



HAL
open science

Rôle de la protéine HRS/HGS (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) au cours de la myogenèse: étude in vitro

Laurent Coudert

► To cite this version:

Laurent Coudert. Rôle de la protéine HRS/HGS (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) au cours de la myogenèse: étude in vitro. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT: 2020LYSE1262 . tel-03557716

HAL Id: tel-03557716

<https://theses.hal.science/tel-03557716v1>

Submitted on 4 Feb 2022

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 :
2020LYSE1262

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 09/12/2020, par :
Laurent Coudert

Rôle de la protéine HRS/HGS
(Hepatocyte growth factor regulated
tyrosine kinase substrate) au cours de
la myogenèse : étude in vitro

Devant le jury composé de :

FRIANT, Sylvie
SADOUL, Remy
LE GRAND, Fabien
VASSILOPOULOS, Stéphane
KRETZ-REMY, Carole

Directrice de Recherche CNRS
Professeur des Universités
Directeur de Recherche CNRS
Chargé de Recherche
Professeur des Universités

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice

LEBLANC, Pascal

Chargé de Recherche CNRS

Directeur de thèse

PREAMBULE

J'ai réalisé mon doctorat au sein de l'institut de NeuroMyoGène à Lyon dans l'équipe « Interaction neurone-muscle » du Pr Laurent Schaeffer et sous la direction de Pascal Leblanc. Durant ces 4 années, je me suis principalement intéressé au rôle de la protéine ESCRT-0 HRS dans le processus de différenciation des myoblastes en myotubes. Ce travail fait l'objet d'une publication qui est en cours d'écriture et dont une version est disponible dans ce manuscrit. En parallèle, j'ai pu travailler sur un projet annexe où nous avons mis en évidence que l'expression d'un mutant pathologique de la protéine Huntingtine favorisé l'agrégation de la protéine TDP-43. J'ai également eu l'occasion de participer à l'écriture d'une Review traitant des différents mécanismes qui participent à la dissémination des protéines prions.

Publications scientifiques:

- **HRS/HGS ESCRT-0 is a master regulator of muscle myogenesis by controlling different signaling pathways.** Coudert L, Osseni A, Gangloff YG, Schaeffer L and P. Leblanc (en preparation)
- **Phosphorylated and aggregated TDP-43 with seeding properties are induced upon mutant Huntingtin (mHtt) polyglutamine expression in human cellular models.** Laurent Coudert, Takashi Nonaka, Emilien Bernard, Masato Hasegawa, Laurent Schaeffer¹, Pascal Leblanc¹.
- **Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions.** Didier Vilette, Josquin Courte, Jean Michel Peyrin, Laurent Coudert, Laurent Schaeffer, Olivier Andréoletti, Pascal Leblanc.

Communications scientifiques :

- Présentation orale, **17^{ème} journée de la société françaises de myologie**, Bordeaux, Novembre 2019, Essential role of the ESCRT-0 HRS protein in muscle cells biology, Coudert Laurent, Scianti Isabella, Ossenie Alexis, Gangloff Yann Gaël, Schaeffer Laurent, and Leblanc Pascal, Prix de la meilleur comunication orale.

- Poster, **6e congrès international de Myologie**, Bordeaux, Novembre 2019, Essential role of the ESCRT-0 HRS protein in muscle cells biology, Coudert Laurent, Scianti Isabella, Ossenie Alexis, Gangloff Yann Gaël, Schaeffer Laurent, and Leblanc Pascal.

- Présentation orale, **Club Neuromuscular INMG**, Lyon, Mars 2019, Implication of the ESCRT machinery in myoblast differentiation, Coudert Laurent, Scianti Isabella, Goillot Evelyne, Schaeffer Laurent, Gangloff Yann Gaël and Leblanc Pascal.

- Présentation orale, **séminaire interne INMG**, Lyon, Janvier 2019, Implication of the ESCRT machinery in myoblast differentiation, Coudert Laurent, Scianti Isabella, Goillot Evelyne, Schaeffer Laurent and Leblanc Pascal.

- Poster, **journée de l'école doctorale BMIC**, Novembre 2018, Implication of the ESCRT machinery in myoblast differentiation, Coudert Laurent, Scianti Isabella, Goillot Evelyne, Schaeffer Laurent and Leblanc Pascal, Prix du meilleur poster

REMERCIEMENTS

Une thèse, c'est avant tout une aventure incomparable à d'autres avec des moments de joie et de déprime, des rencontres, des échanges, qui nous enrichissent en tout point. On apprend à donner le meilleur de nous-même, malgré les nombreuses difficultés et les résultats qui ne sont pas toujours ce que l'on attend, mais il en ressort une incroyable satisfaction quand tout fonctionne et prend enfin forme. En définitif, j'ai adoré cette expérience !

Je voudrais en premier lieu remercier les membres du jury de thèse Sylvie Friant, Remy Sadoul, Carole Kretz, Stéphane Vassilopoulou et Fabien Legrand d'avoir accepté de lire mon manuscrit de thèse et de m'aider à le rendre meilleur, mais également d'évaluer et de discuter de mes quatre années de travail.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement mon directeur thèse Pascal Leblanc de m'avoir donné la chance de réaliser ce doctorat. Je te remercie Pascal pour la confiance que tu m'as accordé dans la réalisation de ce projet, de la grande liberté que tu m'as laissée pour le conduire, ainsi que de ta grande disponibilité et présence à tout moment. Je te remercie aussi d'avoir toujours fait le nécessaire pour que les choses se déroulent au mieux et que je puisse passer ma thèse le plus sereinement possible.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Laurent Schaeffer, à commencer par Laurent qui a toujours été enthousiaste avec le projet et nous a apporté des axes de réflexions intéressants. Merci également Laurent de m'avoir permis de faire cette quatrième année qui m'a énormément aidé pour finaliser le projet. Au bureau « d'à côté », Arnaud, Nikola, Edwige, Sandrine, Isabella, Valérie et Emmanuelle avec qui j'ai pu échanger tant sur le plan scientifique que sur tout le reste et qui participent à la super ambiance du labo, merci pour tous ces super moments de rigolade, de conseils bricolages (que je n'ai pas encore appliqués), et surtout merci pour les pâtisseries !

Je voudrais également remercier les membres de « mon bureau » Vincent, Jean-Luc et Thomas, toujours prêt à raconter de bonnes histoires. Merci aussi à Laetitia pour nos discussions et ce super canapé rouge qui embellit mon appartement, et à Gaël de ton temps accordé dans le projet, de tes blagues et de nous avoir fait découvrir le monde de mTOR. Un

remerciement très spécial à Agnès qui a toujours été au petit soin avec moi et qui m'a beaucoup aidé en relisant ce manuscrit. Un grand merci à l'immanquable Alexis, d'apporter ta bonne humeur, tes conseils et toutes ces discussions constructives sur le projet, mais aussi d'avoir gagné un ami ! Et évidemment un merci aux nouveaux de l'équipe Delia, Flavien, Sham et Andréa, vos gâteaux vont me manquer =p

J'ai également une pensée pour tout ce avec qui j'ai pu interagir et passer du bon temps à l'institut, et tout particulièrement avec les membres présents et passés de l'équipe de Vincent Gache.

Un grand merci à tous mes amis de Lyon, à ce qui sont restés ou partis vers d'autres aventures extraordinaires et à nos super soirées, réveillons, et j'en passe. Une mention spéciale à ma super coloc Clotilde qui est toujours à l'écoute et qui me supporte quand je suis là, merci à vous !

Je voudrais en dernier lieu remercier toute ma famille de m'avoir épaulé durant toutes ces années. Je remercie particulièrement mon père qui m'a permis de réaliser tout mon cursus universitaire en étant derrière moi, mais aussi en m'aidant donné la force d'aller au bout de mes envies. Je voudrais aussi te remercier Elodie, tu es sans doute ma plus belle rencontre de l'INMG ! Merci de m'avoir soutenu dans les moments où le travail prenait beaucoup de temps, dans les moments de doutes, mais aussi d'avoir rendu cette aventure un peu plus agréable.

Pour finir, je souhaite dédier ce travail de thèse à ma mère qui serait fier de tout le travail accompli et sans qui je ne serais pas allé aussi loin.

RESUME

Rôle de la protéine HRS/HGS (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) au cours de la myogenèse : étude in vitro

La myogenèse est un mécanisme biologique à l'origine de la formation des muscles, et est induite également lors d'une blessure musculaire. Elle est orchestrée par les cellules satellites qui prolifèrent et deviennent des myoblastes capables de se différencier pour fusionner et donner naissance à des structures appelées myotubes, futurs composants des fibres musculaires néoformées lors de la réparation tissulaire. Ces étapes sont finement contrôlées par l'activation et/ou l'inhibition de facteurs de transcription myogéniques régulés par l'activation de récepteurs membranaires et des voies de signalisations associées en aval.

Le processus d'endocytose régule de nombreuses voies de signalisation cellulaires en contrôlant le nombre de récepteurs fonctionnels disponibles à la surface cellulaire. Par ailleurs, de nombreuses études ont aussi révélé que des voies de signalisations pouvaient être activées sur les membranes des compartiments endosomaux.

La machinerie ESCRT (endosomal Sorting Complex required for Transport) est composée de quatre sous-unités baptisées ESCRT-0 à ESCRT-III impliquées dans divers mécanismes cellulaires essentiels et notamment dans la biogenèse des compartiments endosomaux appelés corps multivésiculaires. De ce fait, la machinerie ESCRT est impliquée dans le transport, le recyclage ou la dégradation de récepteurs membranaires ubiquitinylés et par conséquent le contrôle de leur activité et des voies de signalisations qui leurs sont associées. L'implication de cette machinerie dans la régulation du processus de myogenèse reste néanmoins à ce jour non explorée.

Mon travail de thèse s'est justement intéressé à caractériser le rôle de cette machinerie dans le processus de différenciation des myoblastes en myotubes. Au cours de ces quatre années, je me suis plus particulièrement intéressé à la protéine HRS/HGS (Hepatocyte growth factor Regulated tyrosine kinase Substrate) de la sous unité ESCRT-0 et à son implication lors du

processus de myogenèse. Nos données expérimentales ont montré que l'expression et la distribution cellulaire de la protéine HRS/HGS étaient dynamiques au cours de la myogenèse et que son inhibition bloquait drastiquement la différenciation des myoblastes en myotubes. La recherche des mécanismes moléculaires et cellulaires associés nous a permis de mettre en évidence que l'inhibition de son expression dans les myoblastes empêchait la dégradation du récepteur à l'EGF (pour Epidermal Growth Factor) et conduisait alors à l'activation constitutive de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK. Cette activation fut associée à une perturbation de la localisation et de l'expression de facteurs de transcription pro-myogéniques impliqués dans le processus de myogenèse. Nous avons également identifié que l'absence de HRS/HGS perturbait l'activité de la GSK3 β et participait à l'inhibition de ce processus. Enfin, nos résultats ont aussi montré que l'absence de cette protéine altérait négativement la voie autophagique indispensable au bon déroulement de la myogenèse.

De façon collective, nos résultats montrent donc pour la première fois que la protéine HRS/HGS est un facteur central, multimodal et essentiel dans la régulation du processus de myogenèse.

Mots clés : Myogenèse, myoblastes/myotubes, ESCRT, HRS, TSG101, voies de signalisations, autophagie/GSK3 β .

ABSTRACT

Role of the HRS/HGS protein (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) during myogenesis: in vitro study

Myogenesis is a biological mechanism involved in muscle formation and is induced after muscle injury. It is orchestrated by satellite cells which proliferate and become myoblasts that can differentiate and fuse to form myotubes structures that correspond to the future components of newly formed muscle fibers during tissue repair. These steps are tightly controlled by the activation and/or the inhibition of myogenic transcription factors regulated themselves by the activation of membrane receptors and downstream associated signaling pathways.

The process of endocytosis regulates many cellular signaling pathways by controlling the number of functional receptors available on the cell surface. Furthermore, many studies also revealed that signaling pathways could be activated on the membranes of endosomal compartments.

The ESCRT machinery (ESCRT for endosomal Sorting Complex required for Transport) is composed of four subunits called ESCRT-0 to ESCRT-III involved in various essential cellular mechanisms and in particular in the biogenesis of endosomal compartments called multivesicular bodies. It plays a major role in the transport, recycling or degradation of ubiquitinated membrane receptors and consequently the control of their activity and their downstream signaling pathways. However, until today, the role of this machinery in the regulation of the myogenesis process remains unexplored.

During these four years of PhD, I focused my attention on the HRS/HGS (Hepatocyte Growth factor Regulated tyrosine kinase Substrate) protein from the ESCRT-0 subunit and investigated its implication during the myogenesis process. Our experimental data showed that HRS/HGS is dynamically expressed and distributed during myogenesis thus suggesting a key role during differentiation. We found that silencing of HRS strongly inhibits the differentiation of

myoblasts into myotube fibers. Mechanistically, our data revealed that HRS differentiation defect was associated with the activation the MEK/ERK and the GSK3b myogenesis inhibitors that collectively negatively altered myogenic transcription factors expression and distribution. Similarly, we also observed that HRS silencing impaired the autophagic flux thus correlating well with previous published data stating that an efficient autophagic process is required during myoblast differentiation.

In conclusion, we found for the first time that HRS is a master regulator that controls myogenesis at different levels through the modulation of important key cellular mechanisms involved in trafficking, signaling and degradation.

Key words: Myogenesis, myoblasts/myotubes, ESCRT, HRS, TSG101, signaling pathways, autophagy/GSK3 β .

ABREVIATIONS

BMP: Bone Morphogenetic Protein

CART: Cytoskeleton associated Recycling or Transport

Cdk: Cyclin dependent kinase

CHMP: Charged Multivesicular body Proteins

EEA1: Early Endocytotic antigen

EGF: Epidermal Growth Factor

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ESCRT: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

FGF: Fibroblast Growth Factor

FOXO: Forkhead Box O3

GSK3 β : Glycogen Synthase kinase 3 β

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HRS: Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

IGF: Insulin like growth factors

ILV: Intraluminal vesicle

IRS: insulin receptor substrate

JNK: Jun N-terminal kinases

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MEF2: Myocyte enhance factor 2

MCD: methyl- β -cyclodextrin

MHC: Myosin Heavy Chain

MRF: Myogenic regulators factors

mTOR: mammalian target of rapamycin

MVB: Multivesicular body

Myf 5: Myogenic factor 5

MyoD: Myoblast determination protein 1

Pax: paired homeobox transcription

PIKfyve: phosphatidylinositol 3-phosphate 5 kinase

Shh: Sonic Hedgehog

SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

SNX: Sorting Nexin

STAM: signal transducing adaptor molecule 1/2

Tak1: Transforming growth factor beta-activated kinase 1

TfR: transferrin receptor

TGF β : Transforming growth factor β

TSG 101: Tumor Susceptibility Gene 101

Wnt: Wingless and Int-1

SOMMAIRE

RESUME	7
ABSTRACT	9
ABREVIATIONS	11
SOMMAIRE	12
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES FIGURES SUPPLEMENTAIRES	17
INTRODUCTION	18
I. LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	18
1.1 ORGANISATION ET STRUCTURE	18
1.2 ORIGINE ET FORMATION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE LORS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	20
1.3 REGENERATION POST-NATALE, ACTEURS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES.	21
1.3.1 LES CELLULES SATELLITES	22
1.3.1.1 Caractéristiques	22
1.3.1.2 Régénération musculaire	23
1.3.2 LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MYOGENESE CHEZ L'ADULTE	24
1.3.2.1 Activation et prolifération des cellules satellites	25
1.3.2.2 Les Protéines Pax	27
1.3.2.3 Les MRFs (Myogenic regulator factors)	28
1.3.2.4 Différentiation	33
1.3.2.5 Fusion et maturation des myotubes	33
1.3.3 REGULATION DE LA MYOGENESE PAR LES VOIES DE SIGNALISATION	35
1.3.3.1 Rôle des cyclin-dependent kinases (CDKs)	36
1.3.3.2 La voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK)	37
1.3.3.3 La voie IGF/PI3K/Akt/mTOR	40
1.3.3.4 La voie canonique Wnt	43
1.3.3.5 La voie du TGF β	45
2 LES VOIES ENDOSOMALES	46
2.1 INTRODUCTION GENERALE A L'ENDOCYTOSE	46
2.2 MECANISMES D'ENDOCYTOSE	47
2.2.1 ENDOCYTOSE DEPENDANT DES CLATHRINES (CME)	47
	12

2.2.2	ENDOCYTOSE INDEPENDANT DE LA CLATHRINE (CIE)	50
2.3	LES COMPARTIMENTS ENDOSOMAUX	52
2.3.1	LA VOIE ENDOSOMALE PRECOCE	54
2.3.2	LA VOIE ENDOSOMALE TARDIVE	55
2.3.3	DEVENIR DES ENDOSOMES TARDIFS	58
2.3.4	LES ENDOSOMES COMME PLATEFORME DE SIGNALISATION : LE SIGNALOSOME	61
3	LES PROTEINES ESCRT	64
3.1	INTRODUCTION	64
3.2	LA FONCTION DES PROTEINES ESCRT	65
3.2.1	FORMATION DES ILVS	66
3.2.1.1	ESCRT-0 à -II : Reconnaissance, rassemblement des récepteurs et invagination de la membrane des MVB	67
3.2.1.2	ESCRT-III, polymérisation et scission membranaire des ILV	70
3.2.1.3	Désassemblage des ESCRT-III : Rôle de VPS4	72
3.2.1.4	Protéine ESCRT et régulation des récepteurs membranaires à travers la formation des MVB	72
3.2.2	AUTRES PROCESSUS IMPLIQUANT LES PROTEINES ESCRT	75
3.2.2.1	ESCRT et autophagie	76
3.2.2.2	ESCRT et réparation de la membranaire plasmique et nucléaire.	78
3.2.2.3	ESCRT et cytokinèse	78
3.2.3	PROTEINES ESCRT ET PATHOLOGIES	79
4	LA PROTEINE HRS	80
4.1	INTRODUCTION	80
4.2	HRS ET REGULATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES	83
4.2.1	HRS ET REGULATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES	83
4.2.2	HRS ET AUTRES PROTEINES MEMBRANAIRES	87
4.3	LES FONCTIONS NON CANONIQUES DE HRS	89
4.3.1	HRS ET LE RECYCLAGE DE PROTEINES MEMBRANAIRES	89
4.3.2	HRS ET REGULATION DU CHOLESTEROL	91
4.3.3	HRS ET REGULATION DE L'AUTOPHAGIE	93
4.4	REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE HRS	94
PUBLICATION 1		99
	HRS/HGS ESCRT-0 is a master regulator of muscle myogenesis by controlling different signaling pathways.	99
RESULTAS COMPLEMENTAIRES		178

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **198**

PUBLICATION 2: **223**

Phosphorylated and aggregated TDP-43 with seeding properties are induced upon mutant Huntingtin (mHtt) polyglutamine expression in human cellular models 223

ANNEXE 1 **244**

Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions 244

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **264**

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma en vue éclatée de la structure du muscle strié squelettique.	19
Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale d'embryon au stade précoce de somitogenèse.	21
Figure 3: Localisation des cellules satellites dans le muscle.	22
Figure 4: Les différentes étapes cellulaires de la régénération in vitro.	24
Figure 5: Schéma du devenir des cellules satellites activées dans l'auto-renouvellement.	26
Figure 6: Schéma des différents domaines de la protéine Pax et de leur expression durant le développement des mammifères.	27
Figure 7: Structure protéique et proximité structurale des MRFs.	29
Figure 8: Schéma représentant l'expression successive des MRFs durant la myogenèse. ..	30
Figure 9: Schéma représentant les phénotypes des animaux dont les gènes des différents MRFs ont été invalidés (Megenev and Rudnicki, 1995).	31
Figure 10: Schéma représentant les interactions entre les MRF et les protéines MEF2.	32
Figure 11: Modèle décrivant le processus de fusion.	34
Figure 12: Facteurs de transcription et protéines kinases régulant les différentes étapes de la myogenèse.	36
Figure 13: Schéma des trois voies de signalisations mitogen-activated protein kinase (MAPK) chez les mammifères.	38
Figure 14: Représentation schématique de la voie PI3K/Akt/mTOR et de ses effecteurs principaux (Yu and Cui, 2016).	41
Figure 15: Schéma d'activation de la voie canonique Wnt/ β -caténine.	43
Figure 16: Vue globale des différentes voies d'endocytose.	47
Figure 17: Formation et structure des vésicules recouvertes de Clathrine.	49
Figure 18: Schéma représentant le système endo-lysosomal.	53
Figure 19: Schéma du devenir des MVB.	59
Figure 20: Représentation schématique des modèles d'endocytose participants à la régulation des voies de signalisation.	62
Figure 21: Schéma représentant les différentes actions des protéines ESCRT dans une cellule.	66
Figure 22: Représentation schématique de l'intervention des protéines ESCRT dans la formation d'une ILV. Adapté de (Rusten et al., 2011).	67
Figure 23: Représentation schématique de l'intervention des protéines ESCRT-III dans la fermeture du col de la vésicule.	71
Figure 24: Effet de l'inhibition des protéines ESCRT sur le tri des récepteurs membranaires et sur l'activation des voies de signalisation.	75
Figure 25: Schéma des processus cellulaires impliquant les protéines ESCRT ainsi que leurs partenaires protéiques.	76
Figure 26: Schéma des différents domaines de HRS (adapté de (Oku et al., 2017).	81

Figure 27: HRS est localisée au niveau de micro-domaines de l'endosome précoce qui ne sont pas marqué pour la protéine EEA1, mais marqué pour la protéine Clathrine.	83
Figure 28: Modèle de la fonction de HRS dans la régulation de RTK	84
Figure 29 : Modèle proposé pour la régulation de la voie du BMP par HRS	85
Figure 30: Schéma présentant la régulation de la voie Wnt et la séquestration de la GSK3β.	86
Figure 31: Modèle impliquant HRS dans le recyclage du récepteur à la transferrine	90
Figure 32: L'absence de HRS provoque l'accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs/Lysosomes	92
Figure 33: Schéma résumant les grandes fonctions de HRS.	96
Figure 34: Modèle du rôle de HRS durant le processus de différenciation des C2C12	221
Figure 35: Effet de l'inhibition d'expression de HRS sur les différentes voies de signalisation et voies cellulaires qui participent à la myogenèse.	222

LISTE DES FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Figure SD1: Effet de l'inhibition de la voie de recyclage endosomal (A) et de la fusion des endosomes tardif avec les lysosomes (B) sur la différenciation des C2C12.	179
Figure SD 2: Effet de l'inhibition de l'expression de HRS sur la taille et la forme des endosomes précoces et tardifs.	181
Figure SD 3: Effet de l'absence de HRS sur la localisation de mTOR en prolifération et à 7h de différenciation.	183
Figure SD 4: État d'activation de mTOR dans les cellules en prolifération et après 7h de différenciation en absence de HRS.	185
Figure SD 5: Effet de la HP- β CD sur l'accumulation de cholestérol dans les cellules contrôle (shCT), shHRS#3 et shNPC1.	187
Figure SD 6: Effet de l'absence de HRS sur la localisation de la β -caténine et de la E-cadhérine en prolifération.	189
Figure SD 7: Influence de l'association à des proportion différentes de cellule control et en absence de HRS sur la fusion des cellules.	191
Figure SD 8: Effet de l'apport du milieu de différenciation des cellules contrôle sur les cellules en absence de HRS.	193
Figure SD 9: Effet de l'inhibition de HRS dans les myotubes sur la localisation de la Clathrine et de l'alpha-Actinine4.	195
Figure SD 10 : Effet de l'absence de HRS sur le niveau d'ARNm de l'Axi2 et de la Follistatine durant la myogenèse.	197
Figure SD 11 : Localisation de HRS et p62 dans les coupes musculaires de 2 patients sIBM.	219

INTRODUCTION

I. Le muscle strié squelettique

1.1 Organisation et structure

Les muscles squelettiques représentent près de 30 à 40% de la masse totale du corps humain et participent à de multiples fonctions telles que les battements cardiaques, la respiration, le déplacement dans l'espace. Il existe trois types de muscles dont le muscle lisse que l'on trouve au niveau d'organes creux comme les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, l'intestin, l'utérus, et qui sont constitués de cellules fusiformes mononuclées (Mukund and Subramaniam, 2020). Leurs contractions irrégulières et continues sont sous le contrôle du système nerveux neurovégétatif. Le muscle strié cardiaque, ou myocarde, est composé de cardiomyocytes et possède une activité continue permettant au sang de circuler dans l'organisme. Et enfin, le muscle strié squelettique, qui est sous le contrôle du système nerveux volontaire permet les mouvements, le maintien de la posture et la régulation de la température corporelle. Cela est rendu possible grâce à la présence de plus de 650 muscles différents rattachés au squelette par les tendons (Mukund and Subramaniam, 2020).

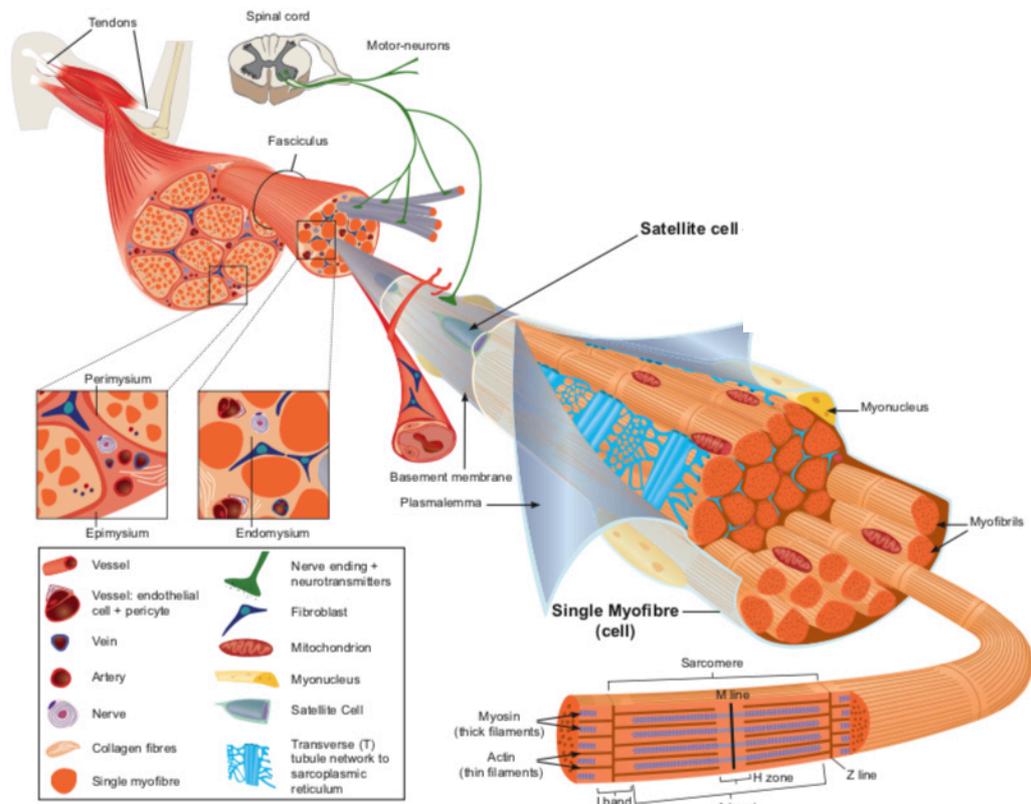


Figure 1: Schéma en vue éclatée de la structure du muscle strié squelettique.

Le muscle squelettique est composé d'un ensemble de fibres qui sont attachées à l'os par le tendon. Chaque fibre est composée de plusieurs myofibrilles, vaisseau sanguin et innervées par des nerfs qui conduisent le signal de contraction. Au niveau structural, trois couches de tissus conjonctifs sont identifiables dans le muscle squelettique et forment un réseau de membranes associées avec les myofibrilles. L'épimysium enveloppe entièrement le muscle et il est en continuité avec le tendon. Le périmysium enveloppe un ensemble de fibres en fascicules. L'endomysium est situé entre les fibres et il enveloppe les fibres musculaires individuelles (Comai and Tajbakhsh, 2014)

Le muscle squelettique est attaché aux os par le tendon (**figure 1**). Il est entouré de plusieurs couches de tissus conjonctifs (épimysium, périmysium et endomysium) permettant le maintien des fibres musculaires. Le muscle est composé de faisceaux de fibres (*fasciculus*) eux-mêmes composés de myofibrilles et de vaisseaux sanguins. Les myofibrilles sont constituées d'actine et de myosine qui donnent l'aspect strié au muscle squelettique et du tubule-T qui correspond au réticulum endoplasmique. Les noyaux, quant à eux, sont localisés à la périphérie des fibres. Chacune des fibres est innervée par un motoneurone et correspond

à une unité motrice. Des cellules à l'état quiescent appelées cellules satellites sont aussi présentes et vont être impliquées, avec d'autres acteurs cellulaires comme les cellules immunitaires, dans le processus de régénération après une blessure (Zammit, 2017).

On distingue trois types de fibres musculaires dont la classification se fait en fonction de leur métabolisme et de leur vitesse de contraction. Les fibres de type I, à contraction lente, sont de petites tailles avec de nombreuses mitochondries leur permettant de résister longtemps à l'effort. Les fibres à vitesse de contraction rapide sont quant à elles représentées par : les fibres de type IIA, possédant de nombreuses mitochondries, qui sont résistantes à des efforts prolongés; et les fibres de type IIB qui sont plus grosses se fatiguent rapidement et possèdent peu de mitochondries (Talbot and Maves, 2016).

1.2 Origine et formation du muscle strié squelettique lors du développement embryonnaire

Chez les vertébrés, les muscles squelettiques de la tête proviennent du mésoderme crânien non segmenté, tandis que les muscles du tronc et des membres dérivent des somites. Sous l'influence de molécules de signalisation provenant de la notocorde, du tube neural, de l'ectoderme et du mésoderme de la plaque latérale, les somites subissent différentes transitions pour devenir le sclérotome (SC) au niveau ventral et le dermomyotome (DM) au niveau dorsal (**figure 2**). A ce stade, des cellules du DM migrent vers la surface ventrale de ce dernier et subissent une transition épithéliale-mésenchymateuse pour former le myotome contenant les précurseurs des cellules myogéniques (Christ and Ordahl, 1995; Comai and Tajbakhsh, 2014). Par la suite, la partie dorsale du myotome sera responsable de la formation des muscles du dos alors que la partie ventrale contrôle la formation des muscles du tronc, du diaphragme et des membres. Le devenir des cellules myogéniques précurseurs est finement régulé par certains facteurs de transcription tels que les protéines Pax3/7 (paired homeobox transcription 3/7) et certains régulateurs de la myogenèse ou MRF (Myogenic regulators factors) tels que MyoD ou la myogénine (Berkes and Tapscott, 2005; Pownall et al., 2002; Tapscott, 2005).

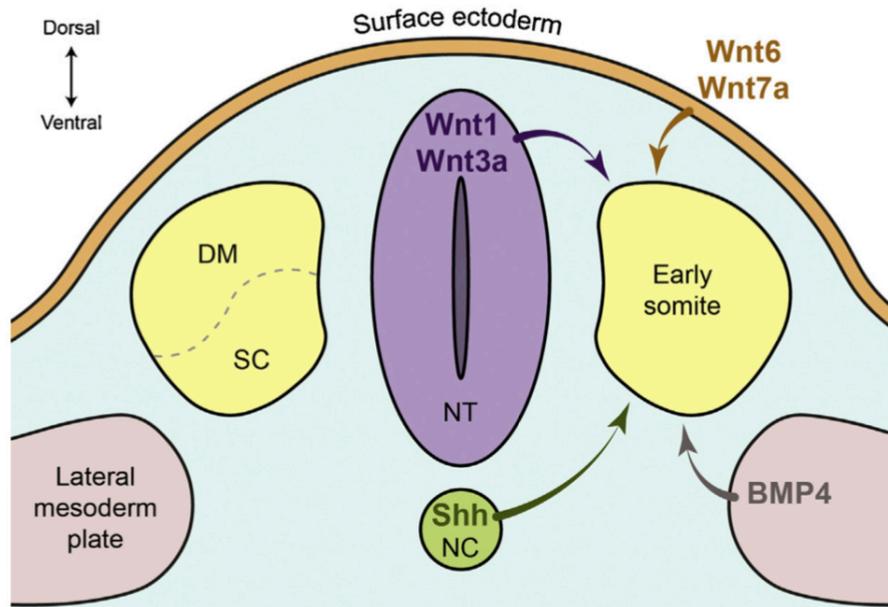


Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale d'embryon au stade précoce de somitogenèse.

Plusieurs signaux moléculaires dont Sonic Hedgehog (Shh), Wingless and Int-1 (Wnt) et les protéines morphogénétiques osseuses BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont sécrétées par le tube neural (Neural Tube : NT), l'ectoderme, la notochorde (NC) et le mésoderme afin de donner naissance à partir du somite au sclérotome (SC) et au dermomyotome (DM). Ensemble, ces signaux régulent la phase précoce de la myogenèse embryonnaire (Hernández-Hernández et al., 2017).

1.3 Régénération post-natale, acteurs cellulaires et moléculaires.

Durant le développement embryonnaire des muscles, certaines cellules Pax3/7 positives ne vont pas exprimer certains MRF et vont s'aligner le long des myotubes formés pour rester à l'état quiescent, ce sont les cellules satellites (Kassar-Duchossoy et al., 2005)(Relaix et al., 2005).

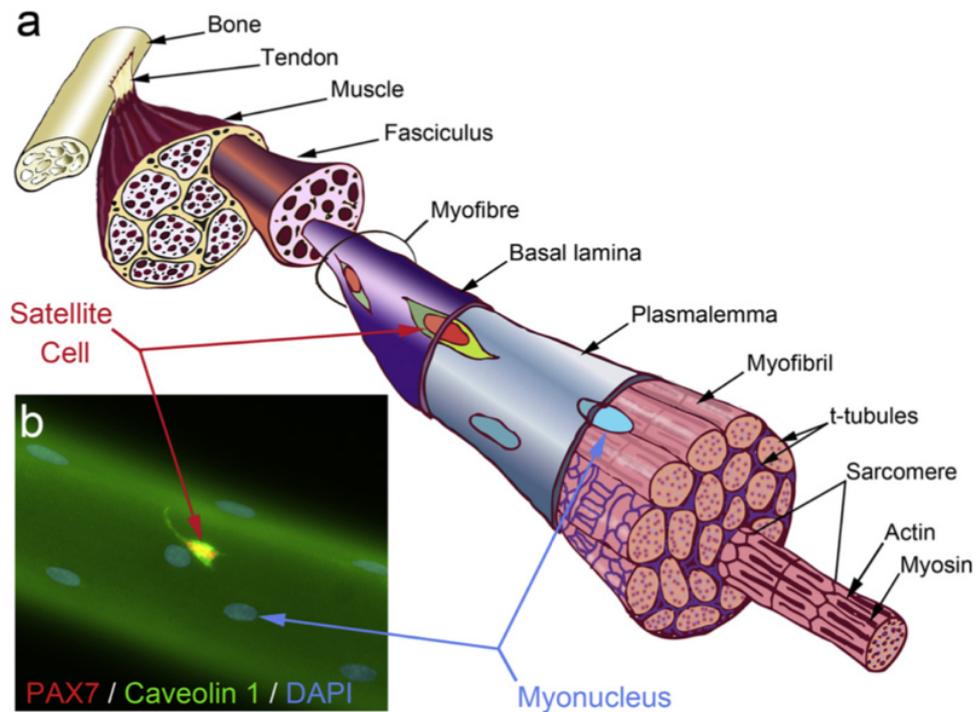


Figure 3: Localisation des cellules satellites dans le muscle.

Les cellules satellites sont localisées entre la membrane basale et le plasmalemma du muscle. Elles sont souvent proches d'un vaisseau sanguin et constituent la principale population de cellules souches musculaires. Elles expriment des facteurs de transcription spécifiques comme PAX7 et des protéines membranaires comme la Cavéoline 1 (Zammit, 2017).

1.3.1 Les cellules satellites

1.3.1.1 Caractéristiques

Depuis la découverte des cellules satellites dans les années 1960 (Mauro, 1961), il est devenu indéniable qu'elles sont les contributrices principales de la croissance post-natale, de la maintenance, et de la réparation du muscle strié squelettique après une lésion. Localisées sous la lame basale des myofibrilles, elles restent à l'état quiescent en conditions normales. Elles sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins qui expriment certains facteurs de croissance nécessaires pour leur prolifération. Réciproquement, les cellules satellites participent à l'angiogenèse (Christov et al., 2007). Les cellules satellites, tout comme les précurseurs myogéniques embryonnaires expriment le facteur de transcription Pax7, ainsi que le facteur Pax3 pour une partie d'entre elles (Relaix et al., 2005). Pax7 est essentiel à la

survie des cellules satellites ; plusieurs études de modèles animaux Pax7^{-/-} montrent une augmentation de la mort de ces cellules par apoptose après la naissance et une diminution de leur population, ce qui impacte la régénération (Kassar-Duchosoy et al., 2005; Kuang et al., 2006; Seale et al., 2000). Les cellules satellites sont reconnaissables par leur morphologie particulière ; elles possèdent un noyau volumineux par rapport au cytoplasme expriment des protéines membranaires telles que la M-cadhérine, l'intégrine $\alpha 7$ et la Cavéoline 1 (Kuang and Rudnicki, 2008). L'identification de ces marqueurs membranaires a notamment permis d'isoler et de caractériser les cellules satellites *in vitro* à partir de muscle par la technique de cytométrie en flux (Bosnakovski et al., 2008).

1.3.1.2 Régénération musculaire

L'étude *in vivo* de la régénération ainsi que de la dégénération musculaire dans certaines pathologies musculaires s'est appuyée sur différentes approches :

- Les modèles animaux où les processus de dégénération ou de régénération sont impactés tels que les souris mdx (portant une mutation du gène codant pour la Dystrophine dans l'exon 23) permettant l'étude de la dystrophie musculaire de Duchenne (Pastoret and Sebillé, 1993).
- Des blessures indirectes du muscle comme, lors de la dénervation.
- Par blessure directe avec l'injection de myotoxines telle que la cardiotoxine (CTX) qui détruit les membranes musculaires (Morgan and Partridge, 2020).

On peut alors délimiter trois grandes étapes au processus de régénération avec, en premier lieu, une dégénération du tissu et une nécrose, puis une phase de régénération pendant laquelle la prolifération et la fusion des cellules satellites jouent un rôle clé, et en dernier lieu, une phase de remodelage du tissu musculaire pour retourner à un état d'origine avant la lésion (Grefte et al., 2007). Durant la phase de régénération musculaire, un processus inflammatoire se met en place et certains acteurs du système immunitaire vont jouer un rôle prépondérant. C'est notamment le cas des neutrophiles qui sont capables d'envahir rapidement le muscle après une blessure (Fielding et al., 1993). Ces neutrophiles vont avoir différents rôles dont l'élimination des débris musculaires engendrés par la blessure et l'initiation du recrutement des macrophages. Ces derniers vont jouer un double rôle dans le

processus de régénération (Tidball, 2017), en adoptant dans un premier temps, un profil pro-inflammatoire en exprimant des cytokines comme l'interféron (IFN γ) qui participe à la prolifération des cellules satellites (Arnold et al., 2007; Cheng et al., 2008) puis dans un second temps, en adoptant un profil anti-inflammatoire qui participe à la différenciation des cellules satellites, notamment grâce à la sécrétion du Transforming growth factor β (TGF β) (Arnold et al., 2007; Lemos et al., 2015).

1.3.2 Les différentes étapes de la myogenèse chez l'adulte

Différentes étapes vont régir la régénération ou myogenèse du muscle lésé et commence par l'activation des cellules satellites qui exprime des facteurs de transcription spécifiques induisant leur prolifération et leur passage au stade de myoblaste. Par la suite, les myoblastes vont s'engager dans le processus de différenciation avec des changements morphologiques notables dont l'élongation des cellules et l'expression de protéines de fusion pour devenir des myocytes. Ceux-ci vont finalement fusionner entre eux pour donner des myotubes, qui viendront réparer le muscle lésé (**figure 4**). L'étude de ces différentes étapes a été réalisée *in vitro* et *in vivo* et a mis en lumière différents facteurs protéiques essentiels à la régénération qui vont être détaillés ci-dessous.

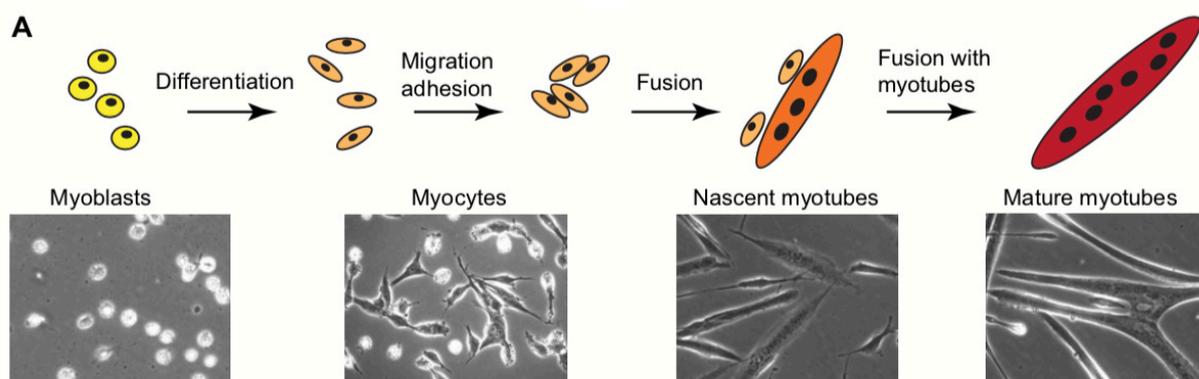


Figure 4: Les différentes étapes cellulaires de la régénération in vitro.

Les myoblastes prolifèrent *in vitro* dans un milieu riche en facteurs de croissance. La différenciation est induite par la diminution drastique des facteurs de croissance et initie le processus de différenciation des myoblastes en myocytes qui migrent, adhèrent et fusionnent les uns avec les autres pour former des myotubes. Par la suite, d'autres myocytes vont

fusionner aux myotubes naissants pour former des myotubes plus larges et matures possédant de multiples noyaux (Abmayr and Pavlath, 2012).

Afin d'étudier le processus de myogenèse *in vitro*, la lignée cellulaire de myoblastes C2C12 de souris, isolée dans les années 1970, est couramment utilisée (Yaffe and Saxel, 1977). Ces cellules peuvent être mises en différenciation après réduction de la concentration en sérum du milieu de culture cellulaire (remplacement des 10% de sérum de veau fœtal par 2% de sérum de cheval). D'autres sources de cellules musculaire permettent l'étude du processus de différenciation dont notamment l'isolation de cellules satellites à partir des muscles des pattes de souris (Montarras et al., 2005) ou encore l'utilisation de myoblastes primaires humains qui peuvent être ou non immortalisés (Thorley et al., 2016).

1.3.2.1 Activation et prolifération des cellules satellites

Lors d'une lésion musculaire, les cellules satellites quiescentes peuvent rapidement être activées, se diviser et se différencier en myocytes puis fusionner pour donner naissance aux myotubes et ainsi réparer le muscle. Les molécules libérées par le muscle lésé, ainsi que par son environnement vont permettre l'activation des cellules satellites quiescentes, ainsi que le recrutement des cellules immunitaires (Tidball, 2017). Parmi ces molécules, certains facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), ou encore le HGF (Hepatocyte Growth Factor), sont libérés et vont activer la prolifération des cellules satellites (Tatsumi et al., 1998; Yablonka-Reuveni et al., 1999). Une fois activées, les cellules satellites vont être capables de sécréter du HGF pour augmenter leur expansion (Miller et al., 2000; Sheehan et al., 2000). L'IGF (Insulin like growth factors) qui régule positivement la prolifération ainsi que la différenciation est aussi sécrété par les cellules satellites activées (Florini et al., 1991; Philippou et al., 2007). Outre les facteurs de croissances, d'autres molécules sont aussi capables d'activer la prolifération des cellules satellites tel que l'oxyde nitrique (NO) qui est libéré par le muscle lésé et stimule l'expression de métalloprotéases matricielles telle que la MMP2 (Matrix metalloproteinases 2), permettant d'augmenter la libération de facteurs de croissance séquestrés dans la matrice extracellulaire (Anderson,

2000; Yamada et al., 2008). Des protéines de l'inflammation comme les cytokines vont aussi jouer un rôle essentiel lors de la prolifération des myoblastes et de la différenciation des myocytes (Arnold et al., 2007; Tidball, 2017)

Durant la régénération, les cellules souches satellites se divisent de deux façons pour, garder une quantité constante de cellules satellites pour les futurs évènements de régénération d'une part, et d'autre part pour créer une quantité suffisante de cellules capables de réparer le muscle lésé (**Figure 5**).

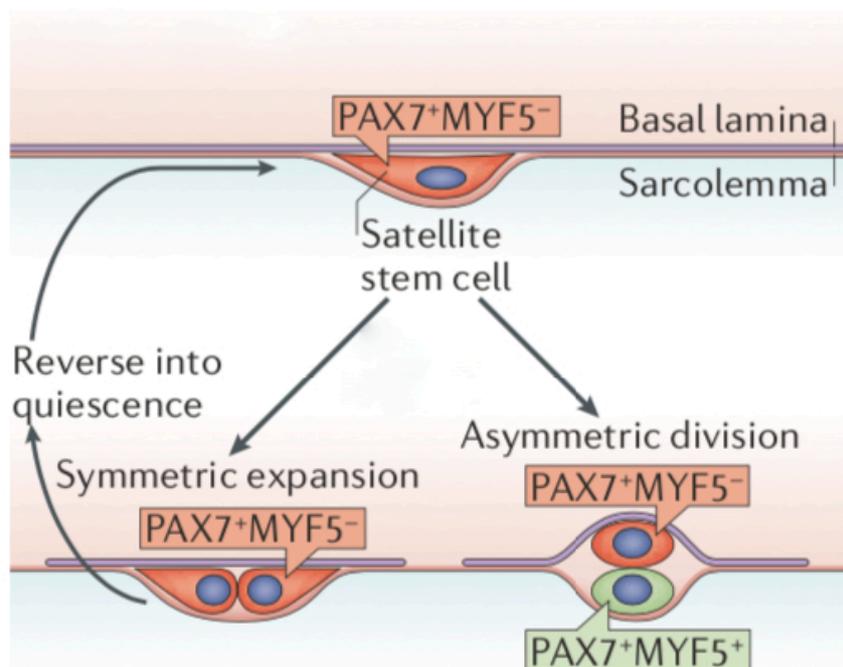


Figure 5: Schéma du devenir des cellules satellites activées dans l'auto-renouvellement.

Les cellules souches satellites activées, Pax7⁺Myf5⁻, vont s'engager dans une division symétrique ou asymétrique en fonction des stimulus de l'environnement (Adapté de (Wang and Rudnicki, 2012).

Lorsque les cellules se divisent parallèlement au muscle, on parle d'expansion symétrique, ce qui donne naissance à deux cellules souches exprimant le facteur de transcription Pax7, mais pas Myf5 et qui reste à l'état quiescent. Une division perpendiculaire à la fibre, dite asymétrique, donne naissance à deux cellules distinctes. Une de ces cellules va être activée et poussée vers la surface apicale ; elle exprime les facteurs de transcription Pax7 et Myf5 et participe au processus de régénération en migrant jusqu'au site de la lésion. La

seconde cellule, quant à elle, reste adhérente à la membrane basale et se maintient à l'état de cellule satellite souche (Kuang et al., 2007; Wang and Rudnicki, 2012).

1.3.2.2 Les Protéines Pax

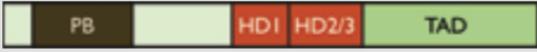
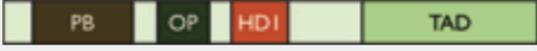
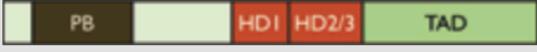
Pax gene	Protein domains*	Expression during development [†]
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pax3</i> • <i>Pax7</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • CNS, neural crest, somites/ skeletal muscle • CNS, neural crest, somites/ skeletal muscle
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pax2</i> • <i>Pax5</i> • <i>Pax8</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • CNS, kidney, ear, eye • CNS, B lymphoid, testis • CNS, kidney, thyroid
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pax4</i> • <i>Pax6</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • CNS, pancreas, gut • CNS, pancreas, gut, nose, eye
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pax1</i> • <i>Pax9</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • Sclerotome/skeleton, thymus, parathyroid • Sclerotome/skeleton, thymus, craniofacial tissue, teeth

Figure 6: Schéma des différents domaines de la protéine Pax et de leur expression durant le développement des mammifères.

Les régions codant les domaines protéiques : Paired-box domain (PD), ocatapeptide (OP), homeodomain (HD2/3), la première hélice (HD1), le domaine d'activation transcriptionnelle (Transcriptional activation domain : TAD) sont présents ou non dans chacun des gènes codant pour les 9 protéines Pax. CNS : Central nervous system (Asfour et al., 2018).

Les protéines de la famille Pax (Paired Box) sont codées par 9 gènes (**figure 6**). Pax3 et Pax7 sont deux protéines proches qui sont impliquées dans la spécification et le maintien des progéniteurs musculaires. L'expression de Pax3 est essentielle pour la migration des précurseurs musculaires du somite vers les membres lors du développement (Bober et al., 1994; Goulding et al., 1994). Le rôle de Pax7 dans le développement musculaire ne semble pas être critique car des souris Pax7^{-/-} ne présentent pas de défaut de formation mais sont

dépourvues de cellules satellites à l'état adulte (Seale et al., 2000). La situation est différente dans le muscle adulte. La plupart des cellules satellites sont Pax3 négatives mais Pax7 positives, ce qui assure leur survie. Durant la régénération musculaire, Pax7 est capable d'activer la transcription du MRF MyoD en se fixant sur un site spécifique de son promoteur (Hu et al., 2008). Il semble aussi être capable d'activer l'expression du MRF Myf5 (McKinnell et al., 2008). De façon surprenante, des études postérieures montrent que l'ablation de Pax7 et Pax3 à des stades de développements plus tardifs n'impacte pas la régénération ni la prolifération ou le nombre de cellules satellites (Lepper et al., 2009).

1.3.2.3 Les MRFs (Myogenic regulator factors)

Les protéines de la famille des MRF jouent un rôle clé dans le processus de myogenèse embryonnaire et adulte. Elles comptent quatre membres : Myf5 (Myogenic factor 5), MyoD (Myoblast determination protein 1), Myogenin (ou Myf4) et MRF4. Ils possèdent une structure protéique semblable et sont des facteurs de transcriptions à hélice-boucle-hélice ou bHLH (b Helix Loop Helix) (**figure 7**).

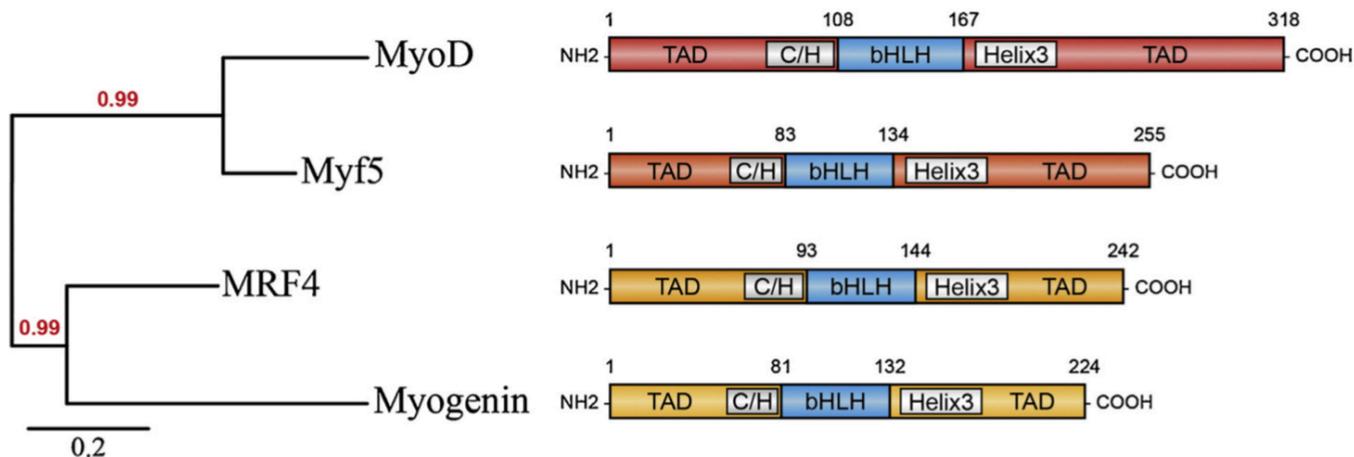


Figure 7: Structure protéique et proximité structurale des MRFs

Les quatre MRFs partagent le domaine bHLH qui est fortement conservé, et essentiel à leurs fonctions. Le domaine bHLH est entouré de la région N-terminale (NH2) qui est un domaine riche en Cystéine/Histidine, alors que la région C-terminale (COOH) contient un domaine à hélice qui participe à la régulation de la transcription. L'arbre révèle la proximité structurale entre Myf5 et MyoD, ainsi qu'entre la Myogénine et MRF4, en corrélation avec leurs fonctions respectives durant la myogenèse (Hernández-Hernández et al., 2017).

