in electrical remodeling, rather than left atrial muscle remodeling. To identify rare variants involved in atrial myopathy using mutational screening, a high-throughput next-generation sequencing (NGS) workflow was developed based on a custom AmpliSeq™ panel of 55 genes potentially involved in atrial myopathy. This workflow was applied to a cohort of 94 patients with AF, 76 with atrial dilatation and 18 without. Bioinformatic analyses used NextGENe® software and *in silico* tools for variant interpretation. The AmpliSeq custom-made panel efficiently explored 96.58% of the targeted sequences. Based on *in silico* analysis, 11 potentially pathogenic missense variants were identified that were not previously associated with AF. These variants were located in genes involved in atrial tissue structural remodeling. Three patients were also carriers of potential variants in prevalent arrhythmia-causing genes, usually associated with AF. Most of the variants were found in patients with atrial dilatation (n=9, 82%). This NGS approach was a sensitive and specific method that identified 11 potentially pathogenic variants, which are likely to play roles in the predisposition to left atrial myopathy. Functional studies are needed to confirm their pathogenicity.

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most frequent arrhythmia, affecting 30 million individuals worldwide [1]. Advanced age and hypertension, which can damage the left atrium (LA), are the main predisposing risk factors for AF [2]. A plethora of evidence suggests that the onset of most AF types is facilitated by LA remodeling, i.e., atrial myopathy [3]. Ion-channel, neural, and structural remodeling of the LA muscle has been widely documented [4] and numerous studies have found a genetic predisposition and a highly heritable component associated with AF risk [5].

In the past 20 years, the genetic basis for AF was established through studies evaluating familial AF [6, 7], linkage

[8, 9], candidate genes [10, 11], and genome-wide association studies (GWAS) [12–14] that reported common and rare variants in genes encoding ion-channels, gap junction proteins, and signaling molecules. Recently, next-generation sequencing (NGS) technologies have advanced in terms of sensibility, specificity, practicability, and the cost to rapidly screen large numbers of genes. Massively parallel NGS approaches, including gene panels, whole exome sequencing, or whole genome sequencing, are beginning to supplant Sanger sequencing [15]. Thus, sequencing candidate genes might be the best approach to reveal variations in AF-associated genes [16–18].

The available molecular data only account for a limited percentage of the genes involved in AF, mainly those involved



TABLE 1: List of the genes included in our panel.

| Gene         | NM number      | Gene            | NM number      | Gene          | NM number   | Gene          | NM number      | Gene          | NM number   |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|-------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| <i>ABCC8</i> | NM_001287174.1 | <i>FHOD3</i>    | NM_025135.4    | <i>IL10</i>   | NM_000572.2 | <i>MYL7</i>   | NM_021223.2    | <i>SMAD2</i>  | NM_005901.5 |
| <i>ABCC9</i> | NM_005691.3    | <i>FKRP</i>     | NM_001039885.2 | <i>JPH2</i>   | NM_020433.4 | <i>MYOZ1</i>  | NM_021245.3    | <i>SMAD3</i>  | NM_005902.3 |
| <i>ACE</i>   | NM_000789.3    | <i>GATA4</i>    | NM_001308093.1 | <i>JUP</i>    | NM_002230.2 | <i>NODAL</i>  | NM_018055.4    | <i>SMAD4</i>  | NM_005359.5 |
| <i>AKAP9</i> | NM_005751.4    | <i>GATA5</i>    | NM_080473.4    | <i>LEFTY1</i> | NM_020997.3 | <i>NOS1AP</i> | NM_014697.2    | <i>SMYD2</i>  | NM_020197.2 |
| <i>CER1</i>  | NM_005454.2    | <i>GATA6</i>    | NM_005257.5    | <i>LEFTY2</i> | NM_003240.3 | <i>NOS3</i>   | NM_000603.4    | <i>TGFB1</i>  | NM_000660.5 |
| <i>CTGF</i>  | NM_001901.2    | <i>GJA1</i>     | NM_000165.4    | <i>LMNA</i>   | NM_170707.3 | <i>ORAI1</i>  | NM_032790.3    | <i>TGFB3</i>  | NM_003239.3 |
| <i>DES</i>   | NM_001927.3    | <i>GJA5</i>     | NM_005266.6    | <i>LTB2</i>   | NM_002341.1 | <i>PCSK6</i>  | NM_002570.3    | <i>TIMP-1</i> | NM_003254.2 |
| <i>DSC2</i>  | NM_024422.4    | <i>GJCI</i>     | NM_001080383.1 | <i>MMP2</i>   | NM_004530.5 | <i>PITX2</i>  | NM_153427.2    | <i>TIMP-2</i> | NM_003255.4 |
| <i>DSG2</i>  | NM_001943.4    | <i>GNB3</i>     | NM_002075.3    | <i>MMP9</i>   | NM_004994.2 | <i>PKP2</i>   | NM_001005242.2 | <i>TMEM43</i> | NM_024334.2 |
| <i>DSP</i>   | NM_004415.3    | <i>HSP90AB1</i> | NM_001271971.1 | <i>MYBPC2</i> | NM_004533.3 | <i>PRRX1</i>  | NM_006902.4    | <i>TMPO</i>   | NM_003276.2 |
| <i>FGFR1</i> | NM_023110.2    | <i>HSPE1</i>    | NM_002157.2    | <i>MYH7</i>   | NM_000257.3 | <i>SHOX2</i>  | NM_003030.4    | <i>TRPM4</i>  | NM_017636.3 |

in ion-channel remodeling. Atrial myocardial damage is characterized by atrial fibrosis [19], inflammatory infiltrates [20], altered cell-to-cell adhesion and mechanical coupling [21], and abnormal contractions [22]. To identify variants in the genes coding for proteins potentially involved in atrial tissue rather than ion-channel remodeling, we designed a fast protocol utilizing a custom AmpliSeq panel and Ion Personal Genome Machine (PGM) Sequencer to sequence 55 atrial myopathy candidate genes in a prospective cohort of 94 patients, 76 with and 18 without atrial dilatation. Patients carrying pathogenic or likely pathogenic variants were also screened against a homemade panel of prevalent arrhythmia-causing genes, mainly involved in electrical remodeling.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Patients.** The cohort included 94 nonvalvular patients with AF prospectively recruited from the Louis Pradel Cardiology Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). The ethics committee of Lyon approved the study and informed consent was obtained from each patient prior to enrollment (DC2015-2566). Individuals older than 18 years with a confirmed diagnosis of paroxysmal/persistent/permanent AF but without significant underlying heart disease, left ventricular dysfunction (left ventricular ejection fraction <50%), valvular heart diseases, or other systemic/metabolic diseases were included in the cohort. The presence of AF was determined by ECG or Holter recordings. Paroxysmal AF was defined as self-terminating, in most cases within 48 hours. Persistent AF lasted longer than 7 days and was terminated by either pharmacologic intervention or electrical cardioversion. For permanent AF, rhythm control interventions were not pursued [23]. Left atrial dilatation was defined as a volume superior to 32 ml/m<sup>2</sup> or a surface > 22 cm<sup>2</sup>, measured by transthoracic echocardiography.

**2.2. NGS Strategy.** Genomic DNA samples underwent NGS using a custom AmpliSeq design (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) created using Ion AmpliSeq designer software. In the first step, the criteria for gene selection were based on the previously reported transcriptome of atrial tissue in

patients with AF [24]. We found that 1,627 genes had altered basal expression levels in the LA tissue of patients with AF compared with the control group. The significantly enriched Gene Ontology biological process “anatomical structure morphogenesis” contained the highest number of genes, and this was in line with changes in structure that occur when the human heart remodels following AF development (i.e., left atrial dilatation and interstitial fibrosis). We then selected the most dysregulated genes to build a homemade gene panel. In the second step, genes were selected, using PubMed, based on their documented or potential involvement in structural remodeling. A candidate ID gene list was generated using the search terms: “structural remodeling”, “AF fibrosis”, “AF conduction”, and “AF inflammation”. Articles concerning the structural remodeling of AF were included predominantly in the list. The genetic panel was made of 55 genes potentially involved in structural heart disease (Table 1). The design allowed analysis of all coding exons of selected genes (padding  $\pm 30$  bp). Library preparation and Ion Torrent PGM sequencing were performed as previously reported [25, 26]. Selected patients carrying pathogenic or likely pathogenic variants in this panel were further tested by NGS using a second custom panel designed to identify disease-causing variants in 38 known arrhythmia-causing genes [27].

**2.3. Bioinformatic Analyses.** Bioinformatic analyses were performed using a homemade pipeline based on NextGENE v.2.3.4.2 (SoftGenetics, State College, PA, USA) and Alamut® 2.7.1 (Interactive Biosoftware, Rouen, France) software, as previously reported [25, 26]. Identified gene variants (i.e., missense, nonsynonymous, splice site, insertions, and deletions) were further analysed using the filtering steps shown in Figure 1. According to reported guidelines, specific standard terms [“pathogenic”, “likely pathogenic”, “uncertain significance”, “likely benign”, and “benign”] were used to evaluate the pathogenicity of variants identified in the studied genes [28]. Likely pathogenic variants (single nucleotide variants) were verified by conventional dideoxy sequencing using the BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and an ABI 3730 automatic sequencer (Life Technologies).

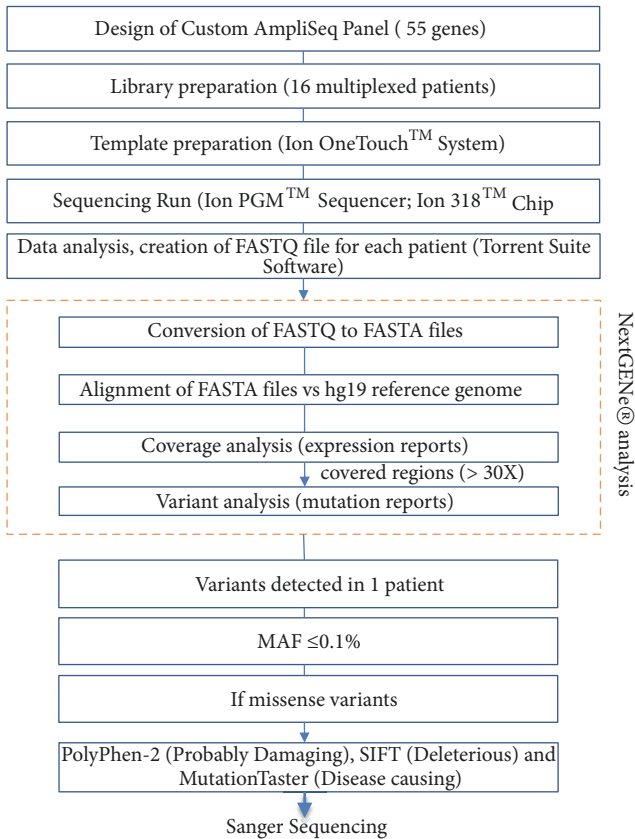


FIGURE 1: *Filtering steps.* Decision tree for exploration of genes related to atrial fibrillation using a next-generation sequencing approach to detect mutations, based on a custom AmpliSeq library and Ion Torrent PGM sequencing. Abbreviations: MAF = minor allele frequency; PGM = Personal Genome Machine.

The frequency of each variant in the general population was examined using the disease database ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) and the population database Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>). *In silico* tools used for missense variant interpretation included PolyPhen-2 [29], SIFT [30], and MutationTaster [31]. The grade of evolutionary nucleotide conservation was determined by PhyloP scores (<http://compgen.cshl.edu/phast/>). The protein evolution was predicted with the Grantham score [32]. The protein domains affected by the single nucleotide changes were also described. Multiple protein sequences across species were aligned using the program MUSCLE [33] version 3.6.

**2.4. Quantification Methods.** Nuclear positioning was quantified in mammalian myotubes containing at least five nuclei, and myotubes were classified aggregated when more than 70% of the nuclei did not align along the same axis.

**2.5. Transfections.** Myoblasts were transfected with siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen): siRNA sequences (Ambion): 5'-GCUCUAAACAUGAUUCAAGTT-3' (AKPA9-#1);

TABLE 2: Clinical parameters of the patients involved in the study.

|                               | All patients (n=94) |
|-------------------------------|---------------------|
| Ratio M/F                     | 63/31               |
| Age (years)                   | 54.4 ( ± 12.0)      |
| Age of AF onset (years)       | 48.01 ( ± 14.35)    |
| BMI                           | 27.7 ( ± 5.5)       |
| <i>AF type</i>                |                     |
| Paroxysmal                    | 55                  |
| Persistent                    | 21                  |
| Permanent                     | 18                  |
| <i>Risk factors</i>           |                     |
| Hypertension                  | 23                  |
| CVA                           | 16                  |
| LA surface (cm <sup>2</sup> ) | 26.8 ( ± 7.5)       |

Abbreviations. AF = atrial fibrillation; BMI= body mass index; CVA = cerebrovascular accident; LA = left atrium.

5'-CGAUGGUAGAAUUCUAGATT-3' (AKPA9-#2);  
5'-GCCAAGCUUGUCCAUGAU-TT-3' (AKPA9-#3).

**2.6. Cell Culture.** C2C12 myoblasts were grown and differentiated for 5 days as described before [34].

**2.7. Statistical Analysis.** Student's t-tests were performed. Differences were considered statistically significant when P < 0.01.

### 3. Results

Clinical features of the 63 men and 31 women included in the cohort are listed in Table 2. The median age at the time of inclusion for AF probands was 54.4 years (range: 42–66 years). Paroxysmal AF was the most common type and 80.8% of patients with AF presented with left atrial dilatation. Particularly, patients developing permanent AF presented left atrial dilatation. Our AmpliSeq custom-made panel explored 96.58% of targeted sequences. Six runs, containing 16 DNA samples each, were performed and the coverage statistics were comparable between each run. The strategy for filtering (Figure 1) led to the identification of 11 putative pathogenic variants not previously reported in patients with AF (Table 3). Each variant was present in a single patient. Nine variants were found in patients with AF and left atrial dilatation and two in patients without atrial myopathy. Three variants were not reported in the ExAC consortium. All putative pathogenic missense variants were predicted to disrupt protein function by PolyPhen-2 (score ranges: 0 to 1), SIFT, and MutationTaster as “probably damaging” (0.85 = the threshold), “deleterious”, and “disease causing”, respectively. The PhyloP highlighted that mutated nucleotides detected in cases 6211, 4464, 2095, 1885, 4162, 1875, and 2691 were highly conserved. Comparisons based on the physical or chemical properties of amino acids showed the candidate *JPH2* variant (p.Ser255Leu) and *MMP9* variant (p.Arg143Cys) had high Grantham differences, suggesting that these missense variants could be pathogenic. A multialignment of proteins

TABLE 3: List of putative pathogenic variations identified in a cohort 94 patients.

| Case | Patient characteristics |                         |               | Variation |      |                   |                   | Pathogenicity <sup>‡</sup> | Presence in databases  |      | Nucleotide conservation prediction | Grantham Score <sup>§</sup> | Protein domain   |
|------|-------------------------|-------------------------|---------------|-----------|------|-------------------|-------------------|----------------------------|--|------|------------------------------------|-----------------------------|--|
|      | AF type                 | Dilated LA <sup>†</sup> | Gene          | Chr       | Exon | Nucleotide change | Effect on protein |                            | ClinVar  | ExAC | PhyloP <sup>§</sup>                |                             |  |
| 2115 | <i>Paroxysmal</i>       | Yes                     | <i>ABCC8</i>  | 11        | 32   | c.3941G>A         | p.Arg1314His      | Likely pathogenic          |  | Yes  | 3.98                               | 29                          | ABC transporter type 1, transmembrane domain                                 |
| 6211 | <i>Permanent</i>        | Yes                     | <i>AKAP9</i>  | 7         | 46   | c.11229G>A        | p.Met3743Ile      | Likely pathogenic          | RCV000310251.1 (Uncertain significance), RCV000171732.1 (Likely benign), RCV000362669.1 (Uncertain significance) | Yes  | 7.99                               | 10                          | Pericentrin/AKAP-450 centrosomal targeting domain                            |
| 6198 | <i>Permanent</i>        | Yes                     | <i>DSG2</i>   | 18        | 6    | c.566C>T          | p.Pro189Leu       | Likely pathogenic          |  | No   | 1.50                               | 98                          | Cadherin; Cadherin-like  |
| 2235 | <i>Paroxysmal</i>       | No                      | <i>DSP</i>    | 6         | 23   | c.3550C>T         | p.Arg1184Trp      | Likely pathogenic          |  | Yes  | 3.98                               | 101                         |  |
| 4464 | <i>Permanent</i>        | Yes                     | <i>DSP</i>    | 6         | 24   | c.7997G>A         | p.Gly2666Asp      | Likely pathogenic          |  | Yes  | 10.00                              | 94                          | Plectin repeat   |
| 2095 | <i>Paroxysmal</i>       | Yes                     | <i>FHOD3</i>  | 18        | 7    | c.614T>C          | p.Leu205Pro       | Likely pathogenic          |  | No   | 7.99                               | 98                          | Rho GTPase-binding/formin homology 3 (GBD/FH3) domain; Armadillo-type fold   |
| 1885 | <i>Paroxysmal</i>       | Yes                     | <i>FHOD3</i>  | 18        | 8    | c.776C>T          | p.Thr259Met       | Likely pathogenic          |  | Yes  | 7.76                               | 81                          | Rho GTPase-binding/formin homology 3 (GBD/FH3) domain; Armadillo-type fold   |
| 4162 | <i>Permanent</i>        | Yes                     | <i>JPH2</i>   | 20        | 2    | c.764C>T          | p.Ser255Leu       | Likely pathogenic          |  | No   | 9.18                               | 145                         | Junctophilin   |
| 2186 | <i>Paroxysmal</i>       | Yes                     | <i>MMP9</i>   | 20        | 3    | c.427C>T          | p.Arg143Cys       | Likely pathogenic          |  | Yes  | 2.68                               | 180                         | Peptidase M10, metallopeptidase; Peptidase, metallopeptidase; Peptidase M10A |
| 1875 | <i>Paroxysmal</i>       | No                      | <i>MYOZ1</i>  | 10        | 3    | c.167G>C          | p.Gly56Ala        | Likely pathogenic          |  | Yes  | 7.76                               | 60                          | Myozenin   |
| 2691 | <i>Paroxysmal</i>       | Yes                     | <i>TMEM43</i> | 3         | 5    | c.424G>A          | p.Glu142Lys       | Likely pathogenic          | RCV000039386.3 (Uncertain significance), RCV000172593.3 (Likely benign), RCV000250239.1 (Uncertain significance) | Yes  | 8.11                               | 56                          | Transmembrane protein 43 family  |

<sup>†</sup> LA volume >32 ml/m<sup>2</sup> or a surface >22 cm<sup>2</sup>; <sup>‡</sup>specific standard terminologies—“pathogenic”, “likely pathogenic”, “uncertain significance”, “likely benign”, and “benign” were used to describe variants identified (Ref [28]); <sup>§</sup> range of PhyloP score [-20.0;10.0]; <sup>§</sup> range of Grantham score [0-215]. Abbreviations: AF = atrial fibrillation; ExAC = Exome Aggregation Consortium; LA= left atrium.

- 1: *H. sapiens*
- 2: *P. troglodytes*
- 3: *M. mulatta*
- 4: *C. lupus*
- 5: *B. taurus*

**ABCC8, p.Arg1314His.**

|         |  |      |
|---------|--|------|
| 1: 1286 | TYALMVSNYLNMVVRNLADMELQLGAVKRIHGLLKTEAESYEGLLAPSLI | 1335 |
| 2: 1322 | TYALMVSNYLNMVVRNLADMELQLGAVKRIHGLLKTEAESYEGLLAPSLI | 1371 |
| 3: 1285 | TYALMVSNYLNMVVRNLADMELQLGAVKRIHGLLKTEAESYEGLLAPSLI | 1334 |
| 4: 1285 | TYALMVSNYLNMVVRNLADMELQLGAVKRIHGLLKTEAESYEGLLAPSLI | 1334 |
| 5: 1285 | TYALMVSNYLNMVVRNLADMELQLGAVKRIHGLLKTEAESYEGLLAPSLI | 1334 |

**DSG2, p.Pro189Leu.**

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 1: 186 | ADEPNTLNSKISYRIVSLEPAYP-VVFLNKDTGEIYTTSVTLDRREEHSS | 234 |
| 2: 186 | ADEPNTLNSKISYRIVSLEPAYP-VVFLNKDTGEIYTTSVTLDRREEHSS | 234 |
| 3: 186 | ADEPNTLNSKISYRIVSLEPAYP-VVFLNKDTGEIYTTSVTLDRREEHSS | 234 |
| 4: 184 | ADEPNTLNSKISYRIVSQEPTYP-VVFLNKDTGEIYTTSVTLDRREEHSS | 232 |
| 5: 184 | ADEPNTLNSKISYRIVSQEPANS-VVFLNKDTGEIYTTSVTLDRREEYSS | 232 |

**DSP, p.Gly2666Asp.**

|         |  |      |
|---------|--|------|
| 1: 2637 | IERGIVDSITGQRLEAQAQACTGGIIHPTTGQKLSLQDAVDSQGVLDQDMAT | 2686 |
| 2: 2637 | IERGIVDSITGQRLEAQAQACTGGIIHPTTGQKLSLQDAVDSQGVLDQDMAT | 2686 |
| 3: 2637 | IERGIVDSITGQRLEAQAQACTGGIIHPTTGQKLSLQDAVDSQGVLDQDMAT | 2686 |
| 4: 2639 | IERGIVDSITGQRLEAQAQACTGGIIHPTTGQKLSLQDAVDSQGLIDQDMAT | 2688 |
| 5: 2655 | IERGIVDSISGQRLEAQAQACTGGIIHPTTGQKLSLQDAVDSQGLIDQDMAT | 2704 |

**FHOD3, p.Thr259Met.**

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 1: 238 | KRGVWPWSNIMEILEEKDGVDTPELLVYAMTLVNKTL SGLPDQDTFYDVVD | 287 |
| 2: 238 | KRGVWPWSNIMEILEEKDGVDTPELLVYAMTLVNKTL SGLPDQDTFYDVVD | 287 |
| 3: 238 | KRGVWPWSNIMEILEEKDGVDTPELLVYAMTLVNKTL SGLPDQDTFYDVVD | 287 |
| 4: 212 | KRGVWPWSNIMEILEEKDGVDTPELLVYAMTLVNKTL SGLPDQDSFYDVVD | 261 |
| 5: 238 | KRGVTPWSNIMEILEEKDGVDTPELLVYAMTLVNKTL SGLPDQDTFYDVVD | 287 |

**MMP9, p.Arg143Cys.**

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 1: 123 | YWI--QNYSEDLPRVIDDAFA <del>RA</del> FALWSAVTP <del>PL</del> TFTRVYS-RDADIVI <del>Q</del> | 169 |
| 2: 123 | YWI--QNYSEDLPRVIDDAFA <del>RA</del> FALWSAVTP <del>PL</del> TFTRVYS-RDADIVI <del>Q</del> | 169 |
| 3: 123 | YWI--QNYSEDLPRVIDDAFA <del>RA</del> FALWSAVTP <del>PL</del> TFTRVYS-RDADIVI <del>Q</del> | 169 |
| 4: 123 | YWI--QNYSEDLPRVIDDAFA <del>RA</del> FALWSAVTP <del>PL</del> TFTRVYG-PEADIII <del>Q</del> | 169 |
| 5: 123 | YWI--QNYSEDLPRVIDDAFA <del>RA</del> FALWSAVTP <del>PL</del> TFTRVYG-PEADIVI <del>Q</del> | 169 |

**TMEM43, p.Glu142Lys.**

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 1: 100 | LLSDPNYGVHLPVAVKLR <del>RR</del> HVEMYQWVETEE <del>S</del> REYTED-GQVKK <del>E</del> TR-YSY | 147 |
| 2: 100 | LLSDPNYGVHLPVAVKLR <del>RR</del> HVEMYQWVETEE <del>S</del> REYTED-GQVKK <del>E</del> TR-YSY | 147 |
| 3: 100 | LLSDPNYGVHLPVAVKLR <del>RR</del> HVEMYQWVETEE <del>S</del> REYTED-GQVKK <del>E</del> TR-YSY | 147 |
| 4: 100 | LLSDPNYGVHLPVAVKLR <del>RR</del> HVEMYQWVETEE <del>S</del> REYTED-GQVKT <del>E</del> TR-YSY | 147 |
| 5: 100 | LLSDPNYGVHLPVAVKLR <del>RR</del> HVEMYQWVETEE <del>S</del> REYTED-GQVKT <del>E</del> RK-YSY | 147 |

**AKAP9, p.Met3743Ile.**

|      |   |      |
|------|---|------|
| 3695 | HVTLKRIYGYKYLRAESFRKALIIYQKKYLLLLLGGFQCECEDATLALLAR <del>MG</del> | 3744 |
| 3696 | HVTLKRIYGYKYLRAESFRKALIIYQKKYLLLLLGGFQCECEDATLALLAR <del>MG</del> | 3745 |
| 3664 | HVTLKRIYGYKYLRAESFRKALIIYQKKYLLLLLGGFQCECEDATLALLAR <del>MG</del> | 3713 |
| 3680 | HAAIKRIYGYKYLRAESFRKALIIYQKKYLLLLLGGFQCECEDATLALLAR <del>MG</del> | 3729 |
| 3685 | HAAIKRIYGYKYLRAESFRKALIIYQKKYLLLLLGGFQCECEATLALLAR <del>MG</del>  | 3734 |

**DSP, p.Arg1184Trp.**

|      |  |      |
|------|--|------|
| 1149 | EKENLWQKLESEKAIKEKEYEIERLRVLLQEEGT <del>R</del> KREYENELAKVRNH | 1198 |
| 1149 | EKENLWQKLESEKAIKEKEYEIERLRVLLQEEGT <del>R</del> KREYENELAKVRNH | 1198 |
| 1149 | EKENLWQKLESEKAIKEKEYEIERLRVLLQDEGA <del>R</del> KREYENELAKVRNH | 1198 |
| 1152 | EKESLWQKMESEKAIKEKEYEIERLRVLLQEEGT <del>R</del> KREYENELAKVRNH | 1201 |
| 1159 | EKESLWQKMESEKAIKEKEFEIERLRVLLQEEGA <del>R</del> KREYENELAKVRNH | 1208 |

**FHOD3, p.Leu205Pro.**

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 188 | RNETIQWLYTLIGSKFRLVVK <del>T</del> ALKLLLVFVEYSESNA <del>PL</del> LIQAVTAVDT | 237 |
| 188 | HNETIQWLYTLIGSKFRLVVK <del>T</del> ALKLLLVFVEYSESNA <del>PL</del> LIQAVTAVDT | 237 |
| 188 | HNETIQWLYTLIGSKFRLVVK <del>T</del> ALKLLLVFVEYSESNA <del>PL</del> LIQAVTAVDT | 237 |
| 177 | ----- FRLVVK <del>T</del> ALKLLLVFVEYSESNA <del>PL</del> LIQAVSAVDT          | 211 |
| 188 | HNETIQWLYTLIGSKFRLVVK <del>T</del> ALKLLLVFVEYSESNA <del>PL</del> LIQAVSAVDT | 237 |

**JPH2, p.Ser255Leu.**

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 242 | QRSRV <del>S</del> F <del>L</del> KSD--LSSGASDAASTASLGEA-AEGADE-AAPFEADIDATT | 287 |
| 242 | QRSRV <del>S</del> F <del>L</del> KSD--LSSGASDAASTASLGEA-AEGADE-ATPFEADIDATT | 287 |
| 242 | QRSRV <del>S</del> F <del>L</del> KSD--LSSGASDAASTGSLGEG-ADE----AAPFEADIDATT | 284 |

**MYOZ1, p.Gly56Ala.**

|    |   |    |
|----|---|----|
| 42 | RDVMLEELSLLTNRGSKMFKLRQMRVEKFIYENHPDVFS <del>S</del> SSMDHFQKFL             | 91 |
| 42 | RDVMLEELSLLTNRGSKMFKLRQMRVEKFIYENHPDVFS <del>S</del> SSMDHFQKFL             | 91 |
| 42 | RDVMLEELSLLTNRGSKMFKLRQMRVEKFIYENHPDVFS <del>S</del> SSMDHFQKFL             | 91 |
| 42 | RDVMLEELSLLTNRGSKMFKLRQMRVEKFIYENHPDVFS <del>S</del> SSMDHFQKFL             | 91 |
| 42 | RDVMLEELSLLTNRGSKMFKLR <del>L</del> RVEKFIYENHPDVFS <del>S</del> SSMDRFQKFI | 91 |

FIGURE 2: High conservation across species. Multiple protein sequence alignments and the evolutionary conservation of each altered amino acid among species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *C. lupus*, and *B. taurus*).

(Figure 2) showed that all altered amino acids had high evolutionary conservation across species, suggesting that they could be functionally important.

The 11 patients identified with variants involved in structural remodeling were further screened using an arrhythmia panel with genes known to be associated with AF [27]. Three of these patients were also carriers of likely pathogenic variants in AF-associated genes (Table 4). Left atrial dilatation was also a characteristic of these patients. Only eight patients were carriers of likely pathogenic variants in atrial myopathy

genes. An overview of AF-associated genes is displayed in Table 5. The majority of these genes are linked with other cardiac diseases. The cellular localization of proteins encoded by candidate genes is shown in Figure 3.

AKAP9 encodes a scaffolding protein involved in Golgi apparatus integrity and Golgi-related microtubules nucleation [35]. It has been recently shown that AKAP9 can contribute to recruit microtubule-organizing center factors at the membrane of myonuclei [36]. We validated AKAP9-dependent myonuclei positioning in a muscle cells context

TABLE 4: List of variants identified in the prevalent arrhythmia-causing genes.

| Case | Variation    |             |     |                 |                      |                      |                            | Presence in databases                      |                  | Prediction analysis of missense variants |           |                    | Nucleotide conservation prediction | Grantham Score <sup>§</sup> |
|------|--------------|-------------|-----|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------------|--|------------------|--|-----------|--------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|      | Gene         | NM_number   | Chr | Exon/<br>intron | Nucleotide<br>change | Effect on<br>protein | Pathogenicity <sup>†</sup> | ClinVar                                    | ExAC             | PolyPhen-2                               | SIFT      | Mutation<br>Taster | PhyloP <sup>‡</sup>                |                             |
| 2095 | <i>ANK2</i>  | NM_001148.4 | 4   | 35              | c.4315G>A            | p.Gly1439Ser         | Likely pathogenic          |  | No               | Possibly damaging                        | Tolerated | Disease causing    | 2.80                               | 56                          |
| 6198 | <i>KCNH2</i> | NM_000238.3 | 7   | 11              | c.2681G>A            | p.Arg894His          | Likely pathogenic          |  | Yes (MAF ≤0.01%) | Probably damaging                        | Tolerated | Disease causing    | 2.68                               | 29                          |
| 1885 | <i>KCNH2</i> | NM_000238.4 | 7   | 13              | c.3052C>G            | p.Pro1018Ala         | Uncertain significance     | RCV000181908.1<br>(Uncertain significance) | Yes (MAF ≤0.01%) | Benign                                   | Tolerated | Disease causing    | 1.50                               | 27                          |
| 1885 | <i>SCN1B</i> | NM_001037.4 | 19  | intron 1        | c.40+2T>G            |                      | Likely pathogenic          |  | No               |  |           |                    |                                    |                             |

<sup>†</sup> Specific standard terminologies—“pathogenic”, “likely pathogenic”, “uncertain significance”, “likely benign” and “benign” were used to describe variants identified [28]; <sup>‡</sup> range of PhyloP score [-20.0;10.0]; <sup>§</sup> range of Grantham score [0-215]. Abbreviations: ExAC = Exome Aggregation Consortium; MAF = minor allele frequency.