Les domaines bHLH participent à l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des MRF avec des protéines possédant aussi des domaines bHLH tels que E12 ou E47, formant ainsi des complexes protéiques-ADN stables (Blackwell and Weintraub, 1990). Les MRFs régulent la transcription en se liant à une séquence spécifique d'ADN nommée E-box.

L'étude des MRF a débuté dans les années 1980 avec la découverte de MyoD dont l'expression forcée dans des fibroblastes provoque leurs conversions en myoblastes (Davis et al., 1987; Lassar et al., 1986). De plus, la surexpression de MyoD dans d'autres types cellulaires comme les chondroblastes, qui participe à la formation du cartilage, induit l'expression de protéines spécifiques au muscle telles que la Myogénine ou de la chaîne lourde de myosine (Myosin Heavy Chain :MHC) (Choi et al., 1990). Inversement, des cellules primaires myogéniques issues de muscle adulte de souris *MyoD^{-/-}* ne sont plus capables de rentrer en différenciation (Sabourin et al., 1999). De plus, une étude montre que l'absence de MyoD dans les myoblastes C2C12 conduit à leur conversion en adipocyte et à l'accumulation de lipides (C. Wang et al., 2017)

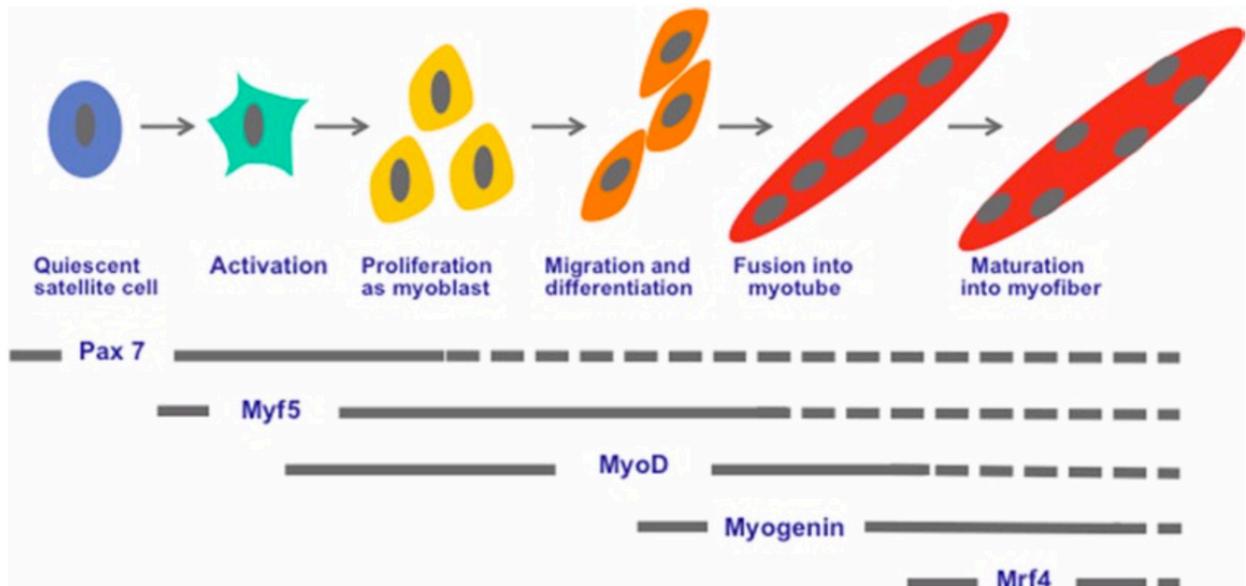


Figure 8: Schéma représentant l'expression successive des MRFs durant la myogenèse.

Les cellules satellites, qui sont quiescentes, expriment Pax7 qui est nécessaire à leur survie. Après un dommage musculaire, les cellules satellites sont activées et expriment Myf5 pour proliférer et devenir des myoblastes. Elles expriment ensuite MyoD qui permet la sortie du cycle cellulaire, puis la Myogénine pour initier la différenciation et la fusion en myotube. L'expression de Mrf4 permet la maturation des myotubes en myofibrilles avec des noyaux situés en périphérie (Zanou and Gailly, 2013).

Comme mentionné précédemment, les cellules satellites activées qui sont Pax7 positives se mettent à exprimer Myf5 et prolifèrent, elles deviennent alors des myoblastes (**Figure 8**). Par la suite, l'expression de MyoD dans les myoblastes en prolifération permet la régulation du cycle cellulaire (Cao et al., 2010). Myf5 et MyoD vont travailler de concert et permettre l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire telles que les protéines CDC6 (Cell division cycle 6) ou MCM2, mais aussi certains facteurs de transcriptions comme FOXO3 (Forkhead Box O3) (Crescenzi et al., 1990; Halevy et al., 1995; Hu et al., 2008; Zhang et al., 2010). Plus tard dans la différenciation, MyoD va avoir un rôle positif dans l'expression de la Myogénine qui débute dans les myocytes (Hasty et al., 1993). Les protéines MyoD et Myogénine vont agir en synergie et permettre la sortie du cycle cellulaire en favorisant l'expression de répresseur des Cdk (Cyclin dependent kinase) et cyclines telle que p21 ou p57 (Liu et al., 2012; Singh and Dilworth, 2013). De plus, La Myogénine va permettre l'expression de différents gènes spécifique du muscle et de facteurs de transcription comme Mrf4 (Davie

et al., 2007; Singh and Dilworth, 2013). Mrf4 intervient dans la maturation des myotubes et permet la réorganisation des myofilaments et la migration des noyaux à la périphérie des cellules. Néanmoins, des études ont montré que les MRFs pouvaient avoir des rôles redondants (**figure 9**)(Rudnicki et al., 1992). En effet, des souris KO pour MyoD ou Myf5 présentent un phénotype musculaire quasiment normal, alors que l'absence de ces deux protéines inhibe la formation des muscles et provoque la mort des souris après la naissance (Rudnicki et al., 1993). De plus, la myogénine est essentielle pour la croissance musculaire post-natale mais semble moins importante pour les cellules satellites adultes qui se différencient normalement *in vivo* en son absence, mais avec une réduction de 30% du poids des souris (Knapp et al., 2006; Meadows et al., 2008).

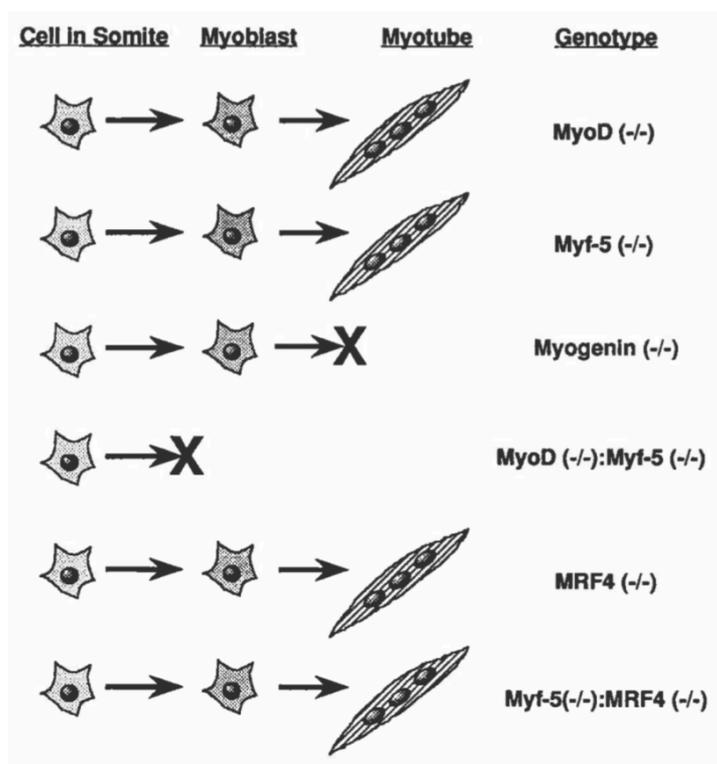


Figure 9: Schéma représentant les phénotypes des animaux dont les gènes des différents MRFs ont été invalidés (Megeny and Rudnicki, 1995).

Les MRFs contrôlent l'expression de différents gènes, dont les protéines de la famille MEF2 (Myocyte enhance factor 2) qui jouent un rôle prépondérant dans la différenciation. Chez les vertébrés, on trouve quatre gènes MEF2 (A, B, C et D) qui appartiennent à la famille

des facteurs de transcription MADS (MCM1 Agamous Deficient SRF). Toutes les protéines MEF2 possèdent dans leur région N-terminale une région conservée MADS qui permet la reconnaissance de régions de l'ADN riches en A/T (Pon and Marra, 2015). MEF2A, B et D sont exprimées de manière ubiquitaire dans l'organisme, alors que MEF2C est préférentiellement exprimé dans le muscle cardiaque et squelettique (Potthoff and Olson, 2007). Pendant la régénération musculaire, MEF2D est exprimé en prolifération, MEF2A apparaît durant les premières étapes du processus de différenciation, MEF2C durant les étapes plus tardives alors que l'expression de MEF2B ne semble pas être modulée durant ce processus (Black and Olson, 1998). De plus, une étude montre que l'ablation individuelle des protéines MEF2 n'impacte pas la myogenèse mais que, l'inhibition de MEF2A, C et D empêche la différenciation (Liu et al., 2014). Une fois associées avec les MRFs, les protéines MEF2 sont capables de former des complexes MEF2-MRF en se liant au domaine bHLH des MRFs pour activer la transcription de gènes cibles de la différenciation (Black and Olson, 1998). Les MRF et les protéines MEF2 fonctionnent de concert dans la régulation de la différenciation (**Figure 10**)

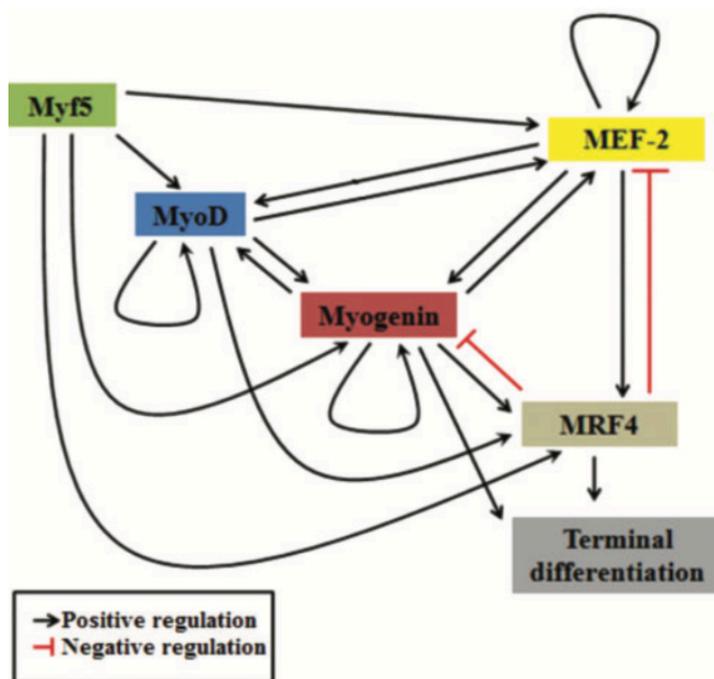


Figure 10: Schéma représentant les interactions entre les MRF et les protéines MEF2.

Myf 5 active les MRFs (MyoD, Myogénine et MRF4) et les protéines MEF2. MyoD est capable de s'autoréguler et agit en synergie avec Myogénine. Myogénine est aussi capable de s'autoréguler, induit la différenciation et coopère en outre avec MRF4. MEF2 s'autorégule et peut activer MyoD et Myogénine et réciproquement (Asfour et al., 2018).

1.3.2.4 Différentiation

Après plusieurs cycles de division cellulaire, les myoblastes vont quitter la phase de prolifération et démarrer leur différenciation en myocytes. Différents facteurs contrôlent cette étape dont les MRF, mais aussi des voies cellulaires dont les voies de signalisation comme la voie des ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) ou la voie PI3K/AKT/mTOR. Ces voies seront détaillées dans le chapitre 1.3.3

Par ailleurs, le processus d'autophagie participe grandement à la myogenèse. Le flux autophagique est augmenté durant la différenciation des myoblastes et se caractérise par une diminution de la protéine p62/SQSTM1 et une augmentation de LC3-I et LC3-II, ce qui protège les cellules de la mort par apoptose (McMillan and Quadriatero, 2014). De plus, il a été observé un remodelage complet du réseau mitochondrial durant la différenciation en lien avec une augmentation de la mitophagie (Sin et al., 2016).

1.3.2.5 Fusion et maturation des myotubes

Suite au processus de différenciation, les cellules vont initier la fusion qui va permettre la formation des structures multinuclées appelées myotubes. Les principales avancées dans la compréhension de ce mécanisme ont été rendues possibles par l'étude de la fusion des myoblastes chez la drosophile. La fusion peut être séparée en deux étapes : tout d'abord la fusion précoce ou primaire qui correspond à un contact entre deux myocytes et leur fusion ; et la fusion tardive ou secondaire qui correspond à la fusion des myocytes avec des myotubes néoformés (**Figure 11**).

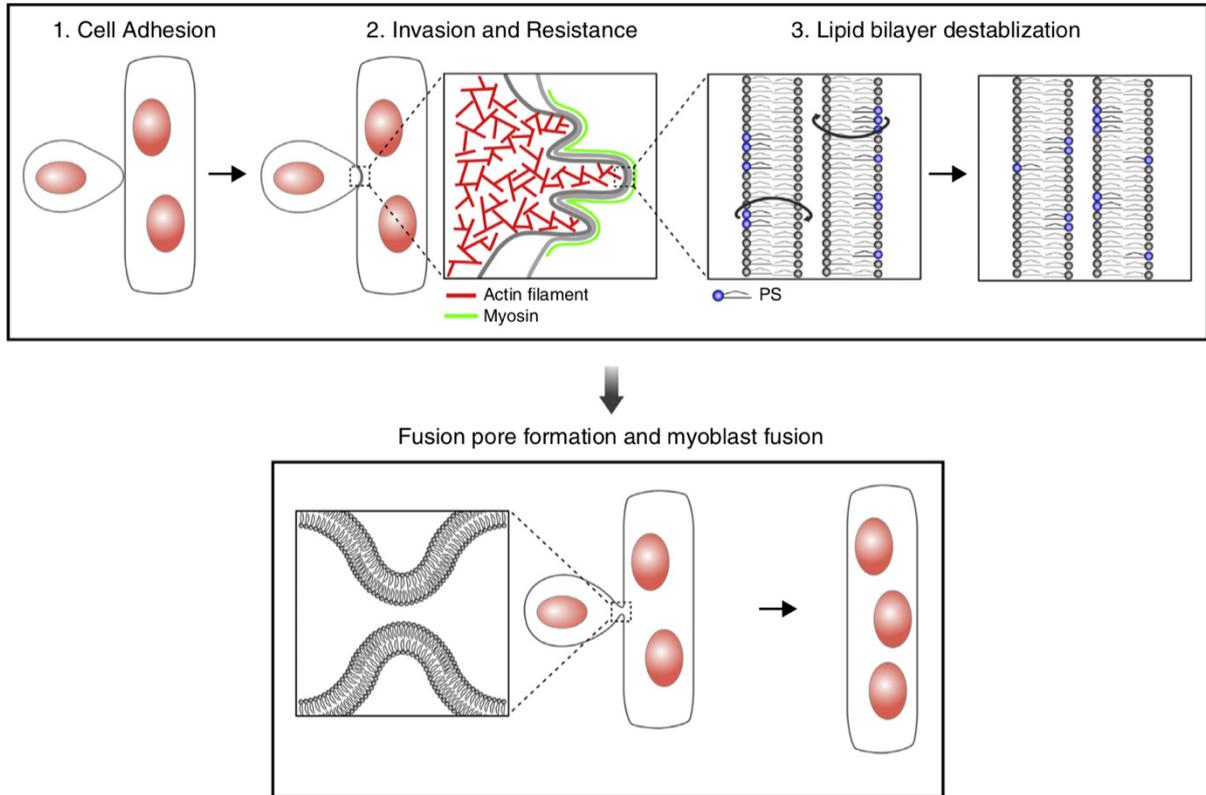


Figure 11: Modèle décrivant le processus de fusion.

Après l'adhésion du myocyte à un myotube néoformé, celui-ci va générer des protubérances membranaires poussées par le réseau d'actine pour envahir la cellule fondatrice. Dès que les deux membranes plasmiques sont rapprochées, les bicouches lipidiques sont déstabilisées, conduisant à la formation d'un pore de fusion. Certains lipides dont la phosphatidylsérine (PS) sont importants pour ce processus en étant disposés de part et d'autre des membranes qui se font face. (Kim et al., 2015).

Plusieurs protéines sont essentielles au processus de fusion chez les vertébrés telle que l'intégrine $\beta 1$, qui est une protéine d'adhésion dont l'absence provoque l'adhésion des myocytes les uns aux autres mais un défaut de fusion (Schwander et al., 2003). Les protéines qui régulent la polymérisation de l'actine comme Rac1 ou N-WASP sont aussi des facteurs importants permettant le réarrangement du cytosquelette d'actine au point de fusion (Gruenbaum-Cohen et al., 2012; Vasyutina et al., 2009). Les cellules réceptrices (Founder cell) quant à elles, accumulent au point de fusion de la Myosin II (MyoII) qui augmente la tension membranaire et permet la fusion (Kim et al., 2015). L'exocytose participe aussi au processus de fusion et des analyses en microscopie électronique révèlent la présence de vésicules au niveau des contacts cellule-cellule (S. Kim et al., 2007). Les protéines SNARE (Soluble N-

éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) dont la protéines SNAP23, jouent un rôle dans la fusion des vésicules entre elles ou avec d'autres compartiments cellulaires, sont impliquées dans le processus de fusion (Gamarra et al., 2019). L'endocytose joue aussi un rôle dans le processus de fusion car l'inhibition de la Dynamine (une protéine GTPase participant à l'endocytose) ou de la Clathrine (responsable de l'endocytose clathrine dépendante) perturbe la fusion des myoblastes C2C12 (Leikina et al., 2013; Shin et al., 2014). Plus récemment, une protéine spécifique du muscle, Myomaker, a été montrée comme étant capitale dans le processus de fusion (Millay et al., 2013).

Pour conclure, ce processus de fusion met en jeu beaucoup d'acteurs moléculaires qui sont, encore à ce jour de mieux en mieux connus (Sampath et al., 2018).

L'ultime étape après la formation des myotubes est leur maturation pour former des fibres fonctionnelles et correspond à l'hypertrophie qui permet l'élargissement des myofibres. Chez la souris par exemple, les cellules satellites fusionnent avec les fibres néoformées durant les trois premières semaines de vie ce qui augmente le nombre de noyaux par myofibre. (White et al., 2010). Néanmoins, un point important est à noter et qu'à l'âge adulte, l'hypertrophie a lieu après de nombreux efforts physiques, intenses et répétés mais que le stock de cellules satellites reste constant. Ceci suggère que ces cellules sont peu impliquées dans ce processus. L'hypertrophie est alors assurée par une augmentation de la synthèse protéique du muscle sous le contrôle de voies cellulaires telle que la voie IGF1-Akt-mTOR. Celle-ci sera abordée par la suite dans le cas de la myogenèse chez l'adulte (Schiaffino et al., 2013).

1.3.3 Régulation de la myogenèse par les voies de signalisation

Nous avons abordé précédemment le rôle des différents facteurs de transcription durant la myogenèse. Ces facteurs n'agissent pas seuls mais sont régulés par des voies de signalisation en amont déclenchées par l'activation de récepteurs membranaires. La régulation fine de ces voies dont la voie MAPK/ERK, ou encore la voie PI3K/AKT/mTOR, et des protéines kinases associées est une étape clé au bon déroulement de la myogenèse (**Figure 12**). Nous allons aborder dans la partie suivante les principales voies de signalisation qui régulent ce processus chez l'adulte.

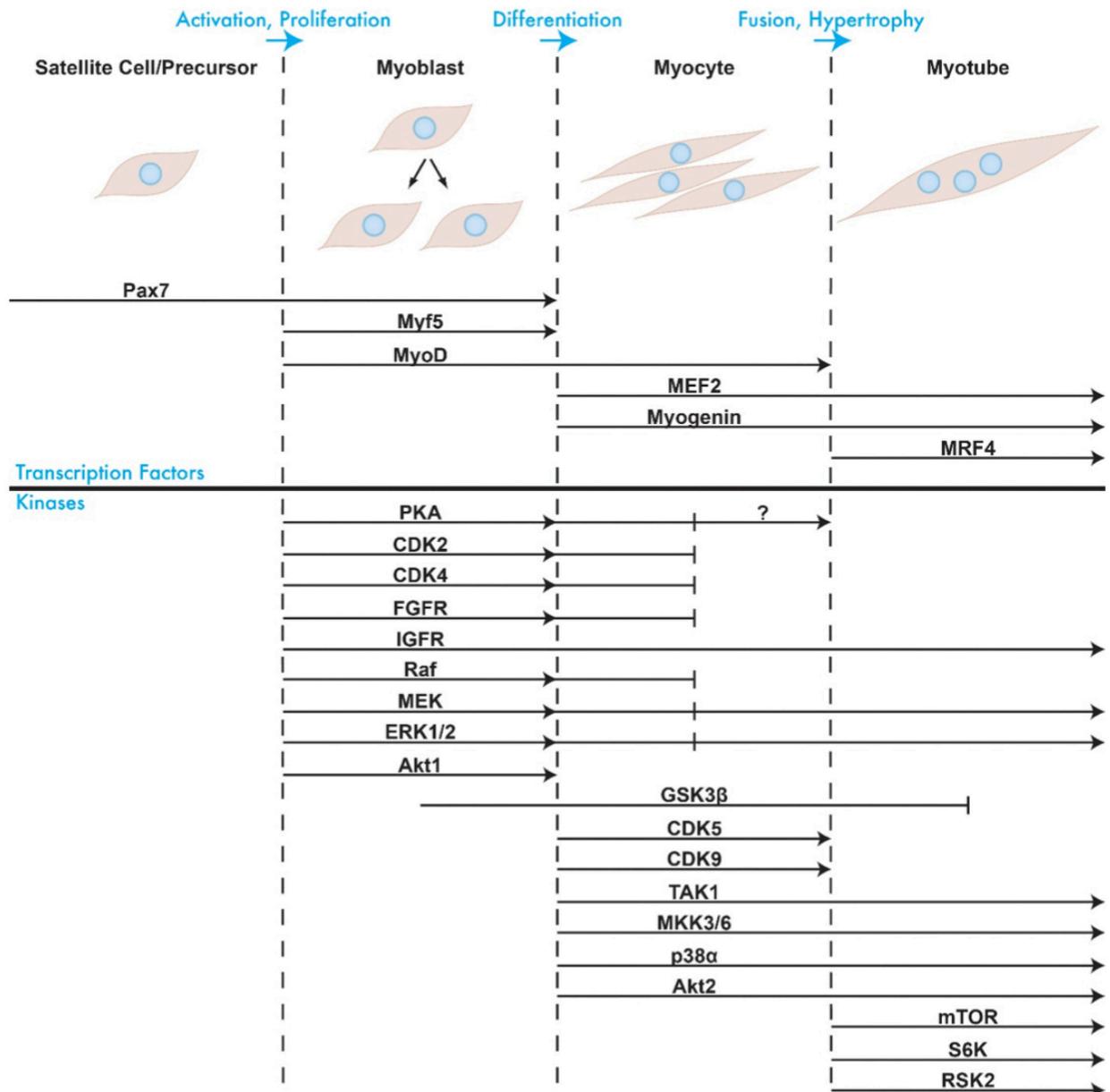


Figure 12: Facteurs de transcription et protéines kinases régulant les différentes étapes de la myogenèse.

Le panel du haut place l'intervention des différents facteurs de transcription durant la myogenèse, et celui du bas liste l'intervention des kinases des différentes voies de signalisation au cours de ce processus (Knight and Kothary, 2011).

1.3.3.1 Rôle des cyclin-dependent kinases (CDKs)

Les CDKs sont des kinases sérine/thréonine qui ont pour cible les cyclines, impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Il existe plusieurs cyclines et CDKs qui peuvent être divisées

en trois groupes : les cyclines G1 qui régulent la progression en phase G1 et l'entrée en phase S ; les cyclines mitotiques, qui régulent l'entrée en mitose ; et les cyclines qui ont un rôle indépendant du cycle cellulaire (Lim and Kaldis, 2013). Concernant la myogenèse dans les myoblastes en prolifération, certaines CDK ont un rôle inhibiteur. C'est le cas de la cycline E/CDK2 et cycline D/CDK4 qui peuvent bloquer la différenciation en affectant l'activité transcriptionnelle de MyoD (**figure 12**) (Guo and Walsh, 1997; Rao et al., 1994; Skapek et al., 1996). Pour que les myoblastes se différencient, ces derniers doivent sortir du cycle cellulaire. l'expression des cyclines et des CDK vont diminuer afin de provoquer cette sortie d'une part, (Jahn et al., 1994) et d'autre part, l'expression d'inhibiteurs de CDK dont p21, va augmenter durant la différenciation (Halevy et al., 1995). Certaines CDK, au contraire, sont importantes pour établir la différenciation. C'est le cas des CDK possédant un rôle indépendant du cycle cellulaire comme CDK5 et CDK9 (Giacinti et al., 2008; Lazaro et al., 1997). Ainsi, les CDKs régulent la myogenèse de différentes façons.

1.3.3.2 La voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Les MAPK représentent une famille importante de sérine/thréonine kinases qui sont réparties dans 3 grandes voies de signalisation dont la voie ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), la voie JNK (Jun N-terminal kinases) et la voie p38 (figure13) ; elles jouent un rôle prépondérant dans le processus de myogenèse.

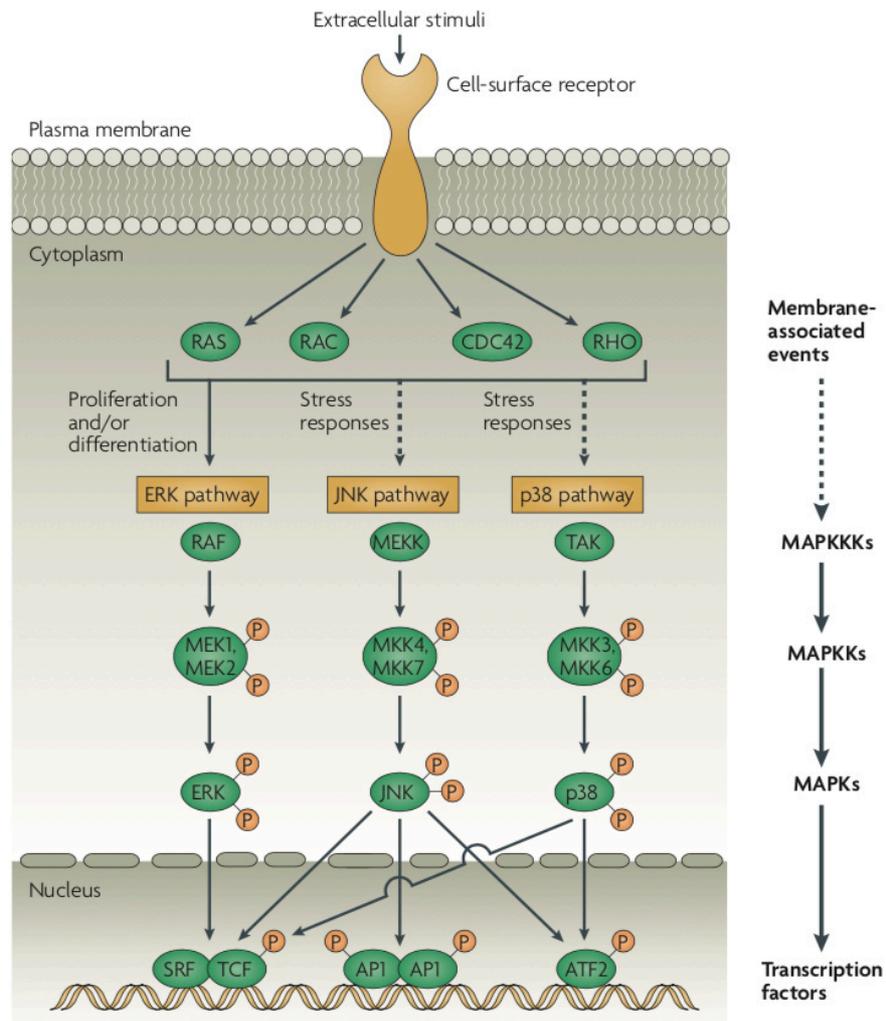


Figure 13: Schéma des trois voies de signalisations mitogen-activated protein kinase (MAPK) chez les mammifères.

Des stimuli extracellulaires sont capables d'activer les voies MAPK qui sont orchestrées par des protéines GTPases comme RAS (Mitogen Activated Protein Kinase), RAC1/2, CDC42 (cell-division cycle 42) ou RHO (RAS homologue). Il en découle l'activation des MAPKKKs (MAPK Kinase kinases) qui à leur tour vont phosphoryler les MAPKKs (MAPK kinases) sur deux résidus sérines. Par-là suite, les MAPKKs phosphorylent les MAPKs sur des résidus thréonine et sérine qui deviennent alors actives. Les MAPKs activées peuvent alors se localiser dans le noyau et phosphoryler différentes cibles telles que des facteurs de transcription (Liu et al., 2007).

Voie MAPK-ERK : Il existe deux isoformes de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), qui sont activées notamment par des récepteurs à tyrosine kinase tels que le FGFR (fibroblast growth factor receptor), ou l'EGFR, et qui participe grandement au processus de myogenèse (Knight and Kothary, 2011; Leroy et al., 2013; Pawlikowski et al., 2017). Au niveau moléculaire, l'autophosphorylation des récepteurs à tyrosine kinases permet la formation

d'un complexe protéique contenant notamment la protéine GRB2, qui en interagissant avec la protéine SOS (son of sevenless) permet la catalyse de GTP et l'activation de la GTPase RAS. RAS lie et active la protéine Raf qui initie la cascade d'activation de la voie ERK (**figure13**). Le rôle de ERK dans la myogenèse est particulier car il présente une activité biphasique. ERK1/2 est phosphorylé et activé durant la phase de croissance des myoblastes, puis inhibé durant les premières étapes de la myogenèse, pour finir par être réactivé par phosphorylation durant la phase d'hypertrophie (Wu et al., 2000a). Durant la phase de prolifération, ERK1/2 réprime la différenciation en inhibant la translocation de MEF2A et C dans le noyau (Winter and Arnold, 2000). De plus, MEK1 qui est activé durant la prolifération, joue un rôle inhibiteur en étant localisé dans le noyau et en liant un complexe contenant MyoD (Perry et al., 2001). Une étude plus récente *in vivo* confirme que la translocation de ERK entre le cytoplasme et le noyau, reflète son état d'activation et contrôle les étapes de prolifération et de différenciation (Michailovici et al., 2014). L'effet inhibiteur de ERK1/2 semble être médié principalement en phase de prolifération par l'action du FGF, dont le niveau protéique du récepteur chute durant les premières étapes de la différenciation (Michailovici et al., 2014; Olwin and Hauschka, 1988; Tortorella et al., 2001). Dans un second temps, l'activité de ERK, et plus spécifiquement de ERK2 est critique pour la phase de fusion et d'hypertrophie (Gredinger et al., 1998; Li and Johnson, 2006). ERK pourrait participer à ces phénomènes en agissant sur l'activité de RSK2 (Ribosoma S6 kinase 2) qui régule positivement la fusion en activant NFAT3 (Nuclear Factor of Activated T cell 3) (Cho et al., 2007). De plus, ERK1/2 en phosphorylant p300, permet d'activer NFATc1 qui est essentiel pour induire l'expression d'une isoforme de la MHC (Meissner et al., 2011). Contrairement au rôle de ERK dans la phase initiale de prolifération des myoblastes, il est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de MyoD durant la différenciation par un mécanisme non connu (Gredinger et al., 1998). MEK1 participe aussi à la stabilisation de MyoD afin de promouvoir la différenciation (Jo et al., 2011).

Voie MAPK-p38 : Le schéma d'activation de la voie p38 est très proche de celui de la voie ERK (**figure 13**). Cette voie a été initialement décrite dans la réponse à des stress cellulaires (Freshney et al., 1994), et est essentielle à la différenciation de différents types cellulaires tels que les neurones (Morooka and Nishida, 1998). Il existe 4 isoformes de p38 dont la forme α , β , γ et δ (Cargnello and Roux, 2011). Parmi ces isoformes, la forme α est essentielle pour la différenciation des myoblastes primaires, alors que les formes α , β et γ sont

essentielles pour la différenciation des myoblastes C2C12 (Perdiguero et al., 2007; Ruiz-Bonilla et al., 2008; Wang et al., 2008). Au niveau moléculaire, les contacts cellule-cellule activent la voie p38 par la liaison de la protéine membranaire N-cadherine de part et d'autre des cellules. Ceci initie la formation d'un complexe intracellulaire comprenant la protéine Cdo, ainsi que d'autres protéines d'échafaudages telles que Bnip-2, Cdc42, et permet le recrutement de p38 (Krauss et al., 2017). D'autres facteurs sont recrutés dont Pak1/2 (P21 (RAC1) Activated Kinase 1), Tak1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1), et MKK3/6 qui activent p38 par des phosphorylations (Krauss et al., 2017). Dès lors, phospho-p38 va pouvoir déclencher la différenciation en activant des facteurs de pro-différenciation tels que MEF2C, MEF2A et MyoD (Wu et al., 2000a; Zetser et al., 1999). p38 agit également sur la sortie du cycle cellulaire en affectant l'expression de cyclines dont la cycline D (Perdiguero et al., 2007). De plus, l'activation de p38 permet de retirer la méthylation de l'histone H3 (H3K4-3me), ce qui diminue alors l'expression de Pax7 et favorise la différenciation (Jones et al., 2005; Palacios et al., 2010).

Voie MAPK-JNK : La voie JNK est activée par différents stimulus extracellulaires dont des cytokines, des pathogènes, des facteurs morphogéniques (Zeke et al., 2016). Ces signaux de stress sont transmis à des protéines appartenant à la famille des Rho GTPase (Rac, Rho, cdc42). Ceci provoque l'activation de MEKK qui à son tour active par phosphorylation MKK4 ou MKK7 (**figure13**). Cela aboutit à l'activation de JNK et de ces cibles en aval, telles que c-Jun ou AP-1 par phosphorylation (Zeke et al., 2016). Peu de données existent sur le rôle de la voie JNK dans la différenciation et sont, de plus, assez contradictoires. En effet, certains groupes font mention du rôle activateur de la voie dans laquelle AP-1 pourrait activer le promoteur de MyoD (Andreucci et al., 2002). A l'inverse, d'autres montrent que la voie JNK inhibe la myogenèse, et que son activité est diminuée par des micro-ARNs qui sont exprimés durant la phase de différenciation (Xie et al., 2018).

1.3.3.3 La voie IGF/PI3K/Akt/mTOR

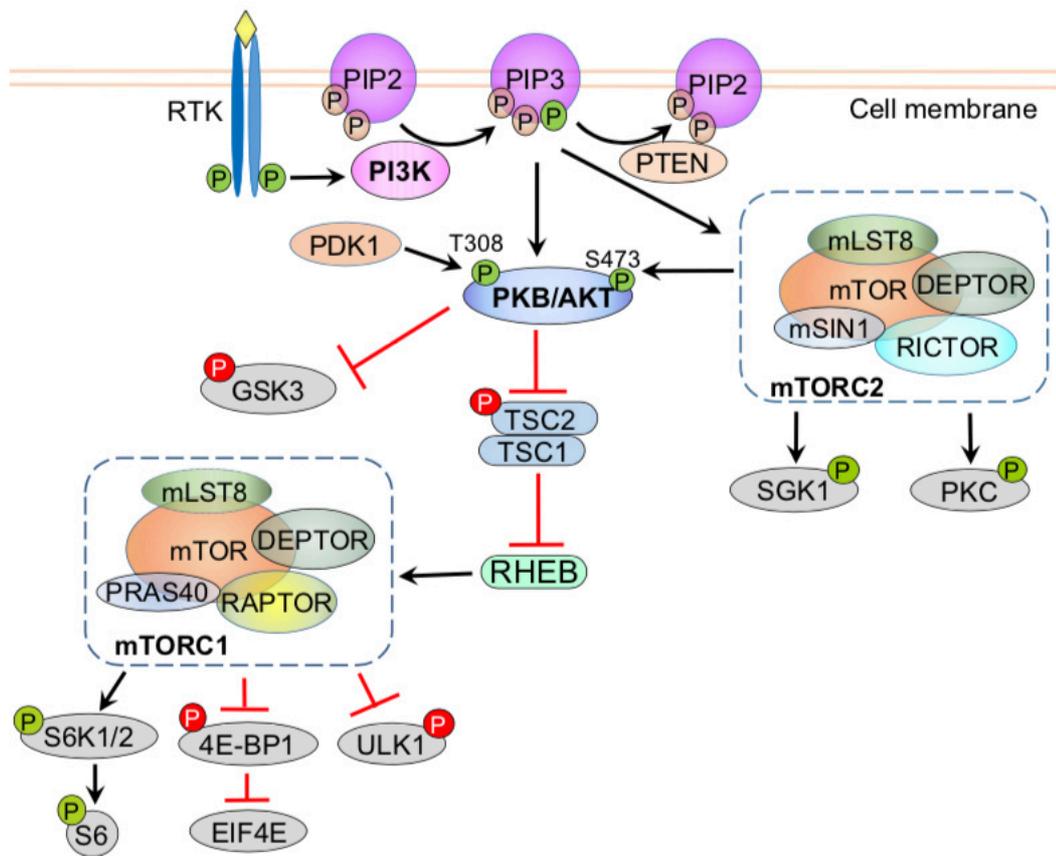


Figure 14: Représentation schématique de la voie PI3K/Akt/mTOR et de ses effecteurs principaux (Yu and Cui, 2016).

Le médiateur central de cette voie de signalisation est la protéine kinase Akt/PKB. Trois isoformes sont décrites (Akt1, 2 et 3), qui possèdent toutes un domaine PH (Pleckstrin homology) d'approximativement 120 acides aminés permettant leurs liaison à des phosphoinositides (Franke, 2008). La voie est activée par la liaison de facteurs de croissance dont l'insuline sur son récepteur (IGFR : Insulin growth factor receptor), contenant un domaine tyrosine kinase qui s'autoactive (**figure 14**). Des lors, la protéine IRS (insulin receptor substrate) est recrutée sur l'IGFR puis activée. Ceci induit le recrutement et l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), qui produit du PI(3,4)P₂ (phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) à partir de PI(4) et du PI(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) à partir de PI(4,5)P₂. La protéine Akt est alors recrutée au niveau de ces domaines riches en phosphoinositides, ainsi que la kinase PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1). PDK1 va phosphoryler Akt sur la thréonine 308, et le complexe mTORC2 (mammalian target of

rapamycin 2) phosphoryle Akt en sérine 473 (Yu and Cui, 2016). Ces deux phosphorylations sont couramment utilisées pour regarder l'état d'activation de Akt en biochimie. Akt va alors phosphoryler différentes cibles, telles que la GSK3 β (Glycogen Synthase kinase 3) ou TSC2 (Tuberous sclerosis 2) dont l'inhibition provoque l'activation de mTORC1. Différentes études montrent que l'activité de Akt est induite durant la différenciation des myoblastes *in vitro* et *in vivo* (Bodine et al., 2001; Rotwein and Wilson, 2009; Sumitani et al., 2002). L'IGF peut activer les 3 isoformes de Akt, mais seules Akt1 et Akt2 semblent essentielles pour la différenciation. Le niveau protéique de Akt1 reste constant au cours de la différenciation, mais son inhibition dans les myoblastes altère fortement les phases précoces de différenciation (Rotwein and Wilson, 2009; Sumitani et al., 2002). Le niveau protéique de Akt2 augmente progressivement durant la différenciation ainsi que son état de phosphorylation et son inhibition provoque la formation de petits myotubes, suggérant un rôle de Akt2 dans les phases tardives de la différenciation et de la fusion (Gonzalez et al., 2004a; Rotwein and Wilson, 2009). Au niveau moléculaire, Akt1 activée est capable de phosphoryler et d'inhiber p21 qui régule la prolifération (Héron-Milhavet et al., 2006). Lorsque les myoblastes sont à confluence, p38 est capable d'augmenter la transcription de Akt2 (Gonzalez et al., 2004b). Ainsi, quand Akt2 devient activé, il provoque la sortie du cycle cellulaire (Gherzi et al., 2010) et agit positivement sur l'activité transcriptionnelle de MEF2 et participe à la différenciation, notamment des cardiomyocytes (Chen et al., 2017; Tamir and Bengal, 2000). Une cible importante de Akt et la protéine kinase GSK3 β qui est alors dégradée lorsqu'elle est phosphorylé en ser9/21, ce qui permet la stabilisation de la protéine β -caténine et NFATC3 qui participent toutes les deux à la différenciation et à la fusion (van der Velden et al., 2008, 2006).

Une des cibles les plus étudiées de Akt dans le muscle est mTOR, dont l'activité est induite principalement durant la phase de différenciation et d'hypertrophie (Ge and Chen, 2012). Brièvement, il existe deux complexes : mTORC1 et mTORC2 qui diffèrent par leurs sous-unités régulatrices ainsi que par leurs sensibilités à la rapamycine, qui affecte uniquement mTORC1 en l'inhibant. La protéine mTOR est considérée comme la sous-unité catalytique de ces complexes (Laplanche and Sabatini, 2009). Concernant la myogenèse, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine bloque la différenciation des myoblastes (Conejo et al., 2001; Erbay and Chen, 2001). L'activité kinase de mTOR n'est pas nécessaire pour les premières étapes de fusion des myoblastes mais est essentielle pour les étapes tardives dont

l'hypertrophie. Ces résultats se confirment *in vitro* et *in vivo* (Ge et al., 2009; Park and Chen, 2005). De plus, mTORC1, de manière kinase indépendante, joue un rôle essentiel dans l'expression de l'IGF2 en inhibant l'expression d'un micro-ARN ciblant l'ARNm de l'IGF2 (Erbay et al., 2003; Ge et al., 2011a). L'IGF2 est capable d'agir de manière autocrine sur la voie PI3K/Akt et permet la différenciation (Erbay et al., 2003). Un rétrocontrôle négatif existe où mTORC1 est capable de déstabiliser la protéine IRS1 et, par conséquent, d'inhiber la signalisation PI3K/Akt (Ge et al., 2011b). En parallèle, l'activation de Akt par mTORC2 (phosphorylation sur la sérine 473) agit de manière positive dans la myogenèse (Sarbasov et al., 2005; Shu and Houghton, 2009). La perte de l'activité kinase de mTOR, dans les muscles de souris génétiquement invalidées induit l'apparition d'une myopathie sévère et précoce avec un défaut de croissance de l'animal, des petits muscles, et des altérations métaboliques plus marquées que celles observées chez les souris invalidées pour mTOR ; ceci souligne l'importance de l'activité kinase de mTOR dans l'homéostasie du muscle (Zhang et al., 2019).

1.3.3.4 La voie canonique Wnt

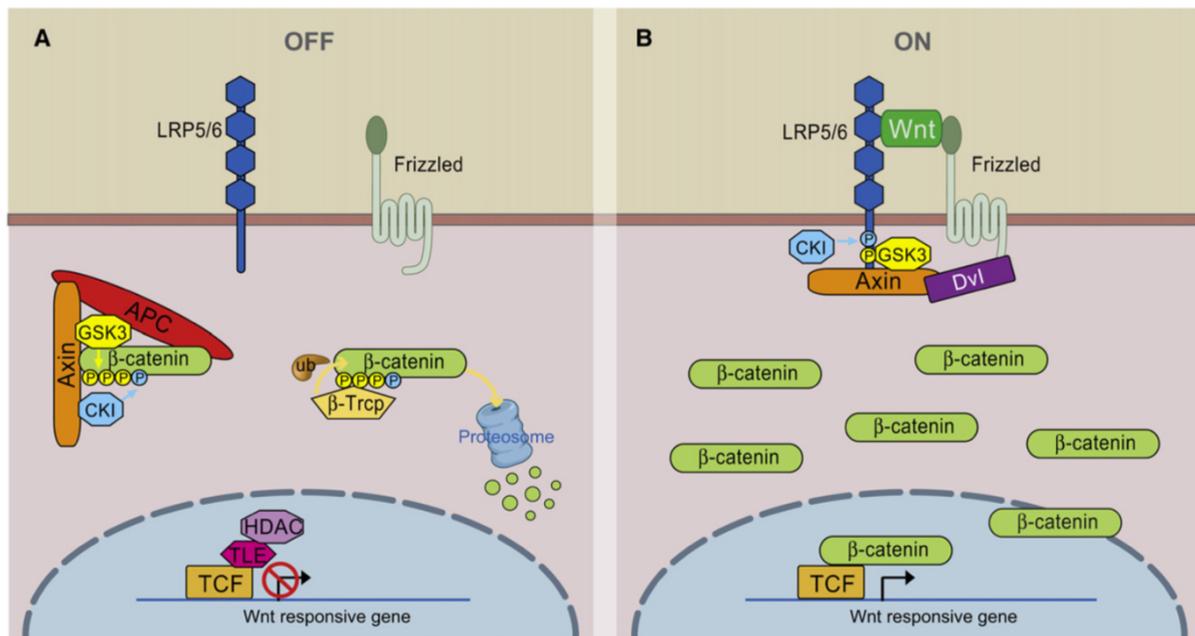


Figure 15: Schéma d'activation de la voie canonique Wnt/ β -caténine.

(A) En absence de ligand Wnt, la β -caténine cytoplasmique se retrouve au niveau d'un complexe formé par l'Axin, APC, GSK3 et CK1. La β -caténine qui est phosphorylée par CK1 et GSK3 est alors reconnue par l'ubiquitine ligase E3 β -Trcp, qui l'ubiquitine et provoque sa dégradation par le protéasome. (B) En présence de Wnt, un complexe se forme entre Frizzled (Fzd) et LRP5/6. Fz recrute Dvl qui induit la phosphorylation de LRP5/6 et le recrutement de

l'Axin. Ceci empêche l'association de l'Axin avec la β -caténine et inhibe sa phosphorylation, permettant son accumulation dans le cytoplasme et dans le noyau (MacDonald et al., 2009).

Les protéines Wnt font parties d'une famille de facteurs de croissance sécrétés et sont impliqués pendant l'embryogenèse, la réparation tissulaire ou dans certaines pathologies comme le cancer. Elles activent la voie de signalisation Wnt dans les cellules cibles en impliquant ou non la β -Caténine (voie canonique ou non canonique), et participent ainsi à la formation embryonnaire du muscle et à la myogenèse dans le muscle adulte (Girardi and Le Grand, 2018). La voie canonique est activée par la liaison du ligand Wnt à un récepteur appartenant à la famille des Fzd (Frizzled) et au corécepteur LRP5/7 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) (**Figure 15**). Par la suite, l'Axin est recrutée sur la partie phosphorylée de LRP5/6 par la protéine d'échafaudage Dvl (Dischevelled). Ceci induit la déstabilisation du complexe de destruction qui en absence de Wnt phosphoryle la β -caténine, provoquant sa ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Le complexe de destruction est composé de l'Axin, de APC (Adenomatous Polyposis Coli), de la CKI (Casein Kinase I) et de la GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β). Ainsi, la relocalisation de l'Axin permet à la β -caténine de s'accumuler dans le cytoplasme, puis dans le noyau où elle s'associe avec des facteurs de transcription TCF et LEF pour activer la transcription de gènes cibles (MacDonald et al., 2009). La voie Wnt est active durant le développement du muscle ainsi que durant les phases de régénération du muscle adulte. Pour ce dernier, après une blessure, plusieurs molécules Wnt, telles que Wnt3a ou Wnt7a, sont exprimées et sécrétés, par différentes sources dont principalement les myofibres et les cellules satellites activées (Brack et al., 2008a; Rudolf et al., 2016). Un changement important a lieu entre la voie de signalisation Notch vers la voie Wnt/ β -caténine, permettant aux cellules satellites en prolifération de se différencier (Brack et al., 2008b). Au niveau moléculaire, la voie Wnt par l'action de la β -caténine, est capable de réguler l'activité et l'expression de MRF dont MyoD et la Myogénine durant la différenciation (Kim et al., 2008; Ridgeway et al., 2000). L'activation de la voie Wnt inhibe aussi l'expression de Pax7 (Hulin et al., 2016). De plus, il existe des interrelations entre les différentes voies car Wnt7 est capable d'activer la voie Akt/mTOR indépendamment de l'IGFR et d'induire l'hypertrophie des myotubes et des myofibres (von Maltzahn et al., 2011).

1.3.3.5 La voie du TGF β

La famille du TGF β est constituée d'une trentaine de membres séparés en deux grandes sous-familles dont celle du TGF β (Transforming growth factor beta) et celle des BMP (Bone Morphogenetic Protein). Dans la sous-famille du TGF β , on trouve différentes isoformes dont le TGF β 1, 2 et 3, les Activines ou encore la Myostatine qui sont des facteurs essentiels dans la régulation de la myogenèse embryonnaire ou adulte. Ces facteurs vont se lier à des récepteurs kinases au TGF β (TGF β R) de type I ou II, qui ont pour cible les protéines Smads. Il existe huit protéines Smad chez les mammifères, dont cinq d'entre elles ont une fonction d'effecteur (Smad1, 2, 3, 5 et 8) que l'on nomme R-Smads (Receptor-regulated Smads), tandis que les protéines Smad 6 et 7 ont une fonction inhibitrice et se nomment les I-Smads (Inhibitory Smads). Smad4, lui, est appelé Co-Smad (Common Smad). Ainsi, les protéines Smad une fois activées sont capables d'activer des gènes cibles (Massagué, 2012). Parmi les membres de la famille du TGF β , la Myostatine fait partie des inhibiteurs les plus forts de la croissance musculaire ainsi que de la prolifération et de la différenciation des myoblastes (Langley et al., 2002; McPherron et al., 1997). De plus, l'ajout de TGF β 1 exogène à des myoblastes prévient la différenciation (Cusella-De Angelis et al., 1994). Globalement, la voie du TGF β est considérée comme étant inhibitrice de la différenciation. De façon intéressante, il existe un lien étroit entre la voie Wnt et la voie du TGF β permettant de moduler la myogenèse. Dans la lignée cellulaire C2C12, il a été montré que Wnt4 pouvait avoir un effet antagoniste sur l'action de la Myostatine, induisant alors la prolifération et la différenciation des cellules (Takata et al., 2000). Plus récemment, des études montrent que la voie Wnt/ β -caténine stimule l'expression de la Follistatine, qui en se liant à la Myostatine du côté extracellulaire est antagoniste au TGF β R, et régule positivement la différenciation (Han et al., 2014; Jones et al., 2015).

Pour conclure sur les voies de signalisations, nous avons vu qu'elles sont multiples à réguler le processus de différenciation et qu'il existe des interactions complexes entre elles permettant une régulation fine de la myogenèse embryonnaire et adulte. L'atténuation de la signalisation de ces voies est essentiel au contrôle de la myogenèse et s'opère notamment par l'endocytose des récepteurs membranaires. La voie de l'endocytose ainsi que les mécanismes mis en jeu pour atténuer les voies de signalisation va être détaillé dans le chapitre suivant.

2 Les voies endosomales

2.1 Introduction générale à l'endocytose

La membrane plasmique des cellules est une structure dynamique qui est en perpétuel remodelage, permettant de dégrader ou de recycler les composants lipidiques et protéiques qui la composent. De plus, cette membrane est capable de se déformer afin de récupérer différents composants dans l'espace extracellulaire. Ces différents processus sont associés à un mécanisme que l'on nomme endocytose (**figure 16**). L'endocytose assure, par exemple l'entrée de nutriment dans la cellule et de molécules effectrices, elle peut être empruntée par certains pathogènes (virus, bactéries), et permet l'internalisation des récepteurs membranaires après leur activation. Les molécules qui sont internalisées à la membrane vont être transférées vers un ensemble hétérogène de vésicules qui sont les compartiments endosomaux. A ce niveau, certains composants vont être recyclés au niveau de la membrane plasmique, telle que le récepteur à la transferrine (Harding et al., 1983), et d'autres, vont être dégradés par les lysosomes dont le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Dunn et al., 1986). Le recyclage et la dégradation participent à la régulation des voies de signalisation qui se trouve en aval de ces récepteurs et influencent directement différents processus cellulaires telles que la division, la migration ou bien la myogenèse (Doherty and McMahon, 2009a; Kim et al., 2015). De ce fait, la dérégulation de ces voies causée par des mutations dans des protéines clés de l'endocytose conduit à différentes pathologies telles que des maladies neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington, et mènent aussi dans certains cas à des pathologies musculaires comme les cavéolinopathies (Gazzerro et al., 2010; Maxfield, 2014).

Cette partie du manuscrit présentera les acteurs impliqués dans le mécanisme d'endocytose et décrira leurs fonctions ainsi que leurs implications potentielles dans la myogenèse. Il sera aussi détaillé le rôle que joue les endosomes dans la régulation des voies de signalisation.