TABLE 5: Genes associated with cardiac diseases.

| Gene          | Protein                             | Cardiac diseases classification |      |     |      |     |     |    | Protein localisation   |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|-----|------|-----|-----|----|------------------------|
|               |                                     | LQTS                            | SQTS | BrS | SIDS | CDM | CHD | AF |                        |
| <i>ABCC8</i>  | Sulfonylurea receptor 1             | X                               | -    | -   | -    | X   | X   | X  | Sarcolemma             |
| <i>AKAP9</i>  | A-kinase anchor protein 9           | X                               | -    | X   | X    | X   | -   | -  | Centrosome             |
| <i>DSG2</i>   | Desmoglein 2                        | -                               | -    | X   | -    | X   | -   | X  | Desmosome              |
| <i>DSP</i>    | Desmoplakin                         | X                               | -    | X   | X    | X   | -   | X  | Desmosome              |
| <i>FHOD3</i>  | FH1/FH2 domain-containing protein 3 | -                               | -    | -   | -    | X   | -   | -  | Z-disk                 |
| <i>JPH2</i>   | Junctophilin 2                      | -                               | -    | X   | -    | X   | -   | X  | Sarcoplasmic reticulum |
| <i>MMP9</i>   | Matrix metalloproteinase-9          | X                               | -    | -   | -    | X   | X   | X  | Extracellular matrix   |
| <i>MYOZ1</i>  | Myozenin-1                          | -                               | -    | -   | -    | X   | -   | X  | Z-disk                 |
| <i>TMEM43</i> | Transmembrane protein 43            | -                               | -    | X   | -    | X   | -   | -  | Transmembrane          |

The presence of an (X) indicates involvement of the gene in each specific cardiac disease classification. The localisation of the protein encoded by each disease gene is also described. Abbreviations: BrS = Brugada syndrome; CDM = cardiomyopathies; CHD = congenital heart diseases; LQTS = long QT syndrome; SIDS = sudden infant death syndrome; SQTS = short QT syndrome.

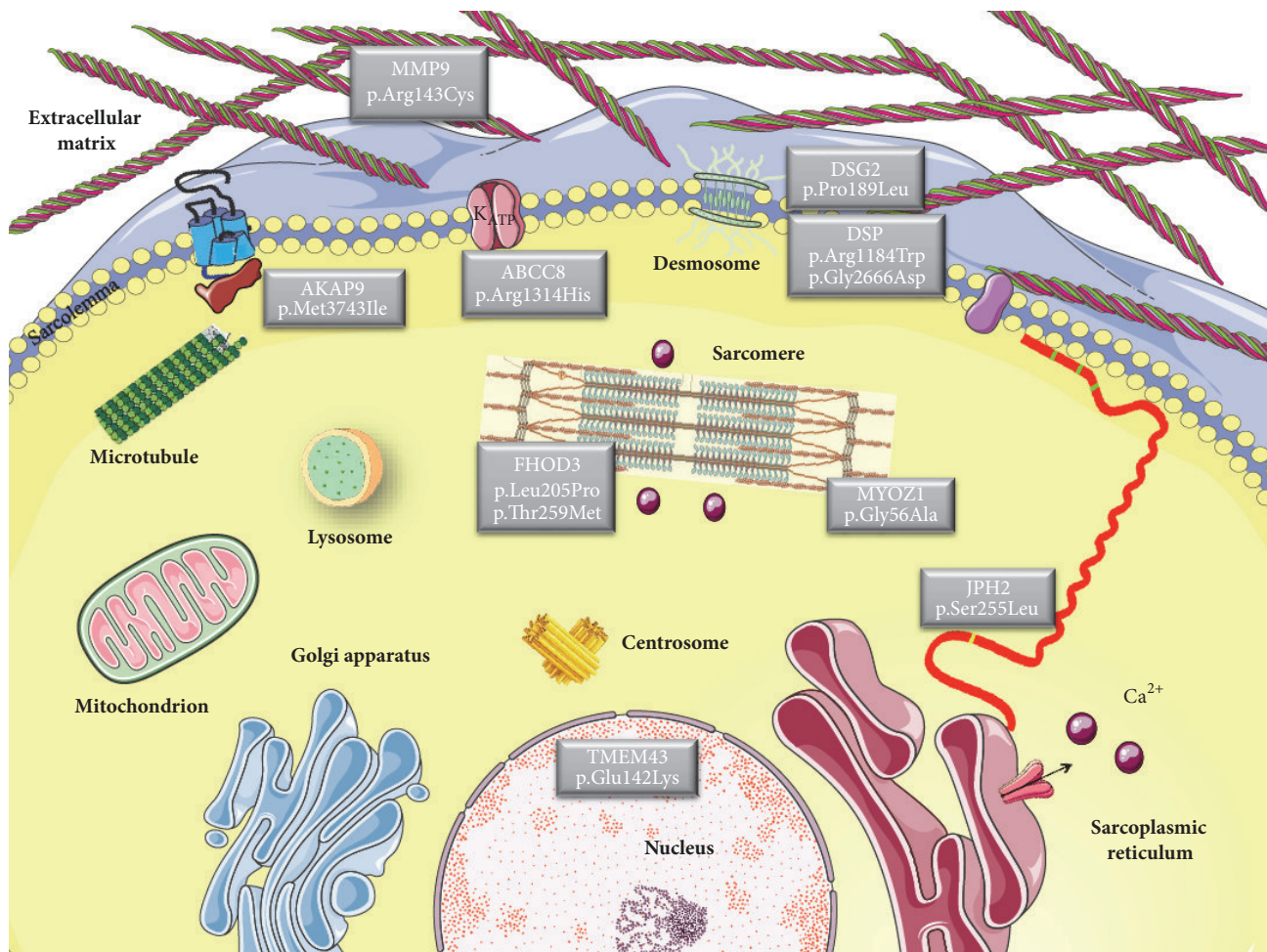


FIGURE 3: Atrial fibrillation disease genes. A schematic of proteins encoded by genes related to atrial fibrillation and their subcellular localization. Proteins participate in many diverse biological processes of cardiomyocytes/fibroblasts.

using C2C12 myoblast and quantify myonuclei aggregation in AKAP9-depleted myotubes using 3 different siRNA (Figure 4). AKAP9-depleted myotubes significantly increase myonuclei aggregation phenotype (up to 30%) within myotubes (Figure 4(c)) without affecting myoblast fusion or myotubes differentiation (Figures 4(a) and 4(b)), confirming a microtubule integrity regulation by an AKAP9-dependant mechanism in a muscle cells context [36].

#### 4. Discussion

This study identified 11 potentially pathogenic variants in patients with AF, using a simple and fast NGS mutation detection approach. In contrast with previous studies, our method focused on the identification of candidate gene variants not previously linked to AF-structural remodeling genes. The role of genetic factors in the development of AF, a complex and multifactorial arrhythmia, is increasingly recognized. At least 14 genetic loci revealed by GWAS are known to increase the risk of AF in populations [37], but these variants only explain a small fraction of the interindividual risk for AF. Most identified genetic loci are associated with genes of electrical

remodeling, such as *KCNN3* [13], or developmental genes, such as *PITX2* [12]. However, a meta-analysis of GWAS suggested additional candidate AF loci, such as genes involved in structural components (*SYNE2*, *MYOZ1*, and *SYNPO2L*) [14]. The NGS represents a high-throughput, rapid, and low-cost strategy for the systematic detection of genomic variants involved in AF. Our NGS approach was based on a custom AmpliSeq design to detect variants in structural remodeling genes. The filtering strategy allowed us to identify 11 rare variants. For all variants, *in silico* tools were used to predict the possible pathogenic impact of an amino acid substitution on the structure and function of the human proteins. This predicted deleterious impact of these variants was strengthened by the evolutionary conservation of the altered amino acids.

Our initial hypothesis was that structural genes could be involved in atrial remodeling as much as ion-channel ones. Three likely pathogenic variants were in ion-channel genes previously associated with AF. Defects were found in *ANK2*, which encodes a multifunctional cytoskeletal adaptor [38], *KCNH2*, which encodes a potassium voltage-gated channel, and *SCN1B*, which encodes the  $\beta$ -subunit of the sodium

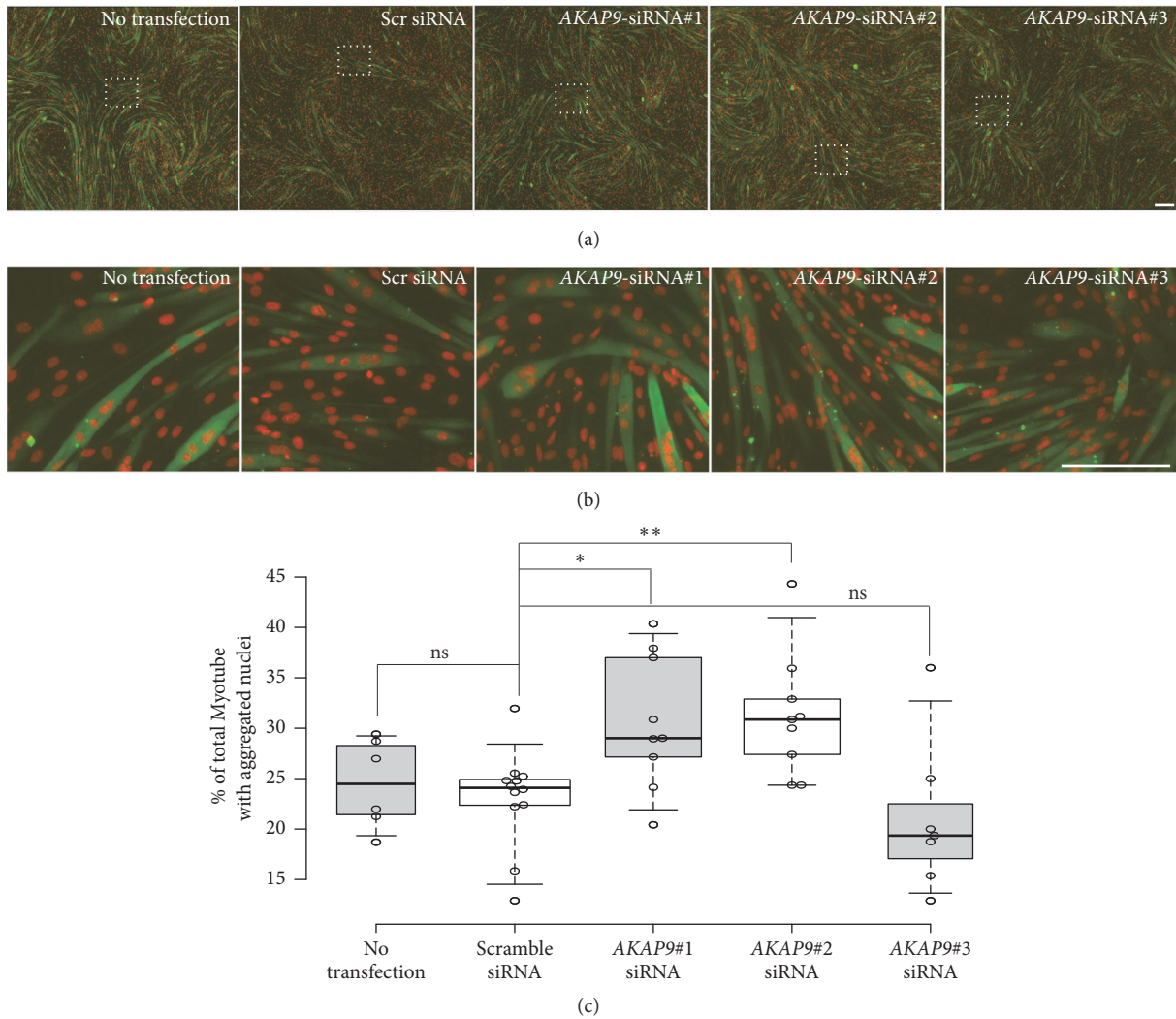


FIGURE 4: *AKAP9* is required for myonuclear positioning in C2C12 myotubes. (a) Representative immunofluorescence images of control (no transfection and Scramble siRNA treated cells) or AKAP9-depleted C2C12 myotubes (using 3 individual siRNA, 30 nM each) differentiated for 5 days and immunostained for myosin heavy chain (green) and 49,6-diamidino-2-phenylindole (red). Scale bar, 160 um. (b) 7x magnifications of rectangles shown in images (a). Scale bar, 160 um. (c) Histogram of percentage of total C2C12 myotubes with aggregated nuclei control (no transfection and Scramble siRNA treated cells) or AKAP9-depleted C2C12 myotubes (using 3 individual siRNA, 30 nM each) differentiated for 5 days. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend to 5th and 95th percentiles, outliers are represented by dots; width of the boxes is proportional to the square root of the sample size; data points are plotted as open circles. n = 6, 12, 9, 9, 7 sample points. Student's t-tests were performed between scrambled siRNA and experimental condition. Asterisk, P, 0.05; two asterisks, P, 0.01; ns: nonsignificant.

channel [39]. Evaluation of the missense variants using both segregation data and *in vitro* systems may help better understand the pathogenicity. The substitution at the splice donor site of the *SCN1B* intron 1, which was not reported in the ExAC consortium, is expected to yield a nonsense-mediated decay mechanism, resulting in a reduction of protein and haploinsufficiency. Several studies have shown that atrial dilatation is an independent risk factor for the development of AF [40]. In a recent study of eight patients with AF and a frameshift deletion in *MYL4*, six subjects developed LA dilatation during the follow-up [22]. In the present study, 82% of the novel variants were found in patients with LA dilatation, reinforcing the suggestion that these

variants could be involved in LA structural damage. Most of the identified genes were previously linked to other cardiac diseases (Table 5). *AKAP9*, *FHOD3*, and *TMEM43* were not previously associated with AF in the literature, but they were linked with other cardiac diseases.

The majority of the new variants found in the present study are located in genes encoding a broad category of proteins. These proteins are involved in many diverse biological processes related to structural remodeling of the extracellular matrix, the sarcolemma, the cytoskeleton, desmosome, sarcomere, the sarcoplasmic reticulum, and nucleus. Upregulation of *MMP9*, a profibrotic and proinflammatory molecule, contributes to atrial extracellular matrix remodeling [41],



which is associated with the development of AF [42]. In the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels of the cardiomyocytes, *ABCC8* encodes the regulatory sulfonyleurea receptor 1. Proteins involved in the desmosome structure include that encoded by *DSG2* and *DSP*. *DSG2* is more expressed in LA of patients with AF than control subjects as previously described [24]. Transcriptional network of cardiac rhythm driven by *TBX5* and modulated by *PITX2* regulates *Scn5a*, *Gjal*, *Ryr2*, *Dsp*, and *Atp2a2* genes [43]. Some of the proteins associated with the selected variants contribute to the structure or function of the sarcomere, with *FHOD3* playing a role in regulation of the actin filament assembly [44]. The cell structure gene *MYOZ1* encodes myozenin-1, which is a skeletal muscle Z line protein involved in stabilizing the sarcomere [45]. In addition, *JPH2* encodes a cardiac structural protein contributing to the formation of the junctional membrane complex architecture that links the sarcoplasmic reticulum with the plasma membrane in cardiomyocytes [46]. The *JPH2* mutation is thought to cause AF because of impaired stabilization of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> channels [47]. The inner nuclear membrane contains associated proteins, including that encoded by *TMEM43*, which is associated with lamin A/C and emerin [48]. *AKAP9*, a scaffolding protein involved in Golgi apparatus integrity and Golgi-related microtubules nucleation [35], is known to be the long QT syndrome-causative gene [49]. Our results confirmed an altered microtubule network in absence of *AKAP9* as inhibition of *AKAP9* results in increased aggregation phenotype in myotubes [36]. Consequences of *AKAP9* knockdown on remaining pool of microtubule-associate-partners remain to be determines. One can speculate that forces exerted by muscle molecular motors could be remodel in absence (or mutated forms) of *AKAP9* and could contribute to alteration of microtubule network dynamic [50, 51]. Microtubules networks are mechanically involved in cardiomyocyte contraction [52]. It will be of interest to analyse resulting network depending on different *AKAP9* variant and skeletal muscle cells could be used as a «simplified muscle model» to screen for the effect on microtubule dynamics of different variant of *AKAP9* found in cardiac muscles.

Each of these variants is involved in different pathways. The link between these variants and the effect on gene expression is unclear. A recent study has found that the SNP rs2595104 associated with AF regulates *PITX2c* expression via interaction with *TFAP2a* [53]. MiRNAs are part of the molecular alterations in LA occurring in patients with atrial remodeling [54]. One might consider that a variant could regulate miRNA in AF patients [55]. Cumulative evidence suggests that response to therapy may be genotype dependent. For example, SNP on chromosome 4q25 associated with AF modulates response to antiarrhythmic therapy [56]. This work opens research directions to establish personalised therapies according to individual genomic data as in cancer patients [57].

## 5. Conclusions

Eleven rare or novel potentially pathogenic variants were identified using the NGS method in patients with nonvalvular

AF, mainly in those with atrial dilatation. Validation studies are needed to confirm the involvement of these variants in atrial structural remodeling. This approach (Figure S1), based on genes involved in atrial structural remodeling, may help uncover new mechanisms underlying AF. In addition, candidate gene approaches based on disease physiopathology should be encouraged.

## List of Abbreviations

AF: Atrial fibrillation  
 ExAC: Exome aggregation consortium  
 GWAS: Genome-wide association studies  
 LA: Left atrium  
 NGS: Next-generation sequencing  
 PGM: Personal Genome Machine.

## Data Availability

The sequencing data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Disclosure

An earlier version of this work was presented at Printemps de la Cardiologie 2018, 13th European Cardiac Arrhythmia Society Congress, CNIC Conference “Atrial fibrillation: from mechanisms to population science,” and 18th Annual Cardiologists Conference.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## Authors' Contributions

All the authors provided substantial contributions to the conception, design, and acquisition and analysis of the data. Pr. Philippe Chevalier is responsible for the integrity of the work.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Laboratory of Molecular Cardiogenetics (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France) for their technical assistance.

## Supplementary Materials

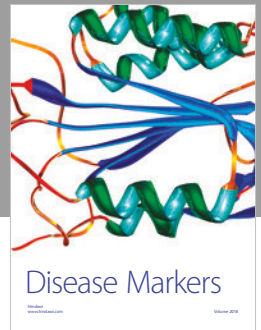
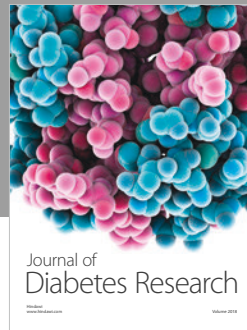
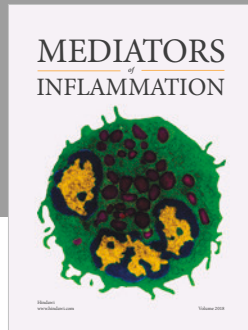
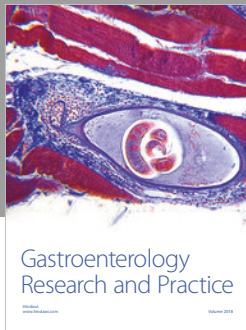
Supplementary Figure 1: schematic overview of our approach in atrial fibrillation (AF) patients. According to our previous transcriptomic data on left atrium (LA) in AF patients that highlighted the structural genes [24], a next-generation sequencing (NGS) approach has been applied to a cohort of 94 AF patients. Eleven potentially pathogenic variants were identified in AF patients, mainly in those with atrial dilatation, through a custom-made panel of 55 genes potentially involved in atrial myopathy. These variants were located

in genes involved in atrial tissue structural remodeling. (Supplementary Materials)

## References

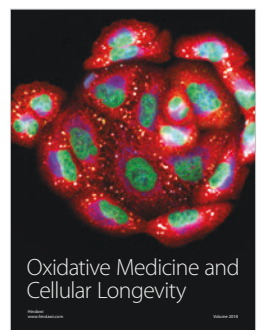
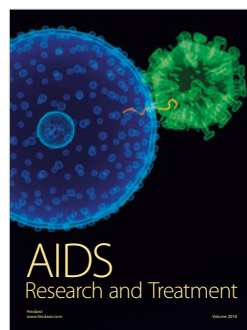
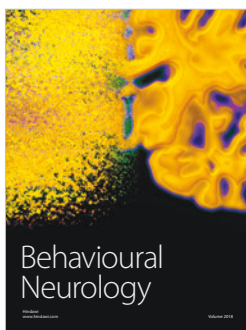
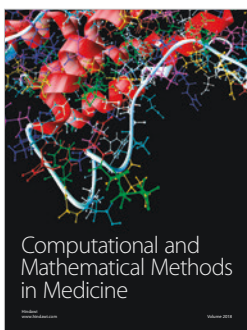
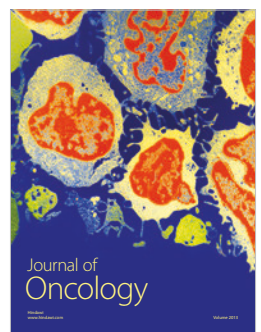
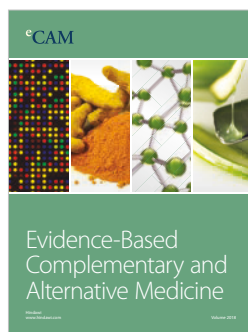
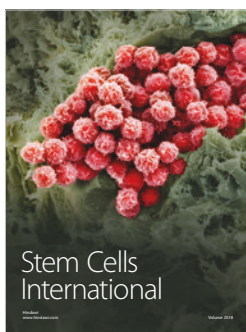
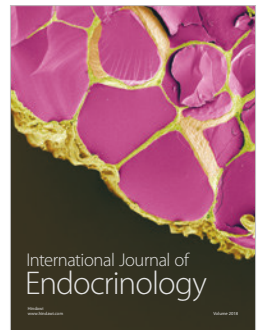
- [1] S. S. Chugh, R. Havmoeller, K. Narayanan et al., “Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a global burden of disease 2010 study,” *Circulation*, vol. 129, no. 8, pp. 837–847, 2014.
- [2] P. Kirchhof, G. Y. H. Lip, I. C. Van Gelder et al., “Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: Emerging diagnostic and therapeutic options—a report from the 3rd Atrial Fibrillation Competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference,” *Europace*, vol. 14, no. 1, pp. 8–27, 2012.
- [3] S. Nattel, B. Burstein, and D. Dobrev, “Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications,” *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, vol. 1, no. 1, pp. 62–73, 2008.
- [4] P.-S. Chen, L. S. Chen, M. C. Fishbein, S.-F. Lin, and S. Nattel, “Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy,” *Circulation Research*, vol. 114, no. 9, pp. 1500–1515, 2014.
- [5] C. S. Fox, H. Parise, R. B. D’Agostino et al., “Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 291, no. 23, pp. 2851–2855, 2004.
- [6] Y.-H. Chen, S.-J. Xu, S. Bendahhou et al., “KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation,” *Science*, vol. 299, no. 5604, pp. 251–254, 2003.
- [7] D. M. Hodgson-Zingman, M. L. Karst, L. V. Zingman et al., “Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 2, pp. 158–165, 2008.
- [8] P. G. A. Volders, Q. Zhu, C. Timmermans et al., “Mapping a novel locus for familial atrial fibrillation on chromosome 10p11-q21,” *Heart Rhythm*, vol. 4, no. 4, pp. 469–475, 2007.
- [9] P. T. Ellinor, J. T. Shin, R. K. Moore, D. M. Yoerger, and C. A. MacRae, “Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16,” *Circulation*, vol. 107, no. 23, pp. 2880–2883, 2003.
- [10] I. L. Thibodeau, J. Xu, Q. Li et al., “Paradigm of genetic mosaicism and lone atrial fibrillation: Physiological characterization of a connexin 43-deletion mutant identified from atrial tissue,” *Circulation*, vol. 122, no. 3, pp. 236–244, 2010.
- [11] J. Jabbari, M. S. Olesen, L. Yuan et al., “Common and rare variants in SCN10A modulate the risk of atrial fibrillation,” *Circulation: Cardiovascular Genetics*, vol. 8, no. 1, pp. 64–73, 2015.
- [12] D. F. Gudbjartsson, D. O. Arnar, A. Helgadóttir et al., “Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25,” *Nature*, vol. 448, no. 7151, pp. 353–357, 2007.
- [13] P. T. Ellinor, K. L. Lunetta, N. L. Glazer et al., “Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation,” *Nature Genetics*, vol. 42, no. 3, pp. 240–244, 2010.
- [14] P. T. Ellinor, K. L. Lunetta, C. M. Albert et al., “Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation,” *Nature Genetics*, vol. 44, no. 6, pp. 670–675, 2012.
- [15] B. Sikkema-Raddatz, L. F. Johansson, E. N. de Boer et al., “Targeted next-generation sequencing can replace sanger sequencing in clinical diagnostics,” *Human Mutation*, vol. 34, no. 7, pp. 1035–1042, 2013.
- [16] C.-T. Tsai, C.-S. Hsieh, S.-N. Chang et al., “Next-generation sequencing of nine atrial fibrillation candidate genes identified novel de novo mutations in patients with extreme trait of atrial fibrillation,” *Journal of Medical Genetics*, vol. 52, no. 1, pp. 28–36, 2015.
- [17] H. Lin, M. F. Sinner, J. A. Brody et al., “Targeted sequencing in candidate genes for atrial fibrillation: The Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Targeted Sequencing Study,” *Heart Rhythm*, vol. 11, no. 3, pp. 452–457, 2014.
- [18] P. Weeke, B. Parvez, M. Blair et al., “Candidate gene approach to identifying rare genetic variants associated with lone atrial fibrillation,” *Heart Rhythm*, vol. 11, no. 1, pp. 46–52, 2014.
- [19] A. Boldt, U. Wetzel, J. Lauschke et al., “Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease,” *Heart*, vol. 90, no. 4, pp. 400–405, 2004.
- [20] A. Frustaci, C. Chimenti, F. Bellocci, E. Morgante, M. A. Russo, and A. Maseri, “Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 96, no. 4, pp. 1180–1184, 1997.
- [21] Q.-Q. Cui, W. Zhang, H. Wang et al., “Assessment of atrial electromechanical coupling and influential factors in nonrheumatic paroxysmal atrial fibrillation,” *Clinical Cardiology*, vol. 31, no. 2, pp. 74–78, 2008.
- [22] D. F. Gudbjartsson, H. Holm, P. Sulem et al., “A frameshift deletion in the sarcomere gene MYL4 causes early-onset familial atrial fibrillation,” *European Heart Journal*, vol. 38, no. 1, pp. 27–34, 2017.
- [23] P. Kirchhof, S. Benussi, D. Kotecha et al., “2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS,” *Europace*, vol. 18, no. 11, pp. 1609–1678, 2016.
- [24] R. Doñate Puertas, E. Meugnier, C. Romestaing et al., “Atrial fibrillation is associated with hypermethylation in human left atrium, and treatment with decitabine reduces atrial tachyarrhythmias in spontaneously hypertensive rats,” *Translational Research*, vol. 184, pp. 57–67.e5, 2017.
- [25] G. Millat, V. Chanavat, and R. Rousson, “Evaluation of a new NGS method based on a custom AmpliSeq library and Ion Torrent PGM sequencing for the fast detection of genetic variations in cardiomyopathies,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 433, pp. 266–271, 2014.
- [26] G. Millat, V. Chanavat, and R. Rousson, “Evaluation of a New High-Throughput Next-Generation Sequencing Method Based on a Custom AmpliSeq™ Library and Ion Torrent PGM™ Sequencing for the Rapid Detection of Genetic Variations in Long QT Syndrome,” *Molecular Diagnosis & Therapy*, vol. 18, no. 5, pp. 533–539, 2014.
- [27] V. Chanavat, A. Janin, and G. Millat, “A fast and cost-effective molecular diagnostic tool for genetic diseases involved in sudden cardiac death,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 453, pp. 80–85, 2016.
- [28] S. Richards, N. Aziz, and S. Bale, “Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology,” *Genetics in Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 405–423, 2015.
- [29] I. A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin et al., “A method and server for predicting damaging missense mutations,” *Nature Methods*, vol. 7, no. 4, pp. 248–249, 2010.
- [30] P. Kumar, S. Henikoff, and P. C. Ng, “Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm,” *Nature Protocols*, vol. 4, no. 7, pp. 1073–1082, 2009.