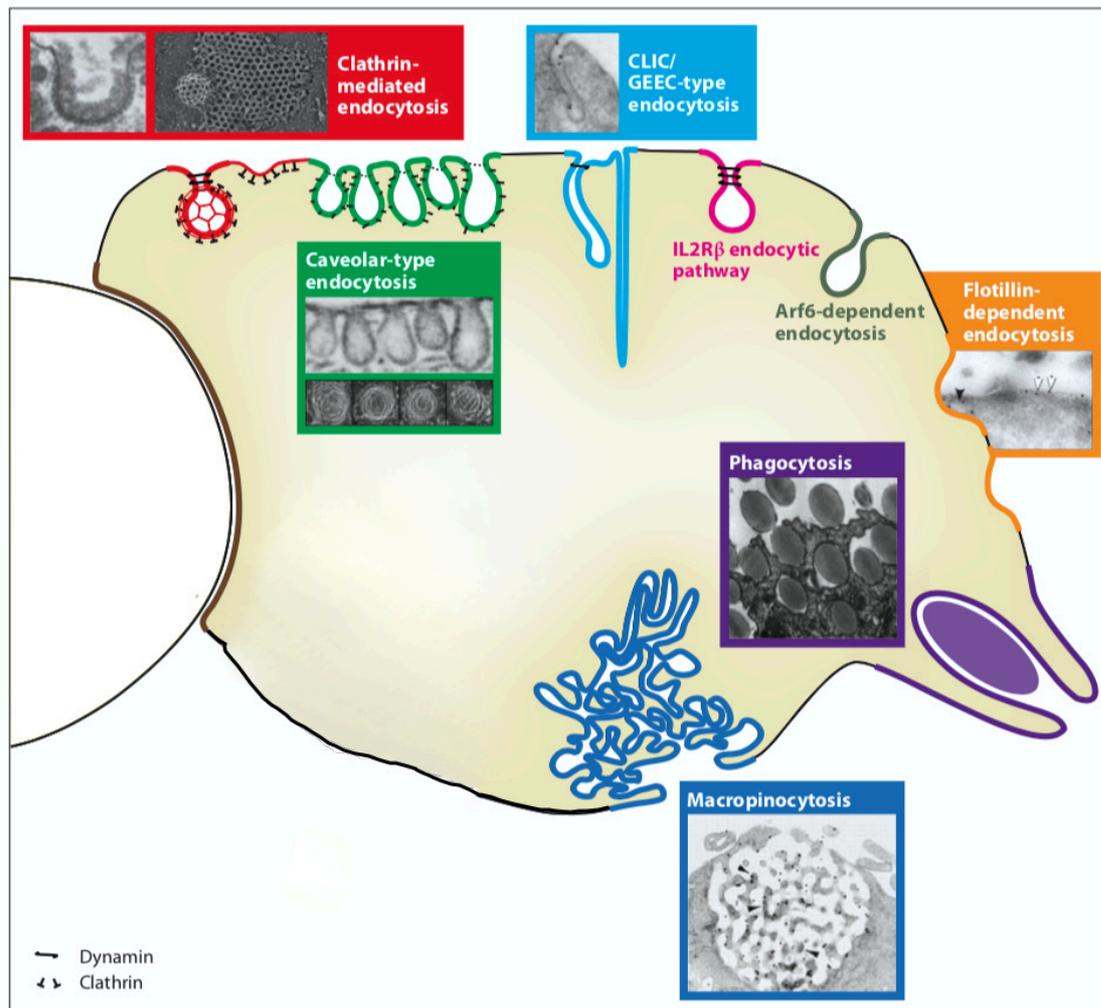


Figure 16: Vue globale des différentes voies d'endocytose.

Représentation schématique illustrée par des images de microscopie électronique des principales voies d'endocytoses. (Modifié à partir de (Doherty and McMahon, 2009a))

2.2 Mécanismes d'endocytose

2.2.1 Endocytose dépendant des clathrines (CME)

L'endocytose médiée par la clathrine (CME) est de loin le mécanisme le mieux étudié et décrit dans la voie d'endocytose. La CME est une voie d'endocytose empruntée par beaucoup de récepteurs transmembranaires ou cargos protéiques tels que l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) ou la TfR (Transferrin Receptor). Elle débute par la formation d'une

vésicule recouverte par un manteau protéique de clathrine au niveau de la membrane plasmique (**figure17 A, B**). La clathrine est composée de six chaînes polypeptidiques (trois lourdes et trois légères) assemblées en une structure à trois branches appelée triskèle, qui s'auto-assemble pour former une cage autour de la vésicule (**Figure 17 C**) (Kaksonen and Roux, 2018). En plus de la clathrine, le manteau est composé d'autres protéines incluant des adaptateurs telles que AP2, β -Arrestine, et de protéines d'échafaudage, comme EPS15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15). Les protéines d'échafaudage interagissent avec les adaptateurs et entre elles pour regrouper les composants du manteau, au niveau duquel un réseau de filaments d'actine se polymérise pour permettre l'endocytose (Kelly et al., 2014; Ma et al., 2016) A ce niveau, des protéines régulatrices incluant les protéines de la famille WASP (Wiskott Aldrich syndrome protein) permettent le recrutement et l'activation du complexe ARP2/3, qui va jouer sur la polymérisation de l'actine et l'activation de moteurs moléculaires (Taylor et al., 2011). La phase de constriction et de scission du cou de la vésicule est orchestrée par les protéines à domaine BAR (Bin, Amphiphysin et Rvs) comme les Endophilines et Amphiphysines qui coopèrent avec la Dynamine pour déclencher la scission de la vésicule (Kaksonen and Roux, 2018). Dernièrement, il a été décrit que des protéines qui ne font pas partie du manteau, telle que la protéine chaperonne HSC70 (Heat shock cognate), et la déphosphorylation du PI(4,5)P2 d'autre part, participaient à la dissociation de la machinerie d'endocytose (Kaksonen and Roux, 2018).

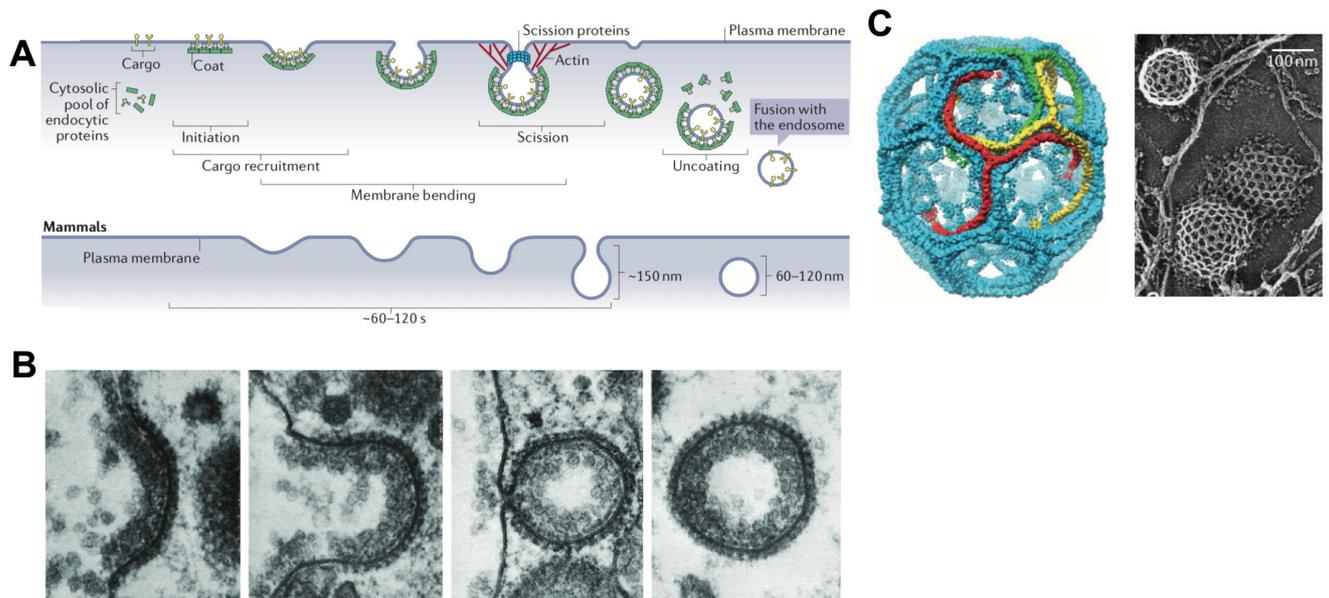


Figure 17: Formation et structure des vésicules recouvertes de Clathrine.

(A) Les protéines qui conduisent à la CME dont la Clathrine, sont assemblées séquentiellement au niveau des cargos à endocyter. La membrane va être déformée, invaginée, puis former une vésicule d'endocytose après scission du col de la vésicule. (B) Les différentes étapes représentées schématiquement en A sont observées en microscopie électronique à transmission. Les zones denses correspondent aux manteaux de Clathrine sur la partie de membrane invaginée puis sur la vésicule d'endocytose (adapté de (Perry and Gilbert, 1979)). (C) Structure de la cage de Clathrine sur une vésicule d'endocytose où l'on peut observer schématiquement les triskèles assemblés ainsi que leur structure en microscopie électronique à transmission au niveau de la membrane plasmique (adapté de (Kaksonen and Roux, 2018))

Outre sa fonction essentielle dans l'endocytose, la Clathrine possède une seconde fonction dans le muscle, où elle forme des structures denses au niveau de la membrane plasmique des myotubes qui permettent le maintien des sarcomères (Vassilopoulos et al., 2014). Elle est associée à ce niveau avec l' α -Actinine 2, qui est une protéine d'adhésion focale sarcomérique, et avec les filaments d'actines (Vassilopoulos et al., 2014). L'absence de la Clathrine perturbe l'organisation sarcomérique de l' α -Actinine 2 et de l'Actine dans les myotubes, et provoque aussi un détachement des fibres musculaires entre elles *in vivo*, qui est associé à une perte de la force de contraction chez la souris (Vassilopoulos et al., 2014). D'autre part, l'inhibition de l'expression de la Clathrine dans les myoblastes perturbe fortement la formation des myotubes (Shin et al., 2014). Certains partenaires protéiques de la Clathrine jouent aussi une fonction dans la myogenèse, dont l'adaptateur de la Clathrine

GGA1 (ARF binding protein 1) (Isobe et al., 2018). Son absence impacte fortement la formation des myotubes en perturbant la dégradation de l'IGFR et la voie de signalisation PI3K/AKT (Isobe et al., 2018). L'ensemble de ces données pointe du doigt le rôle essentiel que joue la Clathrine avec ses partenaires dans la différenciation des myoblastes ainsi que son rôle structural dans le maintien de l'intégrité des sarcomères des myotubes et des fibres musculaires.

2.2.2 Endocytose indépendant de la clathrine (CIE)

Des observations en microscopie électronique, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques affectant la CME montrent que certaines vésicules d'endocytoses ne sont pas recouvertes de Clathrine, démontrant que des mécanismes indépendants de celle-ci sont mis en œuvre (Huet et al., 1980).

a) Phagocytose et macropinocytose.

A grande échelle, la cellule peut internaliser du matériel extracellulaire aboutissant à des structures de plusieurs microns de diamètre. Parmi elles, la phagocytose est utilisée par les macrophages et permet l'internalisation de grosses molécules, cellules ou de bactéries dans des vésicules appelées phagosomes. La macropinocytose qui est dépendante du cholestérol repose sur la formation de protrusions membranaires qui se referment en fusionnant et permettent l'internalisation d'un grand volume de matériel (Doherty and McMahon, 2009b).

b) Endocytose impliquant les cavéoles

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique présentant une forme ovoïde et une taille caractéristique de 60 à 90 nm. Ces invagination ont lieu au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol (rafts) et impliquent différentes protéines telles que la cavéoline et les cavines dont la cavine 1 (Hill et al., 2008). Indépendamment de l'endocytose, les cavéoles jouent un rôle de senseurs mécaniques et participent au maintien de l'intégrité de la membrane plasmique lors de stress mécaniques (Sinha et al., 2011). Cette fonction est particulièrement importante dans le muscle car les cavéolines participent à sa

structure, avec notamment la cavéoline-3 qui est spécifique des muscles squelettiques et des muscles lisses (Gazzerro et al., 2010). Les mutations de la cavéoline-3 conduisent à une myopathie caractérisée par une altération de l'intégrité de la membrane plasmique, une réponse anormale au stress mécanique, et une hyper-activation de la voie de signalisation IL6/STAT3 (Dewulf et al., 2019).

c) Endocytose impliquant la flotilline

Les vésicules d'endocytose impliquant la flotilline sont morphologiquement proches des cavéoles. Il existe deux isoformes de la flotilline (Flotilline 1 et 2) qui s'insèrent dans des domaines membranaires riches en cholestérol et permettent l'invagination de la membrane plasmique (Meister and Tikkanen, 2014). Cependant, la formation de ces vésicules donne rarement lieu à des événements d'endocytose et aurait plus un rôle dans la concentration de cargos en vue de leur endocytose par CME. C'est notamment le cas pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Schneider et al., 2008). Dans la myogenèse, la flotilline-2 a une distribution vésiculaire dans les myoblastes et les myotubes (Ana C. B. Possidonio et al., 2014). De plus, elle semble être impliquée dans le processus de fusion des myoblastes car sa déplétion par la Brefeldin A inhibe fortement la formation des myotubes (Ana Claudia Batista Possidonio et al., 2014).

d) Endocytose impliquant la voie CLIC/GEEC

La voie CLIC (Clathrin-Independent Carrier) est caractérisée par des protrusions membranaires en forme de tubules et non en forme de vésicules. Les cargos internalisés par cette voie CLIC se retrouvent dans un compartiment distinct appelé GEEC (GPI Enriched Early Compartment). Elle joue un rôle dans l'endocytose de protéines à ancre GPI (Mayor et al., 2014).

e) Endocytose impliquant Arf6

Les protéines de la famille Arf, qui lient le GTP, dont la protéine Arf6 (ADP ribosylation factor 6) participent à différentes étapes du trafic d'endocytose dont la CME, en favorisant la production de phospholipides. Arf6 joue un rôle prépondérant dans la CME en activant notamment la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (Grant and Donaldson, 2009a). D'autre part, l'endocytose de différentes protéines de surface, dont des transporteurs de

nutriments comme Glut1, des protéines qui ont une fonction immunitaire (MHC classe I) ou des protéines d'adhésions comme CD157 (Basigin), vont dépendre de Arf6 (Millar et al., 1999; Montealegre et al., 2019; Qi et al., 2019). La protéine Arf6 est essentielle à la myogenèse car elle participe au processus de fusion des myoblastes en activant la phospholipase D et l'expression d'un dominant négatif de Arf6 qui perturbe le processus de fusion (Bach et al., 2010; Chen et al., 2003). De plus, la protéine Arf6 est associée au niveau des points de fusion des myoblastes avec des protéines de la machinerie de fusion comme la M-cadhérine, Trio et Rac1 (Bach et al., 2010).

2.3 Les compartiments endosomaux

Les protéines membranaires ou cargos protéiques internalisés dans une vésicule d'endocytose vont rejoindre un système endomembranaire très dynamique séparé en différents compartiments appelés endosomes. Ces structures vont faire office de plateforme afin de trier le matériel internalisé qui pourra alors être, soit recyclé à la membrane plasmique, soit dégradé par la voie endo-lysosomale, ou bien libéré dans le milieu extracellulaire sous forme de vésicules extracellulaires (Grant and Donaldson, 2009a; Huotari and Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Les voies endosomales sont notamment caractérisées par la présence de lipides et de protéines de la famille Rab (Ras related protein) qui sont de petites GTP-ase monomériques, dont environ 70 ont été caractérisées (Stenmark, 2009).

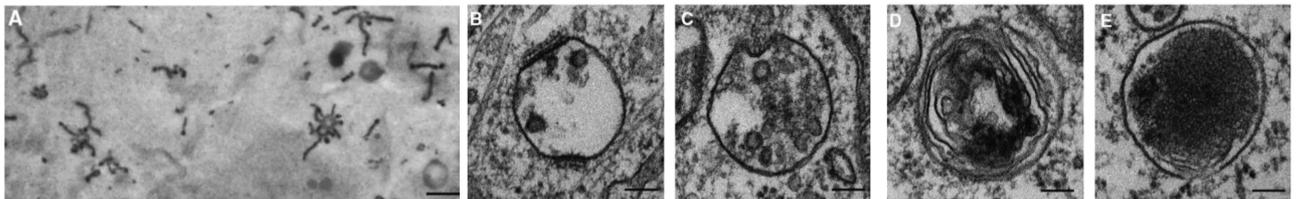
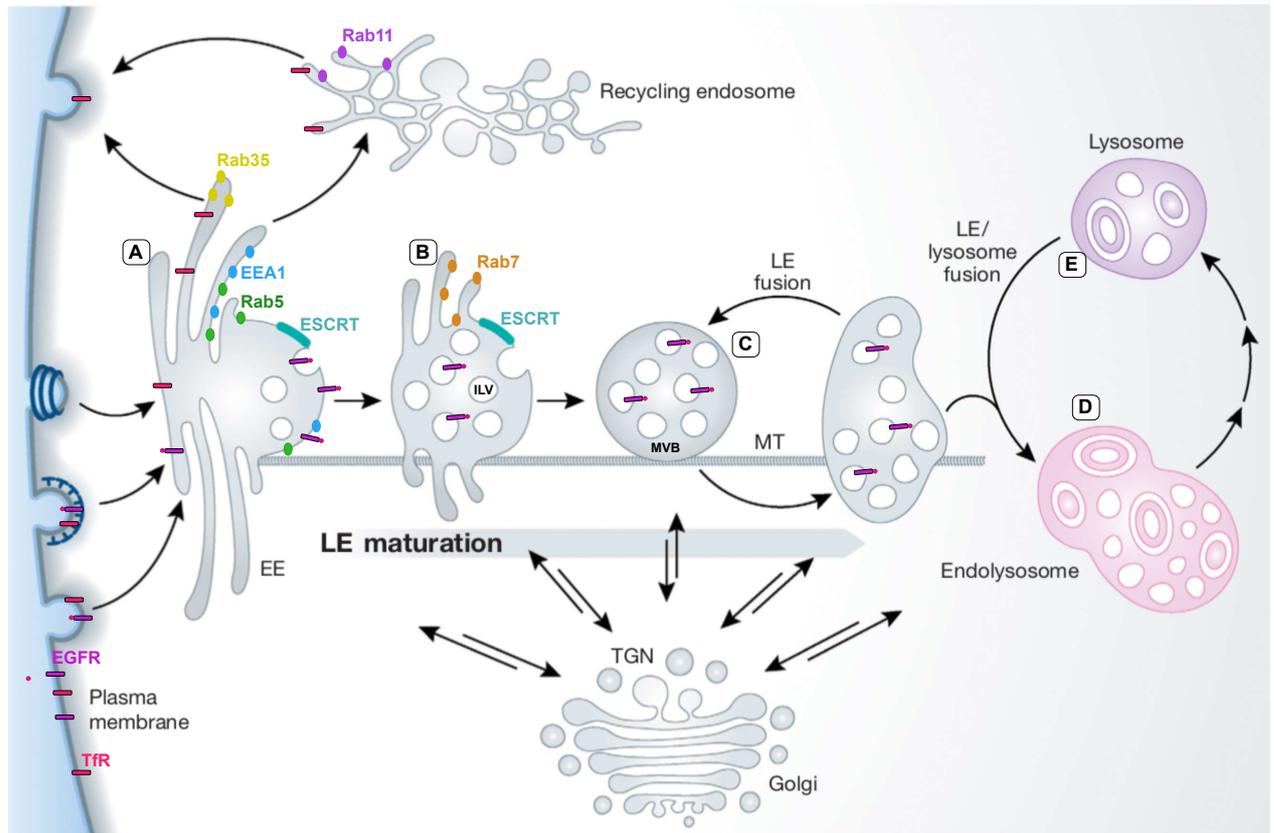


Figure 18: Schéma représentant le système endo-lysosomal

(A) Les vésicules d'endocytose issue de la membrane plasmique par CME ou CIE vont livrer leurs contenus à l'endosome précoce (Early Endosome : EE) caractérisé par la présence des protéines Rab5 et EEA1. Les protéines membranaires peuvent alors être recyclées à la membrane plasmique, en passant par l'endosome de recyclage contenant la protéine Rab11 ou bien être dégradées. L'image en ME montre la présence de structures tubulaires près de la membrane plasmique. (B) La maturation de l'EE en endosome tardif (Late endosome : LE) se fait progressivement et est accompagnée de changements protéiques et structuraux, dont l'enrichissement de la protéine Rab7, et d'un changement de sa composition lipidique, ainsi que de l'intervention de protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) formant progressivement les vésicules intraluminales (ILVs pour Intraluminal vesicles). L'image en ME montre une ILV en cours de formation ainsi que la présence de quelques ILV dans le LE qui vont s'accumuler. (C) le LE devient progressivement un corps multi-vésiculaire (Multi-vesicular body : MVB) au fur et mesure de la formation des ILV. Le MVB est délocalisé vers l'espace périnucléaire et caractérisé par la présence de multiple ILV. (D) le MVB et le lysosome vont fusionner pour donner une structure hybride, l'endo-lysosome, ou bien le contenu va être dégradé. L'image en ME montre la présence de structures denses

correspondant aux protéases du lysosome. (E) Structure d'un lysosome caractérisé par sa structure dense reflétant un contenu riche en protéines (hydrolases). Barre d'échelle : 500nm pour l'image A et 100 nm pour B-E (Modifié à partir de (Huotari and Helenius, 2011).

2.3.1 La voie endosomale précoce

L'endosome précoce (Early Endosome : EE) est l'organelle qui reçoit les vésicules issues de CIE ou de CME (**Figure 18**). Il est proche de la membrane plasmique, de forme tubulaire, et son milieu intraluminal a un pH légèrement acide, proche de 6,5 (Grant and Donaldson, 2009). De plus, il contient en son sein certaines protéines et lipides qui participent à son fonctionnement.

L'EE est caractérisé par la présence de la protéine Rab5, qui est capable de recruter des effecteurs protéiques afin de contrôler la fusion, la mobilité et la maturation de l'EE (Zerial and McBride, 2001). Notamment, Rab5 interagit directement avec la protéine EEA1 (Early Endocytotic antigen), qui est un marqueur des EE, et qui est impliquée dans la fusion des vésicules d'endocytose avec l'EE (Stenmark, 2009). Il est à noter que la mutation Q79L dans le domaine GTPase de Rab5 induit la formation d'un EE géant ; couramment utilisé afin d'étudier plus précisément la localisation de certaines protéines au sein de l'EE (Barbieri et al., 1996).

La présence de certains lipides au niveau de sa membrane dont le PI3P (Phosphatidil Inositol-3-Phosphate) caractérise également l'EE . L'association de VPS34 (Vacuolar Protein Sorting), qui est une phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de classe III, avec Rab5 entraîne la production de PI3P et permet de réguler la structure de la membrane des EE, la fusion des vésicules d'endocytose et le tri des récepteurs à la membrane et la mobilité de l'EE (Gruenberg, 2003; Petiot et al., 2003). Le PI3P permet aussi le recrutement de facteurs protéiques qui portent un domaine FYVE dont EEA1 (Lawe et al., 2000), ou encore l'ESCRT-0 HRS (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-0/Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) (Raiborg et al., 2001b).

Des extensions tubulaires de l'EE sont capables de bourgeonner et de former des vésicules de recyclage impliquant les protéines Rab4 et Rab35. En parallèle, d'autres domaines de l'EE vont se spécialiser en compartiments de recyclage impliquant notamment Rab11

(Grant and Donaldson, 2009b). Un des exemples le plus étudiés illustrant ce mécanisme est celui du TfR (transferrin receptor) qui est endocyté après liaison de la transferrine et qui rejoint rapidement les voies de recyclage afin de retourner à la membrane plasmique dépourvue de transferrine (Sheff et al., 2002).

Il existe aussi une communication entre l'EE et le réseau trans-golgien (TGN) qui se fait de manière bidirectionnelle et fait appel aux protéines du complexe rétromère telle que les SNX (Sorting Nexin) ou encore Rab9 (Johannes and Popoff, 2008). De nombreuses protéines peuvent emprunter cette voie comme par exemple le transporteur de glucose GLUT4 qui est ré-empaqueté au niveau de l'appareil de golgi dans des vésicules destinées à la membrane plasmique (Shewan et al., 2003). Dans le sens inverse, cela permet d'apporter des hydrolases dans les EE et de débiter le processus de dégradation dans les endosomes tardifs (Bonifacino and Rojas, 2006).

Différents exemples de la littérature soulignent l'importance des protéines Rab dans la régulation du processus de myogenèse. Récemment, il a été découvert que Rab5 participe activement à la myogenèse dans un modèle *in vivo* et *in vitro* (Cong et al., 2020). L'absence de Rab5 affecte l'association de la protéine IRS1 avec l'IGFR, et diminue l'activation de la voie AKT/mTOR, suggérant un rôle de Rab5 dans la régulation de voie de signalisation essentiel à la myogenèse (Cong et al., 2020). D'autres articles ont montré que Rab11 jouait un rôle dans la myogenèse des muscles des ailes de drosophile. L'expression d'un dominant négatif de Rab11 ou l'inhibition de son expression perturbe la fusion des myoblastes (Bhuin and Roy, 2009; Singh and Kumar Roy, 2013). Il existe donc un lien étroit entre les protéines Rab qui régulent la voie endosomale et le processus de myogenèse, mais d'autres études sont encore nécessaires afin de mieux comprendre leur implication dans ce processus (Kim et al., 2015).

2.3.2 La voie endosomale tardive

La maturation de l'EE en endosome tardif (Late endosome : LE) est un mécanisme dynamique qui apparaît plutôt comme un processus continu que séquentiel (**Figure 18**). Le pH intra-luminal va progressivement diminuer pour atteindre une valeur comprise entre 6 et 4,9.

De plus, les LE vont être relocalisés en région péri-nucléaire. Un changement protéique majeur est opéré dont un remodelage des protéines Rab avec Rab5 qui est remplacé par Rab7 (Poteryaev et al., 2010; Rink et al., 2005; Vonderheit and Helenius, 2005). Ces changements vont permettre aux LEs de fusionner uniquement entre eux, ou bien avec des lysosomes et les autophagosomes (Huotari and Helenius, 2011). Il existe aussi un changement lipidique. Alors que le PI3P est principalement trouvé au niveau des EE, le PI3,5P2 qui est généré par la PIKfyve (phosphatidylinositol 3-phosphate 5 kinase) à partir de PI3P, est caractéristique des LE (Ikonomov et al., 2001; Rusten et al., 2006). La protéine PIKfyve est recrutée grâce à son domaine FYVE liant le PI3P. Son inhibition par la drogue apilimode conduit à la formation de vacuoles géantes dans le cytoplasme des cellules, inhibe la fusion des LE avec les lysosomes et provoque la sécrétion du contenu de ces vacuoles dans le milieu extracellulaire (Hessvik et al., 2016).

L'un des processus les plus importants dans la biogenèse des LEs est la formation des vésicules intra-luminales (ILV). Ces vésicules dont les tailles sont comprises entre 30 et 100 nanomètres vont donner le nom de corps multivésiculaire (Multi-vesicular body : MVB) au LE. La formation des ILVs est une voie de tri des cargos protéiques à dégrader et participe à l'inactivation des récepteurs membranaires en les privant de leurs cibles cytosoliques (Scott et al., 2014). De plus, les protéines membranaires et les lipides dans ces structures sont facilement accessibles aux hydrolases acides apportées par les lysosomes lors de leur fusion avec les LEs. Les principaux acteurs de la formation des ILVs sont les protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal sorting complexe required for transport) dont la composition protéique et le mode d'action seront précisément décrits dans le chapitre suivant. Brièvement, les protéines ESCRT vont agir séquentiellement afin d'invaginer la membrane des EEs/LEs pour former une vésicule inverse (intra-luminale) qui va bourgeonner dans le lumen du LE et donner naissance à une ILV (Henne et al., 2011).

L'inhibition de l'expression des protéines de la machinerie ESCRT provoque une réduction des ILV formés dans les MVB mais pas leur abolition, suggérant que d'autres mécanismes existent pour générer des ILV (Stuffers et al., 2009). Parmi les processus ESCRT-indépendant, les protéines tétraspanines dont la protéine CD63 jouent un rôle important. La protéine CD63 est localisée préférentiellement au niveau du LE et du lysosome, et permet la

formation des mélanosomes dans les mélanocytes (van Niel et al., 2011). De plus, la taille des MVB ainsi que des ILV est variable selon qu'elles sont générées de manière ESCRT-dépendant ou via les tétraspanines comme CD63 (Edgar et al., 2014). L'inhibition protéique de l'ESCRT-0 HRS diminue la formation d'ILV de grande taille et riche en EGFR, alors que les ILV formés par CD63 sont plus petits. Ainsi, les auteurs suggèrent que la stimulation des cellules avec l'EGF favorise la formation d'ILV de manière ESCRT-dépendant, mettant en avant le fait que la formation des ILV est fortement dépendante du type de cargo à internaliser (Edgar et al., 2014).

D'autres processus sont impliqués dans la formation des ILVs de manière ESCRT indépendante et font appel aux lipides BMP/LBPA (bis(monoacylglycero)phosphate)/(acide lysobisphosphatidique) et aux céramides. Le BMP est un phospholipide enrichi dans les LE, capable de spontanément former des vésicules dans des liposomes *in vitro* (Matsuo et al., 2004). D'autre part, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le BMP bloque la formation des ILV et désorganise les MVB (Kobayashi et al., 1998). Le BMP interagit aussi directement avec la protéine Alix, et avec la machinerie ESCRT pour jouer un rôle direct dans la formation des ILV (Matsuo et al., 2004; Scott et al., 2014). Les céramides, qui sont des sphingolipides (association de sphingosine avec un acide gras), participent à la formation des ILV (Trajkovic et al., 2008). En effet, l'inhibition de la nSMase (sphingomyelinase) par la drogue GW4869 diminue la formation d'ILV, reflétée par une diminution de la sécrétion d'une classe de vésicules extracellulaires que sont les exosomes (Chairoungdua et al., 2010; Kosaka et al., 2010). De plus, l'inhibition de la synthèse des céramides a un impact sur certaines voies de signalisation telle que la dégradation de protéines de la voie Wnt chez la drosophile (Pepperl et al., 2013). En résumé, les lipides jouent donc un rôle important dans la formation des ILVs, qui sont de ce fait enrichis en cholestérol, sphingolipides, PI3P et BMP. D'autre part, ces lipides sont importants pour le processus de myogenèse ; par exemple l'inhibition de la sphingomyelinase par la drogue GW4869 perturbe l'entrée dans le cycle cellulaire et possiblement le processus de différenciation (Nagata et al., 2006). Par ailleurs, les céramides seraient plutôt inhibiteurs de la différenciation (Mebarek et al., 2007), tout comme le cholestérol car son retrait des membranes par la drogue méthyl- β -cyclodextrine favoriserait la différenciation (Mermelstein et al., 2005).

La voie endosomale est donc constituée de plusieurs compartiments qui subissent des remodelages protéiques et lipidiques dynamiques, associés à une acidification progressive de l'espace intra-luminal afin de préparer la dégradation des cargos protéiques qui y résident. La dégradation de ces cargos, telle que les récepteurs membranaires, participe activement à la diminution des voies de signalisation associées et joue un rôle clé dans la régulation de différents processus.

2.3.3 Devenir des endosomes tardifs

Le MVB peut avoir trois destinations possibles dont la dégradation par fusion avec les lysosomes ou par la machinerie autophagique, le stockage temporaire, ou bien la sécrétion de son contenu dans le milieu extracellulaire sous forme d'exosomes (**Figure 19**).

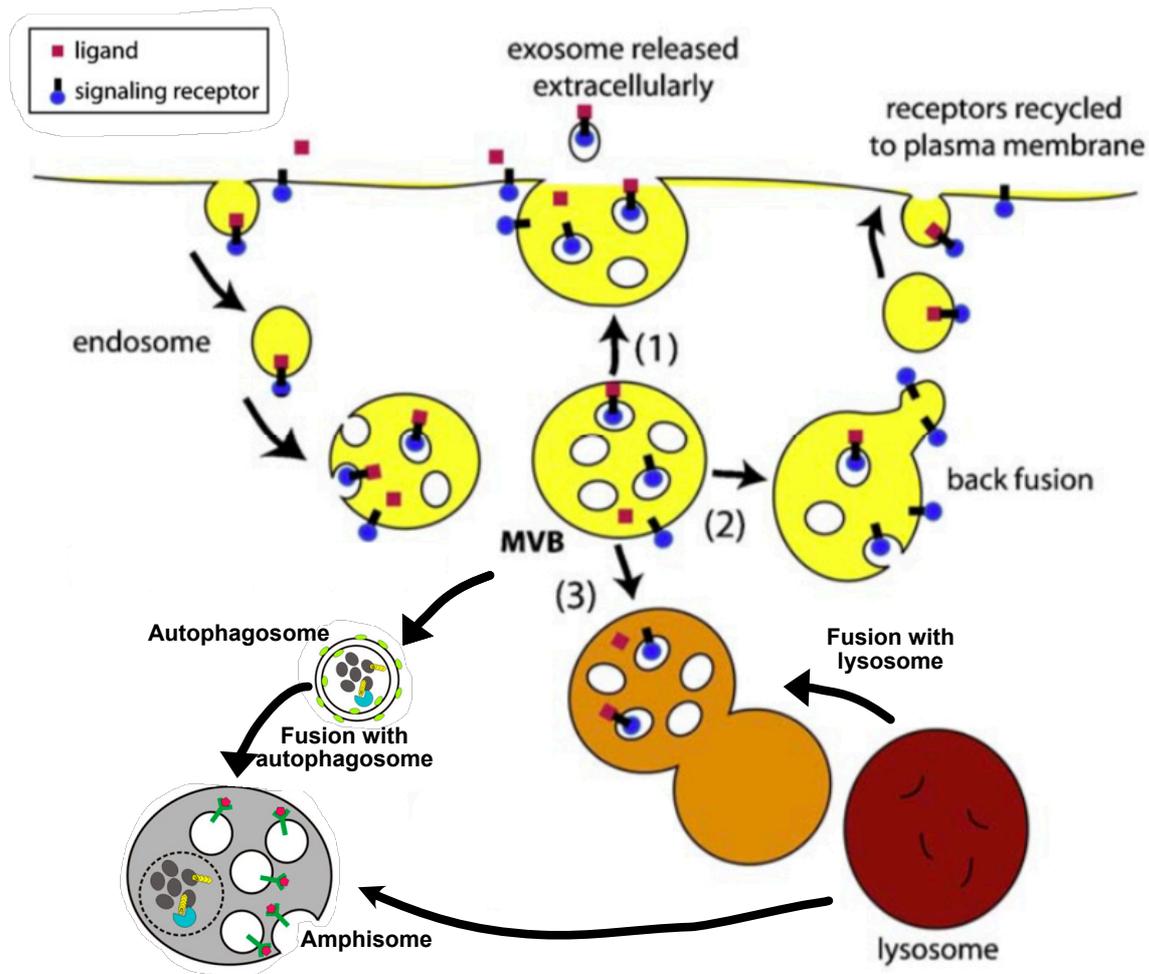


Figure 19: Schéma du devenir des MVB.

Les MVBs peuvent avoir trois destinations : (1) Libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire sous forme de petite vésicules appelées exosomes. (2) Former des extensions tubulaires à partir du MVB en direction de la membrane plasmique permettant de recycler des protéines membranaires dépourvues de leurs ligands. (3) Fusionner avec la machinerie lysosomale ou bien avec les autophagosomes de la machinerie autophagique ce qui conduit à la dégradation de leur contenu (Adapté de (Filimonenko et al., 2007; Von Bartheld and Altick, 2011)).

La fusion des MVB avec les lysosomes va entraîner la dégradation des protéines et des lipides contenus dans les ILVs. Les lysosomes ont un pH acide compris entre 3,5 et 5 et comportent de nombreuses protéases (hydrolases acides) et lipases qui vont dégrader le matériel séquestré. La fusion des MVB avec les lysosomes implique notamment les protéines SNARE (Nakamura and Yoshimori, 2017; Pryor et al., 2004). Les MVB fusionnent aussi avec des

vésicules de la voie autophagique formant des structures appelées amphisomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu (Filimonenko et al., 2007)

Les MVB peuvent aussi transitoirement stocker des molécules internalisées dans les ILVs comme par exemple le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Ce dernier, qui est complexé aux peptides antigéniques dans les cellules dendritiques, va pouvoir se retrouver à la surface des endosomes par un phénomène de « fusion en arrière » (back fusion) des ILVs. Dès lors, les MVB sont capables de former des extensions tubulaires qui vont fusionner à la membrane plasmique et permettre ainsi la présentation d'antigène par le CMH à la surface des cellules immunitaire (Kleijmeer et al., 2001; Murk et al., 2002; Von Bartheld and Altick, 2011)

Les ILV des MVB peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire sous forme de petites vésicules que l'on nomme exosomes. Ce mécanisme est dépendant des céramides, des protéines de la famille Rab dont Rab27a et Rab27b et du calcium intracellulaire (Ostrowski et al., 2010; Savina et al., 2003; Trajkovic et al., 2008). Les exosomes sont des vésicules de petites tailles comprises entre 40 et 100 nm et sont composées de protéines telles que CD63 et CD81, de lipides dont les céramides, et d'acides nucléiques dont des ARNm, de l'ADN et des microARNs (Bobrie et al., 2012; Brzozowski et al., 2018; Colombo et al., 2014; Valadi et al., 2007; Xu et al., 2015). Le contenu des exosomes reflète l'état physiologique de la cellule, et ces dernières années il est utilisé comme biomarqueur dans différentes pathologies dont les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires. Les exosomes peuvent ainsi être utilisés à des fins de diagnostics en allant directement chercher dans ces vésicules des molécules spécifiques d'une pathologie (De Toro et al., 2015; Mateescu et al., 2017). De plus, les exosomes peuvent participer à la dissémination de protéines pathologiques dont la protéine prion pathologique (PrP^{Sc}) (Alais et al., 2008; Arellano-Anaya et al., 2015; Porto-Carreiro et al., 2005; Vilette et al., 2015), le peptide Amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer (Laulagnier et al., 2018), la protéine α -Synucléine impliquée dans les synucléopathies (Gustafsson et al., 2018), la protéine Tau dans les démences frontotemporales ou la maladie d'Alzheimer (Y. Wang et al., 2017), les protéines TDP-43 et SOD1 (Iguchi et al., 2016; Vilette et al., 2018) dans la sclérose latérale amyotrophique ou la protéine Huntingtin impliquée dans la maladie de Huntington (Vilette et al., 2018). De façon

intéressante, l'analyse protéomique comparée des exosomes de myoblastes et de myotubes révèle une différence de protéines sécrétées dont des molécules d'adhésion comme la Myorferline pour les myoblastes et des molécules impliquées dans la contraction pour les myotubes (Forterre et al., 2014; Le Bihan et al., 2012). De plus, la déplétion en exosomes du sérum de veau fœtal présent dans le milieu de culture de prolifération des myoblastes *in vitro* diminue fortement la prolifération et la différenciation de ces derniers, suggérant un rôle prépondérant des exosomes lors du processus de myogenèse (Aswad et al., 2016)

2.3.4 Les endosomes comme plateforme de signalisation : le signalosome

L'internalisation des récepteurs activés et leur transit à travers la voie endo-lysosomale est un des potentiels moyens afin de diminuer la signalisation qui en découle. Néanmoins, des mécanismes alternatifs existent et permettent par exemple à des récepteurs de maintenir leurs signalisations actives en étant localisés sur les endosomes. D'autres récepteurs ont besoin d'être endocytés et localisés sur l'endosome précoce pour être activés (**figure 20**). Ce niveau de régulation a permis de mettre en évidence la notion de « signalosome » ou les endosomes apparaissent comme de véritables stations impliquées dans la régulation, le maintien et/ou l'inhibition de voies de signalisation (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Irannejad et al., 2015; Sorkin and von Zastrow, 2009; von Zastrow and Sorkin, 2007).

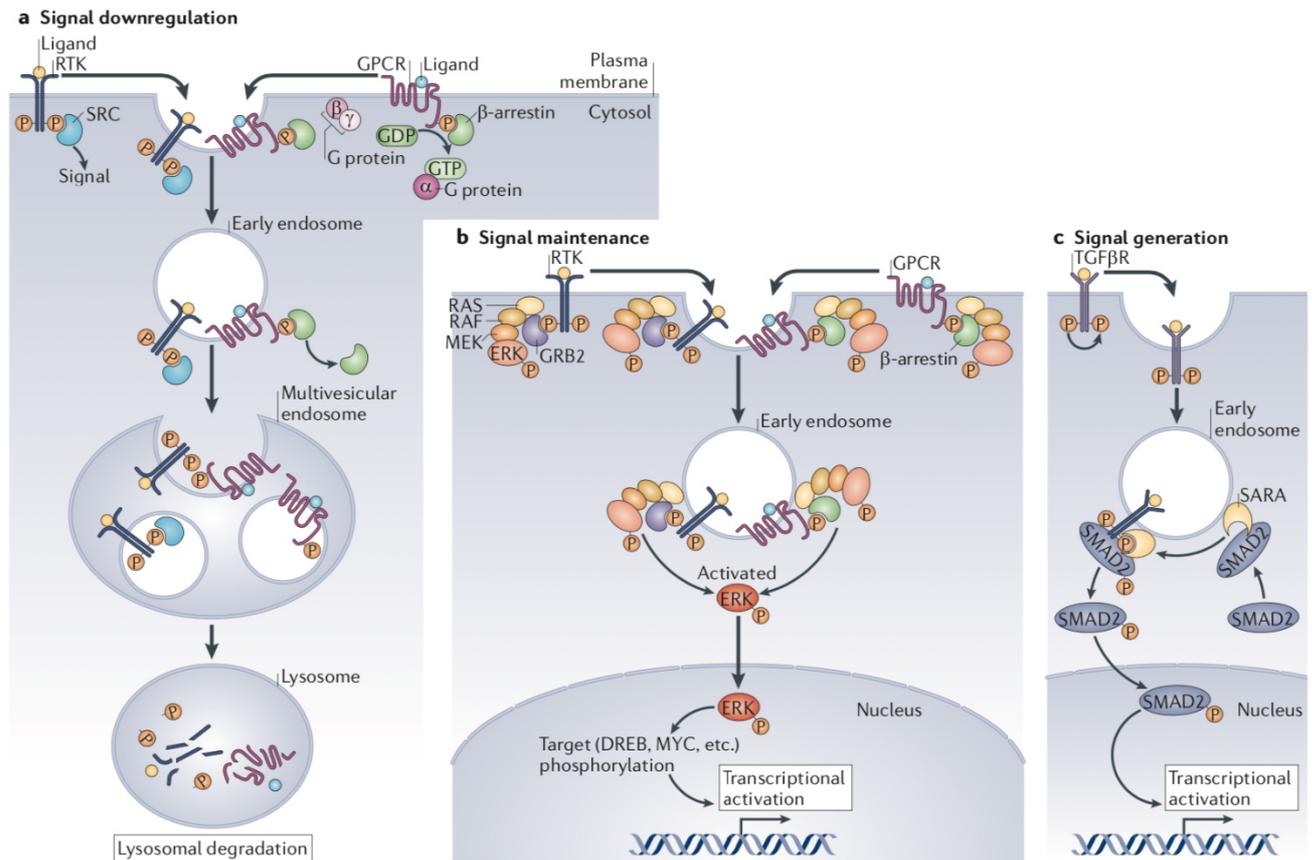


Figure 20: Représentation schématique des modèles d'endocytose participants à la régulation des voies de signalisation.

3 modèles majeurs peuvent être décrits : (a) La diminution du signal par la dégradation des récepteurs qui sont par exemples les récepteurs à tyrosine kinase (RTK), ou les récepteurs couplés au protéine G (GPCR), et dont leur internalisation dans une ILV stoppe le signal. (b) Le maintien du signal issu de récepteurs qui sont localisés au niveau de l'endosomes précoce dont l'exemple de la voie de signalisation MAPK-ERK. (c) La présence des partenaires du récepteur permet la génération d'un signal au niveau de l'endosome précoce. La voie du TGF β est activé lorsque le récepteur phosphorylé est couplé au protéines SARA et SMAD2 (Dobrowolski and De Robertis, 2011).

Suite à la liaison du ligand sur son récepteur qui conduit à son activation par phosphorylation, ce dernier va être ubiquitiné et endocyté. C'est notamment le cas des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR, et dont le mécanisme d'endocytose est bien décrit. L'ajout d'une molécule d'ubiquitine (Ub) se fait généralement sur la lysine 63, qui est un signal d'internalisation (Piper et al., 2014). L'ubiquitination est essentielle par la suite pour que le récepteur soit pris en charge par la machinerie ESCRT afin d'être internalisé et séquestré dans une ILV au niveau du LE/MVB (Clague et al., 2012; Henne et al., 2011b). Dans

le cas de l'EGFR, son activation conduit au recrutement des ubiquitines ligases de la famille Cbl. Ces protéines se lie aux tyrosines phosphorylées de l'EGFR et sont en retour phosphorylées par le récepteur (de Melker et al., 2001; Thien and Langdon, 2001). Par la suite, l'EGFR est endocyté par CME ou CIE, ceci étant dépendant de la concentration d'EGF utilisé lors de l'étude (Woelk et al., 2007). Lorsque l'EGFR ubiquitiné atteint l'EE, il est pris en charge par la machinerie ESCRT qui, par l'action séquentielle des différents protéines qui la composent, permet son internalisation dans une ILV et ainsi stoppe le signal généré en privant le récepteur de ses cibles cytosoliques (Eden et al., 2012; Sorkin and von Zastrow, 2009). Il est intéressant de noter que la mutation de domaines permettant l'ubiquitination de l'EGFR empêche son internalisation dans des ILVs ; ceci favorise son recyclage à la membrane plasmique et prolonge l'activation des voies de signalisation qui en découlent dont la voie MAPK-ERK (Eden et al., 2012). De façon intéressante, des données expérimentales montrent que le niveau protéique de l'EGFR décroît durant la différenciation des myoblastes humains, et est associé à une diminution de la signalisation de la voie MAPK-ERK (Leroy et al., 2013). Réciproquement, l'inhibition de l'expression de l'EGFR dans ces myoblastes en prolifération favorise la différenciation (Leroy et al., 2013). En résumé, le fait que les récepteurs membranaires activés sont intégrés dans une ILV participe donc à la régulation de ou des voies de signalisation associées (**Figure 20a**) (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Irannejad et al., 2015; von Zastrow and Sorkin, 2007). Ceci semble particulièrement vrai pour la régulation de la voie canonique Wnt, dans laquelle la GSK3 est séquestrée dans les ILV après activation de la voie, permettant l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau (Taelman et al., 2010). On parle alors de modèle de séquestration, qui dans ce cas, fait intervenir la machinerie ESCRT dont la protéine HRS.

D'autres récepteurs membranaires se servent des EE comme plateforme afin de maintenir leur signalisation active, on parle alors de signalosome. C'est notamment le cas de certain RTK dont les récepteurs au neurotrophines (Trks) et certaines GPCRs (García-Regalado et al., 2008; Watson et al., 2001). Dans ces exemples, la voie MAPK ERK va être maintenue active par phosphorylation de la protéines ERK au niveau de l'endosome précoce (**Figure 20b**).

Enfin, certains signaux peuvent être générés au niveau de l'endosome précoce lorsque les facteurs protéiques sont réunis. C'est le cas lorsque le TGF β R1 ou 2 sont phosphorylés et

localisés sur l'EE, le récepteur est alors capable de se lier avec les protéines SMAD et SARA (**figure20c**). Dès lors, SMAD1 ou SMAD2 sont phosphorylés puis relâchés du complexe, et transloqués dans le noyau pour activer des gènes cibles (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Hayes et al., 2002; Miura et al., 2000).

L'ultime étape de ces processus est l'internalisation du récepteur membranaire dans une ILV ce qui permet de stopper le signal qui en découle en le privant de ses partenaires cytosoliques. Lors de la myogenèse, nous avons vu qu'il existe des séquences spécifiques dans lesquelles certains récepteurs et voies de signalisation sont activés comme par exemple la voie MAPK-ERK (Knight and Kothary, 2011). Bien que les acteurs protéiques comme les récepteurs membranaires et les protéines kinases de ces voies sont maintenant bien décrits, il existe très peu de données sur leurs régulations par les protéines des voies endosomales et tout particulièrement par les protéines de la machinerie ESCRT. Il y a donc un réel intérêt à comprendre comment ces protéines fonctionnent dans la myogenèse et plus précisément comment les protéines ESCRT sont impliquées dans le processus de différenciation. C'est l'objet de mon travail de thèse.

3 Les Protéines ESCRT

3.1 Introduction

La machinerie ESCRT (pour Endosomal Sorting Complex Required for Transport) chez les mammifères est constituée de 4 complexes appelés ESCRT-0, I, II et III et de protéines associées comme ALIX (ou BRO1) et VPS4A et B (Babst, 2005; Henne et al., 2011b)(**Tableau 1**). Les protéines ESCRT sont impliquées dans la formation des ILV en agissant séquentiellement afin de regrouper les cargos ubiquitinés à la surface des endosomes précoces puis de déformer la membrane limitante de l'endosome afin de provoquer son invagination pour générer la formation d'une vésicule intra-luminaire. La nucléation et la polymérisation des ESCRT-III et l'action de l'ATPase VPS4 participent à la fermeture du cou de la vésicule et à sa libération dans le lumen de l'endosome (Henne et al., 2011b).

Plus globalement, Les protéines ESCRT sont impliquées dans le remodelage des membranes et agissent dans différents processus comme la réparation membranaire ou la cytokinèse (Alfred and Vaccari, 2016; Christ et al., 2017; Hurley, 2015; Vietri et al., 2020a).

Fonction	Complexe	Nom		Caractéristique	Intéractions		
		Hummain	Levure		Protéines associés	Membrane	Ubiquitine
Ciblage	ESCRT-0	HRS	Vps27p	VHS, UIM, FYVE, CB, Coiled coil	TSG101, Clathrine	PI3P	UIM
		STAM1,2	Hse1p	VHS,UIM, CB	HD-PTP, Clathrine		UIM
Pontage	ESCRT-I	TSG101	Vps23	UEV, PRD, Coiled coil	Alix		UEV
		VPS28	Vps28	CTD	EAP45, CHMP6		
		VPS37A-D	Vps37				
		MVB12A,B	MVB12				
	ESCRT-II	EAP20	Vps25			CHMP6	
		EAP30	Vps22				
		EAP45	Vps36	GLUE		PI3P	GLUE
	Domaine Bro1	Alix	Bro1	Bro1, coiled coil, PTAR	CHMP4, TSG101	LBPA binding	Coiled coil
	Filaments	ESCRT-III	CHMP1A,B	Did2p	MIM1	IST1, CHMP2, VPS4	
CHMP2A,B			Vps2	MIM1	CHMP3, VPS4		
CHMP3			Vps24	MIM1	CHMP2, 4		
CHMP4A-C			Snf7	MIM2, Domaine Bro1	CHMP3, 6, 7, Alix, VPS4		
CHMP5			Vps60	MIM1			
CHMP6			Vps20	MIM2	EAP20, VPS28, CHMP4, VPS4	Myristoylation	
CHMP7			Chm7	MIM1, MIM2	CHMP4		
IST1			Ist1	MIM1, MIM2	CHMP1,VPS4		
Remodelage		VPS4A,B	Vps4p	MIT, AAA+	CHMP5, IST1		
		ULK3		MIT, Ser/Thr kinase	CHMP5, IST1		

Tableau 1 : Tableau présentant la composition des différents complexes ESCRT. Adapté de (Christ et al., 2017)

Historiquement, les protéines ESCRT ont été découvertes chez la levure et nommées VPS (pour vacuolar protein sorting). Leur inhibition conduit à un défaut d'acheminement des cargos protéiques aux vacuoles et à la formation de structures vacuolaires géantes nommées vacuoles de classe E (Cereghino et al., 1995; Raymond et al., 1992). En 2001, le complexe ESCRT-I fut décrit comme nécessaire à la formation des MVB contenant des cargos ubiquitinés (Katzmann et al., 2001). Par la suite, les complexes ESCRT-II et -III ont été montrés comme essentiels dans l'acheminement des cargos ubiquitinés vers les vacuoles de la levure (Babst et al., 2002a, 2002b). Le complexe ESCRT-0 fut décrit en 2003 comme essentiel à l'initiation du processus de formation des ILVs en se liant aux PI3P et en permettant le recrutement du complexe I (Katzmann et al., 2003).

3.2 La fonction des protéines ESCRT

La fonction des protéines de la machinerie ESCRT ne se limite pas à la formation des ILVs mais intervient dans différents processus cellulaires essentiels impliquant un remodelage membranaire. Cela comprend la réparation des membranes plasmique et nucléaire, le bourgeonnement de certains virus, la micro- et macro-autophagie, la cytokinèse, le remodelage des axones et des dendrites (Christ et al., 2017; Schmidt and Teis, 2012; Vietri et al., 2020b; Wollert et al., 2009b) (**figure 21**).