- [31] J. M. Schwarz, C. Rödelberger, M. Schuelke, and D. Seelow, "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations," *Nature Methods*, vol. 7, no. 8, pp. 575–576, 2010.
- [32] R. Grantham, "Amino acid difference formula to help explain protein evolution," *Science*, vol. 185, no. 4154, pp. 862–864, 1974.
- [33] R. C. Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797, 2004.
- [34] B. Cadot, V. Gache, E. Vasyutina, S. Falcone, C. Birchmeier, and E. R. Gomes, "Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3," *EMBO Reports*, vol. 13, no. 8, pp. 741–749, 2012.
- [35] S. Rivero, J. Cardenas, M. Bornens, and R. M. Rios, "Microtubule nucleation at the cis-side of the golgi apparatus requires AKAP450 and GM130," *EMBO Journal*, vol. 28, no. 8, pp. 1016–1028, 2009.
- [36] P. Gimpel, Y. L. Lee, R. M. Sobota et al., "Nesprin-1 $\alpha$ -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells," *Current Biology*, vol. 27, no. 19, pp. 2999–3009.e9, 2017.
- [37] N. R. Tucker, S. Clauss, and P. T. Ellinor, "Common variation in atrial fibrillation: Navigating the path from genetic association to mechanism," *Cardiovascular Research*, vol. 109, no. 4, pp. 493–501, 2016.
- [38] S. R. Cunha, T. J. Hund, S. Hashemi et al., "Defects in ankyrin-based membrane protein targeting pathways underlie atrial fibrillation," *Circulation*, vol. 124, no. 11, pp. 1212–1222, 2011.
- [39] K. Hayashi, T. Konno, H. Tada et al., "Functional Characterization of Rare Variants Implicated in Susceptibility to Lone Atrial Fibrillation," *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, vol. 8, no. 5, pp. 1095–1104, 2015.
- [40] W. L. Henry, J. Morganroth, A. S. Pearlman et al., "Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation," *Circulation*, vol. 53, no. 2, pp. 273–279, 1976.
- [41] C.-L. Chen, S. K. S. Huang, J.-L. Lin et al., "Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 45, no. 6, pp. 742–753, 2008.
- [42] M. Li, G. Yang, B. Xie, K. Babu, and C. Huang, "Changes in matrix metalloproteinase-9 levels during progression of atrial fibrillation," *Journal of International Medical Research*, vol. 42, no. 1, pp. 224–230, 2014.
- [43] R. D. Nadadur, M. T. Broman, B. Boukens et al., "Pitx2 modulates a Tbx5-dependent gene regulatory network to maintain atrial rhythm," *Science Translational Medicine*, vol. 8, no. 354, 2016.
- [44] M. Kan-o, R. Takeya, K. Taniguchi, Y. Tanoue, R. Tominaga, and H. Sumimoto, "Expression and subcellular localization of mammalian formin Fhod3 in the embryonic and adult heart," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, 2012.
- [45] N. Frey, J. A. Richardson, and E. N. Olson, "Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 26, pp. 14632–14637, 2000.
- [46] A. Garbino and X. H. Wehrens, "Emerging role of junctophilin-2 as a regulator of calcium handling in the heart," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 31, no. 9, pp. 1019–1021, 2010.
- [47] D. L. Beavers, W. Wang, S. Ather et al., "Mutation E169K in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 62, no. 21, pp. 2010–2019, 2013.
- [48] L. Bengtsson and H. Otto, "LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 4, pp. 536–548, 2008.
- [49] L. Chen, M. L. Marquardt, D. J. Tester, K. J. Sampson, M. J. Ackerman, and R. S. Kass, "Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 52, pp. 20990–20995, 2007.
- [50] V. Gache, E. R. Gomes, and B. Cadot, "Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation," *Molecular Biology of the Cell (MBoC)*, vol. 28, no. 7, pp. 865–874, 2017.
- [51] T. Metzger, V. Gache, M. Xu et al., "MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function," *Nature*, vol. 484, no. 7392, pp. 120–124, 2012.
- [52] P. Robison, M. A. Caporizzo, H. Ahmadzadeh et al., "Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes," *Science*, vol. 352, no. 6284, Article ID aaf0659, 2016.
- [53] J. Ye, N. R. Tucker, L.-C. Weng, S. Clauss, S. A. Lubitz, and P. T. Ellinor, "A Functional Variant Associated with Atrial Fibrillation Regulates PITX2c Expression through TFAP2a," *American Journal of Human Genetics*, vol. 99, no. 6, pp. 1281–1291, 2016.
- [54] R. Doñate Puertas, A. Jalabert, E. Meugnier et al., "Analysis of the microRNA signature in left atrium from patients with valvular heart disease reveals their implications in atrial fibrillation," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 5, p. e0196666, 2018.
- [55] S. Hoffmann, S. Clauss, I. M. Berger et al., "Coding and non-coding variants in the SHOX2 gene in patients with early-onset atrial fibrillation," *Basic Research in Cardiology*, vol. 111, no. 3, article 36, pp. 1–15, 2016.
- [56] B. Parvez, J. Vaglio, S. Rowan et al., "Symptomatic response to antiarrhythmic drug therapy is modulated by a common single nucleotide polymorphism in atrial fibrillation," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 60, no. 6, pp. 539–545, 2012.
- [57] E. Piñero-Yáñez, M. Reboiro-Jato, G. Gómez-López et al., "PanDrugs: a novel method to prioritize anticancer drug treatments according to individual genomic data," *Genome Medicine*, vol. 10, no. 1, 2018.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
[www.hindawi.com](http://www.hindawi.com)





# ANNEXES



## Annexe 1

Tableau présentant les 240 protéines sélectionnées pour le criblage ARN interférents de type siRNA. Diverses caractéristiques de chaque protéine sont présentées : le gène, le protéome microtubules-dépendant dans lequel elles ont été identifiées, leur localisation subcellulaire, leur rôle moléculaire ainsi que leurs potentielles implications dans des pathologies humaines.

| Gène    | Protéine  | Spectrométrie de masse             | Localisation subcellulaire | Fonction moléculaire               | Implication dans des pathologies        |
|---------|---|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|---|
| Abce1   | ATP-binding cassette sub-family E member 1                  | Protéome commun                    | Mitochondrie               | Chaperonne                         | /                                       |
| Acly    | ATP-citrate synthase  | Protéome commun                    | Cytoplasme                 | Activité de transférase            | Gène lié au cancer                      |
| Ahnak   | AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)                            | Enrichie dans les myotubes         | Membrane                   | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | /                                       |
| Akap12  | A-kinase anchor protein 12                                  | Spécifique des myotubes            | Membrane                   | Activité de kinase                 | Gène lié au cancer                      |
| Akap9   | A-kinase anchor protein 9                                   | Spécifique des myotubes            | Appareil de Golgi          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | Gène lié au cancer, syndrome du QT long |
| Anpep   | Aminopeptidase N  | Spécifique des myotubes            | Membrane                   | Activité de métalloprotéase        | /                                       |
| Ap1b1   | AP-1 complex subunit bêta-1                                 | Protéome commun                    | Appareil de Golgi          | Protéine de trafic membranaire     | /                                       |
| Ap1g1   | AP-1 complex subunit gamma-1                                | Protéome commun                    | Appareil de Golgi          | Protéine de trafic membranaire     | /                                       |
| Ap1m1   | AP-1 complex subunit mu-1                                   | Spécifique des myofibres           | Appareil de Golgi          | Protéine de trafic membranaire     | /                                       |
| Ap2m1   | AP-2 complex subunit mu                                     | Condition enrichie en microtubules | Membrane                   | Protéine de trafic membranaire     | /                                       |
| Arf6    | ADP-ribosylation factor 6                                   | Spécifique des myofibres           | Cytoplasme                 | Protéine G                         | /                                       |
| Arfgef2 | Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 | Spécifique des myofibres           | Appareil de Golgi          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | /                                       |
| Arhgdia | Rho GDP-dissociation inhibitor 1                            | Protéome commun                    | Cytoplasme                 | Modulateur des protéines G         | Gène lié au cancer                      |
| Arhgef2 | Rho guanine nucleotide exchange factor 2                    | Enrichie dans les myotubes         | Microtubules               | Protéine du développement          | Retard mental                           |
| Arpc3   | Actin-related protein 2/3 complex subunit 3                 | Spécifique des myofibres           | Actine                     | Actine ou protéine liée à l'Actine | /                                       |
| Atp2a1  | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1         | Protéome commun                    | Réticulum endoplasmique    | Transporteur primaire actif        | /                                       |



|          |   |                             |                         |   |  |
|----------|---|-----------------------------|-------------------------|---|--|
| Atp6v1a1 | V-type proton ATPase catalytic subunit A                | Protéome commun             | Cytoplasme              | ATP synthase  | Epilepsie  |
| Bracl    | Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog     | Protéome commun             | Noyau                   | Ubiquitine protéine ligase                            | Gène lié au cancer, anémie de Fanconi, suppresseur de tumeur |
| Bra2     | Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog     | Protéome commun             | Microtubules            | Protéine de liaison à l'ADN endommagé                 | Gène lié au cancer, anémie de Fanconi, suppresseur de tumeur |
| Calr     | Calreticulin  | Enrichie dans les myofibres | Réticulum endoplasmique | Chaperonne  | Gène lié au cancer   |
| Cand2    | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 2           | Protéome commun             | Noyau                   | Ubiquitine protéine ligase                            | /  |
| Cap1     | Adenylyl cyclase-associated protein 1                   | Protéome commun             | Membrane                | Activité de protéase                                  | /  |
| Capzb    | F-actin-capping protein subunit beta                    | Protéome commun             | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'actine                    | /  |
| Cct1     | T-complex protein 1 subunit alpha                       | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonne  | /  |
| Cct2     | T-complex protein 1 subunit bêta                        | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cct3     | T-complex protein 1 subunit gamma                       | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cct4     | T-complex protein 1 subunit delta                       | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cct5     | T-complex protein 1 subunit epsilon                     | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | Neuropathie  |
| Cct6     | T-complex protein 1 subunit zeta                        | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cct7     | T-complex protein 1 subunit eta                         | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cct8     | T-complex protein 1 subunit theta                       | Protéome commun             | Cytoplasme              | Chaperonine   | /  |
| Cdk1     | Cyclin-dependent kinase 1                               | Spécifique des myotubes     | Noyau                   | Sérine/thréonine protéine kinase                      | Gène lié au cancer   |
| Cenpe    | Centromere-associated protein E                         | Protéome commun             | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Microcéphalie primaire                                       |
| Cep135   | Centrosomal protein of 135 kDa                          | Spécifique des myofibres    | Cytoplasme              | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | Retard mental, microcéphalie primaire                        |
| Cep170   | Centrosomal protein of 170 kDa                          | Spécifique des myotubes     | Microtubules            | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice                   | /  |
| Chp1     | Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1 | Protéome commun             | Cytoplasme              | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice                   | /  |
| Ckap4    | Cytoskeleton-associated protein 4                       | Protéome commun             | Microtubules            | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice                   | /  |
| Ckap5    | Cytoskeleton-associated protein 5                       | Protéome commun             | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |

|        |  |                                    |                   |   |   |
|--------|--|------------------------------------|-------------------|---|---|
| Clasp1 | CLIP-associating protein 1                 | Spécifique des myotubes            | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules  | /   |
| Clasp2 | CLIP-associating protein 2                 | Spécifique des myotubes            | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules  | /   |
| Clip1  | CAP-Gly domain-containing linker protein 1 | Condition enrichie en microtubules | Microtubules      | Chaperonne  | Gène lié au cancer  |
| Clip2  | CAP-Gly domain-containing linker protein 2 | Condition enrichie en microtubules | Microtubules      | Chaperonne  | Syndrome de Williams-Beuren   |
| Col6a3 | Collagen, type VI, alpha 3                 | Protéome commun                    | Membrane          | Protéine de structure de la matrice extracellulaire | Dystrophie musculaire congénitale, dystonie, dystrophie musculaire des ceintures                            |
| Cops5  | COP9 signalosome complex subunit 5         | Protéome commun                    | Noyau             | Activité de métalloprotéase                         | /   |
| Coro1a | Coronin-1A                                 | Spécifique des myofibres           | Actine            | Actine ou protéine liée à l'Actine                  | /   |
| Cotl1  | Coactosin-like protein                     | Spécifique des myofibres           | Actine            | Actine ou protéine liée à l'actine                  | /   |
| Ctsb   | Cathepsin B                                | Protéome commun                    | Cytoplasme        | Activité de protéase                                | Gène lié au cancer  |
| Ctsd   | Cathepsin D                                | Enrichie dans les myofibres        | Cytoplasme        | Activité d'hydrolase                                | Alzheimer, gène lié au cancer, neurodégénérescence  |
| Cul1   | Cullin-1                                   | Protéome commun                    | Noyau             | Ubiquitine protéine ligase                          | Gène lié au cancer  |
| Cul3   | Cullin-3                                   | Protéome commun                    | Appareil de Golgi | Ubiquitine protéine ligase                          | /   |
| Dclk1  | Serine/threonine-protein kinase DCLK1      | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme        | Sérine/thréonine protéine kinase                    | /   |
| Dctn1  | Dynactin subunit 1                         | Protéome commun                    | Microtubules      | Chaperonne  | Sclérose latérale amyotrophique, gène lié au cancer, neurodégénérescence, neuropathie, maladie de Parkinson |
| Dctn2  | Dynactin subunit 2                         | Protéome commun                    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules  | /   |
| Dctn4  | Dynactin subunit 4                         | Spécifique des myotubes            | Microtubules      | Actine ou protéine liée à l'actine                  | /   |
| Dctn5  | Dynactin subunit 5                         | Spécifique des myotubes            | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules  | /   |

|          |  |                            |              |   |  |
|----------|--|----------------------------|--------------|---|--|
| Ddx1     | ATP-dependent RNA helicase DDX1                      | Enrichie dans les myotubes | Noyau        | Protéine de liaison à l'ARN                           | /  |
| Ddx3x    | ATP-dependent RNA helicase DDX3X                     | Protéome commun            | Mitochondrie | Activité d'hélicase                                   | Gène lié au cancer, retard mental  |
| Dst      | Dystonin   | Spécifique des myotubes    | Cytoplasme   | Protéine de liaison aux filaments intermédiaires      | Gène lié au cancer, épidermolyse bulleuse, neurodégénérescence, neuropathie        |
| Dyhc     | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | Protéome commun            | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Dync1h1  | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1                   | Protéome commun            | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Pathologie de Charcot-Marie-Tooth, retard mental, neurodégénérescence, neuropathie |
| Dync1i2  | Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2            | Protéome commun            | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Retard mental  |
| Dync1li1 | Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1      | Protéome commun            | Cytoplasme   | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Dync1li2 | Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2      | Protéome commun            | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Dynll1   | Dynein light chain 1, cytoplasmic                    | Protéome commun            | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Gène lié au cancer   |
| Ecm29    | Proteasome adapter and scaffold protein ECM29        | Protéome commun            | Noyau        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Eed      | Polycomb protein EED                                 | Spécifique des myotubes    | Noyau        | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | /  |
| Eef1a    | Elongation factor 1-alpha 1                          | Protéome commun            | Noyau        | Facteur d'élongation de la transcription              | Gène lié au cancer   |
| Eef1a1   | Elongation factor 1-alpha 1                          | Protéome commun            | Noyau        | Facteur de traduction                                 | Gène lié au cancer   |
| Eef2     | Elongation factor 2                                  | Protéome commun            | Noyau        | Facteur d'élongation de la traduction                 | Gène lié au cancer, neurodégénérescence, ataxie spinocérébelleuse                  |
| Ehbp111  | EH domain-binding protein 1-like protein 1           | Enrichie dans les myotubes | Membrane     | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Eif3k    | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K | Spécifique des myofibres   | Noyau        | Facteur d'initiation                                  | /  |
| Eif4a1   | Eukaryotic initiation factor 4A-I                    | Protéome commun            | Cytoplasme   | Protéine de liaison à l'ARN                           | /  |
| Elavl1   | ELAV-like protein 1                                  | Protéome commun            | Noyau        | Protéine de liaison à l'ARN                           | /  |
| Elmo1    | Engulfment and cell motility protein 1               | Spécifique des myofibres   | Membrane     | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |

|        |  |                                    |                   |  |   |
|--------|--|------------------------------------|-------------------|--|---|
| Elmo2  | Engulfment and cell motility protein 2                           | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Eml2   | Echinoderm microtubule-associated protein-like 2                 | Condition enrichie en microtubules | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Eml4   | Echinoderm microtubule-associated protein-like 4                 | Condition enrichie en microtubules | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Gène lié au cancer                        |
| Enah   | Protein enabled homolog  | Spécifique des myotubes            | Actine            | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Epb72  | Erythrocyte band 7 integral membrane protein                     | Spécifique des myofibres           | Membrane          | Protéine du cytosquelette                          | /   |
| Eya3   | Eyes absent homolog 3  | Spécifique des myotubes            | Noyau             | Activité de phosphatase                            | /   |
| Fam49b | Protein FAM49B   | Protéome commun                    | Membrane          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Flnc   | Filamin-C  | Protéome commun                    | Cytoplasme        | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Cardiomyopathie, myopathie myofibrillaire |
| Fscn1  | Fascin   | Spécifique des myofibres           | Cytoplasme        | Actine ou protéine liée à l'actine                 | Gène lié au cancer                        |
| Gbas   | Protein NipSnap homolog 2  | Protéome commun                    | Mitochondrie      | Activité de transférase                            | /   |
| Gcn111 | eIF-2-alpha kinase activator GCN1                                | Protéome commun                    | Cytoplasme        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Gfpt2  | Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 | Protéome commun                    | Cytoplasme        | Activité de transaminase                           | /   |
| Glud1  | Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial                         | Condition enrichie en microtubules | Mitochondrie      | Activité de déhydrogénase                          | /   |
| Gnb1   | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 | Protéome commun                    | Membrane          | Protéine G hétérotrimérique                        | Gène lié au cancer, retard mental         |
| Gnb211 | Receptor of activated protein C kinase 1                         | Protéome commun                    | Noyau             | Protéine du développement                          | /   |
| Gpnmb  | Transmembrane glycoprotein NMB                                   | Spécifique des myofibres           | Membrane          | Molécule de signalisation liée à la membrane       | Amylose                                   |
| Gsk3b  | Glycogen synthase kinase-3 bêta                                  | Spécifique des myotubes            | Membrane          | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Alzheimer, diabète                        |
| Gsn    | Gelsolin   | Spécifique des myofibres           | Actine            | Actine ou protéine liée à l'actine                 | Amylose, gène lié au cancer               |
| Hook3  | Heat shock cognate 71 kDa protein                                | Protéome commun                    | Appareil de Golgi | Protéine de trafic membranaire                     | Gène lié au cancer                        |
| Hspa8  | Heat shock cognate 71 kDa protein                                | Protéome commun                    | Noyau             | Chaperonne   | Gène lié au cancer                        |

|         |  |                            |                         |  |   |
|---------|--|----------------------------|-------------------------|--|---|
| Hspb1   | Heat shock protein bêta-1  | Protéome commun            | Noyau                   | Chaperonne   | Gène lié au cancer, pathologie de Charcot-Marie-Tooth, neurodégénérescence, neuropathie |
| Hspg2   | Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein | Spécifique des myofibres   | Extracellulaire         | Protéine de la matrice extracellulaire             | /   |
| Hyou1   | Hypoxia up-regulated protein 1                                       | Protéome commun            | Réticulum endoplasmique | Chaperonne   | /   |
| Inpp4b  | Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase                      | Spécifique des myotubes    | Cytoplasme              | Activité d'hydrolase                               | /   |
| Inpp1l  | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2             | Enrichie dans les myotubes | Cytoplasme              | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Gène lié au cancer, diabète   |
| Invs    | Inversin   | Protéome commun            | Noyau                   | Protéine du développement                          | Ciliopathie   |
| Iqgap1  | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1                            | Protéome commun            | Membrane                | Protéine d'activation des GTPase                   | /   |
| Jakmip3 | Janus kinase and microtubule-interacting protein 3                   | Spécifique des myofibres   | Appareil de Golgi       | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Kank2   | KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2              | Enrichie dans les myotubes | Mitochondrie            | Actine ou protéine liée à l'actine                 | /   |
| Kcnab2  | Voltage-gated potassium channel subunit bêta-2                       | Spécifique des myofibres   | Membrane                | Activité d'oxydoréductase                          | /   |
| Kdm1a   | Lysine-specific histone demethylase 1A                               | Spécifique des myofibres   | Noyau                   | Activité d'oxydase                                 | /   |
| Kif13b  | Kinesin family member 13B  | Spécifique des myofibres   | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Kif1bp  | KIF-binding protein  | Spécifique des myotubes    | Microtubules            | Protéine du développement                          | /   |
| Kif2a   | Kinesin-like protein KIF2A   | Protéome commun            | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Gène lié au cancer, lissencéphalie  |
| Kif3a   | Kinesin-like protein KIF3A   | Spécifique des myofibres   | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Kifap3  | Kinesin-associated protein 3   | Spécifique des myofibres   | Appareil de Golgi       | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Klc1    | Kinesin light chain 1  | Protéome commun            | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Klhl22  | Kelch-like protein 22  | Spécifique des myotubes    | Cytoplasme              | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |

|        |  |                                    |                         |  |   |
|--------|--|------------------------------------|-------------------------|--|---|
| Klh3   | Kelch-like protein 3   | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Ktn1   | Kinectin   | Protéome commun                    | Réticulum endoplasmique | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Gène lié au cancer  |
| Lcp1   | Plastin-2  | Spécifique des myofibres           | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'actine                 | Gène lié au cancer  |
| Ldb3   | LIM domain-binding protein 3                                 | Protéome commun                    | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Cardiomyopathie, myopathie myofibrillaire                                 |
| Lmod3  | Leiomodin-3  | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Myopathie némaline  |
| Lrp1   | Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1        | Enrichie dans les myofibres        | Membrane                | Apolipoprotéine                                    | /   |
| Lrpprc | Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial     | Protéome commun                    | Microtubules            | Protéine de liaison à l'ADN                        | Syndrome de Leigh, pathologie mitochondriale                              |
| Macf1  | Microtubule-actin cross-linking factor 1                     | Protéome commun                    | Microtubules            | Protéine de liaison aux filaments intermédiaires   | Lissencephalie  |
| Map1a  | Microtubule-associated protein 1A                            | Protéome commun                    | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Map1b  | Microtubule-associated protein 1B                            | Protéome commun                    | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Map1s  | Microtubule-associated protein 1S                            | Protéome commun                    | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Map2   | Microtubule-associated protein 2                             | Condition enrichie en microtubules | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Map2k1 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1   | Spécifique des myofibres           | Microtubules            | Activité de kinase                                 | Gène lié au cancer, cardiomyopathie, dysplasie ectodermale, retard mental |
| Map4   | Microtubule-associated protein 4                             | Spécifique des myotubes            | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Mapk1  | Mitogen-activated protein kinase 1                           | Spécifique des myofibres           | Noyau                   | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Gène lié au cancer  |
| Mapk3  | Mitogen-activated protein kinase 3                           | Spécifique des myofibres           | Noyau                   | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Gène lié au cancer  |
| Mapre1 | Microtubule-associated protein RP/EB family member 1         | Protéome commun                    | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Matr3  | Matrin-3   | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine de liaison à l'ARN                        | Sclérose latérale amyotrophique, neurodégénérescence                      |
| Mccc1  | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial | Spécifique des myofibres           | Mitochondrie            | Activité de ligase                                 | /   |

|         |  |                             |                 |                                    |   |
|---------|--|-----------------------------|-----------------|------------------------------------|---|
| Mcm3    | DNA replication licensing factor MCM3                | Enrichie dans les myotubes  | Noyau           | Protéine de liaison à l'ADN        | Gène lié au cancer  |
| Mfn2    | Mitofusin-2  | Spécifique des myofibres    | Mitochondrie    | Activité d'hydrolase               | Pathologie de Charcot-Marie-Tooth, neurodégénérescence, neuropathie |
| Mical1  | [F-actin]-monooxygenase MICAL1                       | Protéome commun             | Actine          | Actine ou protéine liée à l'Actine | /   |
| Mid1    | Mid1-interacting protein 1                           | Spécifique des myotubes     | Noyau           | Activité de glycosylase            | /   |
| Mink1   | Misshapen-like kinase 1                              | Spécifique des myofibres    | Cytoplasme      | Activité de kinase                 | /   |
| Mpeg1   | Macrophage-expressed gene 1 protein                  | Spécifique des myofibres    | Cytoplasme      | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | /   |
| Mpp1    | 55 kDa erythrocyte membrane protein                  | Spécifique des myofibres    | Membrane        | Activité de kinase                 | /   |
| Msn     | Moesin   | Spécifique des myofibres    | Actine          | Actine ou protéine liée à l'Actine | Gène lié au cancer  |
| Murc    | Caveolae-associated protein 4                        | Protéome commun             | Cytoplasme      | Protéine de trafic membranaire     | /   |
| Mvp     | Major vault protein                                  | Enrichie dans les myofibres | Noyau           | ATP synthase                       | Gène lié au cancer  |
| Myo5a   | Unconventional myosin-Va                             | Spécifique des myofibres    | Cytoplasme      | Actine ou protéine liée à l'Actine | Gène lié au cancer  |
| Myom2   | Myomesin 2   | Enrichie dans les myotubes  | Actine          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | /   |
| Naca    | Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | Protéome commun             | Noyau           | Chaperonne                         | Allergène   |
| Naglu   | Naglu  | Spécifique des myofibres    | Extracellulaire | Activité d'hydrolase               | Pathologie de Charcot-Marie-Tooth, neurodégénérescence, neuropathie |
| Nckap1  | Nck-associated protein 1-like                        | Spécifique des myofibres    | Membrane        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice | /   |
| Nckap11 | Nck-associated protein 1-like                        | Spécifique des myofibres    | Membrane        | Actine ou protéine liée à l'Actine | /   |
| Nedd4   | E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4                    | Protéome commun             | Membrane        | Ubiquitine protéine ligase         | /   |
| Nek6    | Serine/threonine-protein kinase Nek6                 | Spécifique des myotubes     | Noyau           | Activité de kinase                 | /   |
| Nek9    | Serine/threonine-protein kinase Nek9                 | Spécifique des myofibres    | Noyau           | Activité de kinase                 | /   |

|          |  |                                    |                         |   |  |
|----------|--|------------------------------------|-------------------------|---|--|
| Nexn     | Nexilin  | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                  | Cardiomyopathie, myopathie myofibrillaire                                      |
| Nid1     | Nidogen-1  | Spécifique des myofibres           | Membrane                | Protéine de structure de la matrice extracellulaire | /  |
| Nme2     | Nucleoside diphosphate kinase B  | Spécifique des myotubes            | Noyau                   | Activité de kinase                                  | Gène lié au cancer   |
| Nmt1     | Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1                                 | Spécifique des myofibres           | Cytoplasme              | Activité de transférase                             | /  |
| NuMA1    | Nuclear mitotic apparatus protein 1  | Enrichie dans les myotubes         | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules  | Gène lié au cancer   |
| Obscn    | Obscurin   | Enrichie dans les myotubes         | Noyau                   | Activité de transférase                             | /  |
| Obsl1    | Obscurin-like protein 1  | Spécifique des myotubes            | Appareil de Golgi       | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                  | Nanisme  |
| Pabpc1   | Polyadenylate-binding protein 1  | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine de liaison à l'ARN                         | Gène lié au cancer   |
| Pafah1b1 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha                | Protéome commun                    | Microtubules            | Protéine du développement                           | Lissencéphalie   |
| Pak2     | Serine/threonine-protein kinase PAK 2                                      | Spécifique des myofibres           | Noyau                   | Activité de kinase                                  | /  |
| Pdlim1   | PDZ and LIM domain protein 1   | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                  | /  |
| Pin1     | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1                     | Spécifique des myotubes            | Noyau                   | Chaperonne  | Gène lié au cancer   |
| Plec1    | Plectin  | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                  | Gène lié au cancer, épidermolyse bulleuse, dystrophie musculaire des ceintures |
| Plk1     | Serine/threonine-protein kinase PLK1                                       | Condition enrichie en microtubules | Microtubules            | Activité de kinase                                  | Gène lié au cancer   |
| Plod2    | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2                          | Enrichie dans les myofibres        | Réticulum endoplasmique | Activité d'oxygénase                                | Ostéogenèse imparfaite   |
| Plod3    | Multifunctional procollagen lysine hydroxylase and glycosyltransferase LH3 | Spécifique des myofibres           | Réticulum endoplasmique | Activité d'oxygénase                                | /  |
| Ppp1ca   | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit           | Protéome commun                    | Noyau                   | Activité de phosphatase                             | /  |
| Ppp4c    | Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit                   | Spécifique des myofibres           | Noyau                   | Activité de phosphatase                             | /  |



|          |  |                                    |                         |   |                                   |
|----------|--|------------------------------------|-------------------------|---|-----------------------------------|
| Prdx1    | Peroxioredoxin-1   | Protéome commun                    | Cytoplasme              | Activité de peroxydase                                | /                                 |
| Prune2   | Protein prune homolog 2  | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme              | Activité de phosphatase                               | /                                 |
| Psmc3    | 26S proteasome regulatory subunit 6A   | Protéome commun                    | Noyau                   | Activité de protéase                                  | /                                 |
| Pkm      | Pyruvate kinase PKM  | Protéome commun                    | Cytoplasme              | Activité de kinase                                    | /                                 |
| Rab6a    | Ras-related protein Rab-6A   | Protéome commun                    | Appareil de Golgi       | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /                                 |
| Rbm39    | RNA-binding protein 39   | Spécifique des myofibres           | Noyau                   | Protéine de liaison à l'ARN                           | /                                 |
| Rcc2     | Protein RCC2   | Spécifique des myotubes            | Microtubules            | Facteur de libération de Guanine                      | /                                 |
| Rdx      | Radixin  | Spécifique des myofibres           | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                    | Surdité                           |
| Rps26    | 40S ribosomal protein S26  | Protéome commun                    | Cytoplasme              | Protéine ribosomale                                   | Anémie                            |
| Rps5     | 40S ribosomal protein S5   | Protéome commun                    | Cytoplasme              | Protéine ribosomale                                   | /                                 |
| Rpsa     | 40S ribosomal protein SA   | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine ribosomale                                   | /                                 |
| Rrbp1    | Ribosome-binding protein 1   | Enrichie dans les myofibres        | Réticulum endoplasmique | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /                                 |
| Rtnn     | Rotatin  | Spécifique des myofibres           | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /                                 |
| Sept2    | Septin-2   | Protéome commun                    | Cytoplasme              | Protéine du cytosquelette                             | Gène lié au cancer                |
| Septin11 | Septin-11  | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme              | Protéine du cytosquelette                             | /                                 |
| Serbp1   | Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein  | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine de liaison à l'ARN                           | /                                 |
| Serpine1 | Plasminogen activator inhibitor 1  | Protéome commun                    | Extracellulaire         | Activité d'inhibiteur de protéase                     | Gène lié au cancer                |
| Serpinh1 | Serpin H1  | Protéome commun                    | Réticulum endoplasmique | Activité d'inhibiteur de protéase                     | Ostéogenèse imparfaite            |
| Sirt2    | NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2  | Protéome commun                    | Microtubules            | Enzyme de modifications des histones                  | Gène lié au cancer, neuropathie   |
| Smarca1  | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1 | Condition enrichie en microtubules | Noyau                   | Activité d'hélicase                                   | Dysplasie ectodermale             |
| Smc1a    | Structural maintenance of chromosomes protein 1A   | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | Gène lié au cancer, retard mental |

|         |  |                                    |                         |  |  |
|---------|--|------------------------------------|-------------------------|--|--|
| Smg8    | Protein SMG8   | Spécifique des myotubes            | Noyau                   | Régulateur de l'activité kinase                    | /  |
| Smtn    | Smoothelin   | Spécifique des myotubes            | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Son     | Protein SON  | Spécifique des myotubes            | Noyau                   | Facteur d'épissage de l'ARN                        | Retard mental  |
| Spna2   | Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1                       | Condition enrichie en microtubules | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Epilepsie, retard mental                             |
| Sptbn1  | Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1                        | Protéome commun                    | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Sri     | Sorcine  | Spécifique des myofibres           | Cytoplasme              | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /  |
| Stard9  | StAR-related lipid transfer protein 9                          | Condition enrichie en microtubules | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Stau1   | Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1          | Spécifique des myofibres           | Réticulum endoplasmique | Protéine de liaison à l'ARN                        | /  |
| Stk26   | Serine/threonine-protein kinase 26                             | Protéome commun                    | Appareil de Golgi       | Activité de kinase                                 | /  |
| Strn    | Striatin   | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme              | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Gène lié au cancer                                   |
| Strn4   | Striatin-4   | Spécifique des myotubes            | Cytoplasme              | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /  |
| Svil    | Supervillin  | Spécifique des myotubes            | Membrane                | Actine ou protéine liée à l'actine                 | /  |
| Syne4   | Nesprin-4  | Spécifique des myotubes            | Noyau                   | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Surdité  |
| SYNPO2L | Synaptopodin 2-like protein                                    | Protéome commun                    | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Tagln   | Transgelin   | Protéome commun                    | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'actine                 | Gène lié au cancer                                   |
| Tardbp  | TAR DNA-binding protein 43                                     | Protéome commun                    | Noyau                   | Protéine de liaison à l'ADN                        | Sclérose latérale amyotrophique, neurod g nerescence |
| Tbcd    | Tubulin-specific chaperone D                                   | Spécifique des myofibres           | Microtubules            | Chaperonne   | Neurod g nerescence                                  |
| Tekt2   | Tektin-2   | Spécifique des myofibres           | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Tgfb1i1 | Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein | Protéome commun                    | Noyau                   | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Tgm2    | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2                  | Enrichie dans les myofibres        | Cytoplasme              | Activité de transférase                            | /  |