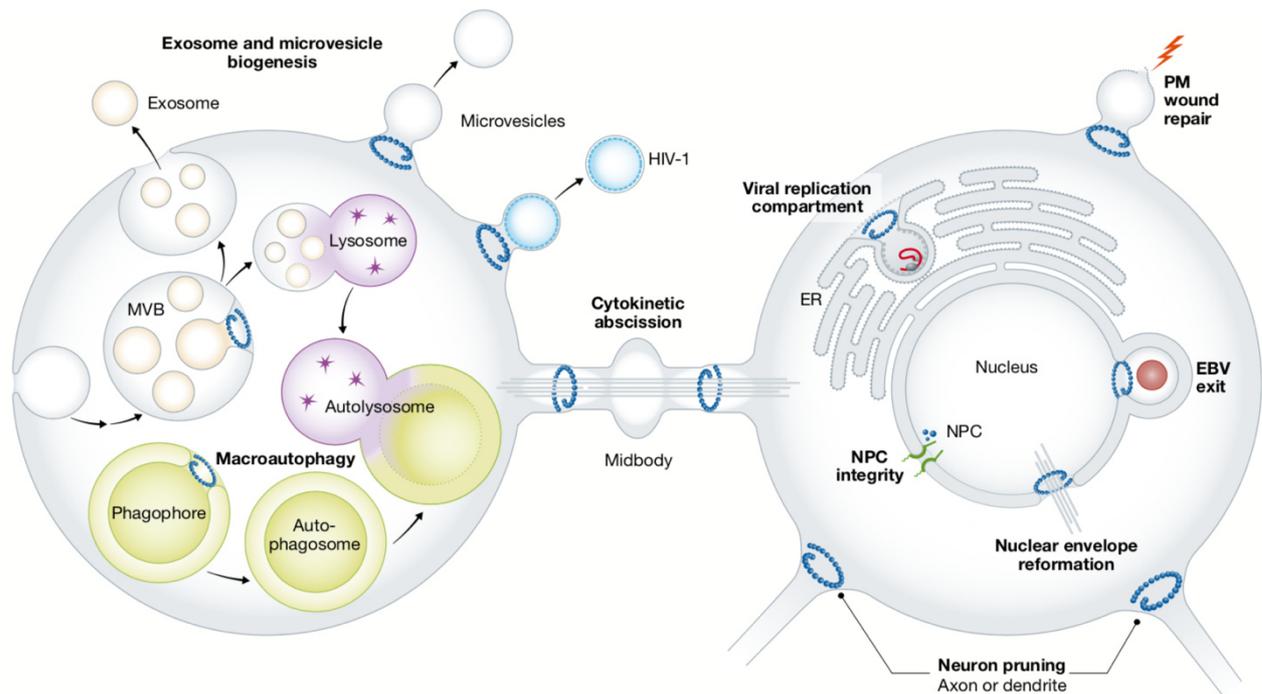


Figure 21: Schéma représentant les différentes actions des protéines ESCRT dans une cellule.

La machinerie ESCRT permet le remodelage des membranes en provoquant leur fermeture du côté cytoplasmique et la formation d'une vésicule. Les colliers de perles bleues représentent l'action du complexe ESCRT-III aboutissant à la fermeture du col des membranes (Hurley, 2015).

3.2.1 Formation des ILVs

Après leur activation, les récepteurs membranaires vont être ubiquitinés, endocytés et acheminés au niveau des endosomes pour aboutir dans une ILV qui compose les MVBs. Le mécanisme de bourgeonnement des ILVs s'opère depuis le cytosol vers la lumière de l'endosome et est orchestré par la machinerie ESCRT. Les protéines de la machinerie vont alors

avoir deux rôles : elles vont séquestrer et concentrer les protéines à inclure dans l'ILV d'une part et d'autre part, permettre le bourgeonnement et la scission de l'ILV issu de la membrane endosomale. On distingue trois grandes étapes dans ce processus : L'action séquentielle des composants du complexe ESCRT-0, I et II qui permet le rassemblement des cargos ubiquitinés et l'invagination de la membrane endosomale ; la dissociation des complexes ESCRT précédemment cités pour laisser place aux protéines ESCRT-III qui s'associent en spirale pour fermer le col de la vésicule. Se produit ensuite la desubiquitination des cargos/récepteurs et la dissociation du complexe III par l'action de la protéine VPS4 et enfin la libération de l'ILV dans le lumen du MVB naissant (**Figure 22**).

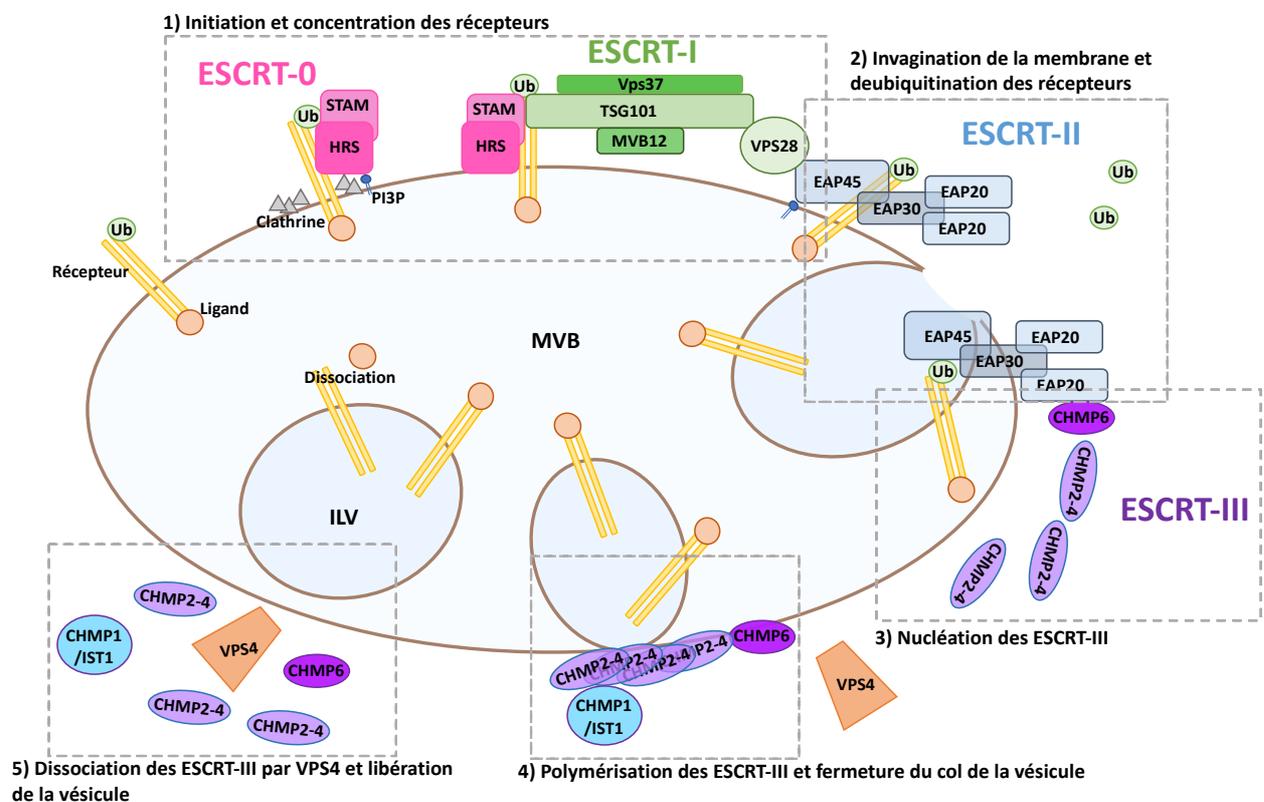


Figure 22: Représentation schématique de l'intervention des protéines ESCRT dans la formation d'une ILV. Adapté de (Rusten et al., 2011).

3.2.1.1 ESCRT-0 à -II : Reconnaissance, rassemblement des récepteurs et invagination de la membrane des MVB

ESCRT 0 :

La première étape de formation des ILVs consiste au regroupement des cargos/récepteurs ubiquitinés à la surface de l'endosome. Ceci est initié par le complexe ESCRT-0 qui comporte deux membres : La protéine HRS/HGS (Hepatocyte Growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) ou Vps27 chez la levure et la protéine STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule 1/2) ou HSE1 chez la levure (**Tableau 1**). Ces protéines interagissent avec un ratio 1 :1 grâce à leur domaine coiled-coil GAT (Asao et al., 1997; Prag et al., 2007). Ces deux protéines ont des similitudes structurales mais HRS possède en plus un domaine à doigts de zinc FYVE (qui est aussi partagé par Fab-1, YGL023, Vps27 et EEA1)(Mao et al., 2000). Ce domaine permet à HRS de se lier au PI3P localisé sur les endosomes et de se lier spécifiquement à cette organelle (**figure 22**) (Raiborg et al., 2001b). D'autre part, HRS et STAM1/2 sont toutes les deux capables de lier l'ubiquitine grâce à leurs domaines UIM (Ubiquitin Interacting Motif) et VHS (Vps27, HRS, STAM), ce qui les localise spécifiquement au niveau des endosomes contenant des cargos ubiquitinés (Bilodeau et al., 2002; Mizuno et al., 2003; Raiborg et al., 2002; Urbé et al., 2003). HRS possède aussi un domaine CBD (Clathrin Binding Domain) permettant de lier la Clathrine et de recruter cette dernière au niveau des endosomes pour faciliter le regroupement des cargos et l'invagination de la membrane (Raiborg et al., 2002, 2001a; Wenzel et al., 2018). Outre son rôle dans le regroupement des cargos, le complexe ESCRT-0 va permettre le recrutement du complexe ESCRT-I en interagissant avec un de ses composants qui est la protéine TSG101 (Bache et al., 2003a; Katzmann et al., 2003).

ESCRT-I :

Ce complexe fut le premier décrit en 2001 ; il est constitué de la sous unité TSG101 (tumor susceptibility gene 101) ou Vps23 chez la levure, de Vps28, Vps37 (Katzmann et al., 2001) et Mvb12 (multivesicular body 12) , identifié en dernier (Chu et al., 2006; Curtiss et al., 2007)(**Tableau 1**). La structure cristallographique du complexe-I montre un hétérotétramère allongé de 20nm de longueur, avec trois sous-unités entrelacées formant une tige et une tête globulaire (Kostelansky et al., 2007). Le complexe ESCRT-I interagit avec le complexe ESCRT-0 via le domaine UEV (Ubiquitin E2 variant domain) de TSG101 et permet aussi l'interaction avec les cargos ubiquitinés (**Figure 22**) (Katzmann et al., 2003; Kostelansky et al., 2006). Le complexe ESCRT-I est aussi capable de recruter le complexe ESCRT-II ou la protéine

adaptatrice ALIX (Babst et al., 2002b; Kostelansky et al., 2007). La liaison avec le complexe ESCRT-II se fait par le domaine C-terminal de Vps28 (Kostelansky et al., 2007, 2006). Le complexe ESCRT-I initie l'invagination de la membrane avec l'ESCRT-II et dans certains cas, recrute directement le complexe ESCRT-III via la protéine Alix (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Hanson and Cashikar, 2012; Langelier et al., 2006).

ESCRT-II :

Le complexe ESCRT-II est un hétérotétramère qui est composé de la protéine EAP30 (ELL-associated protein 30 kDa) ou Vps22 chez la levure, de EAP45 ou Vps36, et de deux protéines EAP20 ou Vps25 (Babst et al., 2002b; Langelier et al., 2006). Le complexe-II adopte une forme de Y où EAP30 et EAP45 forment la base et les deux molécules de EAP20 forment les bras (Hierro et al., 2004; Teo et al., 2004). Le domaine GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding) de EAP30/Vps22 permet d'interagir avec l'ESCRT-I Vps28, mais aussi avec l'ubiquitine et donc les cargos protéiques ubiquitinés (Alam et al., 2004; Slagsvold et al., 2005). De plus, le domaine GLUE permet au complexe ESCRT-II d'interagir avec une grande affinité au PI3P, spécifiant sa localisation sur les EE (**Figure 22**) (Slagsvold et al., 2005). Les complexes I et II ont la capacité d'induire l'invagination de la membrane ainsi que son bourgeonnement (Teis et al., 2010; Teo et al., 2004; Wollert and Hurley, 2010). Finalement, EAP20 (Vps25) est capable de recruter le complexe-III en interagissant avec un de ses composants, Vps20 (CHMP6 chez les mammifère) (Henne et al., 2011b).

En dernier lieu, les cargos doivent être desubiquitinés avant leur insertion dans les ILVs et s'opère durant les différentes étapes d'initiation de la formation de l'ILV. Par exemple, certaines desubiquitinases dont AMSH (Associated molecular with SH3 domain of SAM) ou UBPY (Ubiquitin isopeptidase Y) interagissent avec les complexes ESCRT-0 et ESCRT-III et permettent de desubiquitiner les cargos avant leur incorporation dans les ILVs (Kyuuma et al., 2007; McCullough et al., 2006; Row et al., 2006).

Alix/Bro1 et HDPTP :

Alix, ou Bro1 chez la levure, fut initialement isolée en association avec la protéine ALG-2, qui est une protéine impliquée dans l'apoptose (Missotten et al., 1999). Elle ne fait pas partie des protéines de la machinerie ESCRT mais participe à leur fonctionnement. Par

exemple, Bro1 est nécessaire pour la biogenèse des MVBs (Springael et al., 2002), et elle est impliquée dans le recrutement et l'activation de la desubiquitinase Doa4 pour l'assemblage du complexe ESCRT-III (Luhtala and Odorizzi, 2004). Chez les mammifères, Alix interagit avec les complexes ESCRT I et II, mais ne semble pas essentielle dans le tri des récepteurs car sa déplétion n'a pas d'effet majeur sur la dégradation de l'EGFR (Bowers et al., 2006; Doyotte et al., 2008; Schmidt et al., 2004). Cependant, la protéine HDPTP (His Domain PhosphoTyrosine Phosphatase) qui est un homologue d'Alix et qui possède le domaine Bro1, semble impliquée dans la dégradation des récepteurs puisque l'inhibition de son expression affecte également la dégradation de l'EGFR et la formation des ILVs (Doyotte et al., 2008). La fonction assurée par Bro1 chez la levure semble l'être par HDPTP chez les mammifères plutôt que par Alix. Néanmoins, une étude plus récente montre que la déplétion d'Alix ralentit la dégradation de l'EGFR (Sun et al., 2015). Ceci serait lié au fait que la protéine Alix est capable d'interagir avec l'ESCRT-I TSG101 et de se lier directement avec l'ESCRT-III CHMP4 (Strack et al., 2003). De plus, une étude montre que la protéine Alix est ubiquitinée par le complexe Ozz-E3 dans les fibres musculaires ce qui permet de réguler le niveau protéique de Alix au niveau de compartiment contenant le facteur de polymérisation de l'actine, la Cortactine (Bongiovanni et al., 2012). Enfin, l'inhibition de l'expression de Alix n'impacte pas l'étape précoce de myogenèse mais affecte la distribution et le niveau de F-actine, et la formation des protrusions membranaires (Bongiovanni et al., 2012).

3.2.1.2 ESCRT-III, polymérisation et scission membranaire des ILV

Les protéines du complexe ESCRT-III sont différentes de celles des autres complexes car elles sont sous forme de protéines solubles monomériques et non actives. Elles peuvent cependant se polymériser les unes avec les autres, en filaments lorsqu'elles sont recrutées aux membranes et activées par les composants ESCRT en amont (Hanson and Cashikar, 2012). Le complexe III est composé de 4 protéines dont Vps20, Snf7, Vps24 et Vps2 (Babst et al., 2002a) chez la levure et des protéines CHMP (Charged Multivesicular body Proteins) chez les mammifères dont CHMP7, CHMP6, CHMP4, CHMP3 et CHMP2. De plus, chacune d'entre elles possède des isoformes qui sont plus ou moins présentes selon le type de tissu (Henne et al., 2011b). Certaines ESCRT-III comme CHMP3 sont capables de recruter des desubiquitinases

afin de retirer les molécules d'ubiquitine des cargos protéiques internalisés. CHMP3 est capable de recruter l'enzyme AMSH, comme le fait le complexe ESCRT-0, et participe donc au maintien de la concentration d'ubiquitine dans le cytoplasme (Kyuuma et al., 2007)

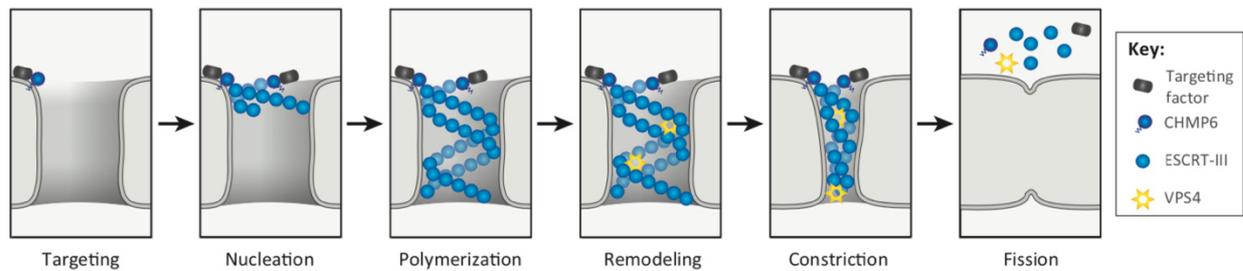


Figure 23: Représentation schématique de l'intervention des protéines ESCRT-III dans la fermeture du col de la vésicule.

CHMP6 est localisée au niveau du cou de la vésicule, où elle est capable de nucléer CHMP4. Avec CHMP2, CHMP3, CHMP1 et IST1, CHMP4 forme des filaments liés à la membrane qui s'enroulent autour de l'invagination membranaire. Le remodelage des filaments d'ESCRT-III par VPS4 entraîne la constriction et la fission de la membrane et la libération de la vésicule (Christ et al., 2017).

Classiquement, la fermeture du col de la vésicule est initiée avec le recrutement du complexe ESCRT-III CHMP6 qui est myristoylé et recruté par l'ESCRT-II EAP20 (**Figure 23**) ; il s'ensuit le recrutement et l'activation de CHMP4B (Snf7 chez la levure) qui interagit avec CHMP6 (Babst et al., 2002a; Shim et al., 2007; Tang et al., 2015). Une fois activée, CHMP4B va pouvoir activer d'autres protéines CHMP4B et initier la formation des filaments d'ESCRT-III autour du col de la vésicule contenant les cargos protéiques. De plus, l'invagination de la membrane initié par les ESCRT 0, I et II participe au processus de nucléation (Lee et al., 2015). Parmi les autres protéines CHMPs, CHMP7 pourrait participer au recrutement de CHMP4B, mais son rôle dans la nucléation de CHMP4B reste moins étudié (Denais et al., 2016; Vietri et al., 2015).

Le mécanisme mis en œuvre par les protéines du complexe ESCRT-III afin de provoquer la scission du col de la vésicule n'est pas réellement bien défini et plusieurs modèles existent pour expliquer ce mécanisme (Fabrikant et al., 2009; McCullough et al., 2013; Peel et al., 2011). Par exemple, des travaux *in vitro* avec la protéine recombinante snf7 (CHMP4) ont montré qu'elle pourrait former une spirale en forme de ressort comprimé. La relaxation du

ressort permettrait de libérer son énergie pour déformer la membrane et conduirait à la scission de la vésicule (Chiaruttini et al., 2015).

3.2.1.3 Désassemblage des ESCRT-III : Rôle de VPS4

Les protéines VPS4A et B sont les seules ATPases à intervenir dans le processus de scission membranaire enclenché par les composants du complexe ESCRT-III. L'activation de VPS4 implique sa multimérisation afin de lier l'ATP, lui permettant d'interagir avec le domaine MIM (MAN1 C-terminal homology domain) des protéines CHMP via son domaine MIT (MIT-interacting motif)(Adell et al., 2014; Monroe et al., 2014). VPS4 va rapidement dépolymériser les filaments protéiques d'ESCRT-III, ce qui assure la libération de la vésicule et un retour à une concentration normale de monomère d'ESCRT-III dans le cytosol (Yang et al., 2015). Le mécanisme exact d'action de VPS4 pour dépolymériser les ESCRT-III n'est pas bien connu mais deux hypothèses ont été proposées. Un premier mécanisme consiste en la scission du cou de la vésicule indépendamment de VPS4, et dans lequel la dépolymérisation des ESCRT-III aurait lieu après la libération de la vésicule, permettant ainsi leurs dissociations (Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010). Dans un second mécanisme, VPS4 agirait avant et pendant l'étape de scission. Ainsi, VPS4 participerait au remodelage des filaments d'ESCRT-III qui conduirait à l'étape finale de scission (Adell and Teis, 2011; Hanson et al., 2008; Saksena et al., 2009).

3.2.1.4 Protéine ESCRT et régulation des récepteurs membranaires à travers la formation des MVB

La machinerie ESCRT régule la dégradation des récepteurs membranaires par la formation des ILV et des MVB, et contrôle ainsi les voies de signalisation qui en découlent (Rusten et al., 2011; Szymanska et al., 2018; Wegner et al., 2011). Dans différents modèles dont *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*), la drosophile (*drosophila melanogaster*), la souris ou les cultures de cellules humaines, la mutation de protéines des complexes ESCRT conduit à

une altération de la morphologie des endosomes (Rusten et al., 2011). Dans ces conditions, la dégradation de protéines telles que les récepteurs membranaires qui dépend de la voie endo-lysosomale s'en trouve alors affectée (**Figure 23**). Ceci inclut les RTK comme l'EGFR, le récepteur au TGF β , les récepteurs de la voie Wnt, les intégrines, les récepteurs Toll et d'autres protéines membranaires (Rusten et al., 2011; Szymanska et al., 2018). L'inhibition de la dégradation de ces récepteurs provoque leur accumulation au niveau de l'endosome et à une dérégulation des voies de signalisations qui leur sont associées. Par exemple, l'absence de l'ESCRT-0 HRS et de STAM chez les larves de drosophiles, conduit à des défauts de morphogénèse attribués à une signalisation anormale de l'EGFR (Chanut-Delalande et al., 2010; Jékely and Rørth, 2003; Lloyd et al., 2002a). Également, les souris KO (Knock Out) pour HRS ou TSG101 meurent à des stades embryonnaires précoces (11 et 6,5 jours respectivement) (Komada and Soriano, 1999; Ruland et al., 2001). Dans les cellules dérivées des souris KO pour TSG101 la voie de l'apoptose est augmentée et le cycle cellulaire est arrêté (Krempler et al., 2002; Li and Cohen, 1996, p. 101). La mort des cellules semble être due au fait que TSG101 n'interagit plus avec Alix, qui a été initialement découverte en interaction avec la protéine pro-apoptotique ALG-2. L'absence de TSG101 favoriserait ainsi la fonction pro-apoptotique de Alix (Mahul-Mellier et al., 2009). De plus, l'absence de TSG101 diminue également la dégradation de l'EGFR et maintient les voies de signalisation en aval activées dans des modèles cellulaires stimulés avec de l'EGF (Babst et al., 2000; Brankatschk et al., 2012). L'activation anormale des voies de signalisation participerait également au défaut morphogénique observé en absence de TSG101 (Ruland et al., 2001). Il est à noter ici que, parmi tous ces travaux, très peu ont regardé si la dérégulation des voies de signalisation observé en l'absence des protéines ESCRT affectait réellement la transcription (Szymanska et al., 2018). Une étude s'est penchée sur la question et montre que l'absence des protéines ESCRT affecte le trafic de l'EGFR et augmente la signalisation de la voie MAPK-ERK après stimulation avec de l'EGF, mais ne semble pas affecter la transcription de gènes cibles (Brankatschk et al., 2012). Également, une autre étude montre que l'absence des protéines ESCRT affecte la signalisation de la voie NF κ B ainsi que la transcription des gènes cibles (**Figure 23**) (Mamińska et al., 2016). Le rôle des protéines ESCRT dans la régulation de la transcription semble donc dépendre des récepteurs membranaires et des voies de signalisation associées mais nécessite d'être étudié plus en détail puisqu'il n'existe pas de consensus sur

l'exhaustivité de son rôle (Szymanska et al., 2018). Globalement, la régulation des voies de signalisation par les protéines ESCRT est multiple et va affecter différents processus cellulaires comme la prolifération, la survie, le développement et tous les mécanismes nécessitant d'être régulés par la voie endo-lysosomale (Wegner et al., 2011)(voir aussi la partie 2.3.4 du manuscrit). Concernant le processus de myogenèse, son bon déroulement est complexe et dépend de l'activation et/ou de l'inhibition des voies de signalisation associées aux récepteurs membranaires. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées, à l'implication potentielle de la machinerie ESCRT dans la régulation de la myogenèse via le contrôle des voies de signalisation. C'est pourquoi mon projet de thèse a consisté à déterminer si la machinerie ESCRT était impliquée dans la myogenèse et s'est focalisé plus particulièrement sur la protéine HRS dans la régulation de ce processus.

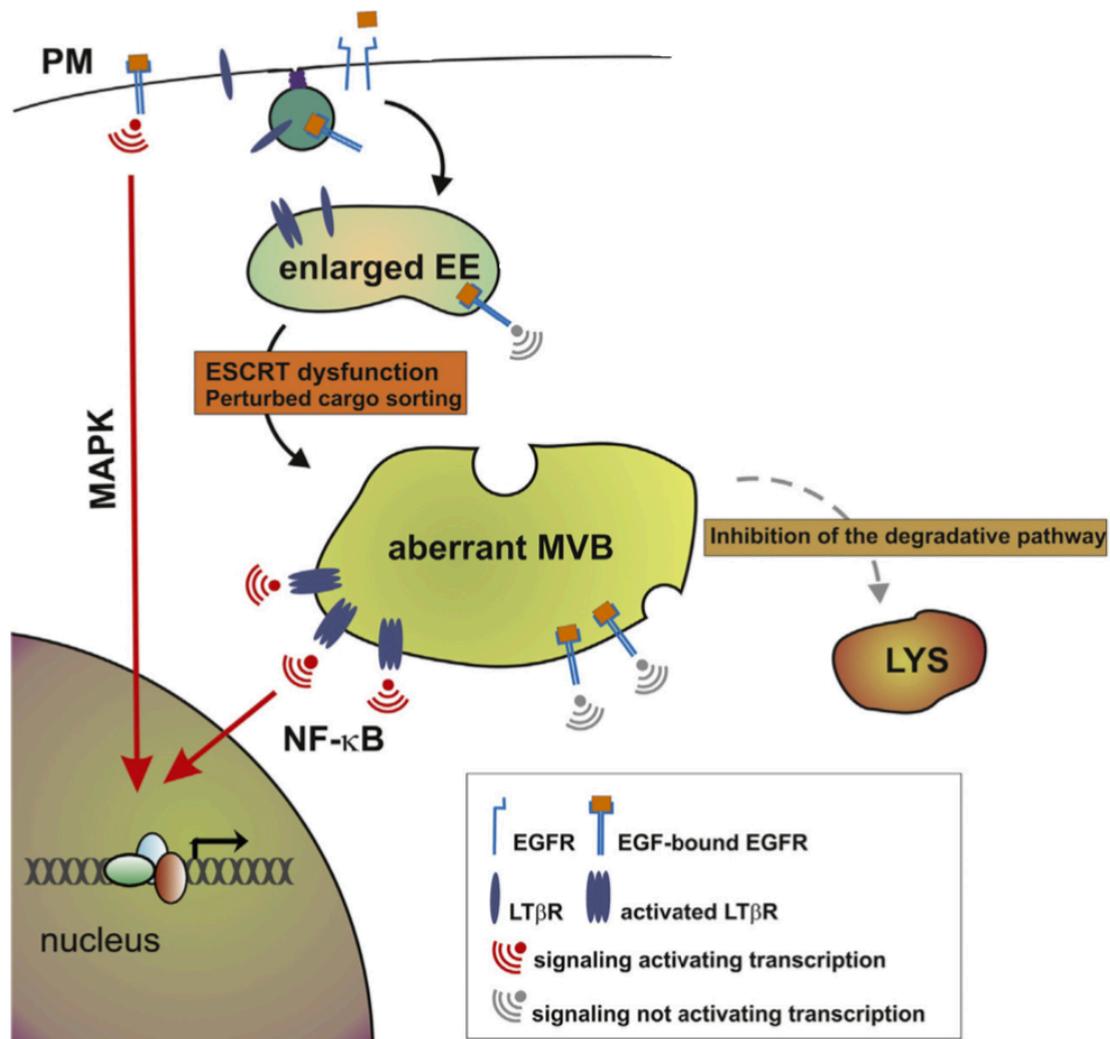


Figure 24: Effet de l’inhibition des protéines ESCRT sur le tri des récepteurs membranaires et sur l’activation des voies de signalisation.

Le dysfonctionnement des protéines de la machinerie ESCRT conduit à l’accumulation d’une multitude de récepteurs membranaires représentés par l’EGFR et LTβR (Lymphotoxin β receptor) au niveau du MVB ayant une morphologie aberrante. Les voies de signalisation associées à ces récepteurs, dont la voie MAPK et NFκB, se trouvent alors dérégulées et peuvent ou non affecter la transcription (modifié à partir de (Szymanska et al., 2018)).

3.2.2 Autres processus impliquant les protéines ESCRT

La nature et la séquence de recrutement des protéines de la machinerie ESCRT dans le processus de formation des MVB sont bien définies mais elles possèdent également d’autres fonctions. Parmi ces fonctions se trouvent un rôle dans le processus d’autophagie, une

implication dans la cytokinèse, la réparation des membranes plasmiques et nucléaires ainsi que dans le bourgeonnement des virus (**figure 25**).

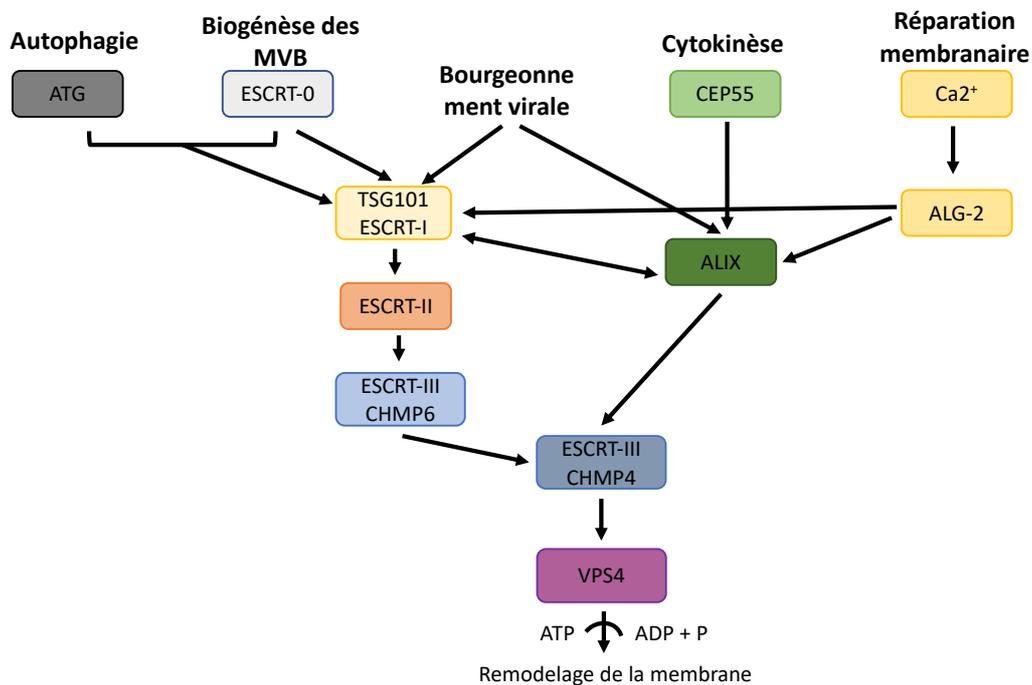


Figure 25: Schéma des processus cellulaires impliquant les protéines ESCRT ainsi que leurs partenaires protéiques.

3.2.2.1 ESCRT et autophagie

L'autophagie est un processus catabolique important par laquelle du matériel intracellulaire obsolète (organelles, agrégats protéiques, etc...) va être dégradé par les hydrolases du lysosome (Dikic and Elazar, 2018). Le principal processus d'autophagie, la macroautophagie, implique l'engloutissement d'une grande partie du cytoplasme dans une vésicule à double membrane que l'on nomme phagophore et qui une fois refermée prend le nom d'autophagosome (Dikic and Elazar, 2018). Par la suite, l'autophagosome, par fusion avec un lysosome, devient un autophagolysosome et le matériel contenu est alors dégradé. La microautophagie quant à elle est un processus autophagique alternatif qui implique un bourgeonnement membranaire vers l'intérieur de l'autophagosome ou du lysosome afin de

dégrader spécifiquement certains cargos protéiques (Glick et al., 2010). La machinerie ESCRT intervient dans ces deux processus d'autophagie.

ESCRT et macroautophagie : La formation de l'autophagosome à partir du phagophore partage des similitudes topologiques avec le processus de formation des ILV par les ESCRT. Ainsi, des études montrent que CHMP2A ou CHMP4, ainsi que VPS4, sont localisées transitoirement au niveau de l'autophagosome naissant et participent à sa fermeture (Takahashi et al., 2018; Zhen et al., 2020; Zhou et al., 2019). De plus, Atg17 (autophagy related gene chez la levure) ou FIP200 chez les mammifères, fait partie du complexe ULK1 initiant l'autophagie et interagit avec CHMP4 afin de le recruter sur les autophagosomes naissants (Zhou et al., 2019). L'absence de protéines ESCRT comme l'ESCRT-0 HRS ou l'ESCRT-I TSG101 provoque l'accumulation de marqueurs de l'autophagie dont p62/SQSTM1 et LC3, ainsi que l'accumulation de protéines qui ne sont plus dégradées. C'est le cas de la protéine TDP-43 (TAR DNA Binding protein 43) dont l'agrégation est caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), une maladie neurodégénérative fatale chez l'homme (Filimonenko et al., 2007). L'inhibition spécifique de l'expression de HRS dans les neurones de l'hippocampe chez la souris conduit à l'apparition de multiples agrégats protéiques dont la TDP-43, la Huntingtin, α -synucléine, le peptide Améloïdé- β , qui sont des protéines retrouvées agrégées dans les pathologies neurodégénératives comme la SLA, la maladie de Huntington et les synucléopathies (Edgar et al., 2015; Lim and Yue, 2015; Oshima et al., 2016). Ces données montrent que les protéines ESCRT participent activement au processus d'autophagie et que leur inhibition ou leur mutation pourraient participer à la mise en place de processus neurodégénératifs (Edgar et al., 2015; Filimonenko et al., 2007; Oshima et al., 2016; Rusten et al., 2006).

ESCRT et microautophagie : Le processus de microautophagie est proche de celui de la formation des ILV, à l'exception près que les protéines dégradées sont cytosoliques. Une étude a montré que la microautophagie endosomale faisait appel aux protéines TSG101 (ESCRT-I) et VPS4 afin d'internaliser des cargos protéiques cytosoliques spécifiques dans les MVB (Sahu et al., 2011). De plus, la protéine chaperonne HSC70 interviendrait dans ce processus pour cibler spécifiquement ces cargos et permettre leur dégradation (Sahu et al., 2011).

3.2.2.2 ESCRT et réparation de la membranaire plasmique et nucléaire.

Suite à un dommage de la membranaire plasmique provoquant des trous, de taille inférieure à 100nm, un flux important de Ca^{2+} peut entrer dans la cellule et déclencher un signal initiant la réparation membranaire et le recrutement rapide de CHMP4B (Jimenez et al., 2014). D'autres protéines sont aussi recrutées telle que ALG-2 (Calcium binding protein) qui elle-même recrute Alix, le complexe ESCRT-III (avec CHMP3, CHMP2A et CHMP2B) et Vps4. Leur présence au site de la lésion membranaire va permettre le clivage de la partie endommagée de la membrane (Scheffer et al., 2014). La nucléation et le recrutement des protéines du complexe III sont initiés par TSG101 et Alix sans intervention des protéines du complexe ESCRT-0 (Okumura et al., 2009). Au niveau de la membrane nucléaire, des stress mécaniques peuvent induire la rupture de cette dernière qui est très vite réparée par l'action des protéines du complexe ESCRT-III notamment (Raab et al., 2016; Vietri et al., 2020).

3.2.2.3 ESCRT et cytokinèse

L'étape de cytokinèse correspond à la séparation physique du pont cytoplasmique qui relie les deux cellules filles dans les dernières étapes de la division cellulaire et dans laquelle la machinerie ESCRT va intervenir. La protéine CEP55 (Centrosomal Protein 55) va recruter la protéine TSG101 au niveau du site de rupture du cytoplasme (midbody), qui s'accumule et recrute la protéine Alix (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). TSG101 et Alix, en liant les protéines du complexe ESCRT-III, vont initier parallèlement l'étape de nucléation des ESCRT-III (Christ et al., 2016; Tang et al., 2016). Cette étape nécessite la présence d'autres facteurs protéiques comme MITD1 (Microtubule Interacting And Trafficking Domain Containing 1) ou IST1, qui vont se lier à la membrane du midbody (Hadders et al., 2012; Lee et al., 2012). Les ESCRT-III se polymérisent sous forme de filaments hélicoïdaux associés de part et d'autre de la membrane du midbody et sont continuellement remodelés par VPS4 afin de refermer le pont cytoplasmique entre les deux cellules (Goliand et al., 2018; Mierzwa et al., 2017; Schöneberg et al., 2018).

3.2.3 Protéines ESCRT et pathologies

ESCRT et infection : Certains pathogènes sont capables de détourner les protéines de la machinerie ESCRT à leur avantage. C'est notamment le cas d'un grand nombre de virus dont le Papilloma virus ou le Rotavirus qui sont endocytés puis incorporés dans les ILV, ce qui permet leurs libérations dans le cytoplasme (Alfred and Vaccari, 2016; Broniarczyk et al., 2014; Pasqual et al., 2011). D'autres virus comme le HIV, détournent la machinerie ESCRT afin de bourgeonner au niveau de la membrane plasmique (Engelenburg et al., 2014; Morita et al., 2011; Usami et al., 2009). D'autres pathogènes non viraux exploitent aussi les protéines ESCRT pour infecter leur hôte. Des études suggèrent que la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis* serait capable d'inhiber la machinerie ESCRT afin d'altérer la maturation des phagosomes et ainsi favoriser le développement bactérien. Une protéine sécrétée par cette bactérie, la EsxH, se lierait à l'ESCRT-0 HRS et empêcherait la dégradation par le lysosome (Mehra et al., 2013; Philips et al., 2008).

ESCRT et cancer : L'un des composants de la machinerie ESCRT les plus étudiés dans le cancer est TSG101 et fut initialement décrit comme étant un gène suppresseur de tumeur. Son inactivation dans des cellules NIH3T3 provoque des tumeurs métastatiques après une xénogreffe sur des souris *nude* (Li and Cohen, 1996). En accord avec cette étude, l'expression de TSG101 est diminuée dans les cancers du col utérin (Broniarczyk et al., 2010). D'autres études montrent au contraire que des niveaux importants de TSG101 participent au maintien et à la progression tumorale plutôt qu'à son initiation (Oh et al., 2007). Il semble donc que l'expression de TSG101 est fortement modulée dans les cancers et qu'elle pourrait avoir un rôle dans la tumorigénèse. D'autre part, le niveau protéique de HRS est fortement augmenté dans des tissus issus de cancer du côlon, de l'estomac, et du foie (Toyoshima et al., 2007). En ce qui concerne le mécanisme impliqué, HRS participerait positivement à la dégradation de la protéine E-cadhérine, qui est une protéine d'adhésion cellulaire, ce qui impliquerait HRS dans la formation des métastases en favorisant la migration des cellules cancéreuses (Toyoshima et al., 2007). Plus récemment, une étude a montré un lien étroit entre HRS et la voie Wnt/ β -caténine ; l'inhibition de l'expression de HRS favoriserait la mort des cellules qui présentent une augmentation de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Canal et al., 2015). Cette étude

suggère que HRS pourrait être une cible thérapeutique dans certains cancers (Canal et al., 2015).

ESCRT et maladie neurodégénérative : Des études rapportent un rôle des protéines ESCRT dans la forme autosomique dominante des démences fronto-temporales (FTD) observée lors de mutations de la protéine ESCRT-III CHMP2B (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008). Ces mutations causent une perte du domaine C-terminal qui contrôle l'auto-inhibition et l'interaction avec VPS4. De plus, ces mutations perturbent la fusion des endosomes avec les lysosomes et provoquent l'accumulation de protéines caractéristiques de la voie autophagique telle que p62 (Alfred and Vaccari, 2016). Dans la myosite à corps d'inclusion sporadique (sporadic inclusion body myositis : sIBM), qui est une myopathie inflammatoire, des observations en immunohistochimie ont montré la présence de protéines accumulées dont CHMP2B au niveau des vacuoles bordées dans le muscle (Nakamori et al., 2013). De plus, l'observation des coupes de muscle de patient sIBM en immunofluorescence a révélé la présence de TDP-43 phosphorylée pathologique, localisée au même niveau que la protéine CHMP2B accumulée (Nakamori et al., 2013). Ces données pourraient suggérer que l'accumulation de CHMP2B perturberait sa fonction et affecterait des processus cellulaires dont il dépend comme l'autophagie, et induirait l'accumulation de différentes protéines dont la TDP-43 (Nakamori et al., 2013).

4 La protéine HRS

4.1 Introduction

La protéine HRS/HGS pour Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, fut initialement découverte en 1995 comme une protéine de 115kDa phosphorylée après l'ajout de HGF (Hepatocyte growth factor) sur des cultures de cellules (Komada and Kitamura, 1995). Les auteurs suggéraient alors que HRS jouerait un rôle unique et important dans la voie de signalisation des facteurs de croissance. Dans le même temps, son homologue chez la

levure, la protéine VPS27 (Vacuolar sorting protein 27) est montrée comme nécessaire pour le trafic membranaire au niveau des vacuoles (équivalent du système endosomal) (Piper et al., 1995; Stenmark et al., 1996; Vida and Emr, 1995). Par la suite, des études ont montré que HRS était préférentiellement localisée sur les endosomes précoces (Komada et al., 1997; Piper et al., 1995). Ce n'est qu'en 1999 que la souris invalidée pour le gène hrs (HRS KO) a été générée et présente des défauts morphogéniques importants avec une mort précoce à 11 jours de développement (Komada and Soriano, 1999). De plus, les auteurs montrent une importante vacuolisation des tissus en absence de HRS avec une accumulation d'endosomes qui explique les défauts morphogéniques observés chez les embryons (Komada and Soriano, 1999).

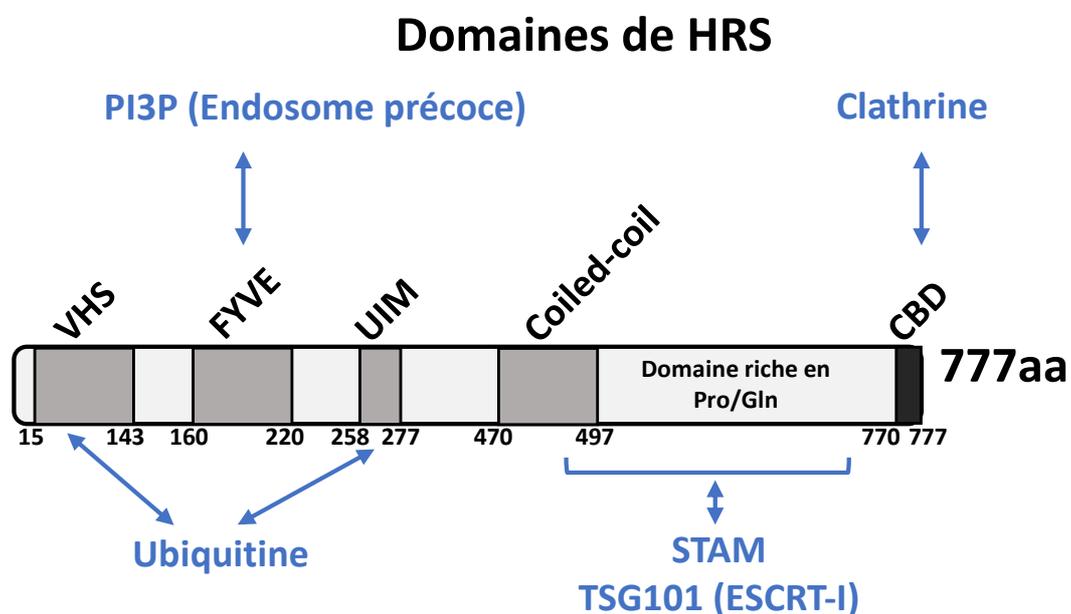


Figure 26: Schéma des différents domaines de HRS (adapté de (Oku et al., 2017).

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate ; VHS : VPS-27, Hrs STAM ; FYVE : Fab-1, YGL023, Vps27 et EEA1 ; UIM : Ubiquitin-Interacting Motif ; CBD: Clathrin Binding Domain.

Plus généralement, HRS est localisé sur le chromosome 17 chez l'humain (*Homo sapiens*) et 11 chez la souris (*Mus musculus*), et possède 21 exons (NCBI). L'ARNm code pour une protéine de 777 acides aminés chez l'homme de 775 acides aminés chez la souris et 622 acides aminés pour VPS27 chez la levure (Uniprot). Le poids moléculaire attendu de HRS est de 86 kDa mais sa détection par des techniques de biochimie comme le *Western Blotting* la révèle

proche de 110 kDa. Au niveau structural, la protéine HRS est composée de domaines distincts (**Figure 26**): Un domaine **FYVE** en doigt de zinc et un domaine coiled-coiled, permettant son interaction avec le inositide PI3P, qui sont distribués essentiellement aux niveaux des endosomes précoces (Komada and Soriano, 1999; Mao et al., 2000; Raiborg et al., 2001b) ; Un domaine **VHS** et un domaine **UIM**, lui permettant d'interagir avec les protéines/cargos ubiquitinés (Bache et al., 2003b; Lohi et al., 2002; Polo et al., 2002; Raiborg et al., 2002; Shekhtman and Cowburn, 2002; Urbé et al., 2003) ; Un domaine **CBD** lui permet de lier la Clathrine, au niveau des endosomes précoces et participerait au regroupement des cargos protéiques ubiquitinés ainsi qu'à l'invagination des membranes (Raiborg et al., 2006, 2002, 2001a; Wenzel et al., 2018). De plus, avec son domaine coiled-coiled, HRS interagit avec le domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) de la protéine STAM1/2, et forme le complexe ESCRT-0 qui initie la formation des ILVs (Asao et al., 1997; Bache et al., 2003b; Endo et al., 2000; Takeshita et al., 1996). La protéine STAM possède aussi des domaines UIM et VHS lui permettant d'interagir avec les cargos ubiquitinés (Endo et al., 2000; Takeshita et al., 1996). Des données récentes montrent que HRS est recruté progressivement au sein de l'endosome précoce reflétant ainsi son rôle dans le regroupement des cargos protéiques ubiquitinés (Wenzel et al., 2018). A l'inverse, le complexe ESCRT-III quant à lui est recruté plus rapidement afin de libérer l'ILV vers la lumière des MVBs (Wenzel et al., 2018).

Les travaux de C.Raiborg et H.Stenmark ont montré que HRS présente une distribution particulière au niveau de l'endosome précoce grâce aux domaines FYVE et CBD, lui permettant d'être localisée dans des micro-domaines spécifiques dépourvus de la protéine EEA1, mais riche en Clathrine (**Figure 27**) (Raiborg et al., 2006). L'absence du domaine CBD de HRS conduit à un recrutement important de la Clathrine et modifie sa localisation sur les endosomes et perturbe la dissociation du complexe ESCRT-0 avec les autres complexes ESCRT (Raiborg et al., 2006; Wenzel et al., 2018). Ces données montrent que HRS est capable de regrouper des cargos ubiquitinés comme l'EGFR au niveau de microdomaines distincts de l'endosome précoce, dépourvus de la protéine EEA1, et qui sont par la suite regroupés plus centralement dans l'endosome (Flores-Rodriguez et al., 2015).

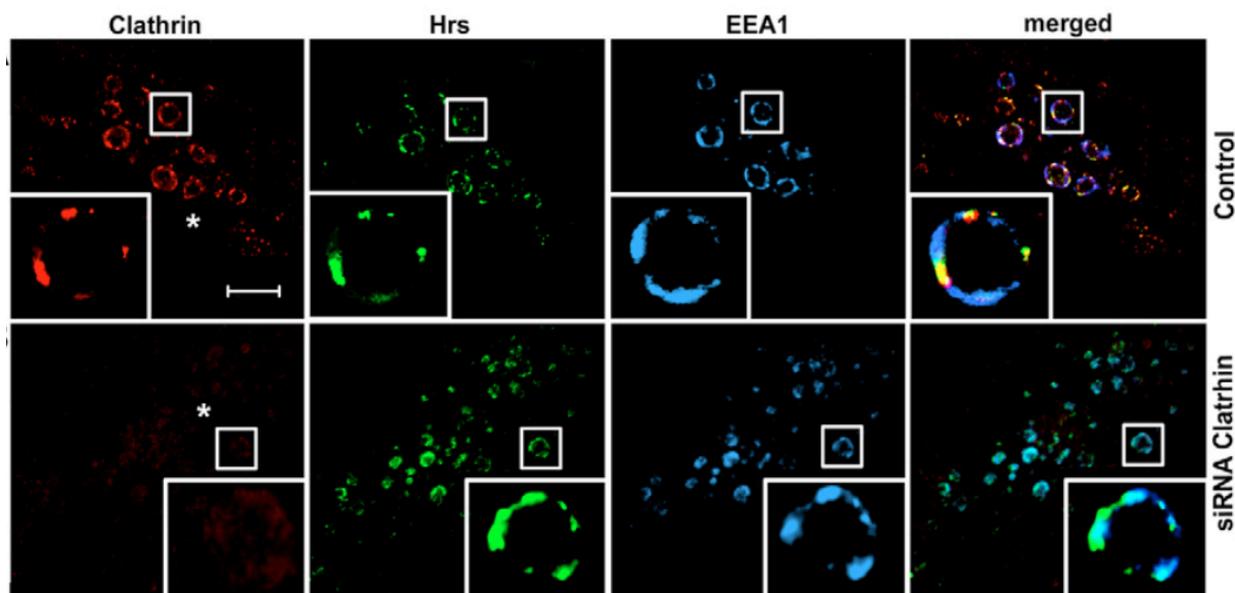


Figure 27: HRS est localisée au niveau de micro-domaines de l'endosome précoce qui ne sont pas marqué pour la protéine EEA1, mais marqué pour la protéine Clathrine.

Immunofluorescence de cellules HeLa co-transfectées avec un plasmide codant pour la protéine mutante Rab5Q79L (permettant d'augmenter la taille des endosomes précoces) et *siARN* ciblant la Clathrine. Les cellules ont été marquées avec les anticorps reconnaissant les protéines endogènes Clathrine, HRS et EEA1. On note que HRS est présent sur des domaines d'endosome précoce qui sont enrichis en Clathrine mais quasiment dépourvus de EEA1, spécifiant des micro-domaines au sein des endosomes précoces où se trouvent HRS et la Clathrine (Raiborg et al., 2006).

La fonction moléculaire de HRS est bien loin de se limiter au regroupement et à la séquestration de cargos protéiques au niveau des endosomes pour former les ILV des MVBs. Il participe aussi à d'autres fonctions cellulaires comme le recyclage de récepteurs membranaires, l'autophagie et le transport du cholestérol (Du et al., 2012; Filimonenko et al., 2007; MacDonald et al., 2018; Tamai et al., 2010; Yan et al., 2005).

4.2 HRS et régulation des protéines membranaires

4.2.1 HRS et régulation des récepteurs membranaires

Comme cité précédemment, l'inactivation du gène *hrs* est létale au stade embryonnaire (Komada and Soriano, 1999). Néanmoins, d'autres modèles ont été développés et utilisés afin

de comprendre son rôle au cours du développement dont notamment chez la drosophile. En 2002, Lloyd *et al.*, ont montré que l'absence de HRS diminuait la dégradation des récepteurs à Torso et à l'EGF, conduisant à une activation plus importante de la voie des MAPK altérant le développement embryonnaire (Lloyd et al., 2002). Dans le même temps, des travaux ont montré dans les larves de drosophile que l'absence de HRS provoquait un grossissement des endosomes précoces au niveau desquelles s'accumulaient des récepteurs et protéines membranaires ubiquitinés (Jékely and Rørth, 2003). Par la suite, des données expérimentales ont montré que l'absence de HRS et de STAM perturbait la voie de signalisation issue du FGFR et de l'EGFR, impactant la migration des cellules lors de l'embryogenèse chez la drosophile (Chanut-Delalande et al., 2010). Globalement, ces études montrent que HRS est essentiel pour la régulation des RTK et des voies de signalisation qui en découlent par la formation des MVB, et participe ainsi au bon déroulement de l'embryogénèse (**Figure 28**) (Chanut-Delalande et al., 2010; Jékely and Rørth, 2003; Lloyd et al., 2002b; Rusten et al., 2011; Sheng et al., 2016; Szymanska et al., 2018; Zhang et al., 2014).

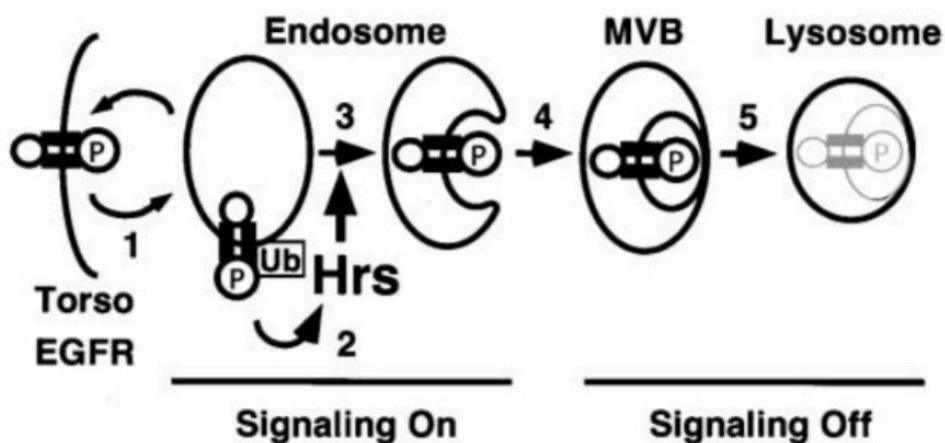


Figure 28: Modèle de la fonction de HRS dans la régulation de RTK.

Après la liaison du ligand sur son récepteur et sa phosphorylation, celui-ci est endocyté puis se retrouve au niveau de l'endosome précoce. Ce récepteur est pris en charge par la protéine HRS, puis les autres protéines ESCRT afin d'être internalisé dans une ILV au niveau des MVBs. Le processus de formation des MVBs par HRS participe à la diminution du signal émis par le récepteurs (Lloyd et al., 2002).

HRS ne contrôle pas uniquement la dégradation des RTK, mais participe également à la régulation de voies de signalisation issues d'autre types de récepteurs membranaires comme

le récepteur du TGF β . HRS coopère avec la protéine SARA (Smad anchor for receptor activation), une autre protéine à domaine FYVE, afin de recruter efficacement Smad2 au niveau du TGF β R et d'induire l'activation de la voie (Miura et al., 2000). De plus, les niveaux d'expression de HRS et de SARA modulent fortement la réponse des cellules T stimulées avec du TGF β , montrant ainsi que la régulation de la voie du TGF β s'opère en présence des deux protéines HRS et SARA (Kunzmann et al., 2003). De surcroît, des expériences *in vivo* montrent que l'absence de HRS diminue la signalisation du BMP, qui est un ligand du récepteur au TGF β (Miura and Mishina, 2011). Également, les auteurs observent que l'absence de HRS diminue la phosphorylation des effecteurs de la voie dont SMAD1, 5 et 8 alors que sa présence permet à TAK1 (TGF β activating kinase 1) d'être localisée au niveau des endosomes précoces afin d'être phosphorylée pour activer la voie du BMP (**Figure 29**) (Miura and Mishina, 2011). Récemment, une étude rapporte le fait que les protéines ESCRT, en plus de HRS, sont également capables de réguler la voie du TGF β (voir partie 2.3.4 de ce manuscrit) (Miller et al., 2018).

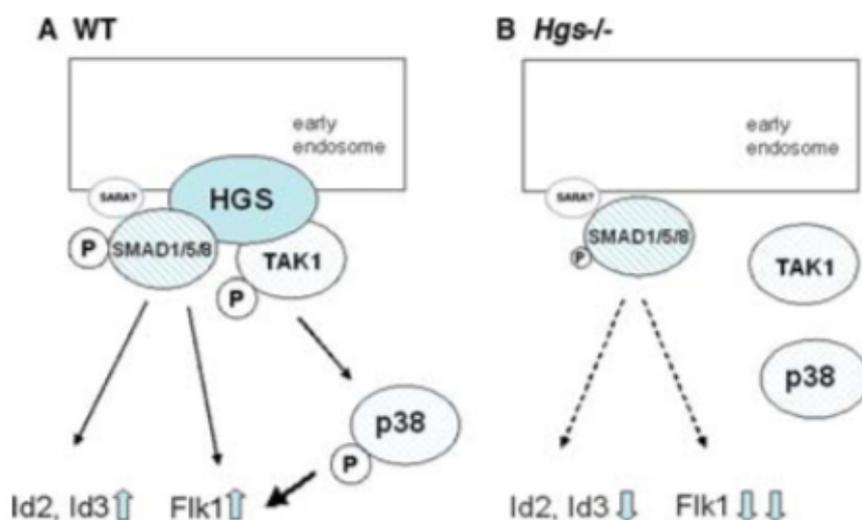


Figure 29 : Modèle proposé pour la régulation de la voie du BMP par HRS

HRS est capable de lier TAK1 au niveau des endosomes précoces afin qu'il soit phosphorylé et activé. Son activation conduit à la phosphorylation de p38 et à l'activation de gènes cibles comme Flk1. Il est à noter que HRS joue aussi sur l'activation des protéines SMAD1/5/8 (Miura and Mishina, 2011).

La voie Wnt est impliquée dans de nombreux mécanismes dont l'embryogenèse et la réparation musculaire (Girardi and Le Grand, 2018). En 2010, Taelman *et al*, propose un nouveau mécanisme dans lequel les protéines HRS et VPS4, seraient au centre de la régulation de cette voie de signalisation en séquestrant la protéine GSK3 dans les ILVs des MVBs (**figure 30**) (Taelman et al., 2010). Après l'activation du récepteur de la voie Wnt (formé du complexe Axin, Dvl et Fz) et la liaison du complexe de destruction de la β -caténine dont la GSK3b fait partie, l'ensemble est endocyté et arrive au niveau de l'endosome précoce. A ce stade, le complexe de destruction est toujours actif ; il empêche la stabilisation de la β -caténine et son accumulation dans le noyau. L'action successive de la protéine HRS et de la protéine VPS4 permettent d'internaliser le complexe de destruction dans une ILV dans laquelle la GSK3 se trouve séquestrée et ne peut plus phosphoryler ses cibles cytosoliques dont la β -caténine (**Figure 28**) (Taelman et al., 2010). Ces données ont été confirmées *in vitro* et *in vivo*.

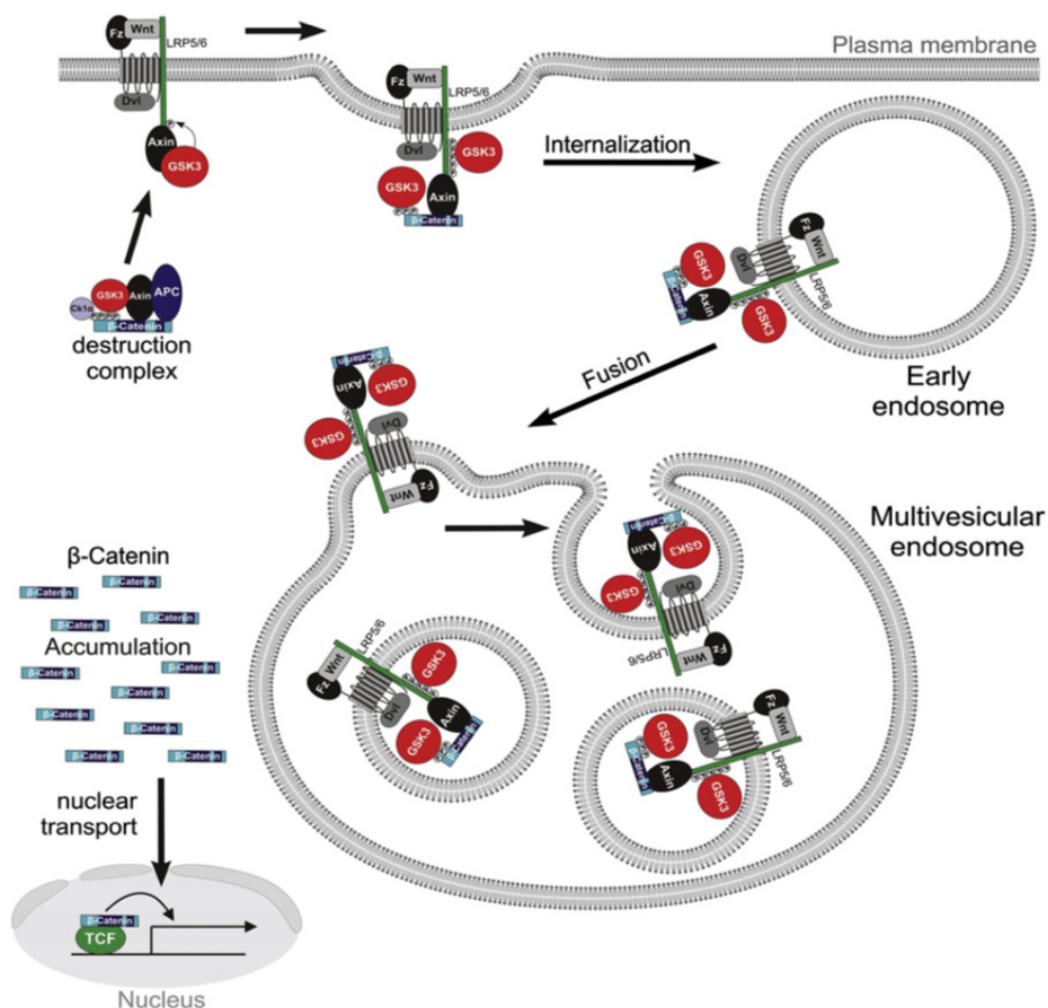


Figure 30: Schéma présentant la régulation de la voie Wnt et la séquestration de la GSK3 β .

L'activation de la voie Wnt ainsi que la liaison du complexe de destruction contenant la GSK3 β au récepteur Wnt (incluant phospho-LRP6, phospho- β -caténine, Dvl, Axin et APC) permet la séquestration de la GSK3 β dans une ILV des MVBs et favorise la stabilisation de multiples protéines cytosoliques dont la β -caténine (Taelman et al., 2010).

Il est à noter tout de même que le mécanisme proposé par Taelman *et al*, ne fait pas consensus. Effectivement, une étude montre que l'absence de HRS favoriserait au contraire l'expression de cibles de la voie Wg (Wnt-Wingless) chez la drosophile (Seto and Bellen, 2006). D'autres travaux suggèrent que la régulation de la voie Wnt par l'endocytose se ferait vraisemblablement en aval de l'activation du récepteur et serait indépendante de la GSK3 (Gagliardi et al., 2014). Ainsi, les auteurs proposent que l'endocytose participe plutôt à la modulation de la disponibilité en β -caténine. Pour l'instant, le mécanisme exact de cette régulation n'a pas encore été élucidé (Gagliardi et al., 2014). Plus récemment, une étude a montré que l'absence de HRS dans des cellules HeLa n'affectait pas le niveau protéique de la β -caténine que ce soit en présence ou en absence de Wnt3a pour activer la voie (Munthe et al., 2020). Ces données contradictoires sur le rôle de HRS dans la régulation de la voie Wnt, et plus globalement sur le rôle de l'endocytose, montrent bien que le processus d'inhibition de la GSK3 est complexe et que selon le modèle d'étude utilisé, les résultats peuvent être différents.

4.2.2 HRS et autres protéines membranaires

Protéine d'adhésion :

Outre la fonction de HRS dans la régulation des récepteurs membranaires, des travaux ont montrés dans le modèle cellulaire HeLa que son absence conduisait à une accumulation cytoplasmique et membranaire de la E-cadherine, provoqué par une inhibition de la dégradation par la voie endo-lysosomale (Toyoshima et al., 2007). De plus, la β -caténine qui interagit avec l'E-cadherine, se trouve dans ce cas fortement associée et piégée au niveau de la membrane plasmique, ce qui inhiberait sa fonction de facteur de transcription (Toyoshima et al., 2007). D'autres études confirment l'importance de HRS dans la régulation et la localisation de l'E-cadherine, qui participe au processus de tumorigenèse et qui est associé à une capacité migratoire plus importante des cellules (Toyoshima et al., 2007; Ye et al., 2012). L'absence de

HRS perturbe également le recyclage de la VE-cadherin (Vascular endothelial) qui est nécessaire à l'établissement de la polarité des cellules endothéliales et à la formation des capillaires sanguins dans le cerveau des souris (Yu et al., 2020).

Réponse immunitaire médiée par les TLRs:

Comme décrit précédemment, certains pathogènes utilisent la voie d'endocytose afin de pénétrer dans la cellule (Mehra et al., 2013; Philips et al., 2008). Ils activent alors des signaux d'alarmes de la cellule comme les protéines TLR (Toll like receptor) dont certaines trafiquent via le système endosomal. HRS participe à l'acheminement du TLR9 et TLR7 vers la voie endosomale de manière dépendante à l'ubiquitine, et régule ainsi les voies de signalisation associées comme la voie du NFκB (Chiang et al., 2012). Certains polluants contenus dans l'air sont aussi capables de potentialiser l'activation des TLR, dont le vanadate (composé inorganique). Il semblerait que cet effet soit provoqué par une augmentation de la phosphorylation de HRS, induisant une diminution de la dégradation du TLR4 et une augmentation de la signalisation de la voie MAPK-ERK (Zelnikar et al., 2014). Plus récemment, afin de mieux caractériser le mécanisme d'entrée dans la cellule de l'entérovirus 71 (EV71 ; virus à ARN), une étude a montré que le niveau protéique de HRS, et du TLR7 était augmenté que ce soit chez les patients, dans les souris ou dans les cultures cellulaires infectées par le virus EV71. Dans ces conditions expérimentales, HRS participerait à la réponse inflammatoire en favorisant l'interaction du virus avec le TLR7 au niveau des endosomes précoces et tardifs et contribuerait aussi à la régulation des voies MAPK-p38 et NFκB afin de produire des cytokines pro-inflammatoires (Luo et al., 2017). Globalement, ces études montrent que HRS est un facteur essentiel dans la réponse immunitaire médiée par les TLRs en régulant leur localisation, dégradation et leurs voies de signalisation en aval.

Afin de déterminer avec quelles protéines ubiquitinées HRS interagit, une étude protéomique centrée sur le domaine UIM de HRS a montré une interaction entre ce domaine et 48 autres protéines (Pridgeon et al., 2009). Parmi elles, nous pouvons citer la protéine APP (Amyloid precursor protein) qui est impliquée dans la maladie d'Alzheimer, la tubuline qui est une protéine du cytosquelette, ou bien la protéine OSBPL5/ORP5 (Oxysterol-binding protein-like protein 5) qui joue un rôle dans le transport des lipides dont le cholestérol (Pridgeon et al., 2009). Ces données soulignent l'importance qu'a HRS dans la régulation de différents

processus cellulaires en interagissant avec différentes protéines ubiquitinés (Pridgeon et al., 2009)

4.3 Les fonctions non canoniques de HRS

Nous l'avons vu dans la partie précédente, HRS régule la dégradation de différents récepteurs et protéines membranaires ubiquitinés ; elle participe de ce fait à la régulation des voies de signalisation qui y sont associées. Cependant, HRS est aussi impliqué dans la régulation d'autres processus cellulaires comme l'autophagie, le transport du cholestérol et le recyclage de protéines membranaires (Du et al., 2012; Filimonenko et al., 2007; Hanyaloglu et al., 2005; Oshima et al., 2016; Yan et al., 2005). Les mécanismes mis en jeu par HRS dans la régulation de ces processus sont quelque peu différents de son rôle canonique dans la séquestration des cargos protéiques ubiquitinés au niveau des endosomes.

4.3.1 HRS et le recyclage de protéines membranaires

En 2005, l'étude de Yan et al., met en lumière une nouvelle fonction de HRS dans le recyclage du récepteur à la transferrine (TfR) qui diffère de son rôle dans la régulation et la dégradation de l'EGFR. Ainsi, les auteurs ont montré que HRS forme un complexe avec l'actinine-4, BERP/TRIM3, et la myosine V, nommé CART (cytoskeleton associated recycling or transport) et interviendrait, de manière dépendante à l'actine, dans le recyclage rapide de certaines protéines membranaires (**Figure 31**) (Yan et al., 2005). Les auteurs suggèrent alors l'existence d'une voie de recyclage dépendante de HRS et du réseau d'actine mais indépendante des endosomes de recyclage et du réseau de microtubules (Yan et al., 2005). Dans le même temps, le groupe de M.V. Zastrow a montré que HRS était nécessaire au recyclage de deux récepteurs couplés aux protéines G, le β 2ADR (β 2 adrenergic receptor) et le μ OR (μ opioid receptor) (Hanyaloglu et al., 2005). Les auteurs soulignent l'importance de la protéine HRS et de son domaine VHS dans la prolongation du signal émis par les récepteurs qui sont recyclés (dont le β 2ADR). Cette fonction étant à l'opposé de son rôle dans l'atténuation des signaux issus de récepteurs à dégrader par la voie endo-lysosomale comme décrit précédemment (Hanyaloglu et al., 2005). HRS présente donc une double fonction et

contrôle le devenir de certains récepteurs membranaires selon que ces récepteurs sont ou non ubiquitinés (Hanyaloglu et al., 2005). Il est à noter que dans cet article, la fonction de HRS a été suivie en la surexprimant dans les cellules, ce qui a créé un dominant négatif et une perte de fonction. Cette fonction de HRS dans le recyclage du β 2ADR, fut aussi confirmée plus tard pour le récepteurs TrkB, identifiant ainsi une voie de recyclage spécifique contrôlée par la protéine HRS (Hanyaloglu and von Zastrow, 2007; Huang et al., 2009).

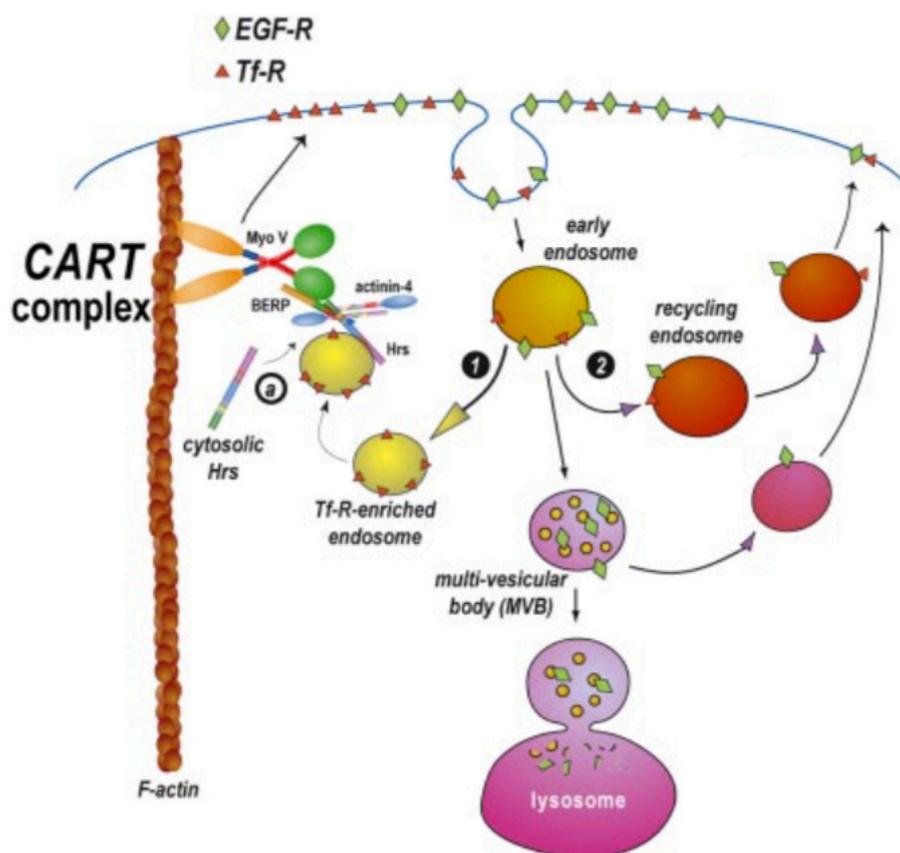


Figure 31: Modèle impliquant HRS dans le recyclage du récepteur à la transferrine.

HRS en se liant à l'Actinine 4 est capable de former un complexe avec BERP et la Myosine V (complexe CART) afin de recycler rapidement les vésicules contenant le récepteur à la transferrine (Yan et al., 2005).

Plus récemment, MacDonald *et al.*, ont rajouté un niveau de complexité au rôle de HRS dans le recyclage en montrant qu'il était nécessaire au recrutement, de la protéines WASH (Wiscott-Aldrich syndrome protein and SCAR homologue) sur les endosomes précoces de façon indirecte (MacDonald et al., 2018). La protéine WASH est alors capable d'induire la polymérisation de l'actine et le recyclage des récepteurs possédant une séquence de liaison à

l'actine. De plus, l'ajout d'une séquence exogène de liaison à l'actine au récepteur membranaire possédant un site d'ubiquitination est suffisant pour induire son recyclage et contrecarre sa dégradation par le système endo-lysosomal (MacDonald et al., 2018). De ce fait, HRS recrute la protéine WASH au niveau des endosomes, ce qui permet le recyclage des récepteurs de manière actine dépendante et la dégradation des récepteurs ubiquitinés (MacDonald et al., 2018).

Pour conclure ce paragraphe, il semble qu'HRS se comporte comme une protéine d'échafaudage, contenant en son cœur, le domaine VHS qui forme une « superhlice » de 8 hélices α (Mao et al., 2000), ainsi que le domaine FYVE. Cet ensemble serait capable d'interagir avec des protéines dont l'Actinine-4 afin de recycler certaines protéines/récepteurs membranaires. Effectivement, une étude montre que HRS est impliquée dans le recrutement de l'Actinine-4 et de ROCK1 (Rho associated protein kinase 1) à la membrane plasmique des cellules lors de l'infection par le virus KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) (Veettil et al., 2016). Cette étude est la seule à montrer une forte localisation de HRS à la membrane plasmique et souligne sa fonction d'intermédiaire structural indépendante du processus de recyclage (Veettil et al., 2016).

4.3.2 HRS et régulation du cholestérol

Du et al., furent les premiers à montrer un rôle direct de HRS dans la régulation du cholestérol qui transite par les voies endosomales (Du et al., 2012). L'absence de HRS, contrairement à celles des ESCRT-I TSG101 ESCRT-II EAP20 et ESCRT-III CHMP6, provoque l'accumulation de cholestérol au niveau des endosomes tardifs exprimant par la protéine Lamp1, au même titre que l'absence du transporteur NPC1 (**Figure 32**). Brièvement, NPC1 et NPC2 sont deux protéines impliquées dans la sortie du cholestérol des endosomes tardifs/Lysosomes (LE/Ly). NPC2 est une protéine soluble qui lie le cholestérol et qui est localisée dans le lumen des lysosomes alors que NPC1 est une protéine membranaire localisée dans la membrane des lysosomes et permet le transfert du cholestérol de NPC2 vers la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique (Kwon et al., 2009). Des mutations de NPC1 ou NPC2 conduisent à la pathologie de Niemann Pick type C caractérisée par l'accumulation de cholestérol non estérifié dans LE/Ly (Carstea et al., 1997; Naureckiene et

al., 2000). L'absence de HRS inhibe le transport du cholestérol vers le RE mais n'impacte pas la localisation de NPC1 et de NPC2, suggérant un rôle à part entière de HRS dans le transport du cholestérol (Du et al., 2012). Cette nouvelle fonction particulière de HRS pourrait être attribuée au fait qu'il interagit avec de nombreux acteurs protéiques, dont la protéine ORP5 (Pridgeon et al., 2009). ORP5 est une protéine qui est majoritairement localisée au niveau du RE et permet le transport du cholestérol depuis le LE/Ly vers le RE (Du et al., 2011). Son absence conduit à l'accumulation de cholestérol au niveau de la membrane des LE/Ly (Du et al., 2011). Puisque ORP5 interagit avec HRS, on peut alors imaginer que l'absence de HRS affecte la localisation de ORP5 au niveau des LE/Ly et induise l'accumulation de cholestérol. Néanmoins, cette hypothèse n'a pas encore été démontrée.

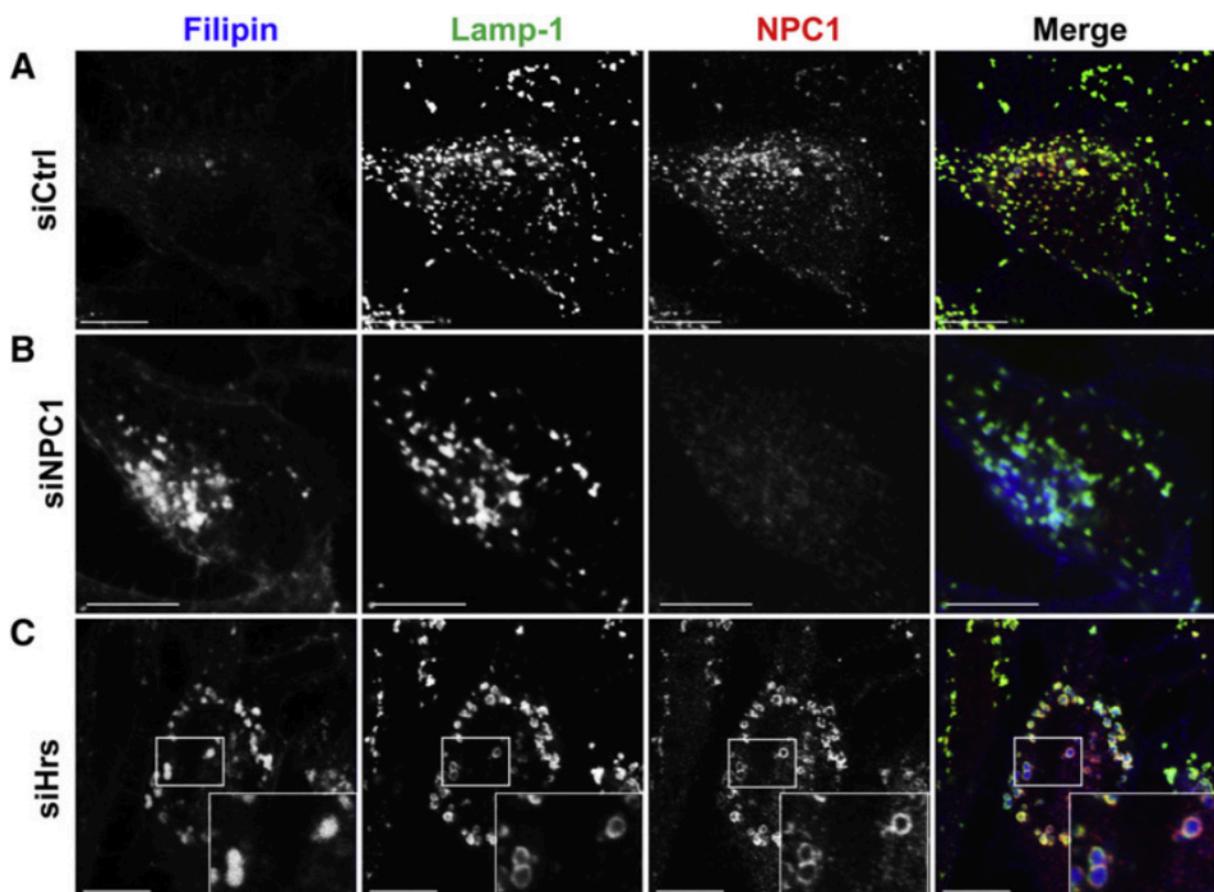


Figure 32: L'absence de HRS provoque l'accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs/Lysosomes.

L'absence de HRS et de NPC1 induit une accumulation de cholestérol mis en évidence avec un marquage par la Filipin dans le lumen des endosomes tardifs/Lysosome lui-même identifié par la présence de la protéine Lamp1 (Du et al., 2012).

4.3.3 HRS et régulation de l'autophagie

En 2007, Filimonenko et al, ont montré que l'absence des protéines HRS, TSG101, EAP30 (ESCRT-II) et CHMP3 (ESCRT-III) provoquait l'accumulation d'ubiquitine au niveau des endosomes tardifs/lysosomes dans la lignée cellulaire HeLa (Filimonenko et al., 2007). Cet article, qui est articulé autour de TSG101, montre que son absence provoque aussi l'accumulation et l'agrégation de p62 et LC3-II, qui sont des marqueurs de l'autophagie. De plus, l'absence de TSG101 provoque aussi l'accumulation de la protéine TDP43 qui est impliquée dans la Sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Filimonenko et al., 2007). Dans le même temps, Tamai et al., ont montré que HRS, était localisée au niveau des autophagosomes grâce à son domaine FYVE et que son absence n'impactait ni la formation des autophagosomes, ni la fonction des lysosomes mais diminuait la maturation des autophagosomes (Tamai et al., 2007). Par la suite, un modèle murin fut généré dans lequel HRS a été spécifiquement inhibé dans les neurones pour mimer le développement de pathologies neurodégénératives (Tamai et al., 2008). L'analyse de l'hippocampe de ces souris a montré une augmentation de la mort des neurones pyramidaux par apoptose, avec une accumulation de protéines ubiquitinés ainsi que des marqueurs de l'autophagie comme p62, traduisant ainsi un défaut dans le processus d'autophagie (Tamai et al., 2008). Une étude plus approfondie de ce modèle, réalisé en 2016, a montré que l'absence de HRS dans les neurones de l'hippocampe était accompagnée par l'accumulation de protéines neurodégénératives comme l' α -Synucléine, la TDP-43 et la protéine mutante Huntingtin qui sont toutes les trois retrouvées dans des pathologies neurodégénératives (Oshima et al., 2016). De plus, les données expérimentales ont montré que l'absence de HRS dans la lignée cellulaire PC12 (mélange de cellules neuroblastiques et d'éosinophiles) affecte négativement les étapes tardives de l'autophagie, provoquant ainsi une augmentation de la signalisation des voies JNK et RIPK1, induisant la mort par apoptose et nécroptose (Oshima et al., 2016).

D'autres études impliquent aussi VPS27 dans la micro-autophagie chez la levure. Des données expérimentales ont montré que VPS27 était nécessaire à l'inhibition de mTORC1 et à l'induction de la micro-autophagie (Rahman et al., 2018). Cette fonction de VPS27 semble nécessiter une interaction avec la Clathrine (Oku et al., 2017).

Pour résumer, HRS participerait au processus d'autophagie en jouant sur la maturation des autophagosomes et permettrait ainsi la dégradation de différentes protéines comme la TDP-43, la Hungtintin, l' α -Synucléine (Filimonenko et al., 2007; Oshima et al., 2016; Tamai et al., 2008). De ce fait, son absence ou sa perte de fonction pourrait être à l'origine, ou bien participer activement, à la mise en place de certaines maladies neurodégénératives/prionopathies telles que la SLA, la maladie d'Alzheimer, des synucléinopathies, ou encore la maladie du prion (Vilette et al., 2015).

4.4 Régulation post-transcriptionnelle de HRS

L'activité et la stabilité de HRS sont régulées par son état de phosphorylation et d'ubiquitination :

La phosphorylation : Suite à l'ajout de facteurs de croissance tels que le HGF ou l'EGF sur des cultures de cellules, HRS est rapidement phosphorylée (Bache et al., 2002; Komada and Kitamura, 1995; Urbé et al., 2000). Plusieurs parties de HRS sont phosphorylées dont le domaine UIM, ainsi que les tyrosines 329 et 334 suite à l'activation de l'EGFR, mais représentent globalement un faible pourcentage de HRS phosphorylée (Row et al., 2005; Stern et al., 2007). La phosphorylation de HRS sur ces résidus semble être orchestrée par des protéines kinases qui se trouvent en aval des récepteurs RTK et permettrait la dissociation de HRS des endosomes précoces (Bache et al., 2002; Haugen et al., 2017; Stern et al., 2007). Chez la levure, les kinases PhK1/2 phosphorylent directement HRS sur sa serine 613 et participent au recrutement de la protéines ESCRT-I VPS28 sur les membrane endosomales (Morvan et al., 2012). Également, les mutations des tyrosines 329 et 334 de HRS inhibent la dégradation de l'EGFR, mais les voies de signalisations en aval n'ont néanmoins pas été analysées pour vérifier une potentielle altération (Stern et al., 2007). Concernant la stabilité de HRS, des études révèlent que la phosphorylation de VPS27/HRS par le complexe mTOR empêche sa dégradation par le protéasome (Dobzinski et al., 2015). De plus, lorsque les cellules sont mises dans un milieu de culture pauvre en nutriments ou que mTOR est inhibé avec de la Rapamycine, le niveau protéique de HRS chute, mais est partiellement restauré par l'ajout d'inhibiteurs du protéasome comme le MG132 (Dauner et al., 2017). Ces données expérimentales montrent que HRS est potentiellement phosphorylé par mTOR et que sa

stabilité et sa dégradation sont régulées par le protéasome (Dauner et al., 2017; Dobzinski et al., 2015).

Ubiquitination : HRS est mono-ubiquitiné sur son domaine UIM, ce qui a pour effet de diminuer son interaction avec les cargos ubiquitinés et leurs dégradations (Hoeller et al., 2006; Polo et al., 2002). L'ubiquitination de HRS est réalisée entre autres par la protéine Rsp5. L'inhibition de cette dernière ne semble pas impacter la biogénèse des MVBs (Stringer and Piper, 2011). D'autre part, la desubiquitinase AMSH est recrutée au niveau des endosomes précoces et entraîne la desubiquitination de HRS, favorisant le transport endosomal du récepteur CXCR4 (Sierra et al., 2010). Au niveau du complexe ESCRT-0, STAM est capable de lier et d'activer des desubiquitinases, grâce à son domaine SH3, ce qui suggère un possible circuit de régulation de l'état d'ubiquitination de HRS (McCullough et al., 2006; Sierra et al., 2010). Néanmoins, les fonctions exactes de l'ubiquitination de HRS, dans son domaine UIM ou bien sur d'autres parties de HRS restent encore mal comprises et nécessitent d'être mieux caractérisées.

Pour conclure sur le chapitre dédié à la protéine HRS, nous avons vu qu'elle régule de nombreux mécanismes dont la dégradation des récepteurs membranaires et agit ainsi sur les voies de signalisation associées. Elle participe au recyclage de protéines membranaires, assure le maintien de l'homéostasie du cholestérol et est actrice du processus d'autophagie (**Figure 33**). Or l'ensemble de ces voies cellulaires sont essentiels au bon déroulement de la myogénèse. De ce fait, HRS semble être un candidat dans la régulation de la myogénèse. La réponse à cette question constitue le cœur de mon projet de thèse.

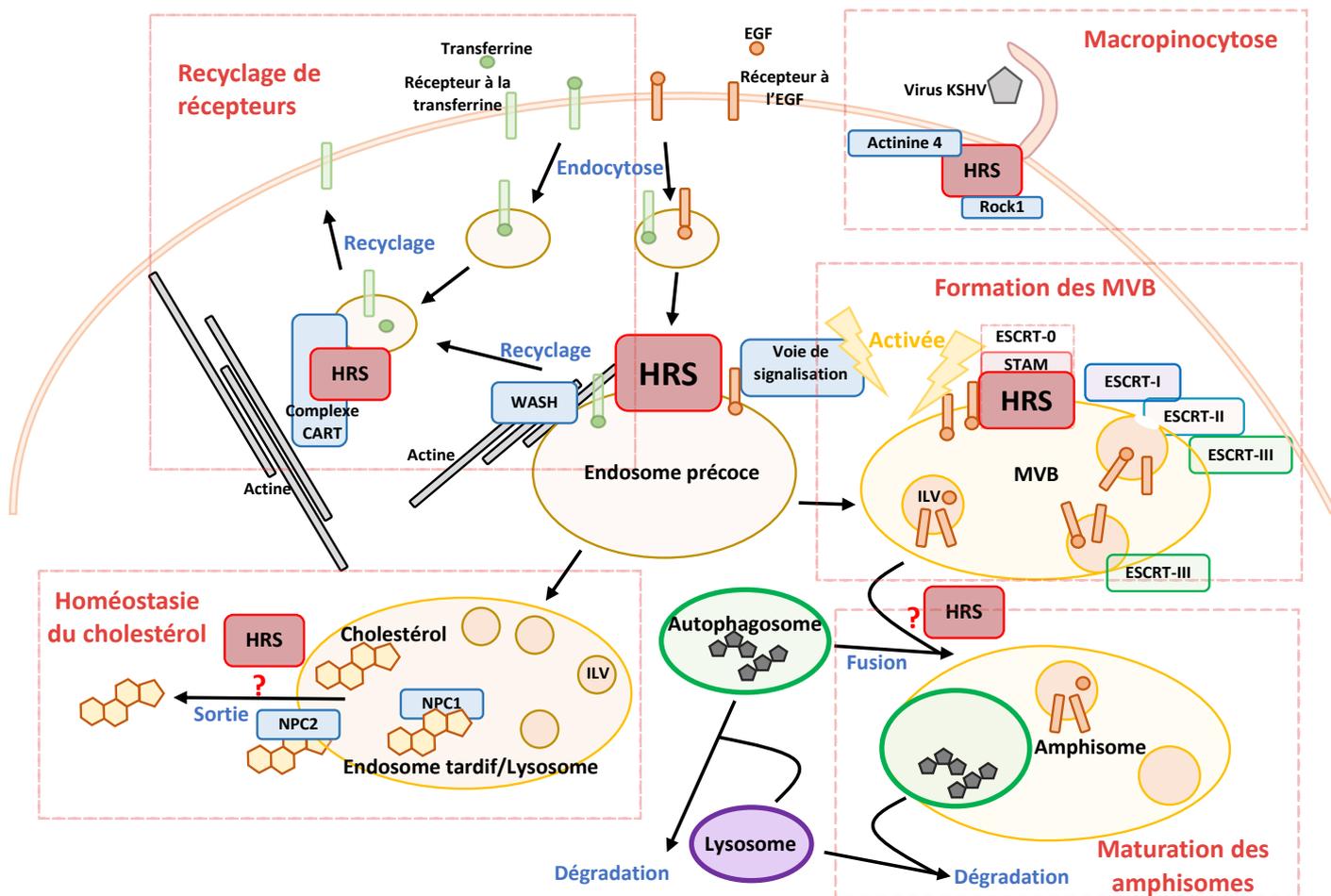


Figure 33: Schéma résumant les grandes fonctions de HRS.

Les fonctions de HRS sont notées en rouge. Inspiré de (Bache et al., 2003b; Christ et al., 2017; Du et al., 2012; MacDonald et al., 2018; Oshima et al., 2016; Raiborg et al., 2006; Tamai et al., 2008, 2007; Veettil et al., 2016; Vietri et al., 2020b; Wenzel et al., 2018; Yan et al., 2005)

SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE

Lors d'un effort physique, les muscles subissent des contraintes mécaniques qui peuvent conduire à des blessures. Afin de réparer les fibres du muscle lésé, un processus de régénération va se mettre en place. Il fait appel aux cellules satellites qui vont séquentiellement s'activer, proliférer, se différencier puis fusionner entre elles pour donner des structures multi-nucléées appelées myotubes et ainsi réparer la fibre musculaire (Zanou and Gailly, 2013). Ces différentes étapes constituent la myogenèse et sont rendues possibles grâce au remodelage des composants protéiques et lipidiques de la membrane plasmique des cellules lors de la différenciation et grâce à l'activation et l'inhibition de récepteurs membranaires spécifiques tel que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Hindi et al., 2013). L'activation de ces récepteurs provoque en aval, la mise en place de voies de signalisation telles que la voie des MAPK ou bien la voie PI3K/AKT, qui orchestrent les différentes étapes de la myogenèse (Knight and Kothary, 2011). La régulation de l'activation des récepteurs membranaires passe en outre par leur endocytose, et par leur temps de résidence au niveau des endosomes (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Irannejad et al., 2015). A ce niveau, l'action successive des protéines de la machinerie ESCRT va permettre d'internaliser les récepteurs activés dans une vésicule dite intra-luminal et former progressivement le corps multi-vésiculaire (Henne et al., 2011). Dès lors, le récepteur n'est plus actif car il est privé de ses partenaires et cibles cytosoliques. Des mutations dans des protéines clés de la voie endosomale peuvent conduire à des défauts d'acheminement de ces récepteurs et ainsi maintenir ou bien inhiber les voies de signalisation qui en découlent (Maxfield, 2014; Rusten et al., 2011; Szymanska et al., 2018).

Les voies de signalisation impliquées dans la myogenèse, ainsi que les récepteurs associés commencent à bien être décrits, cependant, leur régulation par les protéines de la voie endo-lysosomale reste quant à elles moins définies. Dans ce contexte, nous avons voulu mieux comprendre le rôle de ces protéines, en nous focalisant sur la machinerie ESCRT et plus particulièrement sur la protéine ESCRT-0 HRS. Par ailleurs, quelques études préliminaires nous ont aussi confortés dans le choix de cette protéine pour notre étude. Tout d'abord, HRS est la première protéine du complexe ESCRT à intervenir dans le mécanisme de formation des MVBs, faisant d'elle une protéine incontournable dans ce processus. D'autre part, l'expression

de l'homologue de HRS chez le rat, GEF-1 (galactosylceramide expression factor-1) dans des lignées cellulaires autres que musculaires, induit l'expression de facteurs myogéniques (Ogura et al., 2004). De surcroît, l'extinction de l'expression de HRS dans les muscles lisses de souris perturbe leur contraction, diminue leur taille et provoque une forte inflammation (Chen et al., 2015). Pour finir, la déplétion en cholestérol des membranes des myoblastes de poulet, qui favorise leur différenciation, augmente l'expression de l'ARNm de HRS (Ana C. B. Possidonio et al., 2014). Toutes ces données justifient notre intérêt à mieux comprendre et définir le rôle de HRS dans la myogenèse.

Dans cet objectif, nous avons étudié la fonction de HRS durant le processus de différenciation ainsi que l'effet de son inhibition sur la myogenèse. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles cellulaires de myoblastes de souris C2C12 ainsi que des cultures primaires de souris et humaine. Nos résultats expérimentaux mettent en évidence que HRS est essentielle au bon déroulement de la myogenèse et suggèrent un rôle multimodal dans ce processus. La partie suivante du manuscrit présentera l'article issu de mes résultats qui en cours d'écriture. Également, je vous présenterai des données supplémentaires que nous avons obtenue et qui ont participé à notre réflexion.

PUBLICATION 1

HRS/HGS ESCRT-0 is a master regulator of muscle myogenesis by controlling different signaling pathways.

Coudert L, Osseni A, Gangloff YG, Schaeffer L and P. Leblanc (en preparation)

**HRS/HGS ESCRT-0 is a master regulator
of muscle myogenesis by controlling different signaling pathways**

Coudert L.¹, Osseni A.¹., Gangloff YG.¹, Schaeffer L.¹. and P. Leblanc.^{1*}

1 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 09, France.

*Corresponding author, pascal.leblanc@univ-lyon1.fr

Keywords : ESCRT ; HRS/HGS ; Myogenesis ; Signaling pathway; TSG101; Myoblast; Myotube; differentiation; skeletal muscle.

Abstract

Myogenesis is a complex and tightly regulated process ending with the formation of a multinucleated myotube fibers. Differentiation of myoblasts into myotubes is controlled by several myogenic transcription factors that act as terminal effectors of signaling cascades and produce specific transcripts in stage, time and place to ensure the efficient differentiation process. Here we show that HRS/HGS ESCRT-0 is dynamically expressed and distributed during myogenesis thus suggesting a key role during differentiation. We found that silencing of HRS strongly inhibits the differentiation into myotubes in murine and human cellular models. Mechanistically, our data revealed that HRS differentiation defect was associated with activation of MEK/ERK and the GSK3 β myogenesis negative regulators that collectively negatively altered myogenic transcription factors. Similarly, we also observed that HRS silencing impaired the autophagic flux thus correlating well with previous published data stating that efficient autophagic process is required during myoblast differentiation.

In conclusion, we found that HRS is a master regulator that controls myogenesis at different levels through the modulation of important key cellular mechanisms involved in trafficking, signaling and degradation.

Introduction

Differentiation of myoblasts into myotubes is a tightly concerted and highly regulated process that starts from the binding of a large variety of extracellular ligands (cytokines, growth factors) to their surface membrane receptors and the presence of cell-cell contacts that collectively engage different downstream signaling cascades (Hindi *et al*, 2013; Knight & Kothary, 2011). This is followed by activation/repression of several terminal myogenic transcription factors (MRFs) such as MyoD that acts together with Myogenin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) that drive specific expression of myogenic proteins in stage, time and place to ensure the efficient initiation and progress of the differentiation (Asfour *et al*, 2018; Zammit, 2017; Knight & Kothary, 2011; Hernández-Hernández *et al*, 2017). Once realized, myoblasts enter the myogenic differentiation program to become post mitotic myocytes that, after a cell to cell fusion process form multinucleated structures called myotubes with contractile capabilities.

Many signaling surface receptors including growth factor receptor tyrosine kinases (RTKs), Toll receptors (TLRs), TGF beta receptors (TGFR) or G protein coupled receptors (GPCRs) have been shown to positively or negatively control myogenesis (reviewed in Hindi *et al*, 2013). All of these ligand-receptors and their associated signaling pathways must be thinely controlled during myogenesis to allow a precise spatial and temporal expression and/or repression of MRFs needed for the muscle fibers formation (reviewed in Knight & Kothary, 2011).

To attenuate responsiveness to extracellular ligand, cells implemented strategies based on the endocytosis of ligand-activated receptors and their redirection to endosomes or endo-lysosomal compartments. In this context, early endosomes compartments became crucial sorting stations able to determine short or long-term cellular signaling responsiveness through different pathways such as degradation, recycling, scaffolding, sequestration or catalysis (reviewed in (Irannejad *et al*, 2015a). The molecular and cellular mechanisms as well as the trafficking machineries involved in this process are complex and understanding their role in the

myogenesis regulation is currently gaining momentum. However, until today, only few studies investigated the control of myogenesis through the regulation of the intracellular trafficking of compartments like early/late and recycling endosomes, lysosomes or compartments linked to the autophagy (Singh & Kumar Roy, 2013; Comunale *et al*, 2007; Bhui & Roy, 2009; Cong *et al*, 2020; Isobe *et al*, 2018; Vassilopoulos *et al*, 2014; Shin *et al*, 2014; McMillan & Quadrilatero, 2014; Sakane & Akasaki, 2018).

The ESCRT machinery is conserved from yeast to mammals and plays key roles in different normal and pathological contexts (Henne *et al*, 2011; Vietri *et al*, 2019; Saksena & Emr, 2009; Rusten *et al*, 2012). In physiological conditions, the ESCRT machinery is involved in essential cellular process including membrane abscission during cytokinesis, macro- and micro-autophagy, plasma and nuclear membranes remodeling and repair, endosomal sorting of ubiquitinated proteins, intra luminal vesicles (ILVs) formation/multivesicular endosomes-bodies (MVEs/MVBs) biogenesis and exosomes or microvesicles budding and release (reviewed in (Vietri *et al*, 2019)). Different studies also highlighted that ESCRT machinery can modulate signaling pathways mediated through different receptors such as RTKs like the epidermal and hepatocyte growth factor (EGFR, HGFR respectively), TLRs or some GPCRs (reviewed in (Wegner *et al*, 2011; Dobrowolski & De Robertis, 2012; Szymanska *et al*, 2018; Irannejad *et al*, 2015b)).

The ESCRT machinery is composed of approximatively 20 proteins assembled into four distinct heteromeric protein subcomplexes named ESCRT-0, I, II and III according to their chronological involvement in sorting ubiquitinated cargos into MVBs (reviewed in (Babst, 2005; Vietri *et al*, 2019)). In brief, ubiquitinated cargo proteins are first recruited by the ubiquitin binding HRS/HGS (Hepatocyte Growth Factor regulated tyrosine kinase substrate) ESCRT-0 complex to the early endosomes through the binding of HRS FYVE region to clathrin positive phosphatidyl inositol 3 phosphate (PtdIns3P/PI3P) domains on early endosomes. The HRS

complex then recruits ESCRT-I through TSG101 (Tumor susceptibility gene 101) that also binds ubiquitinated proteins. TSG101 recruits ESCRT-III via ESCRT-II or the accessory AIP1/Alix protein and the complexes sequester cargo proteins into the ILVs of the MVB. Finally, the ESCRT-III interacts with the AAA-ATPase Vps4 complex that promotes the disassembly and recycling of the ESCRT components back to the cytoplasm to maintain the function of the MVB pathway (reviewed in (Schmidt & Teis, 2012)). Recently, live-cell imaging of individual endosomes revealed that cargo sorting and ILVs formation occur by concerted, coordinated and repetitive recruitment waves of individual ESCRT subcomplexes and are controlled by Clathrin (Wenzel *et al*, 2018).

The HRS/HGS ESCRT-0 component (the Vps27 ortholog protein in the yeast model) stands out from the other members of the ESCRT machinery. Indeed, HRS is a key to endosomal sorting, first by directly binding ubiquitinated proteins and functioning in the sorting of ubiquitinated cargos into clathrin-coated microdomains on endosomes and second beyond simple recruitment of TSG101, Hrs is an orchestrator of many events surrounding MVB formation as indicated by its multiple binding-partners (Komada, 2005; Clague & Urbé; Pridgeon *et al*, 2009; Raiborg, 2006). However, recent studies also identified additional HRS functions unrelated to the ESCRT pathway. This was precisely highlighted for example by the properties of HRS to specifically regulate the endosomal cholesterol trafficking where, in the same time, other ESCRT components like the ESCRT-I Tsg101 have no effect (Du *et al*, 2012). Along the same line, HRS was found to promote the actin-mediated endosomal recycling of receptors back to the plasma membrane whereas Tsg101 cannot (Hanyaloglu *et al*, 2005; MacDonald *et al*, 2018; Yan *et al*, 2005).

One major attractiveness of HRS definitively remains in its capacity to modulate different signaling pathways activity through the regulation of plasma membrane receptors trafficking and degradation in mammalian and drosophila models thus making it a master regulator (Jékely

& Rørth, 2003; Lloyd *et al*, 2002; Sasaki & Sugamura, 2001; Miura & Mishina, 2011; Taelman *et al*, 2010; Chanut-Delalande *et al*, 2010; Komada, 2005; Morino *et al*, 2004; Kunzmann *et al*, 2003). Indeed, silencing of HRS was found to prevent the degradation of RTKs like EGFR through the lysosomal pathway, leading to its accumulation into the early endosome stations and thus maintaining its downstream signaling activity (Lloyd *et al*, 2002; Malerød *et al*, 2007; Brankatschk *et al*, 2012; Szymanska *et al*, 2018). On the opposite, HRS was also identified as a key component involved in the stimulation of the WNT signaling pathway. In this case, its depletion prevented the Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) sequestration into the early endosomes and induced its accumulation in the cytosol (Taelman *et al*, 2010). In this context, it inactivates the beta catenin transcription factor by phosphorylation that consequently cannot be translocated into the nucleus to activate the transcription of the WNT target genes (reviewed in (Dobrowolski & De Robertis, 2012)). Interestingly, different studies also revealed that HRS modulate the autophagic flux, especially the autophagic clearance of proteins involved in neurodegeneration (Tamai *et al*, 2007; Filimonenko *et al*, 2007; Oshima *et al*, 2016; Matthew-Onabanjo *et al*, 2019). In yeast, Vps27 was also involved, with Atg13, in the control of the macro- and micro-autophagy process via mTORC1 (Hatakeyama *et al*, 2019; Hatakeyama & De Virgilio, 2019).

Most of the cellular and molecular process depicted above can as evidence be transposed into the context of the myogenesis. Only a few studies investigated the role of HRS/HGS into the muscle biology. HRS expression was well observed in smooth and skeletal muscle tissues (Lu *et al*, 1998; Lloyd *et al*, 2002; Chen *et al*, 2015) thus suggesting that it could play a major role in these tissues.

In this context, we focused our investigations on the expression and distribution of HRS and its potential roles in the skeletal muscle cell biology and more precisely during the differentiation process of myoblasts into myotubes.

Here we found that HRS depletion in murine and human muscle cells strongly impairs the differentiation of myoblasts into myotubes. This was well correlated with a dynamic expression and distribution of HRS during the process of myogenesis. Mechanistically, we identified that the MEK/ERK pathway and the GSK3 β kinase, two well characterized negative regulators of myogenesis, were both significantly activated upon HRS depletion. On the opposite, their specific inhibition significantly rescues the differentiation of myoblasts into myotubes thus comforting their key implications in the myoblast differentiation defect observed in HRS depleted cells. Interestingly, we also observed that HRS silencing negatively alters the autophagic flux thus correlating well with previous published data stating that efficient autophagic process is required during myoblast differentiation (McMillan & Quadrilatero, 2014).

In conclusion, we found that HRS is a master regulator that controls the differentiation of myoblasts into myotubes at different levels through the modulation of important key cellular mechanisms involved in trafficking, signaling and degradation.

Results

HRS expression and distribution is modulated during myoblast differentiation

To investigate the role of HRS in the myogenesis process, we first analyzed its protein expression during the differentiation of myoblast into myotubes in the well described murine C2C12 cellular model. For this purpose, C2C12 cells were cultured in growth medium ie proliferative medium (PM) status or in differentiated medium (DM) to initiate the differentiation of myoblasts into myotubes. The data presented in Fig 1A, B revealed that HRS strongly decreases when C2C12 cells were shifted and cultured into DM (compare lanes 2 and 3). HRS expression was then progressively increased from 48 hours of differentiation to reach

its maximum expression at 96 hours (see lanes 3-4 in panel A and quantifications in panel B). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses carried out on C2C12 cells issued from the kinetic (PM and DM from 7 to 96 hours) revealed that hrs-mRNA level remained unchanged during the differentiation process (see Appendix Fig S1) thus suggesting that HRS regulation occurs at the translational or post translational levels (see discussion).

Efficient differentiation of myoblasts into myotubes was assessed by controlling the expression of the Myogenin MRF protein as well as the muscle specific Myosin heavy chain (MHC) terminal muscle marker (Fig 1A). Interestingly, high level of HRS expression was concomitant with high Myogenin expression (see lane 6) thus possibly indicating a role for HRS during myogenesis.