|         |   |                          |                         |  |  |
|---------|---|--------------------------|-------------------------|--|--|
| Tk1     | Thymidine kinase, cytosolic                     | Spécifique des myotubes  | Cytoplasme              | Activité de kinase                                 | Gène lié au cancer                                   |
| Tmem43  | Transmembrane protein 43                        | Spécifique des myofibres | Réticulum endoplasmique | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss               |
| Tomm34  | Mitochondrial import receptor subunit TOM34     | Protéome commun          | Mitochondrie            | Chaperonne   | /  |
| Tpm4    | Tropomyosin alpha-4 chain                       | Protéome commun          | Actine                  | Actine ou protéine liée à l'actine                 | Gène lié au cancer                                   |
| Tpt1    | Translationally-controlled tumor protein        | Spécifique des myotubes  | Cytoplasme              | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Trim54  | Tripartite motif-containing protein 54          | Spécifique des myotubes  | Microtubules            | Ubiquitine protéine ligase                         | /  |
| Trim58  | E3 ubiquitin-protein ligase TRIM58              | Spécifique des myofibres | Microtubules            | Ubiquitine protéine ligase                         | /  |
| Tuba1a  | Tubulin alpha-1A chain                          | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | Gène lié au cancer, lissencephalie                   |
| Tuba1c  | Tubulin alpha-1C chain                          | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | /  |
| Tuba4a  | Tubulin alpha-4A chain                          | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | Sclérose latérale amyotrophique, neurodégénérescence |
| Tubb2a  | Tubulin bêta-2A chain                           | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | /  |
| Tubb3   | Tubulin bêta-3 chain                            | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | /  |
| Tubb4   | Tubulin bêta-4A chain                           | Spécifique des myotubes  | Microtubules            | Tubuline   | Dystonie, Leukodystrophie                            |
| Tubb4b  | Tubulin bêta-4B chain                           | Spécifique des myotubes  | Microtubules            | Tubuline   | Surdité  |
| Tubb5   | Tubulin bêta-5 chain                            | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | /  |
| Tubb6   | Gamma-tubulin complex component 2               | Protéome commun          | Microtubules            | Tubuline   | /  |
| Tubgcp2 | Gamma-tubulin complex component 2               | Spécifique des myotubes  | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Tubgcp3 | Gamma-tubulin complex component 3               | Spécifique des myotubes  | Microtubules            | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Usp7    | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7         | Protéome commun          | Noyau                   | Activité de protéase                               | /  |
| Utrn    | Utrophin  | Protéome commun          | Membrane                | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Vasp    | Vasodilator-stimulated phosphoprotein           | Spécifique des myotubes  | Actine                  | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /  |
| Vat1    | Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog | Protéome commun          | Mitochondrie            | Transporteur secondaire                            | /  |

|       |   |                                    |            |                                     |                    |
|-------|---|------------------------------------|------------|-------------------------------------|--------------------|
| Xirp1 | Xin actin-binding repeat-containing protein 1 | Spécifique des myotubes            | Membrane   | Actine ou protéine liée à l'Actine  | /                  |
| Ybx1  | Y-box-binding protein 1                       | Protéome commun                    | Noyau      | Protéine de liaison à l'ADN         | Gène lié au cancer |
| Ywhab | 14-3-3 protein bêta/alpha                     | Protéome commun                    | Cytoplasme | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | Gène lié au cancer |
| Ywhac | 14-3-3 protein epsilon                        | Protéome commun                    | Noyau      | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | Gène lié au cancer |
| Ywhag | 14-3-3 protein gamma                          | Protéome commun                    | Cytoplasme | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | Epilepsie          |
| Ywhah | 14-3-3 protein eta                            | Protéome commun                    | Cytoplasme | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | Gène lié au cancer |
| Ywhaq | 14-3-3 protein theta                          | Protéome commun                    | Cytoplasme | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | /                  |
| Ywhaz | 14-3-3 protein zeta/delta                     | Condition enrichie en microtubules | Cytoplasme | Protéine d'échafaudage/Adaptat rice | Retard mental      |

## Annexe 2

Tableau présentant les 239 protéines sélectionnées pour le criblage ARN interférents à partir des extraits totaux de myotubes et de myofibres primaires.

| Gène    | Protéine   | Localisation subcellulaire | Fonction moléculaire                               | Implication dans des pathologies                                |
|---------|--|----------------------------|--|---|
| Actc1   | Actin, alpha cardiac muscle 1                              | Actine                     | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | Cardiomyopathie   |
| Alms1   | Alstrom syndrome protein 1 homolog                         | Centrosome                 | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Ambra1  | Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 | Cytoplasme                 | Interaction protéique                              | /   |
| Amot    | Angiomotin   | Membrane                   | Interaction protéique                              | /   |
| Amotl2  | Angiomotin-like protein 2                                  | Cytoplasme                 | Interaction protéique                              | /   |
| Apc     | Adenomatous polyposis coli protein                         | Membrane                   | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Gène lié au cancer, suppresseur de tumeur                       |
| App     | Amyloid-beta A4 protein                                    | Appareil de Golgi          | Inhibiteur de protéase                             | Alzheimer, amylose, neurodégénérescence                         |
| Appbp2  | Amyloid protein-binding protein 2                          | Noyau                      | Interaction protéique                              | Gène lié au cancer  |
| Ar      | Androgen receptor  | Noyau                      | Activité d'oxydoreductase                          | Gène lié au cancer, neurodégénérescence, Pseudohermaphroditisme |
| Arl3    | ADP-ribosylation factor-like protein 3                     | Appareil de Golgi          | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Ciliopathie, syndrome de Joubert                                |
| Arrb1   | Bêta-arrestin-1  | Noyau                      | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Art3    | Ecto-ADP-ribosyltransferase 3                              | Membrane                   | Activité de transférase                            | /   |
| ASB7    | Ankyrin repeat and SOCS box protein 7                      | Cytoplasme                 | Protéine de trafic membranaire                     | /   |
| Atat1   | Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1                        | Microtubules               | Chaperone  | /   |
| Axin1   | Axin-1   | Membrane                   | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Gène lié au cancer, suppresseur de tumeur                       |
| Bbs4    | Bardet-Biedl syndrome 4 protein homolog                    | Centrosome                 | Protéine de liaison à la Tubuline                  | Syndrome de Bardet-Biedl, ciliopathie, retard mental, obésité   |
| Bcar1   | Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1           | Actine                     | Interaction protéique                              | /   |
| Bcas1   | Breast carcinoma-amplified sequence 1 homolog              | Cytoplasme                 | Activité d'homodimérisation de protéine            | /   |
| Bcl2l11 | Bcl-2-like protein 11                                      | Cytoplasme                 | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /   |
| Bicd1   | Protein bicaudal D homolog 1                               | Appareil de Golgi          | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /   |

|          |  |                   |   |  |
|----------|--|-------------------|---|--|
| Bicd2    | Protein bicaudal D homolog 2                                 | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Neurodégénérescence  |
| Bmf      | Bcl-2-modifying factor                                       | Actine            | Interaction protéique                                 | /  |
| Bmi1     | Polycomb complex protein BMI-1                               | Noyau             | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | Gène lié au cancer, proto-oncogène   |
| Bub1b    | Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 bêta | Noyau             | Sérine/thréonine protéine kinase                      | Gène lié au cancer, suppresseur de tumeur  |
| Calm1    | Calmodulin-1   | Cytoplasme        | Protéine apparentée à la calmoduline                  | Syndrome du QT long  |
| Calm2    | Calmodulin-2   | Microtubules      | Protéine apparentée à la calmoduline                  | Syndrome du QT long  |
| Calm3    | Calmodulin-3   | Microtubules      | Protéine apparentée à la calmoduline                  | Syndrome du QT long  |
| Camsap1  | Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1           | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules      | /  |
| Camsap2  | Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2           | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Camsap3  | Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3           | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Capn6    | Calpain-6  | Microtubules      | Protéase  | Gène lié au cancer   |
| Ccdc36   | Interactor of HORMAD1 protein 1                              | Noyau             | Interaction protéique                                 | /  |
| Ccdc64   | BICD family-like cargo adapter 1                             | Centrosome        | Interaction protéique                                 | /  |
| Ccdc64B  | BICD family-like cargo adapter 2                             | Cytoplasme        | Protéine régulatrice du trafic membranaire            | /  |
| Ccdc89   | Coiled-coil domain-containing protein 89                     | Noyau             | Interaction protéique                                 | /  |
| Ccser2   | Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2          | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Cdc14a   | Dual specificity protein phosphatase CDC14A                  | Centrosome        | Activité d'hydrolase et de phosphatase                | Surdité  |
| Cdc51    | Cell division cycle 5-like protein                           | Noyau             | Protéine de liaison à l'ADN                           | /  |
| Cdk5rap2 | CDK5 regulatory subunit-associated protein 2                 | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Retard mental, microcéphalie primaire  |
| Cep120   | Centrosomal protein of 120 kDa                               | Centrosome        | Interaction protéique                                 | Ciliopathie, syndrome de Joubert   |
| Cep164   | Centrosomal protein of 164 kDa                               | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Ciliopathie, nephronophthisis  |
| Cep192   | Centrosomal protein 192                                      | Centrosome        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Cep250   | Centrosome-associated protein CEP250                         | Centrosome        | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | /  |
| Cep290   | Centrosomal protein of 290 kDa                               | Centrosome        | Interaction protéique                                 | Syndrome de Bardet-Biedl, ciliopathie, syndrome de Joubert, syndrome de Meckel, retard mental, |

|         |  |                   |   |   |
|---------|--|-------------------|---|---|
|         |  |                   |   | nephronophthisis, obésité, syndrome de Senior-Loken |
| Cep57   | Centrosomal protein of 57 kDa                      | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Cep57l1 | Centrosomal protein CEP57L1                        | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Cep63   | Centrosomal protein of 63 kDa                      | Centrosome        | Protéine du cytosquelette                             | Nanisme, retard mental                              |
| Cetn1   | Centrosomal protein of 63 kDa                      | Centrosome        | Protéine apparentée à la calmoduline                  | /   |
| Ckap2   | Cytoskeleton-associated protein 2                  | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules      | /   |
| Clip3   | CAP-Gly domain-containing linker protein 3         | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Cluh    | Clustered mitochondria protein homolog             | Cytoplasme        | Facteur d'initiation de la traduction                 | /   |
| Crmp-2  | Dihydropyrimidinase-related protein 2              | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Crocc   | Rootletin  | Centrosome        | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | /   |
| Cul7    | Cullin-7   | Appareil de Golgi | Interaction protéique                                 | Nanisme   |
| Cyr61   | CCN family member 1                                | Extracellulaire   | Facteur de croissance                                 | /   |
| Diaph3  | Protein diaphanous homolog 3                       | Cytoplasme        | Actine ou protéine liée à l'Actine                    | Gène lié au cancer, surdité, neuropathie            |
| Disc1   | Disrupted in schizophrenia 1 homolog               | Centrosome        | Interaction protéique                                 | Schizophrénie                                       |
| Dlg1    | Disks large homolog 1                              | Cytoplasme        | Interaction protéique                                 | /   |
| Dlg2    | Disks large homolog 2                              | Membrane          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /   |
| Dlg3    | Disks large homolog 3                              | Membrane          | Protéine d' chafaudage/Adaptatrice                    | Retard mental                                       |
| Dlg4    | Disks large homolog 4                              | Membrane          | Protéine d' chafaudage/Adaptatrice                    | /   |
| Dlgap1  | Disks large-associated protein 1                   | Membrane          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /   |
| Dnmbp   | Dynamamin-binding protein                          | Appareil de Golgi | Interaction protéique                                 | Cataracte   |
| Dtnbp1  | Dysbindin  | Noyau             | Actine ou protéine liée à l'Actine                    | Albinisme, syndrome Hermansky-Pudlak, schizophrénie |
| Dvl1    | Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1 | Cytoplasme        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | Nanisme   |
| Dync1i1 | Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1          | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Dynlrb1 | Dynein light chain roadblock-type 1                | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Dynlt1b | Dynein light chain Tctex-type 1                    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Dynlt3  | Dynein light chain Tctex-type 3                    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |

|         |   |                   |  |   |
|---------|---|-------------------|--|---|
| Eml1    | Echinoderm microtubule-associated protein-like 1    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Epilepsie, lissencéphalie, retard mental  |
| Eml3    | Echinoderm microtubule-associated protein-like 3    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Eml5    | Echinoderm microtubule-associated protein-like 5    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Eml6    | Echinoderm microtubule-associated protein-like 6    | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Exoc3   | Exocyst complex component 3-like protein            | Appareil de Golgi | Protéine de trafic membranaire                     | /   |
| Ezh2    | Histone-lysine N-methyltransferase EZH2             | Noyau             | Protéine de liaison à l'ARN                        | Gène lié au cancer                        |
| Fam188a | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-3       | Noyau             | Activité d'hydrolase                               | /   |
| Fam83d  | Protein FAM83D                                      | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Fanca   | Fanconi anemia group A protein homolog              | Noyau             | Protéine de liaison à l'ADN                        | Gène lié au cancer, anémie                |
| Fez1    | Fasciculation and elongation protein zeta-1         | Membrane          | Interaction protéique                              | /   |
| Foxp3   | Forkhead box protein P3                             | Noyau             | Protéine de liaison à l'ADN                        | Diabète                                   |
| Gabarap | Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /   |
| Gas2l1  | GAS2-like protein 1                                 | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Gas2l2  | GAS2-like protein 2                                 | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Ciliopathie, dyskinesie ciliaire primaire |
| Gbx1    | Homeobox protein GBX-1                              | Noyau             | Facteur de transcription                           | /   |
| Gipc1   | PDZ domain-containing protein GIPC1                 | Cytoplasme        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Gphn    | Gephyrin  | Membrane          | Activité de transférase                            | Gène lié au cancer                        |
| Gprin2  | G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2  | Membrane          | Interaction protéique                              | /   |
| Haus1   | HAUS augmin-like complex subunit 1                  | Centrosome        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Haus2   | HAUS augmin-like complex subunit 2                  | Centrosome        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Haus3   | HAUS augmin-like complex subunit 3                  | Centrosome        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Haus4   | HAUS augmin-like complex subunit 4                  | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |



|         |   |              |   |  |
|---------|---|--------------|---|--|
| Haus5   | HAUS augmin-like complex subunit 5  | Centrosome   | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Haus6   | HAUS6_N domain-containing protein   | Centrosome   | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Haus7   | HAUS augmin-like complex subunit 7  | Centrosome   | Protéine non motrice de liaison aux microtubules      | /  |
| Haus8   | HAUS augmin-like complex subunit 8  | Centrosome   | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Hdac6   | Histone deacetylase 6   | Noyau        | Enzyme de modification des histones                   | /  |
| Hmg20b  | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related | Noyau        | Protéine de liaison à l'ADN                           | /  |
| Hook1   | Protein Hook homolog 1  | Actine       | Protéine de trafic membranaire                        | /  |
| Hook2   | Protein Hook homolog 2  | Centrosome   | Protéine de trafic membranaire                        | /  |
| Hrasls  | Phospholipase A and acyltransferase 1   | Membrane     | Activité de transférase                               | /  |
| Hspb2   | Heat shock protein bêta-2   | Noyau        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Iqcb1   | IQ calmodulin-binding motif-containing protein 1  | Centrosome   | Interaction protéique                                 | Ciliopathie, nephronophthisis, syndrome de Senior-Loken            |
| Jakmip1 | Janus kinase and microtubule-interacting protein 1  | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Katna1  | Katanin p60 ATPase-containing subunit A1  | Centrosome   | Protéine non motrice de liaison aux microtubules      | /  |
| Katnb1  | Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1   | Centrosome   | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Lissencéphalie   |
| Kdm6a   | Lysine-specific demethylase 6A  | Noyau        | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | Gène lié au cancer, retard mental                                  |
| Kif11   | Kinesin-like protein KIF11  | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Klc2    | Kinesin light chain 2   | Microtubules | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | Paraplégie spastique héréditaire, neurodégénérescence, neuropathie |
| Kntc1   | Kinetochores-associated protein 1   | Noyau        | Interaction protéique                                 | /  |
| Kptn    | KICSTOR complex protein kaptin  | Actine       | Actine ou protéine liée à l'Actine                    | Retard mental  |
| Krit1   | Krev interaction trapped protein 1  | Membrane     | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Larp1b  | HTH La-type RNA-binding domain-containing protein   | Noyau        | Protéine de liaison à l'ARN                           | /  |
| Lrfn4   | Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 4                              | Membrane     | Interaction protéique                                 | /  |
| Lrrc3b  | Leucine-rich repeat-containing protein 3B   | Membrane     | Récepteur transmembranaire                            | /  |

|          |  |                   |  |                                       |
|----------|--|-------------------|--|---------------------------------------|
| Mafa     | Transcription factor MafA                                | Noyau             | Facteur de transcription                           | Diabète                               |
| Map10    | Microtubule-associated protein 10                        | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /                                     |
| Map1lc3a | Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A     | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map1lc3b | Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B     | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map3k10  | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10        | Cytoplasme        | Activité de kinase                                 | /                                     |
| Map3k11  | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11        | Centrosome        | Activité de kinase                                 | /                                     |
| Map6     | Microtubule-associated protein 6                         | Appareil de Golgi | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map7d1   | MAP7 domain-containing protein 1                         | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map7d2   | MAP7 domain-containing protein 2                         | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map7d3   | MAP7 domain-containing protein 3                         | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Map9     | MAP7 domain-containing protein 3                         | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /                                     |
| Mapk8ip3 | C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3        | Appareil de Golgi | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Retard mental                         |
| Mapre2   | Microtubule-associated protein RP/EB family member 2     | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Mapre3   | Microtubule-associated protein RP/EB family member 3     | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /                                     |
| Mark1    | Serine/threonine-protein kinase MARK1                    | Microtubules      | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Autisme                               |
| Mark2    | Serine/threonine-protein kinase MARK2                    | Membrane          | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /                                     |
| Mark3    | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3             | Membrane          | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /                                     |
| Mark4    | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4             | Centrosome        | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /                                     |
| Mast1    | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1 | Microtubules      | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Retard mental, microcéphalie primaire |
| Mast2    | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 | Microtubules      | Sérine/thréonine protéine kinase                   | Gène lié au cancer                    |
| Mast3    | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3 | Cytoplasme        | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /                                     |
| Mast4    | Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4 | Cytoplasme        | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /                                     |

|        |   |                   |  |   |
|--------|---|-------------------|--|---|
| Mast1  | Serine/threonine-protein kinase greatwall                   | Centrosome        | Sérine/thréonine protéine kinase                   | /   |
| Mical2 | [F-actin]-monooxygenase MICAL2                              | Noyau             | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /   |
| Mical3 | [F-actin]-monooxygenase MICAL3                              | Noyau             | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /   |
| Mitd1  | MIT domain-containing protein 1                             | Cytoplasme        | Activité d'homodimérisation de protéine            | /   |
| Mob4   | MOB-like protein phocein                                    | Appareil de Golgi | Activateur de kinase                               | /   |
| Mov10  | Putative helicase MOV-10                                    | Noyau             | Activité d'hélicase                                | /   |
| Mtus1  | Microtubule-associated tumor suppressor 1 homolog           | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Suppresseur de tumeur   |
| Mtus2  | Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2 homolog | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| MYCL   | Protein L-Myc   | Noyau             | Facteur de transcription                           | Gène lié au cancer  |
| Myo18b | Myo18b protein  | Actine            | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /   |
| Mzt1   | Mitotic-spindle organizing protein 1                        | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Nde1   | Nuclear distribution protein nudE homolog 1                 | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | Lissencéphalie  |
| Ndel1  | Nuclear distribution protein nudE-like 1                    | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |
| Nek1   | Serine/threonine-protein kinase Nek1                        | Centrosome        | Activité de kinase                                 | Sclérose latérale amyotrophique, ciliopathie, neurodégénérescence |
| Nes    | Nestin  | Cytoplasme        | Interaction protéique                              | /   |
| Nfkbia | NF-kappa-B inhibitor alpha                                  | Noyau             | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | Gène lié au cancer, dysplasie ectodermale                         |
| Nin    | Ninein  | Centrosome        | Interaction protéique                              | Gène lié au cancer, nanisme, retard mental                        |
| Npc1   | NPC intracellular cholesterol transporter 1                 | Cytoplasme        | Interaction protéique                              | Maladie de Niemann-Pick   |
| Nrf1   | Endoplasmic reticulum membrane sensor NFE2L1                | Cytoplasme        | Facteur de transcription                           | /   |
| Nsrp1  | Nuclear speckle splicing regulatory protein 1               | Noyau             | Protéine de liaison à l'ARN                        | /   |
| Nup43  | Nucleoporin Nup43   | Noyau             | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Nup50  | Nuclear pore complex protein Nup50                          | Noyau             | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                 | /   |
| Nusap1 | Nucleolar and spindle-associated protein 1                  | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /   |

|          |  |                   |   |  |
|----------|--|-------------------|---|--|
| Ofd1     | Oral-facial-digital syndrome 1 protein homolog       | Microtubules      | Interaction protéique                                 | Ciliopathie, syndrome de Joubert, rétinite pigmentaire                     |
| Pak1     | Serine/threonine-protein kinase PAK 1                | Noyau             | Activité de kinase                                    | Epilepsie, retard mental   |
| Pcm1     | Pericentriolar material 1 protein                    | Centrosome        | Interaction protéique                                 | Gène lié au cancer, proto-oncogène   |
| Pcnt     | Pericentrin  | Centrosome        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | Nanisme  |
| Pifo     | Protein pitchfork                                    | Appareil de Golgi | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Pih1d3   | Protein PIH1D3                                       | Cytoplasme        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | Ciliopathie, syndrome de Kartagener syndrome, dyskinésie ciliaire primaire |
| Pou5f1   | POU domain, class 5, transcription factor 1          | Noyau             | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | Gène lié au cancer   |
| Ppp1r15a | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A         | Cytoplasme        | Interaction protéique                                 | Gène lié au cancer   |
| Prc1     | Protein regulator of cytokinesis 1                   | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules      | /  |
| Prmt6    | Protein arginine N-methyltransferase 6               | Noyau             | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | /  |
| Psen2    | Presenilin-2   | Appareil de Golgi | Activité de protéase                                  | Alzheimer, amylose, cardiomyopathie, neurodégénérescence                   |
| Psrc1    | Proline/serine-rich coiled-coil protein 1            | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /  |
| Ptpn21   | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21    | Cytoplasme        | Activité de phosphatase                               | /  |
| Rab3b    | Ras-related protein Rab-3B                           | Appareil de Golgi | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /  |
| Rftn1    | Raftlin  | Cytoplasme        | Protéine de liaison à l'ARN                           | /  |
| Rgs2     | Regulator of G-protein signaling 2                   | Noyau             | Protéine d'activation de la GTPase                    | /  |
| Rgs20    | Regulator of G-protein signaling 20                  | Noyau             | Protéine d'activation de la GTPase                    | /  |
| Rita1    | RBPJ-interacting and tubulin-associated protein 1    | Centrosome        | Protéine de liaison à la Tubuline                     | /  |
| Rmdn1    | Regulator of microtubule dynamics protein 1          | Microtubules      | Interaction protéique                                 | /  |
| Rnf2     | E3 ubiquitin-protein ligase RING2                    | Noyau             | Activité de transférase                               | /  |
| Rps6kb2  | Ribosomal protein S6 kinase beta-2                   | Noyau             | Activité de kinase                                    | /  |
| S100a6   | Protein S100-A6                                      | Noyau             | Protéine apparentée à la calmoduline                  | Gène lié au cancer   |
| Sdccag8  | Serologically defined colon cancer antigen 8 homolog | Centrosome        | Interaction protéique                                 | Syndrome de Bardet-Biedl, ciliopathie, nephronophthisis,                   |

|         |  |                   |   |   |
|---------|--|-------------------|---|---|
|         |  |                   |   | obésité, syndrome de Senior-Loken                     |
| Sfn     | 14-3-3 protein sigma   | Noyau             | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | Gène lié au cancer                                    |
| Sh3kbp1 | SH3 domain-containing kinase-binding protein 1               | Actine            | Interaction protéique                                 | /   |
| Shank2  | SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2            | Cytoplasme        | Interaction protéique                                 | Autisme   |
| Sirt7   | NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7                  | Noyau             | Protéine de liaison ou de régulation de la chromatine | /   |
| Ska1    | Spindle and kinetochore-associated protein 1                 | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Skp1a   | S-phase kinase-associated protein 1                          | Centrosome        | Ubiquitine protéine ligase                            | /   |
| Slain2  | SLAIN motif-containing protein 2                             | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Smek2   | Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3B | Centrosome        | Interaction protéique                                 | /   |
| Snap23  | Synaptosomal-associated protein 23                           | Membrane          | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice                    | /   |
| Snap25  | Synaptosomal-associated protein 25                           | Membrane          | Protéine SNARE  | Syndrome myasthénique congénital, retard mental       |
| Snca    | Alpha-synuclein  | Microtubules      | Protéine régulatrice du trafic membranaire            | /   |
| Soga1   | Protein SOGA1  | Extracellulaire   | Interaction protéique                                 | /   |
| Spag5   | Sperm-associated antigen 5                                   | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Spag6   | Sperm-associated antigen 6                                   | Microtubules      | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules    | /   |
| Spg20   | Spartin  | Cytoplasme        | Interaction protéique                                 | Paraplégie spastique héréditaire, neurodégénérescence |
| Spib    | Transcription factor Spi-B                                   | Noyau             | Activité de transcription                             | /   |
| Srl     | Sarcalumenin   | Cytoplasme        | Protéine de trafic membranaire                        | /   |
| Srpx2   | Sushi repeat-containing protein SRPX2                        | Extracellulaire   | Interaction protéique                                 | Epilepsie, retard mental                              |
| Ssna1   | Sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1 homolog              | Centrosome        | Interaction protéique                                 | /   |
| Stk25   | Serine/threonine-protein kinase 25                           | Appareil de Golgi | Activité de kinase                                    | /   |
| Stk4    | Serine/threonine-protein kinase 4                            | Noyau             | Activité de kinase                                    | /   |
| Stmn1   | Stathmin   | Microtubules      | Protéine de liaison à la Tubuline                     | Gène lié au cancer                                    |
| Stmn2   | Stathmin-2   | Microtubules      | Protéine de liaison à la Tubuline                     | /   |
| Stmn3   | Stathmin-3   | Appareil de Golgi | Protéine de liaison à la Tubuline                     | /   |

|          |  |                   |  |  |
|----------|--|-------------------|--|--|
| Stmn4    | Stathmin-4   | Appareil de Golgi | Protéine de liaison à la Tubuline                  | /  |
| Stmnd1   | Stathmin domain-containing protein 1                             | Cytoplasme        | Protéine de liaison à la Tubuline                  | /  |
| Syne3    | Nesprin-3  | Noyau             | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Tacc1    | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1             | Centrosome        | Interaction protéique                              | /  |
| Tacc2    | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2             | Centrosome        | Interaction protéique                              | /  |
| Tacc3    | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3             | Centrosome        | Interaction protéique                              | /  |
| Tanc1    | Protein TANC1  | Membrane          | Interaction protéique                              | /  |
| Tmem198  | Transmembrane protein 198  | Membrane          | Protéine du développement                          | /  |
| Tmem214  | Transmembrane protein 214  | Cytoplasme        | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /  |
| Tnfrsf14 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14             | Membrane          | Interaction protéique                              | Gène lié au cancer   |
| Tnks     | Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-1                         | Appareil de Golgi | Activité de transférase                            | /  |
| Tp53bp1  | TP53-binding protein 1   | Noyau             | Protéine de liaison à l'ADN                        | Gène lié au cancer   |
| Tpgs1    | Tubulin polyglutamylase complex subunit 1                        | Centrosome        | Microtubules ou protéine se liant aux microtubules | /  |
| Tpgs2    | Tubulin polyglutamylase complex subunit 2                        | Microtubules      | Activité de glutamylase                            | /  |
| Tppp     | Tubulin polymerization-promoting protein                         | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | /  |
| Tpx2     | Targeting protein for Xklp2                                      | Microtubules      | Protéine non motrice de liaison aux microtubules   | Gène lié au cancer   |
| Trak2    | Trafficking protein, kinesin-binding 2                           | Noyau             | Protéine de trafic membranaire                     | /  |
| Trim27   | Zinc finger protein RFP  | Noyau             | Ubiquitine protéine ligase                         | Gène lié au cancer, proto-oncogène   |
| Trim3    | Tripartite motif-containing protein 3                            | Appareil de Golgi | Ubiquitine protéine ligase                         | /  |
| Trip6    | Thyroid receptor-interacting protein 6                           | Noyau             | Actine ou protéine liée à l'Actine                 | /  |
| Trps1    | Zinc finger transcription factor Trps1                           | Noyau             | Protéine de liaison aux acides nucléiques          | /  |
| Trpv4    | Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 | Membrane          | Canal ionique                                      | Pathologie de Charcot-Marie-Tooth, nanisme, neurodégénérescence, neuropathie |
| Ttl      | Tubulin-tyrosine ligase  | Microtubules      | Activité de Ligase                                 | /  |
| Tuba1b   | Tubulin alpha-1B chain   | Microtubules      | Tubuline   | /  |
| Tuba3a   | Tubulin alpha-3 chain  | Microtubules      | Tubuline   | /  |

|         |  |              |  |   |
|---------|--|--------------|--|---|
| Tuba8   | Tubulin alpha-8 chain                            | Microtubules | Tubuline                                   | /   |
| Tubb1   | Tubulin bêta-1 chain                             | Microtubules | Tubuline                                   | /   |
| Tubb2b  | Tubulin bêta-2B chain                            | Microtubules | Tubuline                                   | Retard mental                             |
| Tubd1   | Tubulin delta chain                              | Microtubules | Tubuline                                   | /   |
| Tube1   | Tubulin epsilon chain                            | Centrosome   | Tubuline                                   | /   |
| Tubg2   | Tubulin gamma-2 chain                            | Centrosome   | Tubuline                                   | /   |
| Txndc17 | Thioredoxin domain-containing protein 17         | Cytoplasme   | Transporteur                               | /   |
| Tyw3    | tRNA wybutosine-synthesizing protein 3 homolog   | Cytoplasme   | Activité de transférase                    | /   |
| Ubc     | SUMO-conjugating enzyme UBC9                     | Noyau        | Protéine d'échafaudage/Adaptatrice         | /   |
| Vhl     | von Hippel-Lindau disease tumor suppressor       | Noyau        | Ubiquitine protéine ligase                 | Gène lié au cancer, suppresseur de tumeur |
| Wwc1    | Protein KIBRA                                    | Noyau        | Activité de transcription                  | /   |
| Zbtb8a  | Zinc finger and BTB domain-containing protein 8A | Noyau        | Protéine non motrice de liaison à l'actine | /   |