We next investigated the cellular distribution of HRS during the process of myogenesis. For this purpose, C2C12 cells in proliferation or during differentiation (24 to 122 hours of DM culture) were analyzed by immunofluorescence coupled by confocal microscopy using the anti-HRS antibody. The data presented in Fig 1C first confirmed the bi-modal expression of HRS protein during myogenesis. In addition, while HRS displays a wild punctuated cytosolic distribution in myoblasts as well as in early 24 hours differentiated cells (see white arrowheads in the lower panels), we observed a deep relocalization of HRS f at the nuclear periphery from 48 hours to 122 hours of DM culturing (see white arrows). This perinuclear distribution in myotubes was confirmed when C2C12 cells were transfected with a construct encoding a human GFP-HRS fusion protein (Fig 1D). To determine if HRS perinuclear relocalization during differentiation is a feature of differentiated muscle cells, murine primary muscle satellite cells (muSCs) were cultured into PM or DM until myotubes formation. Differentiation of satellite cells into myotubes is faster than C2C12 cells and appears from 24 hours of differentiation. Immunofluorescence experiments carried out with the anti-HRS antibody and analyzed by confocal microscopy confirmed the presence of HRS perinuclear distribution in

myotubes (Fig 1E) thus indicating that HRS relocalization is characteristically observed during the muscle differentiation process.

To better characterize the compartments associated to perinuclear HRS in myotubes, confocal double immunofluorescence experiments were carried out using the anti-HRS and a set of primary antibodies directed against Rab5a or Rab7 to label early (EE) and late (LE) endosomes respectively, the GM130 Golgi marker, the anti-KDEL for endoplasmic reticulum (ER) or the anti-Clathrin heavy chain (CHC) antibody for clathrin coated vesicles. The data presented in Fig 2 revealed that perinuclear HRS significantly colocalizes with the EE-Rab5a positive endosomes (see panels 2A and 2B). As expected, a strong colocalization was observed between HRS and CHC, a well characterized binding partner of HRS (Raiborg, 2001; Raiborg *et al*, 2002). On the opposite, colocalizations between HRS and Rab7-LE, KDEL-ER or GM130-Golgi positive compartments were barely observed (see panel 2B).

To investigate the expression and the cellular distribution of HRS in muscle tissues, confocal imaging experiments were done on dissected EDL muscle fibers issued from 3 months old mice. The data presented in Appendix Fig S2A revealed, the presence of significant accumulations of HRS protein at the nuclear poles as well as around nuclei (see white arrows), in addition to a global repeated and striated pattern throughout the fibers. Interestingly, in regenerating muscle fibers which typically display aligned and centrally located nuclei (see panel B), a strong and specific accumulation of perinuclear HRS was also detected (see white arrows in Appendix Fig S2B). Of interest, our investigations also identified a strong accumulation of HRS at the neuromuscular junction (NMJ; see Appendix Fig S2C) confirming previously published data on the NMJ in the *Drosophila* model (Lloyd *et al*, 2002). Collectively, our results show that HRS protein is dynamically expressed and distributed during the process of myogenesis indicating a potential role in skeletal muscle biology and more precisely in the process of myogenesis.

To determine if expression of other ESCRT complex components were regulated during differentiation, we next evaluated the level of expression of the ESCRT-I TSG101 protein. In contrast to HRS, the data presented in Fig EV1A,B revealed that TSG101 protein expression does not display a bi modal expression but a progressive increase expression during the differentiation process. This set of data indicates that while HRS and TSG101 belong to the same ESCRT machinery, their regulation during the myogenesis process appears different.

Analyses of TSG101 cellular distribution in myoblasts revealed occasional colocalization between TSG101 and HRS correlating with previously described data in HeLa cells (see Fig EV1C ; (Bache *et al*, 2003). On the opposite to HRS, no perinuclear TSG101 distribution was observed in differentiated myotubes. Surprisingly, unexpected intranuclear TSG101 signals were observed in addition to expected cytoplasmic distribution (see white arrows in Fig EV1C). This data was confirmed using a second independent anti-TSG101 (TSG101-ab2) antibody (see Fig EV1D; see discussion).

Collectively, we found that HRS and TSG101 expression and distribution are significantly different during myogenesis, thus suggesting that HRS and TSG101 could share specific functions during the process of myogenesis.

Silencing of HRS strongly affects the differentiation of myoblasts into myotube fibers.

To explore the role of HRS during myogenesis, we first assessed the impact of HRS silencing on the differentiation of myoblasts into myotubes in the C2C12 cellular model. For this purpose, three independent lentiviral vectors HRS-shRNAs (shRNAs #1 to #3) and a non-specific shRNA target (sh-CT), were used to transduced C2C12 myoblasts. Efficient HRS silencing with the three shRNAs leads to a strong reduction of HRS in transduced proliferating cells (compare lane 1 with lanes 2-4 in Fig 3A). No modification of cell division was observed between the sh-CT and sh-HRS conditions over three days of culture (see Fig 3B).

Phenotypically, cells share barely similar size and aspect but double immunofluorescence coupled confocal imaging using the late endosome/lysosome anti-Lamp1 and the early endosome anti-EEA1 revealed a strong enlargement of early and late endosomes/lysosomes (see Fig 3C) thus correlating with the HRS silencing associated phenotype previously described in the HeLa cellular model (Razi & Futter, 2006; Marchese *et al*, 2003; Komada & Soriano, 1999).

To investigate the impact of HRS silencing on differentiation of myoblasts into myotubes, shCT and shHRS transduced C2C12 myoblasts were next cultured in DM during 96 hours until the formation of myotubes in sh-CT cells was done. Presence of myotubes was determined by immunofluorescence microscopy by visualizing positive Myosin Heavy Chain (MHC) skeletal muscle marker multinucleated myotube fibers. The data presented in Fig 3D revealed that HRS depletion leads to a strong decrease of myotube formation correlated with the strong decrease of MHC positive cells (compare panel D1 with panels D2-D4). Western blotting analyses also confirmed the strong decrease of MHC expression in HRS KD cells (compare lanes 1-6 with lanes 7-12 in panel E and quantifications in panel F). The negative impact of HRS depletion was also correlated with a major and significant decrease of the myogenic differentiation index (see panel G) thus revealing the key role of HRS during the differentiation process.

To determine if HRS is also crucial for differentiation of primary myoblasts, murine muscle satellite cells muSC cells were transduced with HRS-shRNA#3 and sh-CT lentivectors. The data presented in Fig 3H show efficient HRS depletion (compare lanes 1 and 2) and revealed a strong reduction of myotube formation at 2 days of differentiation as judged by the strong decrease of MHC positive multinucleated fibers (see panel I) correlated with the efficient reduction of the myogenic index (panel J). Similar experiments were carried out on immortalized human myoblasts (Y711i cells) using three different human-HRS-shRNAs. The data presented in Appendix Fig S3 indicated that depletion of human HRS (panel A) also

negatively impacts the differentiation process of human myoblasts into myotubes (see panel B) thus pointing out that the key role of HRS in the myogenesis process is conserved between species.

We next investigated if HRS re-expression could rescue the formation of myotubes structures into C2C12 sh-HRS cells. For this purpose, shRNA-HRS#3 transduced myoblast C2C12 cells were transfected by a non-targeted shRNA murine mycHRS encoding construct or an empty vector as negative control. The data presented in Appendix Fig S3C, D revealed that re-expression of HRS partially rescues myotube formation at day 4 (compare the MHC marker in lane 3 with lane 4 in panel C and the presence of MHC positive myotubes in panel D) thus confirming that HRS is essential for myogenesis.

We previously observed that TSG101 ESCRT-I protein expression increases during differentiation in C2C12 cells possibly indicating a myogenic role for TSG101 as well. We thus assessed the impact of TSG101-ESCRT-I depletion. For this purpose, C2C12 myoblasts were transduced with lentivectors encoding three different TSG101-shRNAs and the sh-CT as a negative control. The data presented in Fig EV2A revealed that TSG101-shRNAs (TSG101 #2 and #3), efficiently downregulated TSG101 in C2C12 myoblasts (compare lane 1 with lanes 2-4). When transduced myoblasts were cultured in DM during 4 days, differentiated myotubes were observed in all experimental conditions (Fig EV2B) however, determination of the myogenic differentiation index on TSG101#3-shRNA condition revealed a 34% decrease of differentiation (see panel C) thus indicating that TSG101 depletion alters myogenesis but with a lesser efficiency compared to HRS. While HRS and TSG101 belong to the same machinery and act sequentially, our data highlight that HRS is a stronger regulator of the differentiation process.

HRS depletion strongly affects myogenesis and myogenic regulatory factors

The skeletal muscle specific myogenin gene is a key developmental regulator for skeletal muscle formation. Myogenin expression is indispensable to turn on the muscle gene expression program and is a prerequisite for myoblast differentiation (Faralli & Dilworth, 2012). Myogenin forces myoblasts to undergo myogenic differentiation, resulting in myoblasts exiting the cell cycle and fusing to form multinucleated myofibers (reviewed in (Zammit, 2017)). As a consequence, decrease of Myogenin expression negatively affects the differentiation process of myoblasts into myotubes (Faralli & Dilworth, 2012). In this context, we first investigated the protein expression level of Myogenin in shCT and shHRS#3 C2C12 cells in proliferation and during the course of the differentiation process. The data indicate that while Myogenin expression is very low in proliferation in shCT, it significantly increases from 24 to 96 hours after the differentiation induction (see Fig 4A lanes 1-6 and quantifications in panel B) thus correlating well with previous published data (Wang *et al*, 2008; McMillan & Quadrilatero, 2014). Conversely, induction of Myogenin was strongly reduced in HRS-depleted cells (compare lanes 1-6 with lanes 8-12 and quantifications in panel B) thus indicating that HRS depletion negatively affects the expression of Myogenin. Because Myogenin expression is highly regulated at the transcriptional level (reviewed in (Faralli & Dilworth, 2012)), we next investigated through a qRT-PCR approach if the myogenin mRNA expression level in proliferation and during the differentiation process was altered in shHRS#3 cells. The data indicate that mRNA level of myogenin is significantly decreased in shHRS#3 compared to shCT cells (see Fig 4C) thus indicating that absence of HRS negatively affects the expression of myogenin at the mRNA level. Collectively, this set of data revealed that in absence of HRS, myogenin mRNA and protein levels are strongly altered thus correlating with the strong defect of differentiation.

Myogenin expression is tightly controlled during the process of differentiation by different transcription factors including the MRFs MyoD/bHLH and the MEF2 factors as well as by the

Myogenin itself (Faralli & Dilworth, 2012; Asfour *et al*, 2018). MEF2 factors alone do not possess myogenic activity but, in combination with MyoD/bHLH MRFs, drive and potentialize the myogenic differentiation program (Molkentin *et al*, 1995). In this context, we first investigated the expression level of MyoD in shCT and shHRS C2C12 cells in proliferation status or during the differentiation process. The data presented in Fig 4A,D revealed that expression level of MyoD is not significantly different between shCT and shHRS (compare lanes 1-6 with lanes 7-12 and quantifications in panel D). Interestingly, analysis of MyoD cellular distribution by immunofluorescence confocal microscopy, revealed that MyoD signal appears more accumulated at 24 and 48 hours of differentiation into the nuclei of shCT compared to shHRS cells (see panel E and quantifications in panel F) thus explaining at least in part the difference observed on Myogenin expression between shCT and shHRS.

In addition to contain E-boxes for binding of the myogenic MyoD/bHLH factors, the myogenin promoter contains a consensus binding site for MEF2 proteins (Faralli & Dilworth, 2012). The MEF2 binding site is important for correct spatio-temporal expression of myogenin and mutation of the MEF2 binding site and/or alteration of MEF2 factors such as MEF2A expression and/or its cellular distribution negatively affects the myoblast to myotube differentiation process (Winter & Arnold; Estrella *et al*, 2015; Potthoff & Olson, 2007). In this context, we first analyzed the expression level of MEF2A in shCT versus shHRS C2C12 cells. The data presented in Fig 4 revealed that MEF2A protein expression level was significantly decreased between 48-96 hours of differentiation compared to shCT (compare lanes 1-6 with lanes 7-12 and quantifications in panel G). As expected, the decrease of MEF2A signal in the nuclei was confirmed by immunofluorescence confocal microscopy analyses in shHRS cells at 72 hours of differentiation (see panels I and K). In the same time, qRT-PCR also revealed that *mef2A* mRNA expression was also significantly decreased in shHRS compared to shCT cells (see panel J). Collectively, our data indicate that HRS depletion significantly decreases

expression and/or distribution of myogenic regulators that are essential for the process of myogenesis.

HRS depletion affects signaling pathways involved in myogenesis

The HRS protein is involved in the regulation of the trafficking and the degradation of cell surface receptors such as RTKs including the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). HRS depletion compromised EGFR degradation resulting in its accumulation into the early endosomal compartments (Lloyd *et al*, 2002; Chanut-Delalande *et al*, 2010; Wenzel *et al*, 2018; Brankatschk *et al*, 2012). In this context, EGFR remains constitutively active leading to the stimulation of the downstream associated Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway (Lloyd *et al*, 2002; Szymanska *et al*, 2018; Malerød *et al*, 2007; Brankatschk *et al*, 2012). Interestingly, the EGFR was found to be a key regulator of myogenesis that must be downregulated during myogenesis to allow efficient myoblast differentiation. Indeed, the study revealed that decreased of EGFR during the differentiation process was correlated with a strong increased expression and nuclear localization of the myocyte enhancer factor MEF2A (Leroy *et al*, 2013). Other studies also identified that activation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway was associated to a strong decrease of myoblast differentiation through an alteration of the myogenin transcription via the phosphorylated ERK2 (Yohe *et al*, 2018) or by altering the MEF2A nuclear translocation (Winter & Arnold).

Collectively, these data prompted us to investigate the impact of HRS depletion on the trafficking and the activation of the EGFR dependent Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in our HRS depleted C2C12 cellular model. We first determined if EGFR trafficking was affected in HRS depleted C2C12 cells. For this purpose, we established the flow of EGF Alexa-488 tagged ligand through the degradative pathway by pulse-chase experiments followed by analysis of co-occurrence with the EEA1 early endosomal marker in shCT and shHRS#3 KD

myoblast cells. The data presented in Fig 5A,B show a progressive accumulation of EGF-488 signal in red labeled-EEA1 positive compartments in shHRS#3 KD cells (see the yellow punctuated EGF-488/Red-EEA1 co-occurrence signals indicated by white arrows in panel A and in panel B for quantifications corresponding to the percentage of co-occurrences) whereas EGF-488 signal strongly decreased after 30 to 45 min of chase in shCT control cells due to its final trafficking to the degradative compartments. Thus, these data show that HRS impairs the degradation of the EGFR in the C2C12 cellular model.

To determine if accumulation of EGFR in EEA1 positive compartments was specific of HRS, parallel experiments were carried out with TSG101 KD cells. Oppositely to what we found for HRS, the data presented in Fig EV3A,B revealed that TSG101 depletion does not alter the EGFR trafficking in C2C12 cells. No accumulation of EGF-488 was observed in EEA1 positive compartments thus indicating that EGFR follows its normal trafficking as observed in shCT control cells.

We next investigated if the accumulation of EGFR in the EEA1 positive compartments was associated with an increase of activation of the Ras/Raf/MEK/ERK downstream signaling pathway as previously depicted in drosophila or in HeLa cells (Lloyd *et al*, 2002; Brankatschk *et al*, 2012). For this purpose, we focused our attention on the mitogen activated protein kinases p44/p42-MAPK-ERK1/2, the most downstream components of the cascade that are phosphorylated upon activation of EGFR and the Ras/Raf/MEK1/2-associated signaling pathway. The data presented in Fig 5C-E revealed that while the level of total ERK1/2 was barely similar in shCT and shHRS#3 (compare lanes 1-6 to lanes 7-12), the level of the phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) activated forms was increased with significant peak at 24 hours compared to the control cells (compare lane 3 with lane 9 and lanes 5-6 to lanes 11-12 in panel C and quantifications in panels D and E). These data revealed that upon HRS depletion, the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is activated in the early steps of differentiation thus correlating

well with the accumulation of EGFR in the early endosomal compartments. On the opposite, no activation of ERK1/2 was observed in TSG101 KD cells (see Fig EV3C and quantifications in panel D; see discussion). This set of data correlates with the fact that TSG101 depletion does not impair EGFR trafficking and alters the myogenesis process with less efficiency compared to HRS silencing. Collectively these data suggest that the Ras/Raf/MEK/ERK pathway may play a key role in the altered myogenesis process observed in the HRS-KD cells. In this context, we hypothesized that inhibition of this pathway could rescue, at least in part, the process of myogenesis. To investigate this hypothesis, we cultured shCT and shHRS cells in presence or absence of the U0126 MEK/ERK inhibitor (Marampon *et al*, 2009; Yohe *et al*, 2018) during 96 hours of differentiation. The data presented in Fig 6A revealed that U0126 treatment efficiently rescues the differentiation of HRS-depleted cells as judged by the significant restoration of MYHC labeling and myotube formation in shHRS treated cells (see panel A and the myogenic index in panel B). Analysis by Western blotting of U0126-treated and untreated shCT and shHRS#3 cells at day three of differentiation confirmed the efficacy of the compound since the phosphorylated ERK1/2 downstream targets of MEK1/2 were significantly decreased (compare lane 1 with lane 3 and lane 2 with lane 4 in panel C). As expected, confocal microscopy experiments confirmed that Myogenin protein expression and distribution were significantly restored in shHRS#3-depleted cells at day 3 of differentiation upon U0126 addition (see panels Fig 6D,E). Collectively, these data show that inhibition of MEK/ERK rescues the deficient differentiation phenotype observed in HRS-KD cells and restores Myogenin expression and distribution. These data revealed that activation of the MEK1/2/ERK1/2 pathway is a key component participating to the HRS-KD altered differentiation phenotype.

Recently, Chen *et al.*, (2017) observed that Akt2 deficiency induced a downregulation of MEF2A in mouse heart tissues (Chen *et al*, 2017). In skeletal muscle cellular model, Akt2

expression was also found to promote myogenic differentiation via increasing myogenin gene transcription (Sumitani *et al* 2002). This set of data prompted us to investigate the status of Akt2 in our HRS KD cells. Interestingly, we found that level of total Akt2 protein as well as its activated phosphorylated pSer474Akt2 isoform were significantly decreased in HRS depleted cells compared to our control (see Appendix FigS4 compare lanes 1-6 to lanes 7-12 in panel A and quantifications in panels B and C). On the opposite, no modification of total Akt1 expression was observed between the two conditions (see panel A and quantifications in panel D). Collectively, these data suggest that global decrease of Akt2/pSer474Akt2 could participate in the differentiation defect by altering the transcriptional regulation of MEF2A.

Different studies indicated that p38MAPK is a potential enhancer of the myogenesis process. Indeed, its inhibition prevents myotube formation whereas its activation stimulates myogenesis through the transcriptional activation of the myogenic transcription factors MEF2A and MEF2C (Wu *et al*, 2000). In this context, we investigated if the expression and the activation levels of p38MAPK were altered upon HRS depletion in proliferation and during the differentiation process. The data presented in Appendix Fig S4E-G failed to reveal any significant difference of expression nor phosphorylation levels of this kinase (see panel 7E and quantifications in panel 7F). No modification of activated pThr180/Tyr182-p38 cell distribution was observed between the two conditions (see panel G) thus suggesting that altered myogenesis process associated with HRS depletion is not dependent of the p38 MAPK pathway.

GSK3 β : another potential key factor involved in the HRS-KD-differentiation defect phenotype

The Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is a serine-threonine kinase that is involved downstream of multiple cellular signaling pathways (Mills *et al*, 2011). In the process of myogenesis, the active phosphorylated Y216-GSK3 β (Hughes *et al*, 1993) acts as a negative

regulator of skeletal muscle differentiation (van der Velden *et al.*, 2008) and low therapeutic dose lithium inhibits GSK3 β and enhances myotube formation (Kurgan *et al.*, 2019). Interestingly, Taelman *et al.*, (2010) observed, that in HRS depleted HeLa cells, active GSK3 β accumulates in the cytosol. This prompted us to investigate the impact of HRS depletion on GSK3 β expression, activity and distribution. For this purpose, we first analyzed the expression level of total GSK3 β and its active phosphorylated isoform pY216-GSK3 β by Western blotting. The data presented in Fig 7A indicated that level of activated pY216-GSK3 β was significantly increased (compare lanes 1-6 with lanes 7-12 and quantifications in panel B) in HRS depleted cells. Confocal imaging experiments realized on shCT and shHRS cells using anti-GSK3 β and anti-Lamp1 antibodies revealed that GSK3 β signal appeared to be more accumulated at the periphery of Lamp1 positive vacuoles in shHRS cells compared to shCT cells (see white arrows in panel C and quantifications in panel D) thus correlating with previous published data (Taelman *et al.*, 2010). Collectively, this set of data led us to hypothesize that activation of GSK3 β upon HRS depletion could participate to the differentiation defect phenotype. To verify this hypothesis, we postulated that inhibition of GSK3 β could modulate its negative impact on the differentiation process in our HRS depleted cells. Lithium chloride (LiCl) is a potent Y216-GSK3 β inhibitor (Li *et al.*, 2014). In this context, shCT and shHRS#3 cells were cultured in DM in absence or presence of LiCl (10mM) during five days. At day 5 of differentiation, cells were recovered and analyzed by immunofluorescence microscopy using the anti-MYHC. The data presented in Fig 7E, F indicated that LiCl treatment significantly rescues the formation of myotube fibers in shHRS#3 KD cells as judged by the MYHC labeling (see the restauration MYHC labeling panel E) and the myogenic differentiation index (see panel F) whereas non-treated cells were still undifferentiated. Similar experiments were also carried out using the Azakenpaullone (Aza 3 μ M) GSK3 β inhibitor compound. Despite a less profound effect

compared to LiCl, the data presented in Fig 7E,F also confirmed that inhibition of GSK3 β with Azakenpaullone partially but significantly rescues the myotubes formation in HRS depleted-cells (see panels E and F). This result was comforted by the restoration of MEF2A and Myogenin expression into the nuclei of shHRS treated cells (see Fig 7G-J) in similar way to what it was observed in control non treated cells whereas they are still barely or non-detected in shHRS#3 non-treated cells. Collectively, these data indicate that while HRS depleted cells were incompetent to differentiate into myotubes, inhibition of GSK3 β reactivate their myogenic potential to form myotube structures. In this context, these data suggest that GSK3 β could be an additional key component participating to the differentiation defect phenotype observed in absence of HRS.

The autophagy process is compromised in C2C12 HRS KD cells

Different studies revealed that the ESCRT machinery is tightly linked with the process of autophagy. For instance, depletion of ESCRT components such as TSG101 or HRS strongly compromises the autophagic degradation process leading to the accumulation of the ubiquitinated binding proteins LC3 and SQSTM1/p62 as well as the aggregation of pathological prion-like proteins involved in neurodegenerative disorders (Filimonenko *et al*, 2007; Oshima *et al*, 2016; Tamai *et al*, 2007, 2008). Interestingly, inhibition of autophagy was found to impair the differentiation and fusion of myoblasts (McMillan & Quadrilatero, 2014). In the C2C12 cells, the enhanced autophagic flux is characterized by an accumulation of the lipidated LC3-II and to a significant decrease of the SQSTM1/p62. Conversely, blocking the autophagic flux by chloroquine prevents differentiation of myoblasts into myotubes (McMillan & Quadrilatero, 2014). This led us to investigate the effect of HRS depletion on the autophagy process in differentiating C2C12 cells. The data presented in Fig 8A first confirmed the inverse relationships between the decrease of p62/SQSTM1 and the increase of LC3II in shCT cells

(see lanes 1-6). In a striking contrast, high level of p62/SQSTM1 was sustained in shHRS cells while, in the same time, LC3II signal accumulated during the course of the differentiation thus strongly reflecting an altered autophagic flux in absence of HRS (compare lanes 7-12 with lanes 1-6). Double immunofluorescence confocal experiments using anti-LC3 and anti-p62/SQSTM1 antibodies confirmed the altered autophagic flux in myoblasts (see white arrows in panel B) as well as at 4 days of differentiation as judged by the strong accumulation of punctuated signals of p62 and LC3 in HRS KD undifferentiated cells (see white arrowheads). On the opposite, only faint p62 and LC3 labelings were observed in myotubes in shCT differentiated cells (see white arrowheads). As expected, no myotubes were observed in shHRS cells.

Interestingly, TSG101 KD cells gave similar results (see Fig EV4). Indeed, p62 signal was sustained in shTSG101 cells during the course of the differentiation whereas it significantly dropped in shCT cells (see Fig EV4A compare lanes 1-6 with lanes 7-12). Similarly, LC3II strongly accumulates in shTSG101 compared to shCT during differentiation (see panel A). In myoblasts, double immunofluorescence confocal microscopy revealed as depicted for HRS, a strong accumulation of LC3II and p62 in shTSG101 depleted cells whereas only faint signals were observed in shCT cells (see white arrows in shTSG101 and shCT panel B respectively). Interestingly, in the differentiation context, we observed the presence of undifferentiated cells as well as myotubes with strong LC3 and p62 punctuated signals in shTSG101 (see white arrows and arrowheads in panel C respectively). However, we also frequently identified myotubes without accumulations (see yellow arrowheads) as depicted in shCT cells. Collectively, these data indicate that HRS and TSG101 are both required for proper autophagic flux during C2C12 differentiation. In addition, this set of data also suggests that impact of HRS and TSG101 depletion on autophagy may explain, at least in part, the differentiation defect observed in TSG101 and in HRS KD cells (see discussion).

Cholesterol accumulation is not a key factor in the HRS deficient differentiation phenotype

Others important functions and implications of HRS have been identified in different cellular process. For example, HRS was previously shown to play an essential role in the endosomal trafficking of cholesterol. Indeed, HRS silencing strongly enhances the accumulation of cholesterol in Lamp1 late endosomes/lysosomes positive compartments in different cellular models (Du *et al*, 2012; Vilette *et al*, 2015) in a similar way to what it was previously described for the depletion of the Nieman Pick complex 1 (NPC1) cholesterol transporter (Du *et al*, 2012). Interestingly, cholesterol modulation was previously found to alter the formation of myotubes in a chicken cellular model (Mermelstein *et al*, 2005, 2007) and cholesterol depletion was found to enhance hrs mRNA expression whereas tsg101 mRNA was down regulated (Possidonio *et al*, 2014) thus suggesting that alteration of cholesterol in myoblasts could impact the differentiation process. In this context, this prompted us to investigate whether HRS depletion could affect cholesterol trafficking in murine C2C12 cells and could further impact the differentiation process. For this purpose, shHRS#3 myoblast C2C12 cells were recovered and first analyzed by confocal microscopy to visualize cholesterol as well as late endosomes/lysosomes through Filipin and an anti-Lamp1 labelings respectively. Similar experiments were carried out on sh-CT as well as sh-TSG101#3 as control cells. The data presented in Fig EV5A show a strong accumulation of cholesterol into Lamp1 positive compartments in shHRS#3 cells (see white arrows). On the opposite, no cholesterol accumulation was observed in sh-CT nor shTSG101#3 KD cells thus correlating with previously published results (Du *et al*, 2012) and pointing once more the functional differences between HRS and TSG101 even in the C2C12 cellular model.

To determine if cholesterol accumulation can play a role in the differentiation defect we observed in our HRS KD cells, we postulated that accumulation of cholesterol in

LE/Lysosomes induced by NPC1 depletion could negatively alter the process of differentiation in the C2C12 cellular model. For this purpose, we investigated if depletion of the cholesterol transporter NPC1 could alter the process of differentiation. C2C12 myoblasts were transduced with a shNPC1 lentivector and efficient NPC1 depletion was confirmed by Western blotting (see Fig EV5B compare lanes 1 and 2). Confocal immunofluorescence analysis of shNPC1 myoblast cells stained for Filipin and Lamp1, revealed a strong accumulation of cholesterol into Lamp1 positive compartments thus correlating with previously published data in the HeLa cellular model (Du *et al*, 2012). To determine if accumulation of cholesterol in shNPC1 myoblasts can compromise the differentiation process, shNPC1 C2C12 cells were cultured during 4 days in DM. The data presented in Fig EV5D,E revealed that differentiation of shNPC1 cells occurs normally as judged by the similar myogenic differentiation index between shCT and shNPC1 samples. Collectively, these data indicate that cholesterol accumulation in LE/lysosomes compartments may not be a key factor at this timepoint responsible for the impaired differentiation of HRS KD cells.

Discussion

The ESCRT machinery plays key roles in a large variety of different and important cellular process, however, until today, its implication in muscle biology and more specifically during myogenesis was barely investigated. In this study, we focused our attention on the first component HRS/HGS ESCRT-O and investigated its role during the differentiation of myoblasts into myotubes in murine and human species. Our data revealed that HRS is dynamically expressed with high protein expression level in proliferating myoblasts followed by a significant decrease in the early phase upon induction of differentiation and a progressive re increase of expression from 48 hours of differentiation. No major modification of mRNA expression level was observed in the decrease phase thus suggesting that negative regulation is

mediated at a post transcriptional level. Interestingly, Dauner et al., (2017) identified that HRS protein was downregulated through degradation upon starvation or inhibition of mTORC1 thus suggesting that mTORC1 is necessary to maintain HRS protein level (Dauner *et al*, 2017). Similarly, in the yeast model, inactivation of mTORC1 through starvation antagonized the Vps27 HRS ortholog function by inducing its degradation through the proteasome system (Dobzinski *et al*, 2015; Hatakeyama & De Virgilio, 2019). The strong reduction of serum in the C2C12 differentiation medium partially mimics the starvation step that, through the modulation of mTOR, could explain, at least in part, the decrease of HRS during the early steps of the differentiation induction. Interestingly, the TSG101 ESCRT-I component displays a different modulation of expression compared to HRS. TSG101 level was weak in proliferation and progressively increases during differentiation thus indicating that HRS and TSG101 although from the same machinery do not follow the same regulation during the differentiation.

Analyses of HRS distribution in C2C12 cell lines as well as in primary myoblasts in proliferation or during differentiation revealed also a dynamic distribution. We observed for the first time a deep redistribution of HRS during the differentiation process with a cytosolic distribution in myoblasts that progressively accumulates in a perinuclear manner in Rab5 and CHC positive compartments/vesicles in differentiated myotubes. The profound redistribution of HRS during the process of differentiation is intriguing and needs to be deeply investigated to understand its signification. However, our data indicated that HRS colocalizes well with the CHC component, a well characterized HRS binding partner (Raiborg *et al*, 2002; Raiborg, 2006, 2001) and an essential factor involved in the actin and α -actinin-2 scaffolding required for muscle sarcomere organization (Vassilopoulos *et al*, 2014). Interestingly, HRS was also found to be required for the endosomal localization of the actin nucleating factor Wiscott Aldrich Syndrome protein and Scare homologue (WASH) involved in the recycling of specific membrane proteins (MacDonald *et al*, 2018). The perinuclear re-localization of HRS could

reflect a restructuration of the endosomal network and their associated cargos that could play an essential role in the formation of functional myotubes. Of interest, this perinuclear distribution was also observed *in vivo*, in muscle fibers. Surprisingly, no perinuclear HRS was observed for the sub-synaptic nuclei while HRS was significantly accumulated at the NMJ as previously described in the *drosophila* model (Lloyd *et al*, 2002). The role of perinuclear HRS in myotubes as well as its accumulation at the NMJ is currently under investigation in our laboratory. TSG101-ESCRT-I component also displays a dynamic redistribution during the differentiation process thus suggesting that TSG101 may play also a specific role in this process. However, our data revealed that while HRS was accumulated around nuclei, TSG101 tends to accumulate into the nuclei of myotube fibers. This unexpected localization was after all, correlated with different studies revealing that TSG101 displays a nuclear localization in a cell cycle dependent manner (Xie *et al*, 1998; Kim *et al*, 2007). Nuclear TSG101 was observed in serum starved cells and in cells in G1 phase thus possibly correlating with the C2C12 culture conditions for myoblast differentiation. It would be tempting to speculate that HRS could participate to the intranuclear recruitment of TSG101.

These data clearly underline that the ESCRT machinery and in particular the HRS and TSG101 subunits could be potential regulators of the myogenesis. In this context, we focused our attention on HRS and always compared against TSG101 and investigated the impact of their depletion in skeletal muscle cells. Our data revealed that silencing of HRS strongly impairs the differentiation of myoblasts into myotubes whereas TSG101 delays the process. Interestingly, during the course of our study, Hunt *et al* (2019), through a molecular screen to identify ubiquitin-related enzymes that regulate skeletal muscle myofiber size, also observed that HRS KD negatively impaired the differentiation of myoblasts into myotubes in the *drosophila* and mouse models (Hunt *et al*, 2019). Conversely, silencing of the HRS binding partner ESCRT-0 STAM component had no effect on the differentiation. Collectively, these data indicate that

HRS is an essential component involved in the process of muscle differentiation. However, it is worth noting that while HRS, STAM or TSG101 affiliate to the same ESCRT machinery and take place in a sequential way during MVB biogenesis, the impact of HRS on the differentiation process is different thus suggesting a specific role of HRS that could be mediated by additional specific domains or functions due, at least in part, to its multiple binding partners. The molecular and cellular mechanisms involved in the differentiation defect in absence of HRS were not investigated by Hunt et al., (2019).

In this study we identified different mechanisms that can explain the defect in the differentiation process. We found that Myogenin and MEF2A expression were strongly impaired and that translocation of MyoD into the nucleus was negatively impacted upon HRS depletion. Our investigations also revealed that HRS silencing impairs the degradation of the EGFR leading to the constitutive activation of its downstream signaling Ras/Raf/MEK/ERK pathway as judged by the increased phosphorylation status of ERK1/2 in the early phase of differentiation. Treatment of HRS KD cells with the U0126 inhibitor restored the expression and the localization of Myogenin and significantly rescued the differentiation of myoblasts into myotubes thus confirming that EGFR and its downstream Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway plays a major role in our aberrant differentiation phenotype. These data are in a total agreement with those previously published indicating that EGFR down regulation is an early event required for the induction of myoblast differentiation and reduction of its expression during myoblast differentiation is directly associated with an increase of MEF2A and Myogenin (Leroy *et al*, 2013). The role of the Ras/Raf/MEK/ERK downstream signaling pathway in myogenesis is versatile and time window dependent. In the early phase, MEK and ERK activation repress myogenesis (Jo *et al*, 2009; Bennett, 1997; Wu *et al*, 2000; Winter & Arnold; Perry *et al*, 2001; Yohe *et al*, 2018; Yokoyama *et al*, 2007; Michailovici *et al*, 2014) whereas depletion of ERK2 in later steps prevents fusion of myoblasts into multinucleated myotubes (Li

& Johnson, 2006, 2). We found a strong increase of phosphorylated ERK1/2 in the early phase of differentiation thus suggesting that in this small window time the absence of HRS certainly affects the very early mechanisms that initiate the process of differentiation. Interestingly, ERK2 activation was shown to suppress myogenic differentiation by directly impinging on the myogenin promoter in normal myoblasts (Yohe *et al*, 2018). In this context, the impaired differentiation was attributed to an interaction between ERK2 and RNA Pol II at the myogenin locus, leading to a stalling transcription of myogenin. The authors identified that upon inhibition of the MEK/ERK pathway by the U0126 inhibitor, ERK2 was no longer localized at the myogenin promoter, leading to promoter release of RNA Pol II and allowing complete transcription of myogenin (Yohe *et al*, 2018). Our data revealed also that U0126 treatment significantly rescues the aberrant differentiation process observed in HRS depleted cells. Here, it is tempting to speculate that interaction of RNA pol II with myogenin promoter could be affected in HRS depleted cells.

During the course of our investigations, our data revealed that TSG101 depletion in C2C12 does not affect the trafficking of EGFR nor activate the MEK/ERK pathway as it was observed for HRS KD cells. This result is different from what it was previously observed in HeLa TSG101 depleted cells where MEK1/2 and ERK1/2 were activated (Malerød *et al*, 2007; Brankatschk *et al*, 2012). On the opposite, Zhang *et al* (2011) observed that level of phosphorylated ERK was decreased upon TSG101 depletion (Zhang *et al*, 2011). Stimulation with EGF during the course of the experiments could explain these differences, however, when pulse chase experiments were carried out with EGF in TSG101 depleted C2C12 cells, no effect was observed on the trafficking of EGFR through the endosomal pathway and no accumulation of EGF-Alexa 488 was detected in the early endosomal compartments as observed in HRS KD cells. These conflicting data suggest that the molecular mechanisms involved are more complex than previously thought and can, perhaps, be modulated according to the cellular model.

Constitutive activation of Raf impairs murine L6 myoblasts differentiation by altering the MEF2A trafficking (Winter & Arnold *et al*, 2000) and MEK1 activation was found to repress the ability of MyoD to transactivate differentiation-specific target genes (Perry *et al*, 2001). We observed a strong decrease of MEF2A in absence of HRS. Leroy *et al* (2013) observed that MEF2A is increased when EGFR is downregulated. Our data correlate well with this result since EGFR is constitutively activated and MEF2 inhibited upon HRS depletion. During the course of our study we also observed that Akt2 was strongly decreased in HRS KD cells whereas Akt1 remains unchanged. Interestingly, different studies revealed that Akt2 was upregulated during myogenic differentiation and promoted differentiation via increasing myogenin transcription (Sumitani *et al*; Knight & Kothary, 2011). In addition, downregulation of Akt2 in cardiomyocytes significantly impairs MEF2A expression (Chen *et al*, 2017). Collectively, these data suggest that alteration of Akt2 expression upon HRS depletion may participate to the differentiation defect phenotype by altering the transcription of *mef2*.

Interestingly, while no modification of MyoD expression was observed in HRS KD cells, we noticed that MyoD was less translocated into the nucleus thus correlating well with the decrease of Myogenin expression. The mechanisms by which HRS depletion affects the trafficking of MyoD remains unresolved at the present time but we can hypothesize that cellular components involved in the translocation of MyoD may be affected by a defective intracellular trafficking due to the absence of HRS.

Normal skeletal muscle differentiation is initiated by the coordinated action of master transcription factors, including MyoD and Myogenin. MyoD activates the expression of Myogenin, which interacts with the MEF2 family transcription factors to drive terminal differentiation (Asfour *et al*, 2018; Zammit, 2017). Presence of Myogenin expression is a prerequisite for myoblast differentiation and alteration of MyoD and/or MEF2 expression or cell distribution significantly impairs the myogenesis process (Perry *et al*, 2001; Winter &

Arnold). Here we found that the tryptic MyoD/MEF2A/Myogenin is negatively altered in our HRS depleted cells and that defects are linked to the constitutive activation of EGFR RTK due to a mis-regulation of an endosomal trafficking mediated and controlled by HRS.

Other signaling pathways like the Wnt/beta catenin pathway modulate the process of myogenesis through the regulation of MyoD (Kim *et al*, 2008; Faralli & Dilworth, 2012) and inhibition of beta catenin via phosphorylation by the active Y216-GSK3 β kinase impairs the differentiation of myoblast into myotubes (Wang *et al*, 2013). Repression of myogenesis by GSK3 β can be reverted by addition of GSK3 β inhibitors like lithium chloride that increases MEF2A,D expression and transcriptional activity in skeletal myoblasts (van der Velden *et al*, 2008; Dionyssiou *et al*, 2013; Kurgan *et al*, 2019). Interestingly, Taelman *et al* (2010) identified that HRS depletion favors cytosolic accumulation of active GSK3 β thus leading to the inactivation of beta-catenin (Taelman *et al*, 2010). Here we effectively observed that active Y216-GSK3 β is increased in HRS depleted cells. Interestingly, Takashi-Yanaga *et al* (2004) observed that MEK1/2 was involved in the phosphorylation and the activation of Y216-GSK3 β in human skin fibroblasts (Takahashi-Yanaga *et al*, 2004). This result could explain, at least in part, how HRS depletion, by activating the MEK/ERK pathway, could enhance the GSK3 β activity in our cellular model. The fact that inhibition of GSK3 β by lithium chloride or Azakenpaullone significantly rescues the HRS-KD-differentiation defect phenotype suggests that GSK3 β is also an additional suspect involved in our aberrant differentiation phenotype. At this step of the study, we cannot exclude that others signaling pathways that usually positively or negatively regulate myogenesis could be altered upon HRS depletion. Interestingly, we observed that the p38MAPK pathway that controls myoblast differentiation was not altered in our model thus indicating that the mechanisms involved in our mutant phenotype are selective.

HRS was also characterized by its capacity to modulate the autophagy process (Filimonenko *et al*, 2007; Tamai *et al*, 2007; Oshima *et al*, 2016). Furthermore we also know that efficient autophagy is necessary for the smooth running of myogenesis (McMillan & Quadrilatero, 2014). In our study, we found that HRS depletion negatively alters the autophagic flux confirming previously published results (Filimonenko *et al*, 2007; Oshima *et al*, 2016). Interestingly, similar observations were noticed in absence of TSG101 thus suggesting that part of the differentiation defect observed in HRS is due to alteration of the autophagy process.

To conclude, our data revealed for the first time that HRS depletion strongly affects the differentiation process in different myoblast cellular models. We identified that HRS is a master regulator of myogenesis by controlling different key mechanisms at the trafficking, signaling and autophagy levels. The important alterations in such essential cellular and molecular mechanisms explain the strong defect we observed in the process of myogenesis in absence of HRS.

HRS/HGS appears as a central modulator protein with a key role in the neuromuscular system. In the future it would be of importance to investigate its potential implication in human degenerative disorders affecting nervous and muscular tissues.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS and the INSERM (PL). PL received the support of the Association Française contre les Myopathies (AFM) through the MyoNeurAlp alliance.

LC received a three-year PhD (2017-2020) salary from an ARC2 “Qualité de vie et Viellissement” grant from the région Auvergne Rhône-Alpes and from the AFM MyoNeurAlp alliance for the fourth year of PhD (2020-2021).

Microscopy was performed on the microscopy facilities of SFR Santé Lyon-Est (CIQLE, UMS 3453). We thank the Centre de Biotechnologie Cellulaire Biotec and the Centre de ressources Biologiques for their access to healthy primary human myoblasts.

We thank Drs Sophie Rome and François Mallet for helpful discussions during the Comité de suivis de these (CST) of LC.

We thank Drs Eva Wenzel and Camilla Raiborg for helpful discussions, protocols and constructs and Dr Mark Von Zastrow for constructs.

Materials and methods

Antibodies

Primary antibodies: The anti-HRS/HGS antibodies (ref#ab155539; WB 1:1,000, IF 1:100); -NPC1 (ref#ab134113; WB 1:1,000); -MEF2A (ref# ab32866; IF 1:500); -GSK3 β (ref#ab32391 WB 1:1000; IF 1:100) were from Abcam. The anti-TSG101 (Ref#ab83; IF 1:100 and sc-7964; WB 1:500) were from Abcam and Santa Cruz-Technology respectively. The anti-EEA1 (CS#3288; IF 1:100), -phospho-p38Thr180/Tyr182 (CS#9211; WB 1:1,000), -p38-alpha (CS#9228; WB 1:1,000); -phospho-ERK1/2 (Thr202, Tyr204) (CS#3179; WB 1:2,000); -total-ERK1/2 rabbit (CS#9102; WB 1:1,000); -LC3 (CS#2775; WB 1:1,000, and IF 1:100), -GAPDH (CS#2118; WB 1:10,000), -total-AKT2 (CS#2964; WB1:1,000), -phospho-AKT2-Ser474 (CS#85995; WB 1:1,000) were from Cell Signaling. The anti-Lamp1-Fluor 488 (1D4B sc-19992; IF 1:50) were from Santa-Cruz Biotechnology. The anti-SQSTM1/p62 (Ref#GP62-C; WB 1:4,000, IF 1:200) was from Progen and the anti-Myogenin (Ref#F5D; WB 1:200, IF1:100) was from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB). The anti-Clathrin heavy chain (#610499; IF 1:100) and anti-GSK3 β y316 (#612312; WB 1:1000) were from BD Biosciences. The anti-Phospho-p38 (#44-684G; IF 1:100) and -MyoD (#MA1-41017; WB 1:1000; IF 1:100)

were from ThermoFisher. The anti-GM130/GOLGA2 (NBP2-53420; IF 1:200) was from Biotchn. The anti-myosin heavy chain antibody (MF20 hybridoma cell culture supernatant) was kindly provided by V.Gache (INMG, Lyon, France)

Secondary antibodies: For Western blotting, the anti-mouse (NA931V) and anti-rabbit (NA934V) labeled with peroxidase (GE Healthcare UK) were used at 1:10,000.

For immunofluorescence, the goat anti-mouse dylight-488 (115-486-072); goat anti-mouse dylight-549 (115-506-072); the donkey anti-mouse alexa-Fluor-647 (715-606-151); the donkey anti-rabbit rhodamine (TRITC) (711-025-152) were purchased from Jackson Lab. The donkey anti-rabbit alexa-Fluor 488 (A21206) was purchased from Molecular probe. All these secondary antibodies were used at 1:1,000. Antibodies for flow cytometry: CD34-FITC (#11-0341-82); Ly-6A/E (Sca-1)-PE (#12-5981-82); CD45-PE (#12-0451-82); CD31 (PECAM-1)-PE (#12-0311-82) were purchased from ThermoFisher and were used as previously described by the manufacturer.

Drugs and compounds

1-Azakenpaulone (A3734) used at 3 μ M in DMSO, Lithium chloride (203637) used at 10mM in PBS, U0126 (U120) used at 10 μ M in DMSO and were purchased from Sigma-Aldrich. The FR180204 (No 3706) used at 1 or 3 μ M in DMSO and was purchased from Tocris.

Constructs

The psPAX2 plasmid is a 2nd generation lentiviral packaging construct encoding the HIV-1 Gag, GagPol, Tat and Rev accessory proteins, the pMDG2 plasmid encoding the vesicular stomatitis envelope glycoprotein (VSVg) were kindly provided by Didier Trono (EPFL). The pLKO1 constructs encoding small hairpin RNAs (shRNA) directed against murine HRS (HRS#1 TRCN313945; HRS#2 TRCN314016 and HRS#3TRCN0000088688), TSG101

(TSG101#1 TRCN0000054603; TSG101#2TRCN0000054604 and TSG101#3 TRCN0000054607) and NPC1 (TRCN0000012124) were from Sigma-Aldrich (Mission shRNA plasmid DNA). The negative pLKO1 shRNA control (shCT) as well as the human HRS shRNAs constructs (huHRS#1TRCN0000037894; huHRS#2 TRCN0000037895 and huHRS#3 TRCN0000037896) were kindly provided by Clotilde Thery and were previously described in (Ostrowski *et al*, 2010; Colombo *et al*, 2013).

The HIV-1 pLv-hTERT-CDK4 for human primary myoblast immortalization bearing the expression cassettes encoding the HTert and CDK4 proteins and the puromycin resistance was from CloneSpace LLC (ref SKU: CS1031).

The pCDNA3.1-Myc-Empty and pCDNA3.1-Myc-murine-HRS were kindly provided by Mark von Zastrow (Hanyaloglu *et al*, 2005). The pEGFPC1 encoding the GFP-human-HRS construct was kindly provided by Dr daSilva and was previously described in (Tavares *et al*, 2017).

Cell lines and primary muscle cells

The C2C12 skeletal myoblast cell line (ATCC CRL-1772) was kindly provided by S.Rome (CarMeN institute, Lyon, France) and was previously described in (Forterre *et al*, 2014). C2C12 were grown in the growth medium (GM) Dulbecco's modified Eagle's medium containing glutamax /pyruvate/glucose (DMEM Gibco) supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin streptomycin (P/S) and maintained at 37°C under 5% CO₂. Myoblast to myotube cell differentiation was induced by shifting the cells into the differentiation medium (DM; DMEM supplemented with 2% of horse serum HS, Gibco and 1% P/S).

Primary muscle satellite cells (muSC) were isolated as previously described (Liu *et al*, 2015). Briefly, mice were sacrificed and hind limb muscles were recovered and enzymatically dissociated with collagenase B (Roche, #11 088 831 001) and Dispase (Roche, #04 942 078

001) for 30 min at 37°C. Digestion was stopped by the addition of FBS and the mixture was filtered through a 70 µm cell strainer (#15-1070 BioLogix) and mildly centrifuged at 350xg (5804 r, eppendorf) for 7 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in phosphate buffer (1X -PBS) containing 2% FBS and incubated with appropriate antibodies (α 7 integrin-647, CD34-FITC, CD45-PE, CD31-PE, Sca1-PE) at 4°C during 45 min protected from the light. Cells were centrifuged at 350xg for 5 min at 4°C and resuspended in phosphate buffer containing 2% FBS and passed through 30 µm CellTrics strainer. Cells were FACS sorting with FACSARIA (ANIRA, Gerland, Lyon, France). The muSC are the CD31/CD45/Sca1⁻ CD34/ α 7integrin⁺ population. muSC were grown into DMEM F/12 supplemented with 20 % of HS, 1% PS and 2,5µg/ml of FGF and dishes coated with Matrigel (#354234, Corning). Differentiation of muSC cells was induced by shifting the growth medium to DMEM F/12 with 2% of horse serum (HS) and 1% P/S. The human embryonic kidney cell line (HEK293T) was obtained from Généthon (Evry, France) and were cultured in DMEM-Glutamax supplemented with 10% (v/v) FBS and P/S.

The human Y711i immortalized myoblast cell line was obtained as follows. Quadriceps muscle biopsy from a 64 years-old male was obtained from the CBC (Centre de Biotechnologie Cellulaire, Groupement Hospitalier Est, Bron France). Muscle stem cells were extracted, sorted and tested for their myogenicity as previously described (Thorley *et al*, 2016). Cells were then expanded in proliferating KMEM medium (1 volume of M199, 4 volumes of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 20% foetal bovine serum (v:v), 25 µg/ml Fetuin, 0.5 ng/ml β -FGF, 5 ng/ml EGF, 5 µg/ml Insulin). The Y711 primary cells immortalization was carried out by transducing Y711 cells with the HIV-1 lentivector encoding the HTert and CDK4 overnight in KMEM culture medium. One day after transduction, cells were passaged and cultured in presence of puromycin (1 µg/ml) for selection during 3-4 days until the death of non-transduced primary myoblast control cells was completed. Once

puromycin selected, transduced myoblasts were cultured in KMEM-D medium (KMEM medium with dexamethasone 0.2 µg/ml) in absence of puromycin. After one week of culture in KMEM-D medium, immortalized myoblasts can be cultured for a long term and were named Y711i (i for immortalized) myoblast. Differentiation of Y711i myoblasts into Y711i myotubes was carried out in free DMEM or free DMEM+insulin (10 µg/ml) during 4-5 days.

Lentivector vector production and RNA interference

The lentiviral vector particles were produced by transient transfection of the packaging construction plasmid HIV-1 psPAX2, a minimal genome (HIV-1 pLKO1) bearing the expression cassette encoding the shCT control (shCT) or against HRS, TSG101 or NPC1 components and the plasmid encoding the VSV-G-envelope expressing construct pMDG2 (DNA ratio 8:8:4 µg of the respective plasmids) into HEK293T cells (4 x 10⁶ cells plated 1 day before transfection) by the calcium phosphate method (Vilette *et al*, 2015). At 48 hours post-transfection, virus-containing media was collected, centrifugated at 3,000xg during 5 min (Multifuge X1; ThermoFisher) and filtrated (0,45µm filter, Millipore). Viral particles were normalized using the qPCR Lentivirus Titration Kit from abm (LV900) or by Reverse Transcriptase RT test (Vilette *et al*, 2015) and titrated on C2C12, muSC or human primary Y711 cells for the lentivector encoding the hTERT-CDK4 cassette. Transduction of C2C12, muSC or Y711 human myoblasts were carried with different MOI in 6 well plates for C2C12 (80,000 cells/well) or 100-mm dishes for muSC (200,000 cells/dish) or in 12 well plates (80,000 cells plated 1 day before) in presence of 6 µg/ml of polybrene overnight.

One day after transduction, cells were passaged and cultured in presence of 1 to 4µg/ml puromycin (SIGMA) during 2 to 3 days. Efficiency of the knockdown was monitored by Western blotting using the anti-HRS, anti-TSG101 and anti-NPC1 antibodies.

Transfection of C2C12 cells

C2C12 myoblasts were transfected with 2-4µg of DNA and with 10µl of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) in OptiMEM according to the manufacturer protocol and differentiated 7 hours or one day later. Cells were recovered 4-6 days after transfection for further analysis.

Counting cells

Cell numbers was carried out at 6, 24 and 72 h after plating by the addition of 1X Trypsin/EDTA and manual counting with a cell counting Malassez's chamber.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from cultured cells grown in 100 or 35 mm dishes using Tri-reagent (Sigma) or RNeasy Mini kit (Quiagen 74104). The RNA quality was verified by agarose gel. Reverse transcriptase was performed on mRNA using 5X reaction buffer (Thermofisher); RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (EP0451, Thermofisher) and random hexamer (Eurogentec) and Biometra thermocycler. RT-qPCR reaction using SYBR Green Mastermix (Quiagen) in the CFX-connect system (Bio-Rad) was performed on the cDNA using the oligonucleotides (sens/antisens) myogenin (CAATGCACTGGAGTTCGGTC /ACAATCTCAGTTGGGCATGG), hrs (GACAAGCTGGCACAGATACG/CTCTGCACCTCCAGGTACTC), mef2A (CAGCATTCCAGGGGAAGTAA/AATCAAAGGATAAGC), cyclosporine A (AACTTTGCCGAAAACCAT/GATGGCACAGGAGGAAAGAG). The relative levels of mRNAs were calculated with the second derivative method ($2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ equation) and normalized to CypB expression with the Bio-Rad CFX software.

Immunofluorescence and confocal microscopy imaging

Naïve and sh-Ct, -HRS, -TSG101 and -NPC1 C2C12 and Y711i and muSC primary myoblasts/myotubes were grown in 6 well plates, 35-mm dishes or on 12-mm diameter coverslips (Thermoscientific) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 1X-PBS at room temperature during 10 min or alternatively with methanol at -20°C during 3 to 5 min. Cells were permeabilized with 0,2% or 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) during 5 min at room temperature and blocked 1 hour with 1X-PBS containing 5% normal goat serum (NGS, Gibco). Muscle fibers were fixed with 4% PFA at room temperature during 20 min. Fibers were permeabilized with 1% Triton X-100 for 15 min and blocked 1 hour with 1X-PBS containing 0,5% BSA, 2% NGS, 0,1% Triton X-100. Cells and fibers were labeled overnight with the indicated primary antibody in 1X-PBS containing 2% of BSA for cells or in blocking buffer for fibers at 4°C. After extensive washing steps with 1X-PBS 0,02% Triton X-100, cells and fibers were stained during 1 hour at room temperature with secondary antibodies coupled with alexa fluor 488 or 555. After washings, nuclear DNA was counterstained with DAPI (D9542; Sigma-Aldrich) during 5 min at room temperature and washed 3 times. For cholesterol staining, the cells were stained with freshly prepared 50µg/ml of Filipin (SAE0087; Sigma-Aldrich) in 2%BSA-PBS1X and appropriated secondary antibodies for 1hour at room temperature. The coverslips were mounted with immumount medium (Thermo scientific). Images were acquired using the confocal microscope Zeiss LSM-880 (CICQLE platform from Grange Blanche, Lyon, France) and analyzed using the Image J software.

Pulse-chase experiments and colocalization analysis

Sh-Ct, sh-TSG or sh-HRS cells in proliferation were preincubated with cycloheximide (10µg/ml) 60 min before EGF stimulation, as well as during the course of the experiment to prevent EGFR synthesis as previously described (Wenzel *et al*, 2018). Cells were pulse-stimulated during 5 min with 50 ng/ml EGF-488 (E13345, Thermo Fisher Scientific) and then

washed with warm DMEM containing cycloheximide. After indicated chase times (15, 30 and 45 min), cells were fixed with 4% PFA during 10 min and immunostained as described in the Immunofluorescence and confocal microscopy imaging section. Colocalization between EGF-488 and EEA1 was quantified with the ImageJ software. To quantify colocalization, a binary mask corresponding to the overlap between the green (EGF-488) and the red (EEA1) channels was generated according to (Osseni *et al*, 2016). This mask corresponded to the surface of colocalization on one confocal plane. A ratio was calculated between the surface of colocalization and the total green surface (EGF-488). Results were given as percentage of colocalization of EGF-488 with EEA1. The same procedure was used to quantify colocalization of HRS around nuclei with CHC, Rab5, Rab7, GM130 and KDEL. In this case, only the ratio of overlapping between HRS and the target proteins was used.

C2C12 myoblast and muSC differentiation analysis

To determine the rate of myoblast differentiation, the myogenic index was used as a morphological parameter of muscle differentiation. The number of nuclei in cells positive for the myosin heavy chain (MHC) staining and the total number of nuclei were counted in >6 randomly selected fields per well. The myogenic index (in %) was then calculated as: ([number of nuclei in positive MHC staining] / [total number of nuclei in counted fields] × 100) using ImageJ software version 2.0.

Immunoblotting

Whole cell lysates were prepared using Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (50mM Tris HCl pH8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,5%Na-deoxycholate, 0,1% SDS) supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete; Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitor (PhosphoStop; Roche) and centrifugated at 10,000g, during 10 min at

4°C or directly lysed in 1X sample buffer (60mM TrisHCl buffer at pH6,8, 2%SDS, 10%Glycerol, 5% β-mercapto-ethanol, 0,025 % bromophenol blue)).Protein concentration was determined with the Bradford reagent (Biorad) and 5-30µg of proteins were loaded and separated by SDS-PAGE electrophoresis gels in presence of 2,2,2-Trichloroethanol (TCE, T54801, Sigma-Aldrich) (X%) for stain free analyzes. Gels were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, IPVH0001 0,45 µm) by semi-dry electrotransfer apparatus (TransBlot® Turbo™, Bio-Rad) in TOWBIN buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) or wet electrotransfer (25mM Tris, 192 mM glycine, 20% Ethanol) and rate of transfer was controlled by stain free analyzes using the ChemiDoc™ Touch imaging system (Biorad) analyzer. Membranes were incubated with primary antibody in 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-Buffered Saline (TBS buffer; UP74004B, Interchim) over-night at 4°C. Membranes were successively washed 3x5min in TBS 0,1% Tween-20 and were next probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies during 1 hour at room temperature. After three washing steps, immunodetection was carried out using the ECL™ reagent (Amersham). Western Blotting revelation was carried with a ChemiDoc™ Touch imaging system (Biorad). Quantification of immunoblots was done using the image lab software (Biorad).

Quantification and statistical analysis

All experiments were performed at least three independent times unless otherwise indicated. The unpaired two-tailed Student's t test was used to compare the means of two independent groups to each other. Bar graphs present the mean ± SEM. A significant result was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses were done with Excel and GraphPad Prism.

All images analysis has been done with the ImageJ software (version 2.0).

Concerning GSK3 β localization in vacuoles, signal intensity has been obtained by manually drawing a ROI line of 1 μ m between the middle of a vacuole and the cytoplasm. 6 vacuoles have been counted in 5 different images for each experiment.

Concerning the calculation of Myogenin and MEF2A ratio on nuclei, manual counting of Myogenin and MEF2A positive nuclei have been realized. Ten fields for each experiment have been counted.

Legends

Figure 1: HRS is dynamically expressed and distributed during myogenesis in C2C12 and primary muscle cells.

(A) Representative Western blotting of myoblast C2C12 cell extracts in proliferation status (Pro; lane 1) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6) and probed with anti-MHC, -MyoD, -Myogenin antibodies as makers of differentiation, and anti-HRS antibody.

(B) Quantification of the HRS protein level from experiments as presented in (A). Data are presented as ratio of HRS/GAPDH and normalized to the Pro status starting point. Data are presented as the mean +/- SEM. n=8 experiments. Significance was assessed using a Kruskal-Wallis test; ***p<0,001, **p<0,01.

(C) Representative immunofluorescence images of HRS distribution in C2C12 in proliferation (Pro) or during differentiation at the indicated time points (in hours). Cells were stained with the anti-HRS antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. White dotted squares represent a focus of the selected region (see lower panel). White arrowheads and arrows show cytosolic HRS and perinuclear distribution respectively during the course of the myogenesis process. Scale bar, 20 μ m.

(D) Representative immunofluorescence images of C2C12 myoblasts transfected with the construct encoding the human GFP-HRS (huHRS-GFP) fusion 1 day before induction of

differentiation and differentiated for 144 hours. huHRS-GFP signal (in green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. White dotted squares represent a focus of the selected region (see lower panel). White arrows indicate the perinuclear huHRS-GFP labeling. Scale bar, 20 μ m and 10 μ m for inset.

(E) Representative immunofluorescence images of HRS distribution in primary murine muscle satellite cells (muSC) in proliferation (Pro) or at 24 and 48 hours of differentiation. Cells were stained with the anti-HRS antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. White dotted squares represent a focus of the selected region (see lower panel). White arrows indicate the perinuclear accumulation of HRS labeling. Scale bar, 20 μ m.

Figure 2: Significant perinuclear colocalization of HRS with Rab5a and Clathrin Heavy Chain (CHC) in differentiated myotubes.

(A) Representative immunofluorescence images of HRS distribution in C2C12 at 144 hours of differentiation. Cells were probed with the anti-HRS (green) and the anti-Rab5a for early endosome or anti-Clathrin Heavy Chain (CHC); anti-Rab7 for late endosome; anti-KDEL for endoplasmic reticulum or anti-GM130 for the Golgi apparatus (in red). White dotted squares represent a focus of the selected regions (see insets). Scale bar, 20 μ m.

(B) Quantifications of colocalization from experiments like in (A) have been made by creating binary mask between merge channel of HRS and Rab5; CHC; Rab7; KDEL or GM130 signals. Quantification of the signals obtained around nuclei are presented as plot-graphs where one dot corresponds to the signal for one nucleus. Data represent mean +/- SEM, n=33-45 nuclei for each group. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test (P<0.05); *** P=0.0004; **** P<0.0001.

Figure 3: HRS silencing inhibits myoblast to myotube differentiation.

(A) Representative Western blotting of C2C12 transduced myoblasts with HIV-1 lentivectors encoding a shControl (shCT, lane 1) or different shRNAs directed against the hrs mRNA shHRS#1 (lane 2), #2 (lane 3), #3 (lane 4) and probed with the anti-HRS and the anti-GAPDH antibodies.

(B) Quantification of shCT and shHRS#3 C2C12 myoblast cell number at 6, 24 or 46 hours. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using two-tailed Mann-Whitney test.

(C) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 myoblasts and probed with antibodies directed against Lamp1 (green) for late endosome/lysosomes or EEA1 (red) for early endosomes. White dotted squares represent a focus of the selected regions (see insets). Scale bar, 20µm.

(D) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#1-3 C2C12 at 96 hours of differentiation and probed with the anti-MHC antibody (green) as a marker of myotubes and DAPI (red) for nuclear labeling. Note the strong decrease of MHC positive myotubes in shHRS conditions. Scale bar, 200µm.

(E) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 myoblasts at the Pro status (lanes 1,7) or during the differentiation 7-96 hours (lanes 2-6 and 8-12) and probed with the anti-HRS, -MHC, and -GAPDH antibodies. Note the absence of MHC signal in HRS depleted condition confirming the absence of myotubes.

(F) Quantification of the MHC protein level present in experiments like in (C). Data are presented as ratio of MHC/GAPDH and normalized to the Pro starting point condition. Data are presented as the mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; **p<0,01, ***p<0,001.

(G) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structures as shown in (D). Data are presented as the mean

+/- SEM, each dot represents one images, n=24 images. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test ($P<0.05$); **** $P<0.0001$.

(H) Representative Western blotting of muscle satellite cell (muSC) extracts transduced with the lentivector encoding shCT (lane 1) or shHRS#3 (lane 2) and probed with the anti-HRS and the anti-GAPDH antibodies.

(I) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 muSC at 48 hours of differentiation and probed with the anti-MHC antibody (green) and DAPI (red) for nuclear staining. Note the strong decrease of myotubes structures in shHRS#3 muSc cells. Scale bar, 200 μ m.

(J) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structures containing at least 2 nuclei as presented in (I). Data are presented as mean +/- SEM, each dot represents one images, n=16 images. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test ($P<0.05$); **** $P<0.0001$.

Figure 4: Depletion of HRS affects the expression and localization of the myogenic regulator factors.

(A) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 extracts in proliferation (Pro) status (lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72, 96 hours of differentiation (lanes 2-6 and 8-12). Membranes were probed with the anti-HRS, -MHC, -Myogenin, -MyoD, -MEF2A and -GAPDH antibodies.

(B) Quantifications of the Myogenin protein level present in experiments like in (A). Data are presented as the ratio of Myogenin/GAPDH and normalized to the Pro starting point condition. Data are presented as the mean +/- SEM, n=4 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; * $p<0,05$, **** $p<0,0001$.

(C) Real time quantitative PCR of myogenin mRNA carried out on mRNAs from shCT and shHRS#3 C2C12 cells collected in proliferation (Pro) and at 7, 24, 48, 72, 96 hours of differentiation. Data are presented as mean \pm SEM, n=4 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; ***p<0,001, ****p<0,0001.

(D) Quantification of the MyoD protein level present in experiments like in (A). Data are presented as the ratio of MyoD/GAPDH signals and normalized to the Pro starting point condition. Data are represented as the mean \pm SEM, n=6 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test.

(E) Representative immunofluorescence images of MyoD in shCT and shHRS#3 C2C12 cells at 24 or 48 hours of differentiation and probed with anti-MyoD antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear staining. Scale bar, 40 μ m.

(F) Quantification of high MyoD positive nuclei. The data are presented as mean \pm SEM, representing 9 fields counted per experiment, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test (P<0.05), ****p<0,0001.

(G) Quantification of the MEF2A protein level present in experiments like in (A). The data are presented as the ratio of MEF2A/GAPDH signals and normalized to the Pro starting point condition. Data are presented as the mean \pm SEM, n=5 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05, **p<0,01.

(H) Representative immunofluorescence images of MEF2A distribution (green) in shCT and shHRS#3 C2C12 cells and analyzed at 48 or 72 hours of differentiation. DAPI staining (blue) represents nuclear labeling. Scale bar, 40 μ m.

(I) Quantification of high MEF2A positive nuclei. Data are presented as mean \pm SEM, representing 7 fields counted per experiment, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test (P<0.05), ****p<0,0001.

(J) Real time quantitative PCR of *mef2A* mRNA from shCT and shHRS#3 C2C12 cells collected in proliferation (Pro) and at 7, 24, 48, 72, 96 hours of differentiation. The data are presented as mean \pm SEM, n=4 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Figure 5: Depletion of HRS negatively alters EGFR trafficking and up-regulates the ERK-MAPK pathway during differentiation.

(A) Representative immunofluorescence images of pulse chase experiments: shCT and shHRS#3 C2C12 myoblast cells were stimulated for 5 min with 50 ng ml⁻¹ of EGF-488 (green) and after removing unbound ligand-chased for the indicated amount of time. Cells were probed with the anti-EEA1 to visualize early endosomes and trafficking of EGF-488/EGFR was followed through the early endosomal pathway. White arrows indicate colocalization of EGF-488/EGFR (in green) with the EEA1 early endosome marker (in red). Note the accumulation of EGF-488 in EEA1 positive compartments (yellow merge) in shHRS#3 depleted cells. Scale bar, 20 μ m.

(B) Quantifications of colocalization of EGF-488 in EEA1 positive compartments: analysis shows the percentage of EGF-488 overlapping with EEA1 and establishes the endocytic trafficking of EGF ligand through the early endocytic pathway (EEA1 compartment). Open circles correspond to shCT and black squares to shHRS#3 conditions. The data are presented as mean \pm SEM. Analyses were done on 5 fields per condition on n=3 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney *** P<0,001; ** P<0,005.

(C) Representative Western blotting of protein extracts from shCT and shHRS#3 C2C12 cells collected in proliferation (Pro) (lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6 and 8-12) and probed with anti-HRS, -MHC, -pERK1/2 (Thr202/Tyr204), -total-ERK1/2, and -GAPDH antibodies.

(D,E) Quantification of the phosphorylated-ERK1/2 from similar experiments presented in (C). The data are presented as a ratio of pERK1/2/GAPDH and normalized to the Pro starting point condition. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01

Figure 6: Inhibition of MEK1/2/ERK1/2 by the U0126 compound rescues formation of myotubes in absence of HRS.

(A) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells at 96 hours of differentiation upon ERK1/2 inhibitor FR180204 (FR18) treatment (1 or 3 μ M) or diluent (DMSO) as negative control and stained with anti-MHC antibody as a marker of myotubes (green) and DAPI for nuclear staining (red). Scale bar, 200 μ m.

(B) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells at 96 hours of differentiation upon MEK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M) or diluent (DMSO) treatment and stained with anti-MHC antibody as a marker of myotubes (green) and DAPI for nuclear staining (red). Scale bar, 200 μ m.

(C) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structures in experiments as presented in (B). Data are mean +/- SEM, each dot represents one field, n=27 images. n=3 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney (P<0.05); *** P<0,0001; * P=0.0247.

(D) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 cell extracts collected at 3 days of differentiation in presence of DMSO or 10 μ M of U0126 and probed with anti-pERK1/2 (Thr202/Tyr204), -total-ERK1/2, and -GAPDH antibodies.

(E) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells at 72 hours of differentiation upon treatment with 10 μ M of the U0126 MEK1/2 inhibitor or

DMSO as negative control and stained with the anti-Myogenin antibody (red) and DAPI (blue) for nuclear staining. Scale bar, 40 μ m.

(F) Quantification of the Myogenin positive nuclei (%). Data are presented as mean \pm SEM, 10 fields have been counted per experiments, n=2 experiments. Significance was assessed using a Kruskal-Wallis test; ****p<0,0001.

Figure 7: Inhibition of GSK3 β rescues myoblast differentiation and Myogenin and MEF2A expression and localization into the nucleus.

(A) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 cell extracts collected in proliferation (Pro; lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours (lanes 2-6 and 8-12) of differentiation and probed with the anti-MHC, -GSK3 β , -phosphorylated-Tyr216 (pY216GSK3 β) and -GAPDH antibodies.

(B) Quantification of the pY216GSK3 β level in experiments as in (A). Data are presented as ratio of pY216GSK3 β /total GSK3 β and normalized to the starting point Pro condition as mean \pm SEM, n=4 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01.

(C) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced myoblasts probed with anti-Lamp1 for late endosome/lysosomes and anti- GSK3 β antibodies. Note the strong accumulation of GSK3 β at the periphery of Lamp1 positive vacuoles. Scale bar, 20 μ m.

(D) Quantification of the GSK3 β accumulation depicted in (C). A region of interest (ROI) has been plotted from the outside to the inside of Lamp1 positive vacuoles and GSK3 β signal was quantified using the Image J software. Data are presented as mean \pm SEM. 40-50 vacuoles

were analyzed for each condition, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

(E) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells treated with 10mM of LiCl or 3 μ M of Azakenpaullone (Aza) or diluent (Dil) as negative control and analyzed at 120h of differentiation. Cells were stained with anti-MHC antibody (green) and DAPI (red) for nuclear staining. Note that inhibition of GSK3 β with LiCl and Aza partially restores the formation of myotubes in absence of HRS. Scale bar, 200 μ m.

(F) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structures as depicted in (E). Data are presented as mean +/- SEM with 6 images per condition. n=2 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney; ****p<0,0001.

(G) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells challenged with 10mM LiCl and analyzed at 72hours of differentiation and stained with anti-MEF2A antibody (green) an DAPI (blue) for nuclear staining. Scale bar, 40 μ m.

(H) Quantification of MEF2A positive nuclei. Data are presented as mean +/- SEM, with 6 images per condition. n=2 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney, ** P<0,0038; **** P<0,0001.

(I) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells challenged with 10mM LiCl and analyzed at 72hours of differentiation and stained with the anti-Myogenin antibody (red) and DAPi (blue) for nuclear staining. Scale bar, 40 μ m.

(J) Quantification of Myogenin positive nuclei. Data are presented as % of mean +/- SEM, with 6 images per condition. n=2 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney, **** P<0,0001.

Figure 8: HRS depletion negatively alters the autophagic flux.

(A) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 cell extracts collected in proliferation (Pro; lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6 and 8-12) and probed with the anti-HRS, -p62/SQSTM1, -LC3, and -GAPDH antibodies.

(B) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 myoblasts probed with the anti-LC3 (green), anti-p62 (red) antibodies and DAPI (blue) for nuclear staining. White Arrows indicate accumulation of LC3 and p62 proteins in absence of HRS. Scale bar, 20 μ m.

(C) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 cells at 96 hours of differentiation probed with the anti-LC3 (green), anti-p62 (red) antibodies and DAPI (blue) for nuclear staining. Note the absence of myotubes and the accumulation of LC3 and p62 only in shHRS#3 cells. Scale bar, 20 μ m.

Expanded View Figure legends:

Fig EV1: The protein level of the ESCRT-I TSG101 increased during myoblast differentiation.

(A) Representative Western blotting of C2C12 cell extracts collected in proliferation (Pro; lane 1) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6) and probed with antibodies directed against HRS, TSG101, Myogenin and GAPDH as loading control.

(B) Quantification of the TSG101 protein level in experiments as presented in (A). Data are presented as ration of TSG101/GAPDH and normalized to the starting point Pro condition. Data are presented as mean +/- SEM, n=5 experiments. Significance was assessed using a Kruskal-Wallis test.

(C, D) Representative of confocal images of C2C12 cells in Pro status or at 144h of differentiation and stained with antibodies directed against HRS (green), TSG101-antibodies-

1&2 (ab1&2, red) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Note the intra nuclear accumulation of TSG101. Scale bar, 20 μ m.

Fig EV2: TSG101 silencing in C2C12 delays differentiation.

(A) Representative Western blotting of shCT (lane 1) and different shTSG101 (#1-3; lanes 2-4) C2C12 cell extracts and probed with antibodies directed against TSG101 and GAPDH.

(B) Representative immunofluorescence images of shCT and shTSG101#1-3 C2C12 cells at 96 hours of differentiation and stained with anti-MHC antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Scale bar, 200 μ m.

(C) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structure as presented in (B). Data are presented as mean \pm SEM, each dot represents one image, n=24 images. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test ($P < 0.05$); **** $P < 0.0001$.

Fig EV3: TSG101 silencing in C2C12 doesn't impact EGFR trafficking

(A) Pulse chase experiments in TSG101 depletion context: shCT and shTSG101#3 C2C12 myoblast cells were stimulated for 5 min with 50 ng ml⁻¹ of EGF-488 (green) and after removing unbound ligand-chased for the indicated amount of time. Cells were probed with the anti-EEA1 to visualize early endosomes and trafficking of EGF-488/EGFR was followed through the early endosomal pathway. White arrows indicate colocalization of EGF-488/EGFR (in green) with the EEA1 early endosome marker (in red). Note the accumulation of EGF-488 in EEA1 positive compartments (yellow merge, see white arrows) and the progressive disappearance during the chase process. Scale bar, 20 μ m.

(B) Quantifications of colocalization of EGF-488 in EEA1 positive compartments: analysis shows the percentage of EGF-488 overlapping with EEA1 and establishes the endocytic

trafficking of EGF ligand through the early endocytic pathway (EEA1 compartment). Open circles correspond to shCT and black squares to shTSG101#3 conditions. The data are presented as mean \pm SEM. Analyses were done on 5 fields per condition on n=3 experiments. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney ($P < 0.05$): ns non-significant difference.

(C) Representative Western blotting of protein extracts from shCT and shTSG101#3 C2C12 cells collected in proliferation (Pro) (lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6 and 8-12) and probed with antibodies directed against MHC, TSG101, total-ERK1/2, pERK1/2 (Thr202/Tyr204) and -GAPDH.

(D,E) Quantification of the phosphorylated-ERK1/2 from similar experiments presented in (C). The data are presented as a ratio of pERK1/2/GAPDH and normalized to the Pro starting point condition. Data are presented as mean \pm SEM, n=2 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig EV4: TSG101 depletion in C2C12 negatively alters autophagic flux during differentiation.

(A) Representative Western blotting of shCT and shTSG101#3 C2C12 cell extracts collected in proliferation (Pro; lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation (lanes 2-6 and 8-12) and probed with the antibodies directed against TSG101, MHC, p62/SQSTM1, LC3 and GAPDH.

(B) Representative immunofluorescence images of shCT and shTSG101#3 C2C12 myoblasts probed with the anti-LC3 (green), anti-p62 (red) antibodies and DAPI (blue) for nuclear staining. White Arrows indicate the strong accumulation of LC3 and p62 proteins in absence of TSG101. Scale bar, 20 μ m.

(C) Representative immunofluorescence images of shCT and shTSG101#3 C2C12 myoblasts and myotubes at 96 hours of differentiation probed with the anti-LC3 (green), anti-p62 (red) antibodies and DAPI (blue) for nuclear staining. White arrows and arrowhead show strong accumulation of p62 and LC3 in undifferentiated myoblasts and myotubes respectively whereas yellow arrowheads indicate no accumulation of p62 and LC3 in absence of TSG101. Scale bar, 20 μ m.

Fig EV5: NPC1 like HRS silencing affects cholesterol homeostasis but doesn't affect differentiation.

(A) Representative immunofluorescence images of shCT, shHRS#3 and shTSG101#3 C2C12 myoblasts stained with filipin for cholesterol labeling and probed with the anti-Lamp1 antibody as late endosome/lysosome marker. Note the strong and specific accumulation of cholesterol in Lamp1 positive compartments (see white arrows) in shHRS#3 cells. Scale bar, 20 μ m.

(B) Representative Western blotting of shCT (lane 1) and shNPC1 (lane 2) C2C12 cell extracts probed with anti-NPC1 and anti-GAPDH antibodies.

(C) Representative immunofluorescence images of shCT and shNPC1 C2C12 myoblasts stained with filipin for cholesterol labeling and anti-Lamp1 antibody for late endosome/lysosome compartments. Note the strong accumulation of cholesterol in Lamp1 positive compartments (see white arrows) in shNPC1 cells. Scale bar, 20 μ m.

(D) Representative immunofluorescence images of shCT and shNPC1 C2C12 cells at 96 hours of differentiation and stained with anti-MHC antibody (green) for myotube labeling and DAPI (red) for nuclear staining. Scale bar, 200 μ m.

(E) Quantification of the differentiation index corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structure in (D). Data are presenting as dots and showing the mean \pm SEM, each dot represents one field, n>20 images.

(G) Quantification of the myogenic index (differentiation index) corresponding to the number of nuclei present in MHC positive structures containing at least 2 nuclei as depicted in (D). Data are presented as mean +/- SEM; each dot represents one images, n=20 images. Significance was assessed using an unpaired t-test, Mann-Whitney.

Appendix Supplementary Figures:

Appendix Fig S1: the mRNA level of HRS doesn't change during differentiation of C2C12

(A) Real time quantitative PCR of hrs mRNA from C2C12 cells collected in proliferation (Pro) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours of differentiation. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiences. Significance was assessed using a Kruskal-Wallis test.

Appendix FigS2: HRS is localized around nuclei in muscle fibers and is enriched at the neuromuscular junction

(A) Representative immunofluorescence images of EDL muscle fibers stained with anti-HRS antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Note the accumulation of HRS around and at the poles of nuclei (see white arrows). White dotted squares represent a focus of the selected region (see right panel). Scale bar, 20µm.

(B) Representative immunofluorescence image of EDL muscle fibers in regeneration and stained with anti-HRS antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Note the strong accumulation of HRS around the nuclei (see white arrows). The dotted square represents a focus on the selected region (right panel). Scale bar, 20µm

(C) Representative immunofluorescence image of a neuromuscular junction (NMJ) of an EDL muscle fiber stained with anti-HRS antibody (green), the bungarotoxine (BTX) to show the

acetyl choline receptor (red) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Note that the HRS signal is enriched at the NMJ. Scale bar, 20 μ m

Appendix Fig S3: HRS depletion in immortalized human myoblasts negatively alters their differentiation and partial rescue of differentiation through HRS overexpression.

(A) Representative Western blotting of shCT (lane 1) and sh-huHRS#1-3 (lanes 2-4) of immortalized human myoblast (Y711i) extracts at 96h of differentiation. Membrane was probed with antibodies directed against HRS, MHC, and GAPDH.

(B) Representative immunofluorescence images of shCT and sh-huHRS#1-3 Y711i cells at 96 hours of differentiation and stained with anti-MHC antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Scale bar, 200 μ m.

(C) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 cells transfected one day prior differentiation with empty or Myc-HRS encoding construct for 4 days. Membrane was probed with antibodies directed against MHC, HRS, Myogenin and GAPDH.

(D) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 cells and transfected one day prior differentiation with empty or Myc-HRS encoding constructs for 4 days. Cells were probed with anti-MHC antibody (green) and DAPI (blue) for nuclear labeling. Scale bar, 200 μ m.

Appendix Fig S4: Depletion of HRS negatively affects Akt2 protein level but doesn't impact p38MAPK expression and localization.

(A) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 cell extracts collected in proliferation (Pro; lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours (lanes 2-6 and 8-12) of differentiation and probed with anti-MHC, -phosphorylated Serine 474 Akt2 (pS474Akt2), -Akt2, -Akt1 and -GAPDH antibodies.

(B) Quantification of total Akt2 protein level in experiments as presented in (A). Data are presented as ratio of Akt2/GAPDH signal and normalized to the starting point Pro condition. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; ***p<0,001; ****p<0,0001.

(C) Quantification of pS474Akt2 protein level in experiments as presented in (A). Data are presented as ratio of pS474Akt2/GAPDH signal and normalized to the starting point Pro condition. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01.

(D) Quantification of total Akt1 protein level in experiments as presented in (A). Data are presented as ratio of Akt1/GAPDH signal and normalized to the starting point Pro condition. Data are presented as mean +/- SEM, n=3 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test; *p<0,05; **p<0,01.

(E) Representative Western blotting of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cell extracts collected in proliferation (Pro; lanes 1 and 7) and at 7, 24, 48, 72 and 96 hours (lanes 2-6 and 8-12) of differentiation and probed with the anti-total-p38, -phosphorylated-Thr180/Tyr182-p38 (pp38), and -GAPDH antibodies.

(F) Quantification of the pp38 level in experiments as presented in (E). Data are presented as ratio of pp38/total p38 and normalized to the starting point Pro condition. Data are presented mean +/- SEM, n=4 experiments. Significance was assessed using a two-way ANOVA test.

(G) Representative immunofluorescence images of shCT and shHRS#3 C2C12 transduced cells at 7 or 24 hours of differentiation and stained with the anti-pp38 antibody (green). Scale bar, 20µm.

References

- Asfour HA, Allouh MZ & Said RS (2018) Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp Biol Med (Maywood)* 243: 118–128
- Babst M (2005) A Protein's Final ESCRT. *Traffic* 6: 2–9
- Bache KG, Brech A, Mehlum A & Stenmark H (2003) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 162: 435–442
- Bhuin T & Roy JK (2009) Rab11 is required for myoblast fusion in Drosophila. *Cell Tissue Res* 336: 489–499
- Brankatschk B, Wichert SP, Johnson SD, Schaad O, Rossner MJ & Gruenberg J (2012) Regulation of the EGF transcriptional response by endocytic sorting. *Science Signaling* 5: ra21
- Chanut-Delalande H, Jung AC, Baer MM, Lin L, Payre F & Affolter M (2010) The Hrs/Stam Complex Acts as a Positive and Negative Regulator of RTK Signaling during Drosophila Development. *PLoS ONE* 5: e10245
- Chen D, Chen F, Xu Y, Zhang Y, Li Z, Zhang H, Pan T, Su Y, Wan M, Wang X, *et al* (2017) AKT2 deficiency induces retardation of myocyte development through EndoG-MEF2A signaling in mouse heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493: 1410–1417
- Chen J, Hou N, Zhang C, Teng Y, Cheng X, Li Z, Ren J, Zeng J, Li R, Wang W, *et al* (2015) Smooth Muscle Hgs Deficiency Leads to Impaired Esophageal Motility. *Int J Biol Sci* 11: 794–802
- Clague MJ & Urbé S The interface of receptor trafficking and signalling. 7
- Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C & Raposo G (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126: 5553–5565
- Comunale F, Causeret M, Favard C, Cau J, Taulet N, Charrasse S & Gauthier-Rouvière C (2007) Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biology of the Cell* 99: 503–517
- Cong XX, Gao XK, Rao XS, Wen J, Liu XC, Shi YP, He MY, Shen WL, Shen Y, Ouyang H, *et al* (2020) Rab5a activates IRS1 to coordinate IGF-AKT-mTOR signaling and myoblast differentiation during muscle regeneration. *Cell Death Differ*
- Dauner K, Eid W, Raghupathy R, Presley JF & Zha X (2017) mTOR complex 1 activity is required to maintain the canonical endocytic recycling pathway against lysosomal delivery. *J Biol Chem* 292: 5737–5747
- Dionyssiou MG, Nowacki NB, Hashemi S, Zhao J, Kerr A, Tsushima RG & McDermott JC (2013) Cross-talk between glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and p38MAPK regulates myocyte enhancer factor 2 (MEF2) activity in skeletal and cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 54: 35–44
- Dobrowolski R & De Robertis EM (2012) Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 53–60
- Dobzinski N, Chuartzman SG, Kama R, Schuldiner M & Gerst JE (2015) Starvation-Dependent Regulation of Golgi Quality Control Links the TOR Signaling and Vacuolar Protein Sorting Pathways. *Cell Reports* 12: 1876–1886
- Du X, Kazim AS, Brown AJ & Yang H (2012) An Essential Role of Hrs/Vps27 in Endosomal Cholesterol Trafficking. *Cell Reports* 1: 29–35
- Estrella NL, Desjardins CA, Nocco SE, Clark AL, Maksimenko Y & Naya FJ (2015) MEF2 Transcription Factors Regulate Distinct Gene Programs in Mammalian Skeletal Muscle Differentiation. *J Biol Chem* 290: 1256–1268
- Faralli H & Dilworth FJ (2012) Turning on Myogenin in Muscle: A Paradigm for Understanding Mechanisms of Tissue-Specific Gene Expression. *Comparative and Functional Genomics* 2012: 1–10
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EMC, Isaacs A, Brech A, Stenmark H & Simonsen A (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of Cell Biology* 179: 485–500
- Forterre A, Jalabert A, Berger E, Baudet M, Chikh K, Errazuriz E, De Larichaudy J, Chanon S, Weiss-Gayet M, Hesse A-M, *et al* (2014) Proteomic Analysis of C2C12 Myoblast and Myotube Exosome-Like Vesicles: A New Paradigm for Myoblast-Myotube Cross Talk? *PLoS ONE* 9: e84153
- Hanyaloglu AC, McCullagh E & von Zastrow M (2005) Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *EMBO J* 24: 2265–2283
- Hatakeyama R & De Virgilio C (2019) TORC1 specifically inhibits microautophagy through ESCRT-0. *Curr Genet* 65: 1243–1249
- Hatakeyama R, Péli-Gulli M-P, Hu Z, Jaquenoud M, Garcia Osuna GM, Sardu A, Dengjel J & De Virgilio C (2019) Spatially Distinct Pools of TORC1 Balance Protein Homeostasis. *Molecular Cell* 73: 325-338.e8

- Henne WM, Buchkovich NJ & Emr SD (2011) The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* 21: 77–91
- Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE & Rudnicki MA (2017) The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72: 10–18
- Hindi SM, Tajrishi MM & Kumar A (2013) Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Science Signaling* 6: re2–re2
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF & Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal* 12: 803–808
- Hunt LC, Stover J, Haugen B, Shaw TI, Li Y, Pagala VR, Finkelstein D, Barton ER, Fan Y, Labelle M, *et al* (2019) A Key Role for the Ubiquitin Ligase UBR4 in Myofiber Hypertrophy in *Drosophila* and Mice. *Cell Reports* 28: 1268–1281.e6
- Irannejad R, Tsvetanova NG, Lobingier BT & von Zastrow M (2015a) Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 35: 137–143
- Irannejad R, Tsvetanova NG, Lobingier BT & von Zastrow M (2015b) Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 35: 137–143
- Isobe M, Lee S, Waguri S & Kametaka S (2018) Clathrin adaptor GGA1 modulates myogenesis of C2C12 myoblasts. *PLoS ONE* 13: e0207533
- Jékely G & Rørth P (2003) Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO reports* 4: 1163–1168
- Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin L-S & Li L (2007) Spongiform Neurodegeneration-associated E3 Ligase Mahogunin Ubiquitylates TSG101 and Regulates Endosomal Trafficking. *MBoC* 18: 1129–1142
- Kim C-H, Neiswender H, Baik EJ, Xiong WC & Mei L (2008) β -Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity. *MCB* 28: 2941–2951
- Knight JD & Kothary R (2011) The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skeletal Muscle* 1: 29
- Komada M (2005) The Hrs/STAM Complex in the Downregulation of Receptor Tyrosine Kinases. *Journal of Biochemistry* 137: 1–8
- Komada M & Soriano P (1999) Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes & Development* 13: 1475–1485
- Kunzmann S, Wohlfahrt JG, Itoh S, Asao H, Komada M, Akdis CA, Blaser K & Schmidt-Weber CB (2003) SARA and Hgs attenuate susceptibility to TGF- β 1-mediated T cell suppression. *The FASEB Journal* 17: 194–202
- Kurgan, Whitley, Maddalena, Moradi, Stoikos, Hamstra, Rubie, Kumar, Roy, Woodgett, *et al* (2019) A Low-Therapeutic Dose of Lithium Inhibits GSK3 and Enhances Myoblast Fusion in C2C12 Cells. *Cells* 8: 1340
- Leroy MC, Perroud J, Darbellay B, Bernheim L & Konig S (2013) Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation Triggers Human Myoblast Differentiation. *PLoS ONE* 8: e71770
- Li H, Huang K, Liu X, Liu J, Lu X, Tao K, Wang G & Wang J (2014) Lithium Chloride Suppresses Colorectal Cancer Cell Survival and Proliferation through ROS/GSK-3 β /NF- κ B Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1–8
- Li J & Johnson SE (2006) ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 1425–1433
- Liu L, Cheung TH, Charville GW & Rando TA (2015) Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Nat Protoc* 10: 1612–1624
- Lloyd TE, Atkinson R, Wu MN, Zhou Y, Pennetta G & Bellen HJ (2002) Hrs Regulates Endosome Membrane Invagination and Tyrosine Kinase Receptor Signaling in *Drosophila*. *Cell* 108: 261–269
- Lu L, Komada M & Kitamura N (1998) Human Hrs, a tyrosine kinase substrate in growth factor-stimulated cells: cDNA cloning and mapping of the gene to chromosome 17. *Gene* 213: 125–132
- MacDonald E, Brown L, Selvais A, Liu H, Waring T, Newman D, Bithell J, Grimes D, Urbé S, Clague MJ, *et al* (2018) HRS–WASH axis governs actin-mediated endosomal recycling and cell invasion. *J Cell Biol* 217: 2549–2564
- Malerød L, Stuffers S, Brech A & Stenmark H (2007) Vps22/EAP30 in ESCRT-II Mediates Endosomal Sorting of Growth Factor and Chemokine Receptors Destined for Lysosomal Degradation. *Traffic* 8: 1617–1629
- Marampon F, Bossi G, Ciccarelli C, Rocco AD, Sacchi A, Pestell RG & Zani BM (2009) MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther*: 10
- Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H & Benovic JL (2003) The E3 Ubiquitin Ligase AIP4 Mediates Ubiquitination and Sorting of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4. *Developmental Cell* 5: 709–722

- Matthew-Onabanjo AN, Janusis J, Mercado-Matos J, Carlisle AE, Kim D, Levine F, Cruz-Gordillo P, Richards R, Lee MJ & Shaw LM (2019) Beclin 1 promotes endosome recruitment of hepatocyte growth factor tyrosine kinase substrate (HRS) to suppress tumor proliferation. *Cancer Res*: canres.1555.2019
- McMillan EM & Quadriatero J (2014) Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochemical Journal* 462: 267–277
- Mermelstein CS, Portilho DM, Medeiros RB, Matos AR, Einicker-Lamas M, Tortelote GG, Vieyra A & Costa ML (2005) Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. *Cell Tissue Res* 319: 289–297
- Mermelstein CS, Portilho DM, Mendes FA, Costa ML & Abreu JG (2007) Wnt/ β -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. *Differentiation* 75: 184–192
- Mills CN, Nowsheen S, Bonner JA & Yang ES (2011) Emerging Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 in the Treatment of Brain Tumors. *Front Mol Neurosci* 4
- Miura S & Mishina Y (2011) Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs) is involved in BMP signaling through phosphorylation of smads and TAK1 in early mouse embryo. *Dev Dyn* 240: 2474–2481
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF & Olson EN (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83: 1125–1136
- Morino C, Kato M, Yamamoto A, Mizuno E, Hayakawa A, Komada M & Kitamura N (2004) A role for Hrs in endosomal sorting of ligand-stimulated and unstimulated epidermal growth factor receptor. *Experimental Cell Research* 297: 380–391
- Oshima R, Hasegawa T, Tamai K, Sugeno N, Yoshida S, Kobayashi J, Kikuchi A, Baba T, Futatsugi A, Sato I, *et al* (2016) ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways. *Sci Rep* 6: 24997
- Osseni A, Sébastien M, Sarraut O, Baudet M, Couté Y, Fauré J, Fourest-Lieuvin A & Marty I (2016) Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J Cell Sci* 129: 3744–3755
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, *et al* (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12: 19–30
- Perry RLS, Parker MH & Rudnicki MA (2001) Activated MEK1 Binds the Nuclear MyoD Transcriptional Complex to Repress Transactivation. *Molecular Cell* 8: 291–301
- Possidonio AC, Miranda M, Gregoracci GB, Thompson FL, Costa ML & Mermelstein C (2014) Cholesterol depletion induces transcriptional changes during skeletal muscle differentiation. *BMC Genomics* 15: 544
- Potthoff MJ & Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134: 4131–4140
- Pridgeon JW, Webber EA, Sha D, Li L & Chin L-S (2009) Proteomic analysis reveals Hrs ubiquitin-interacting motif-mediated ubiquitin signaling in multiple cellular processes: Hrs UIM-mediated protein interactions. *FEBS Journal* 276: 118–131
- Raiborg C (2001) Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO Journal* 20: 5008–5021
- Raiborg C (2006) Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *Journal of Cell Science* 119: 2414–2424
- Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E & Stenmark H (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* 4: 394–398
- Razi M & Futter CE (2006) Distinct Roles for Tsg101 and Hrs in Multivesicular Body Formation and Inward Vesicle Trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 17: 15
- Rusten TE, Vaccari T & Stenmark H (2012) Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol* 14: 38–45
- Sakane H & Akasaki K (2018) The Major Lysosomal Membrane Proteins LAMP-1 and LAMP-2 Participate in Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 41: 1186–1193
- Saksena S & Emr SD (2009) ESCRTs and human disease. *Biochemical Society Transactions* 37: 167–172
- Sasaki Y & Sugamura K (2001) Involvement of Hgs/Hrs in Signaling for Cytokine-mediated *c-fos* Induction through Interaction with TAK1 and Pak1. *J Biol Chem* 276: 29943–29952
- Schmidt O & Teis D (2012) The ESCRT machinery. *Current Biology* 22: R116–R120
- Shin N-Y, Choi H, Neff L, Wu Y, Saito H, Ferguson SM, De Camilli P & Baron R (2014) Dynamin and endocytosis are required for the fusion of osteoclasts and myoblasts. *Journal of Cell Biology* 207: 73–89
- Singh D & Kumar Roy J (2013) Rab11 Plays an Indispensable Role in the Differentiation and Development of the Indirect Flight Muscles in *Drosophila*. *PLoS ONE* 8: e73305

- Sumitani S, Goya K, Testa JR, Kouhara H & Kasayama S Akt1 and Akt2 Differently Regulate Muscle Creatine Kinase and Myogenin Gene Transcription in Insulin- Induced Differentiation of C2C12 Myoblasts. 9
- Szymanska E, Budick-Harmelin N & Miaczynska M (2018) Endosomal “sort” of signaling control: The role of ESCRT machinery in regulation of receptor-mediated signaling pathways. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 74: 11–20
- Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec J-L, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD & De Robertis EM (2010) Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143: 1136–1148
- Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Hirata M, Miwa Y, Morimoto S & Sasaguri T (2004) Glycogen synthase kinase-3 β is tyrosine-phosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316: 411–415
- Tamai K, Tanaka N, Nara A, Yamamoto A, Nakagawa I, Yoshimori T, Ueno Y, Shimosegawa T & Sugamura K (2007) Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360: 721–727
- Tamai K, Toyoshima M, Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, *et al* (2008) Loss of Hrs in the Central Nervous System Causes Accumulation of Ubiquitinated Proteins and Neurodegeneration. *The American Journal of Pathology* 173: 1806–1817
- Tavares LA, da Silva EML, da Silva-Januário ME, Januário YC, de Cavalho JV, Czernisz ÉS, Mardones GA & daSilva LLP (2017) CD4 downregulation by the HIV-1 protein Nef reveals distinct roles for the γ 1 and γ 2 subunits of the AP-1 complex in protein trafficking. *J Cell Sci* 130: 429–443
- Thorley M, Duguez S, Mazza EMC, Valsoni S, Bigot A, Mamchaoui K, Harmon B, Voit T, Mouly V & Duddy W (2016) Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. *Skeletal Muscle* 6: 43
- Vassilopoulos S, Gentil C, Lainé J, Buclez P-O, Franck A, Ferry A, Précigout G, Roth R, Heuser JE, Brodsky FM, *et al* (2014) Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *The Journal of Cell Biology* 205: 377–393
- van der Velden JLJ, Schols AMWJ, Willems J, Kelders MCJM & Langen RCJ (2008) Glycogen Synthase Kinase 3 β Suppresses Myogenic Differentiation through Negative Regulation of NFATc3. *J Biol Chem* 283: 358–366
- Vietri M, Radulovic M & Stenmark H (2019) The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol*
- Vilette D, Laulagnier K, Huor A, Alais S, Simoes S, Maryse R, Provansal M, Lehmann S, Andreoletti O, Schaeffer L, *et al* (2015) Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 72: 4409–4427
- Wang H, Xu Q, Xiao F, Jiang Y & Wu Z (2008) α , β , and γ Isoforms in Myogenic Differentiation. *Molecular Biology of the Cell* 19: 10
- Wang Y, Mohamed JS & Alway SE (2013) M-cadherin-inhibited phosphorylation of β -catenin augments differentiation of mouse myoblasts. *Cell Tissue Res* 351: 183–200
- Wegner CS, Rodahl LMW & Stenmark H (2011) ESCRT Proteins and Cell Signalling. *Traffic* 12: 1291–1297
- Wenzel EM, Schultz SW, Schink KO, Pedersen NM, Nähse V, Carlson A, Brech A, Stenmark H & Raiborg C (2018) Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. *Nat Commun* 9: 2932
- Winter B & Arnold H-H Activated Raf kinase inhibits muscle cell differentiation. 10
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JYJ & Puri PL (2000) p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Molecular and Cellular Biology* 20: 3951–3964
- Xie W, Li L & Cohen SN (1998) Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 1595–1600
- Yan Q, Sun W, Kujala P, Lotfi Y, Vida TA & Bean AJ (2005) CART: An Hrs/Actinin-4/BERP/Myosin V Protein Complex Required for Efficient Receptor Recycling. *MBoC* 16: 2470–2482
- Yohe ME, Gryder BE, Shern JF, Song YK, Chou H-C, Sindiri S, Mendoza A, Patidar R, Zhang X, Guha R, *et al* (2018) MEK inhibition induces MYOG and remodels super-enhancers in RAS-driven rhabdomyosarcoma. *Sci Transl Med* 10: eaan4470
- Zammit PS (2017) Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72: 19–32

Zhang Y, Song M, Cui ZS, Li CY, Xue XX, Yu M, Lu Y, Zhang SY, Wang EH & Wen YY (2011) Down-regulation of TSG101 by small interfering RNA inhibits the proliferation of breast cancer cells through the MAPK/ERK signal pathway. *Histology and Histopathology* 26: 87–94

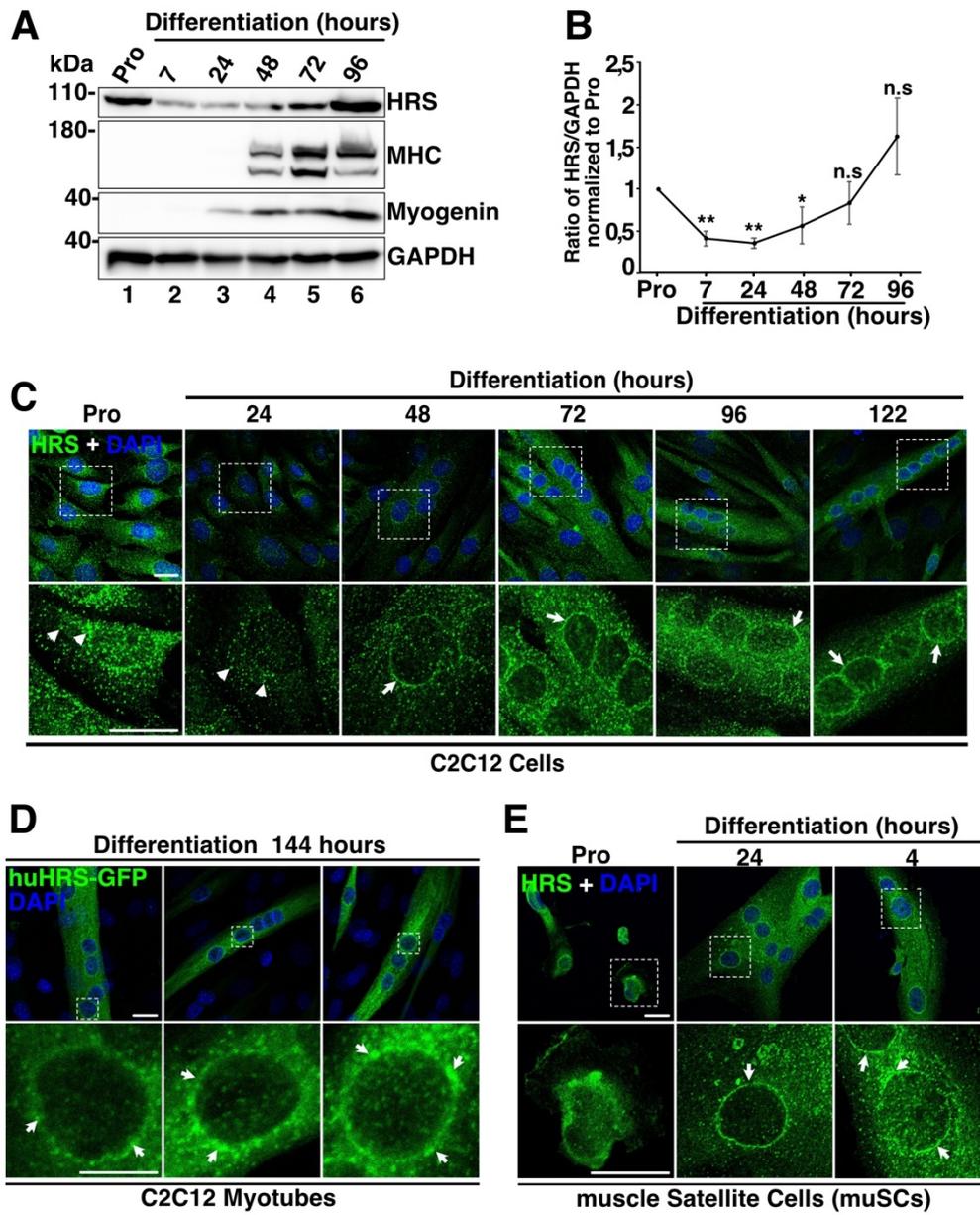


Figure 1 Coudert et al.

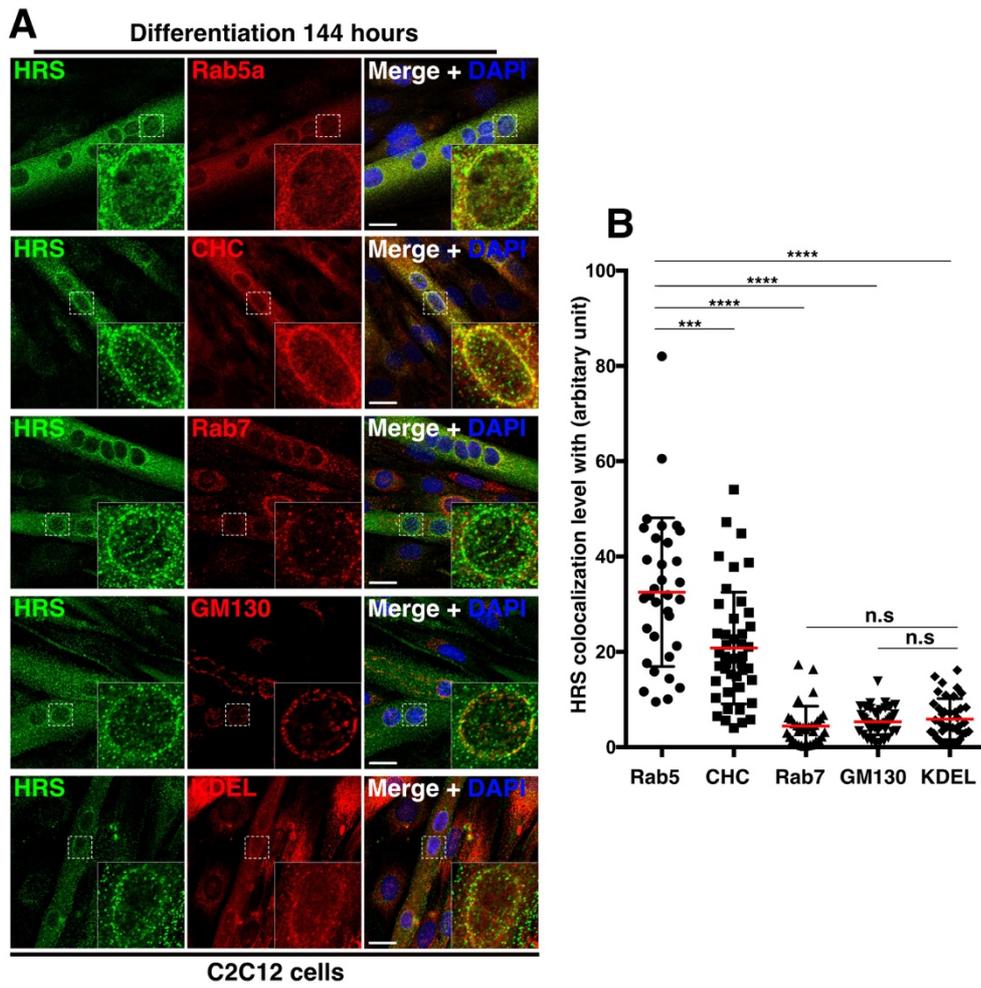


Figure 2 Coudert et al.

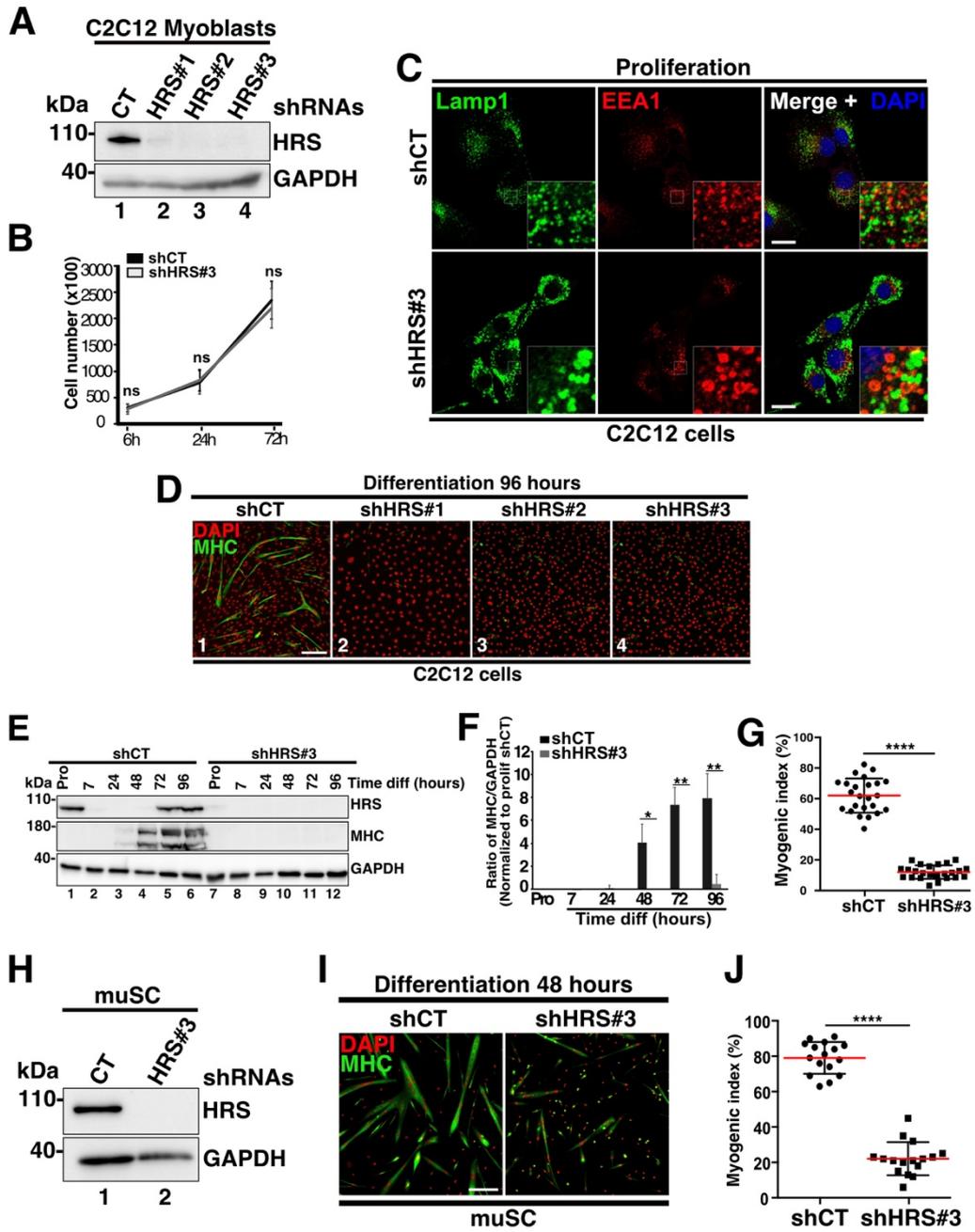


Figure 3 Coudert et al.

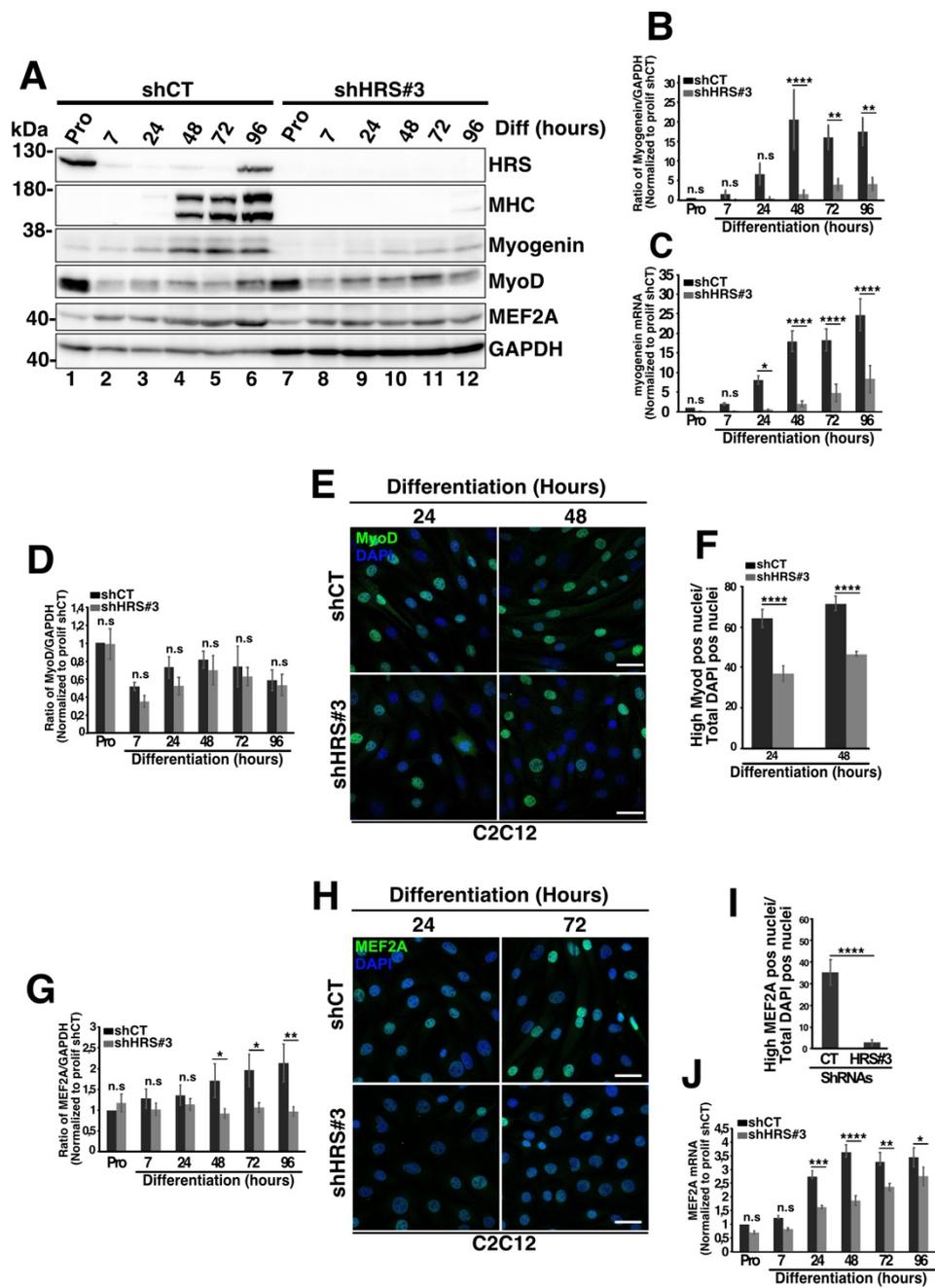


Figure 4 Coudert et al.

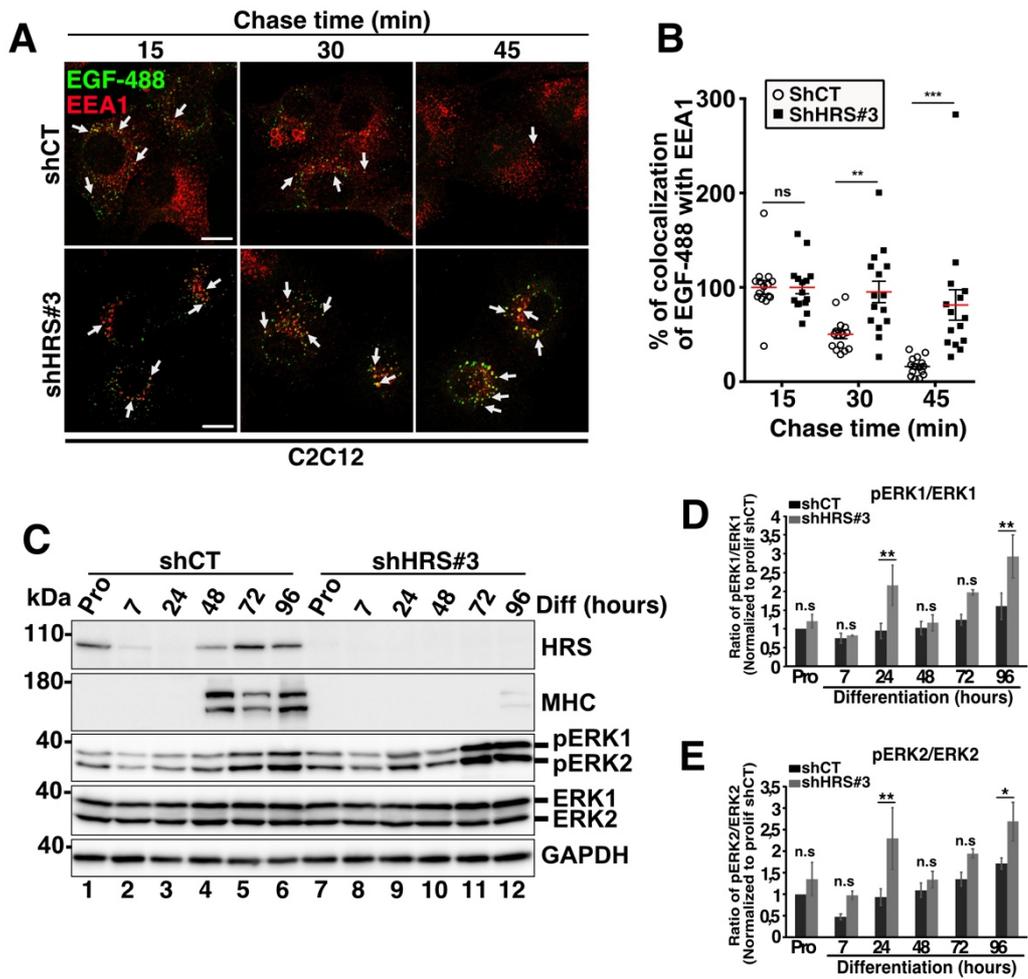


Figure 5 Coudert et al.

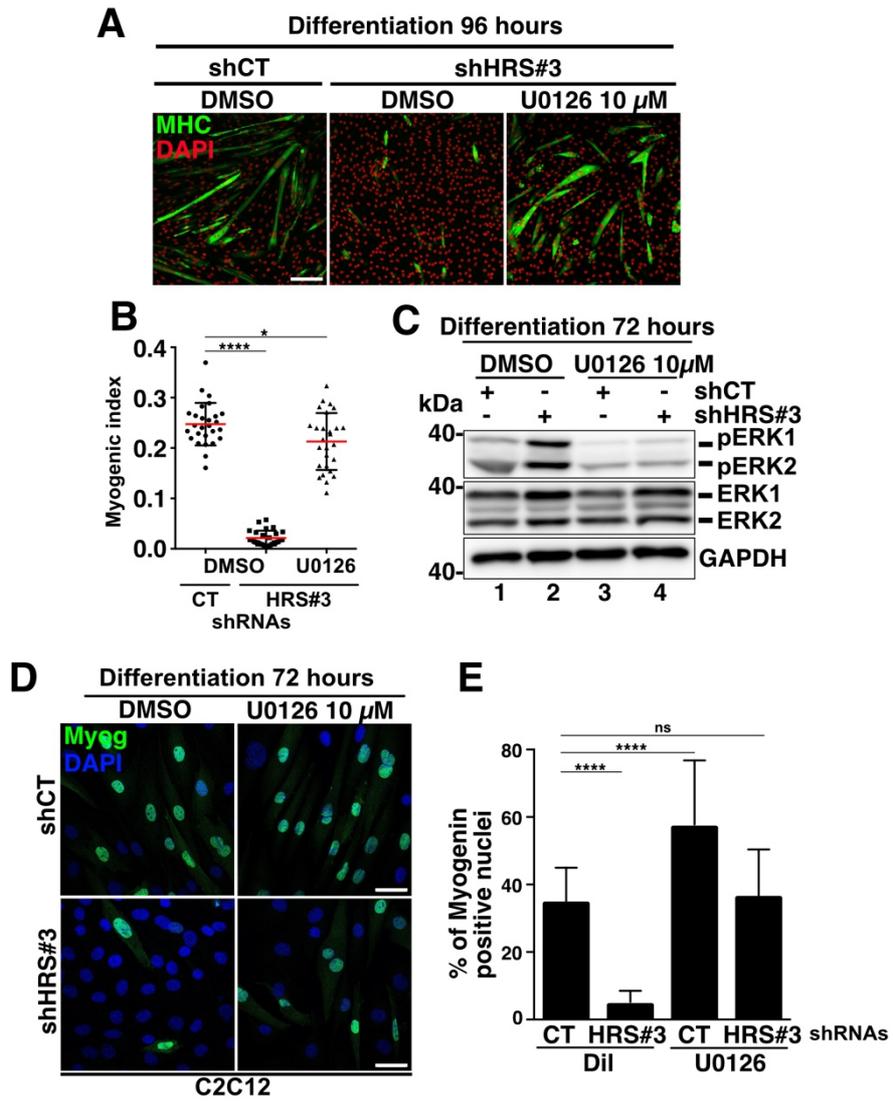


Figure 6 Coudert et al.

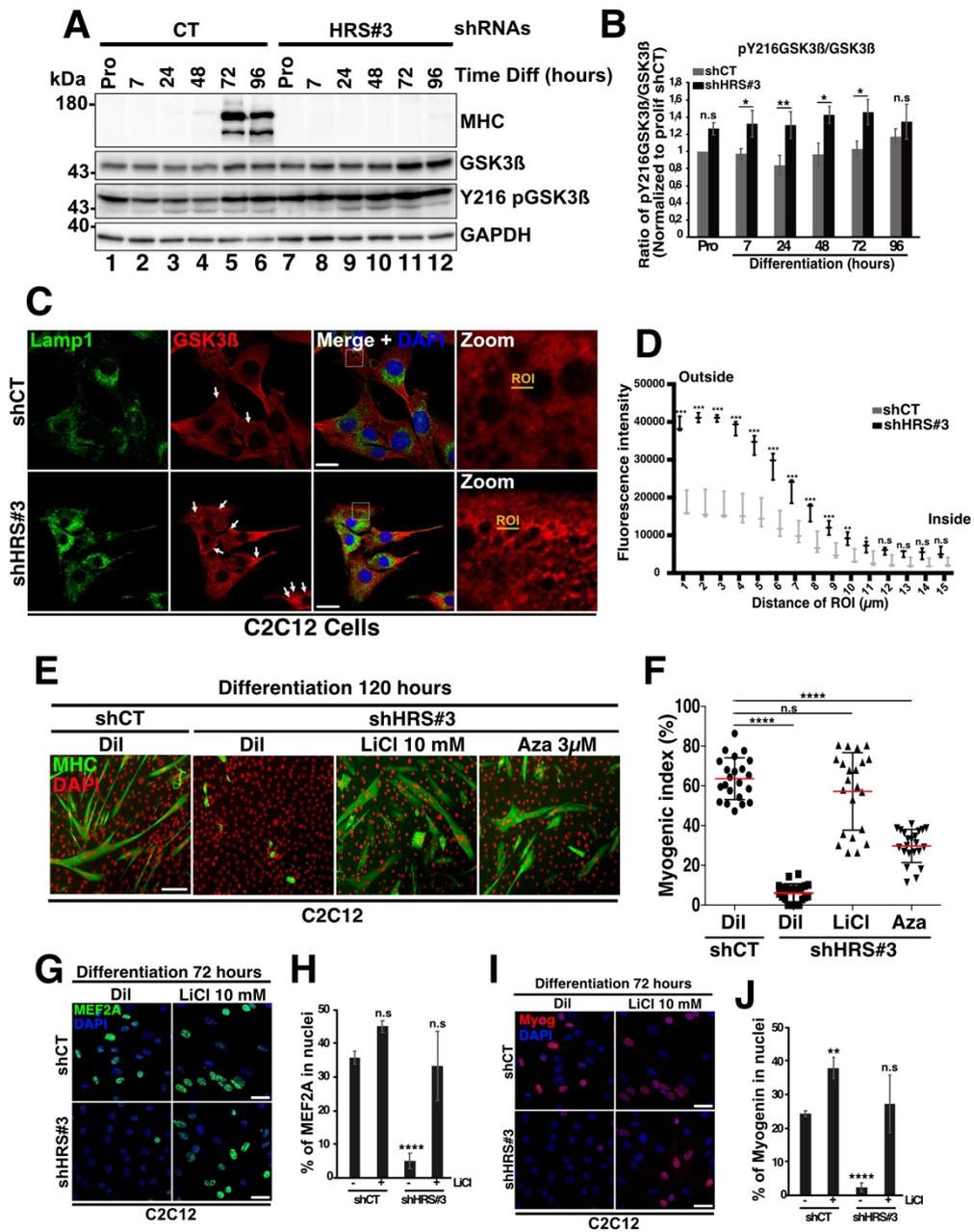


Figure 7 Coudert et al.

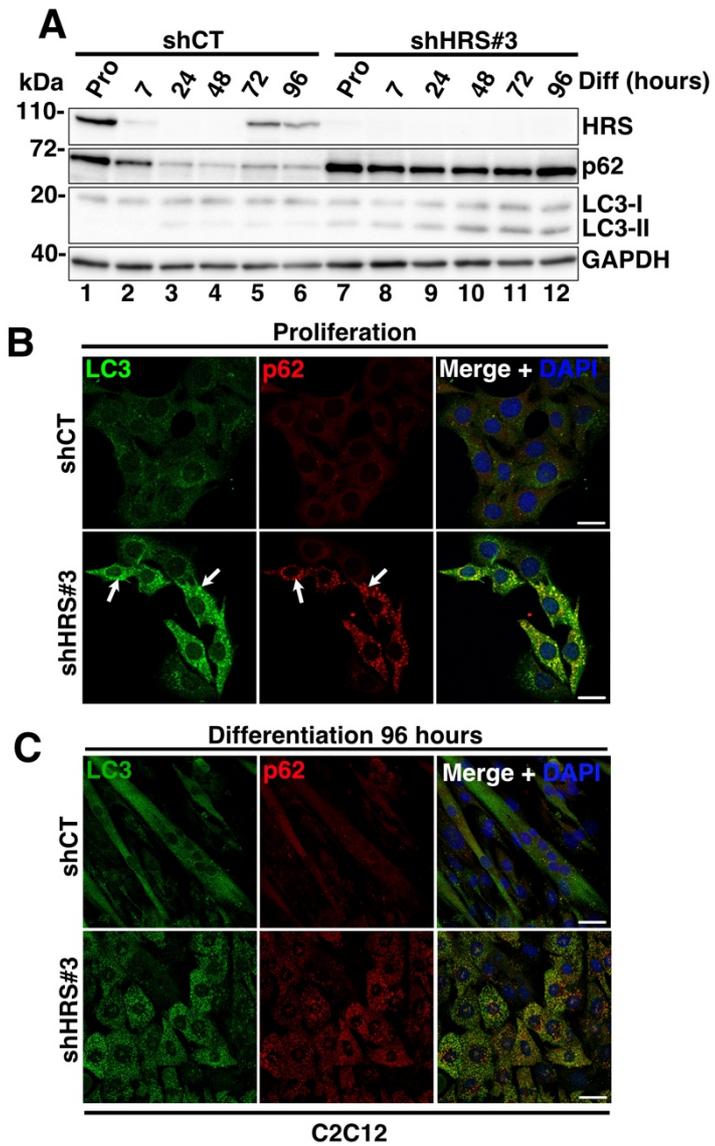


Figure 8 Coudert et al.

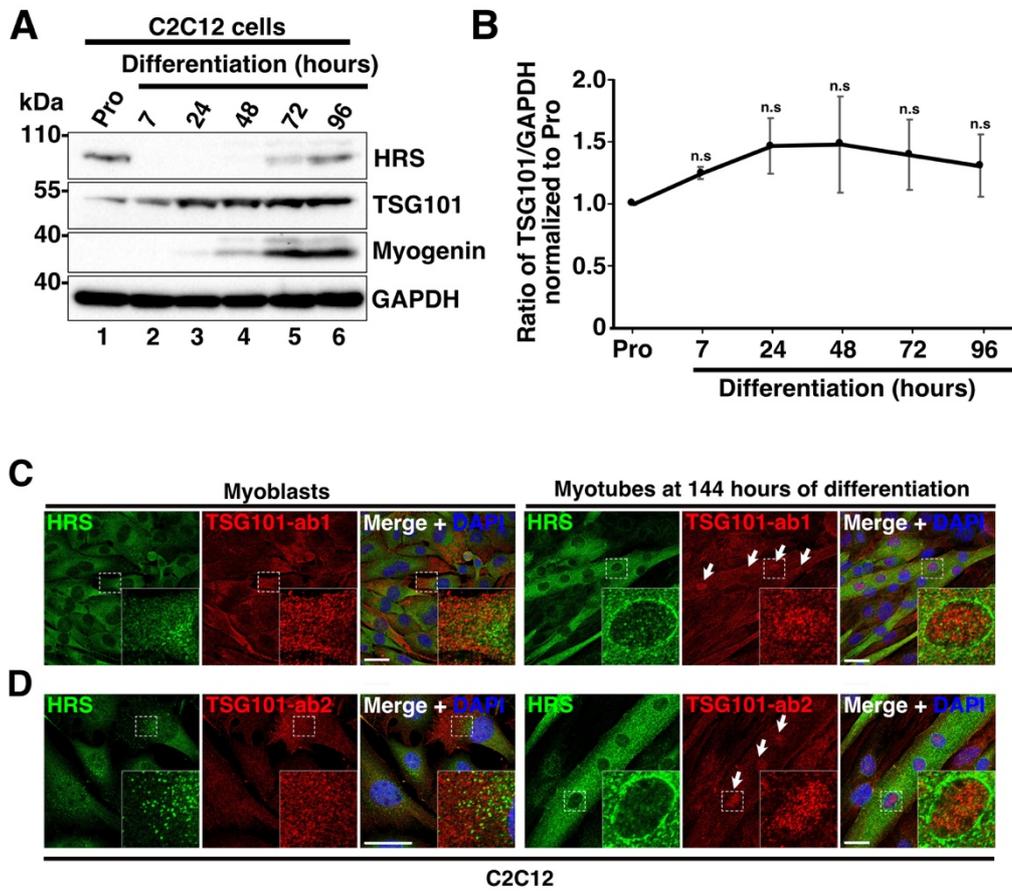


Fig EV1 Coudert et al.

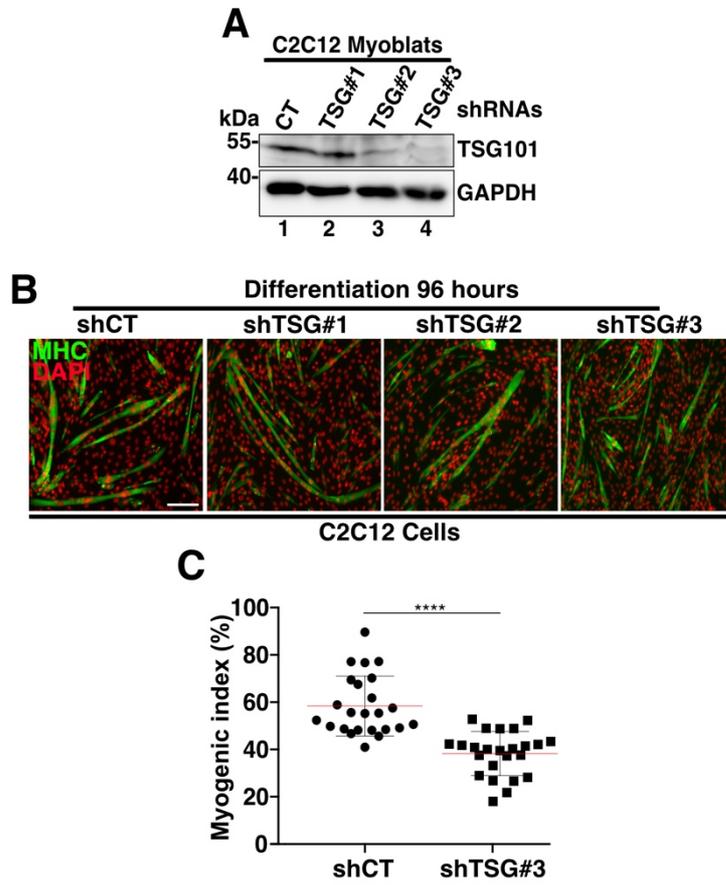


Fig EV2 Coudert et al.

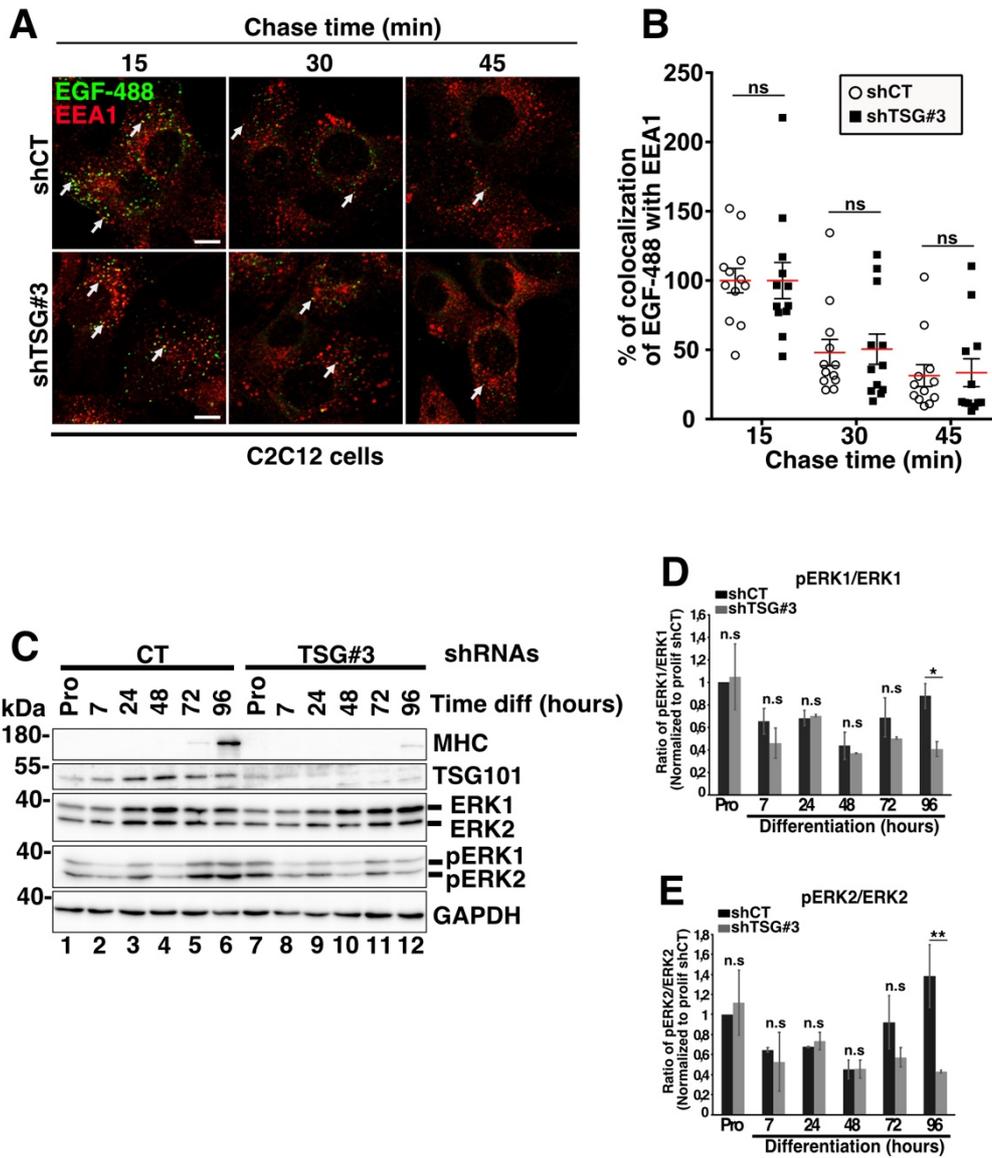


Fig EV3 Coudert et al.

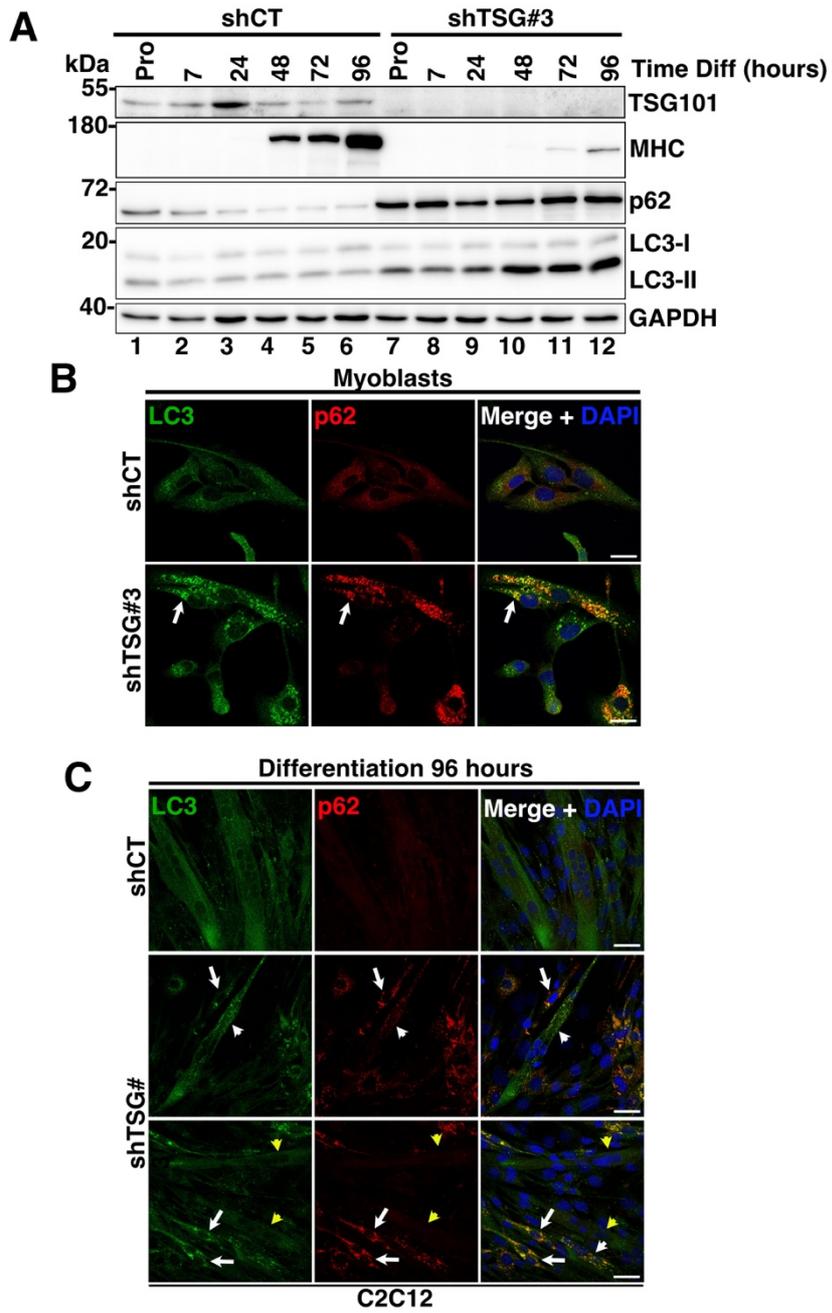


FIG EV4 Coudert et al.

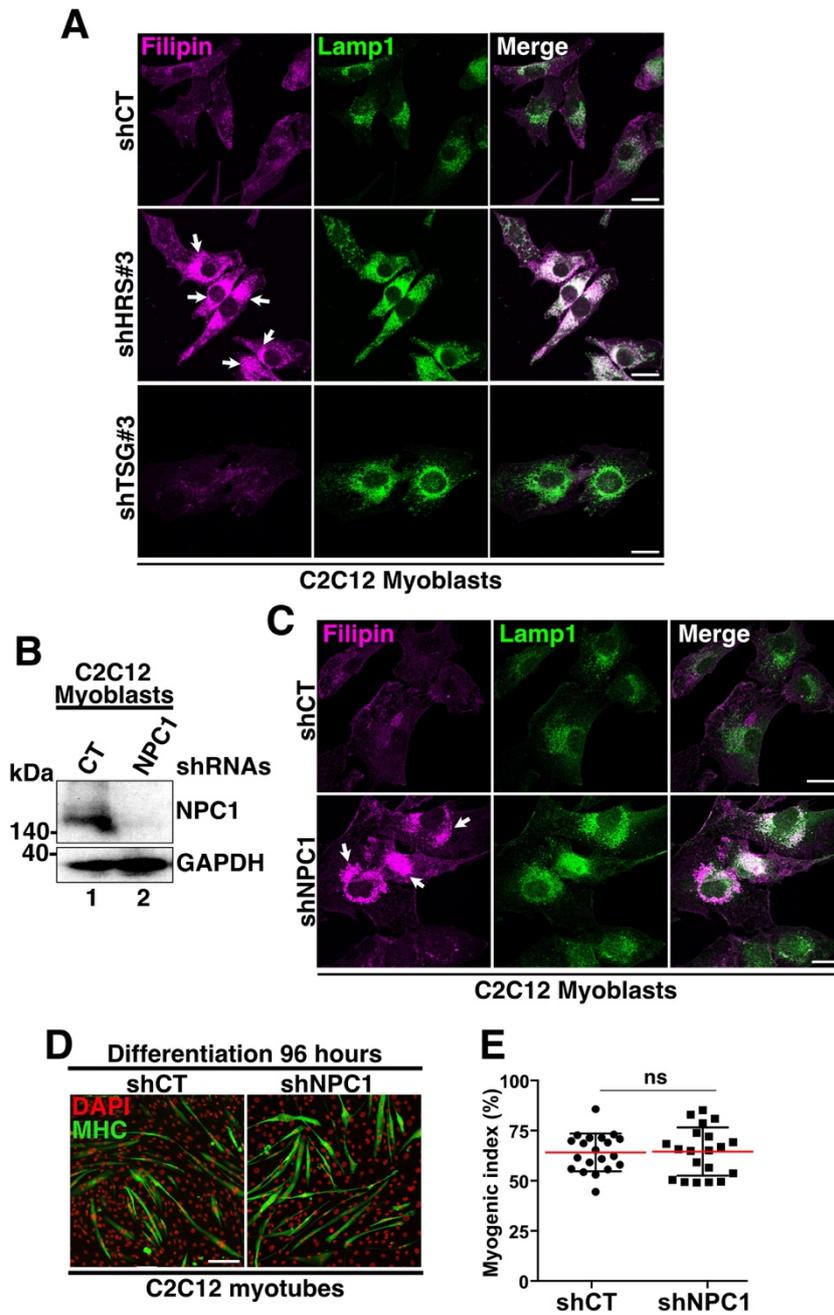
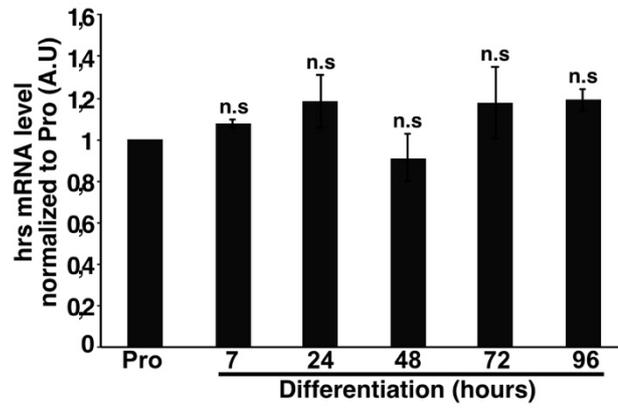
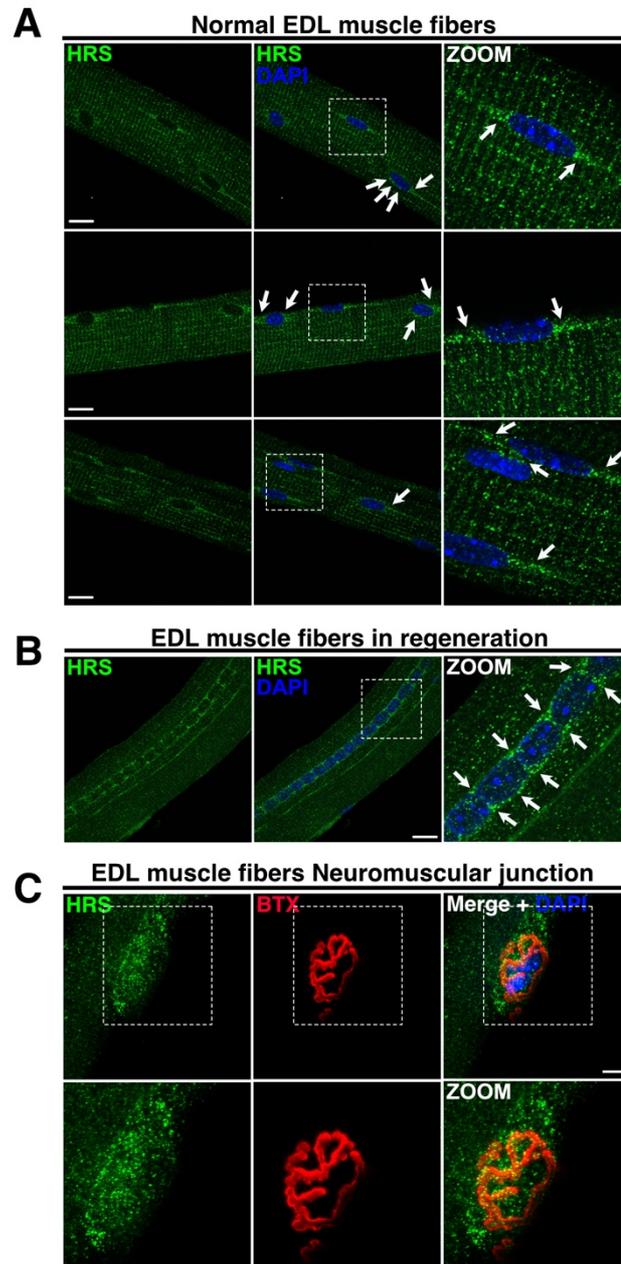


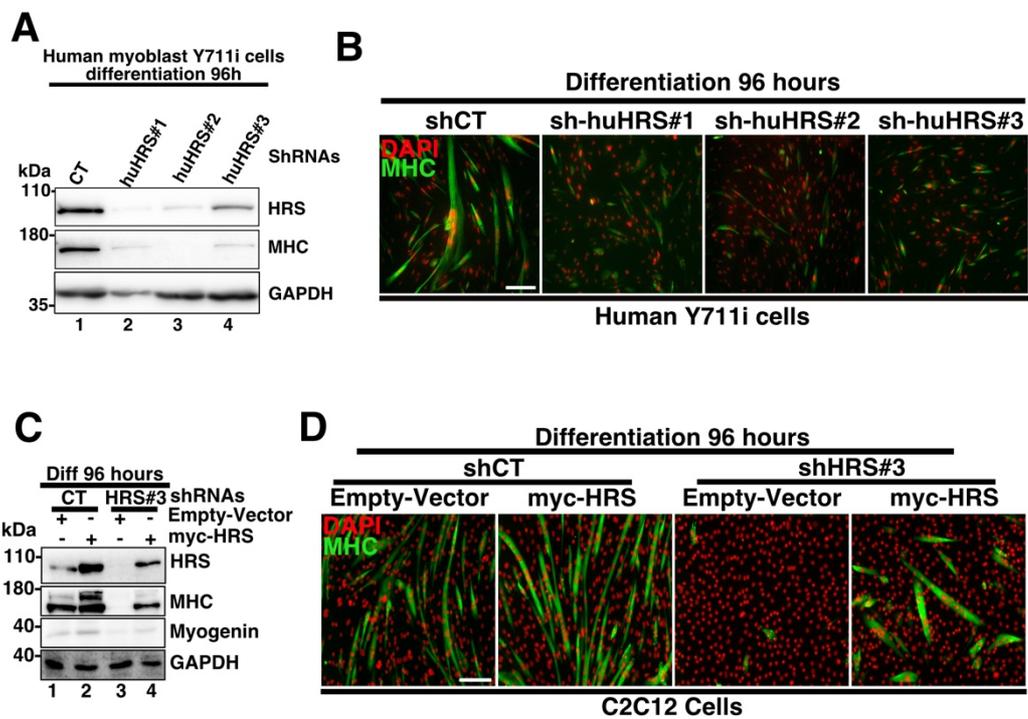
FIG EV5 Coudert et al.



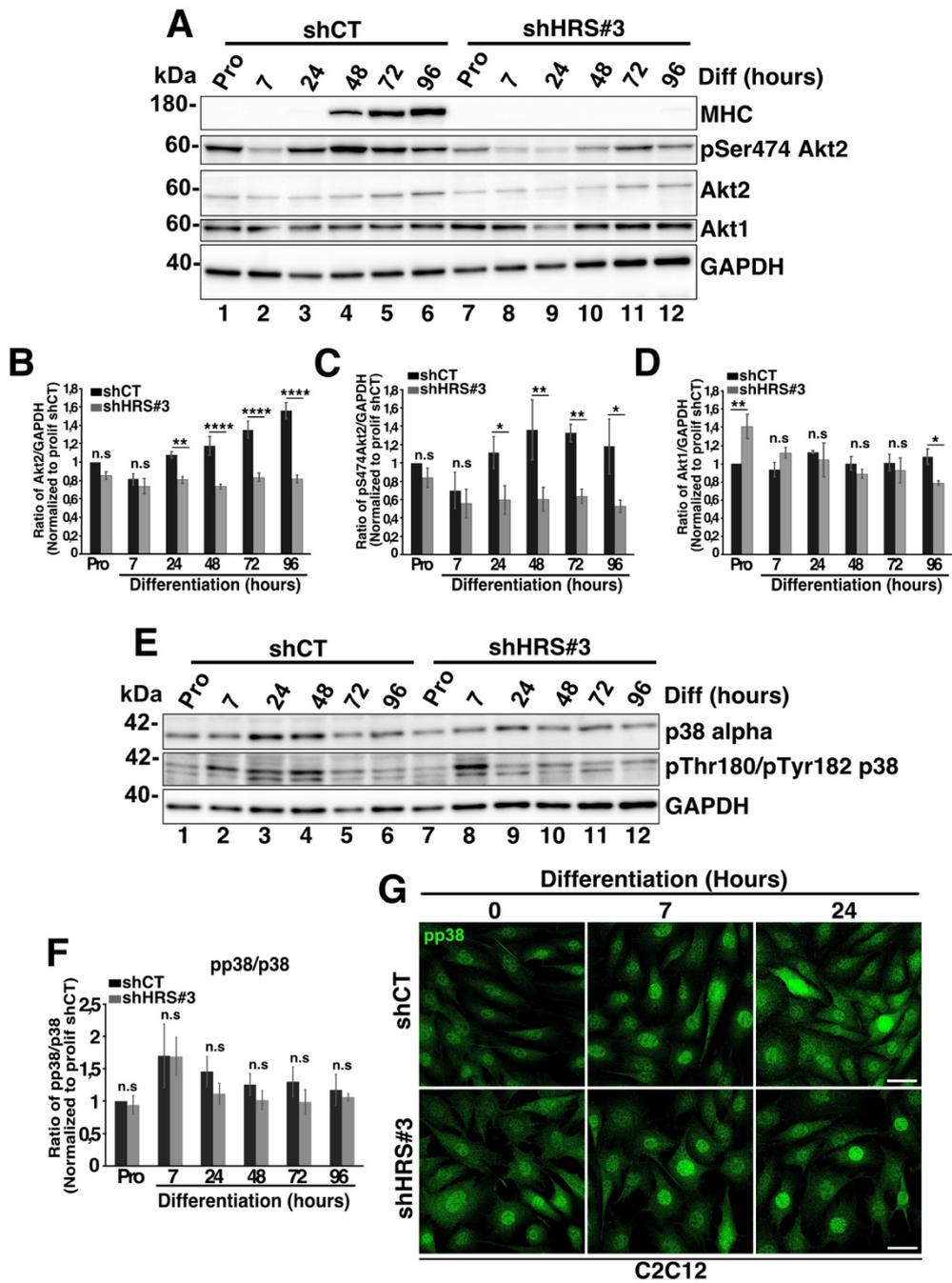
Appendix Figure S1 Coudert et al.



Appendix Figure S2 Coudert et al.



Appendix Figure S3 Coudert et al.



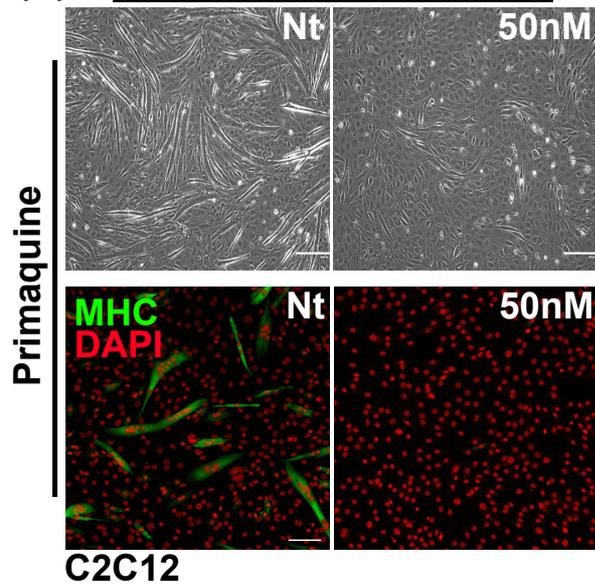
Appendix Figure S4 Coudert et al.

RESULTAS COMPLEMENTAIRES

1) L'inhibition des endosomes de recyclage dans les C2C12 bloque la différenciation, à l'inverse de l'inhibition de la fusion des endosomes tardifs.

Afin d'étudier le rôle des voies d'endocytoses dans la myogenèse, nous avons focalisé notre attention sur les protéines ESCRT-0 HRS et ESCRT-I TSG101 pour inhiber la formation des ILVs dans les MVBs. Également, nous avons utilisé différentes drogues soit pour inhiber le recyclage des protéines membranaires au niveau des endosomes de recyclage soit pour empêcher l'étape finale de fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes. Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons utilisé un inhibiteur des voies de recyclages, la primaquine (van Weert et al., 2000). Les résultats obtenus grâce à l'imagerie Brightfield ont révélé que l'addition de 50 nM de primaquine dans le milieu de différenciation pendant quatre jours inhibait la formation des myotubes (**Figure SD1 A**). Le suivi de l'expression des chaînes lourdes de la myosine (Myosin Heavy Chain : MHC) par immunofluorescence dans les cellules en différenciation et dans les myotubes a révélé une inhibition de la formation des myotubes en présence de primaquine (**Figure SD1 A**). Dans un second temps, nous avons utilisé l'inhibiteur apilimode, dont la cible est la protéine PIKEfyve ; cette dernière est impliquée dans la conversion du PI3P en PI3,5P2 et participe directement à la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes (Hessvik et al., 2016; van Weert et al., 2000). L'ajout de 50, 75 ou 100 nM d'apilimode dans le milieu de différenciation des cellules entraîne une très faible altération de la formation des myotubes après quatre jours de différenciation comme observé en microscopie Brightfield et en immunofluorescence (**Figure SD1 B**). Il est à noter que les myoblastes ainsi que les myotubes présentes une forte vacuolisation après traitement avec l'apilimode. Ce phénotype est associé au fait que les endosomes tardifs s'accumulent dans les cellules (Hessvik et al., 2016). Nous concluons de ces expériences que l'inhibition de la voie endosomale de recyclage perturbe fortement le processus de différenciation alors que, l'inhibition plus tardive de la fusion des endosomes avec les lysosomes n'affecte que très modérément le processus de différenciation.

(A) 4 jours de différenciation



4 jours de différenciation

(B)

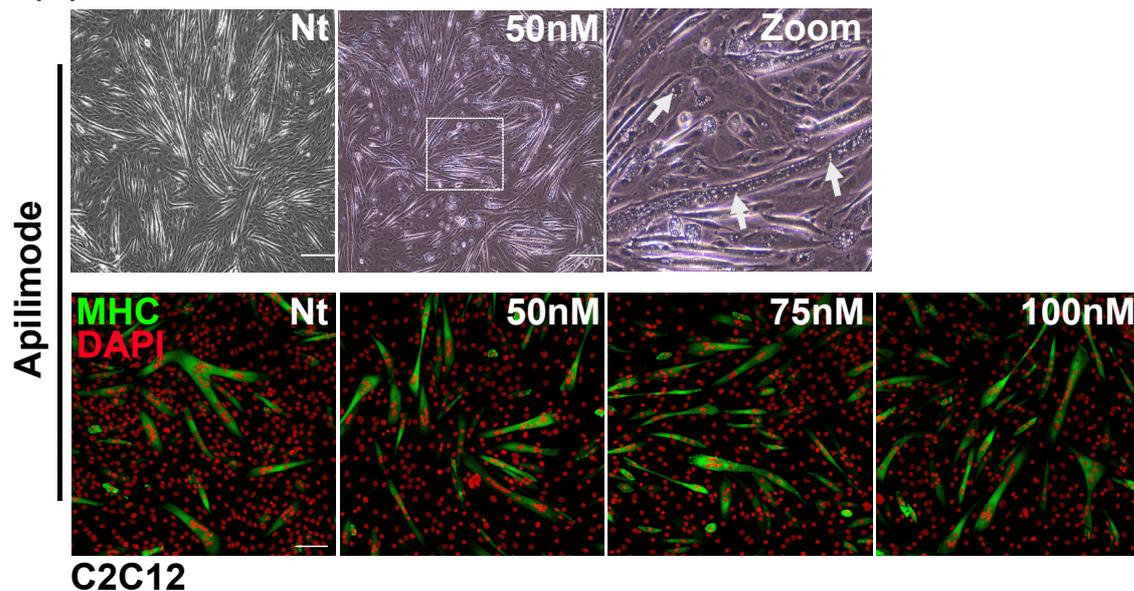


Figure SD1: Effet de l'inhibition de la voie de recyclage endosomal (A) et de la fusion des endosomes tardif avec les lysosomes (B) sur la différenciation des C2C12.

(A) Image en Brightfield et immuno-marquage de cellules C2C12 mises en différenciation pendant 4 jours avec 50 μ M de primaquine. Les cellules ont été immunomarquées pour la chaîne lourde de myosin (MHC) en vert et les noyaux en rouge avec du DAPI. Barre d'échelle, 100 μ m.

(B) Image en brightfield et immuno-marquage de C2C12 mises en différenciation pendant 4 jours avec 50, 75 ou 100 nM d'apilimode. Les cellules ont été immuno-marquées pour la

chaîne lourde de myosine (MHC)₂ en vert et les noyaux marqués avec du DAPI sont en rouge. Les flèches montrent la présence de vacuoles dans les myotubes. Barre d'échelle, 100µm.

2) L'inhibition de HRS provoque l'élargissement des endosomes précoces et tardifs.

HRS est impliquée dans la formation des ILVs des MVBs en séquestrant et en accumulant des protéines et récepteurs membranaires ubiquitinés à la surface des endosomes (Henne et al., 2011b). Des études montrent que son inhibition conduit à l'accumulation de structures vacuolaires dans les cellules (Komada and Soriano, 1999; Oshima et al., 2016; Tamai et al., 2007). De ce fait, nous avons voulu étudier la morphologie des différents compartiments endosomaux en l'absence de HRS dans notre modèle de C2C12. Nous avons utilisé des cellules dans lesquelles l'expression de HRS était inhibée par l'expression stable d'un ARN antisens (shARN) pour localiser par immunofluorescence les protéines Rab5 et EEA1 marquant les endosomes précoces et la protéine Lamp1 marquant les endosomes tardifs/lysosomes. Les résultats montrent que l'absence de HRS induit une forte augmentation de la taille des endosomes précoces marqués par la protéine Rab5a et EEA1 (**figure SD2 A**). Cette augmentation de taille a été aussi observée pour les endosomes tardifs/lysosomes marqués par la protéine Lamp1 (**Figure SD2 B**). De plus, nous avons observé une délocalisation des endosomes tardifs/lysosomes en périphérie des cellules lorsque HRS est absent. Ces données confirment que l'absence de HRS provoque l'élargissement des structures endosomales ainsi que la délocalisation des endosomes tardifs/lysosome en périphérie des cellules dans le modèle cellulaire C2C12 (Lloyd 2002, M Razi et al. 2006, Du et al, 2011, J zhang 2014).

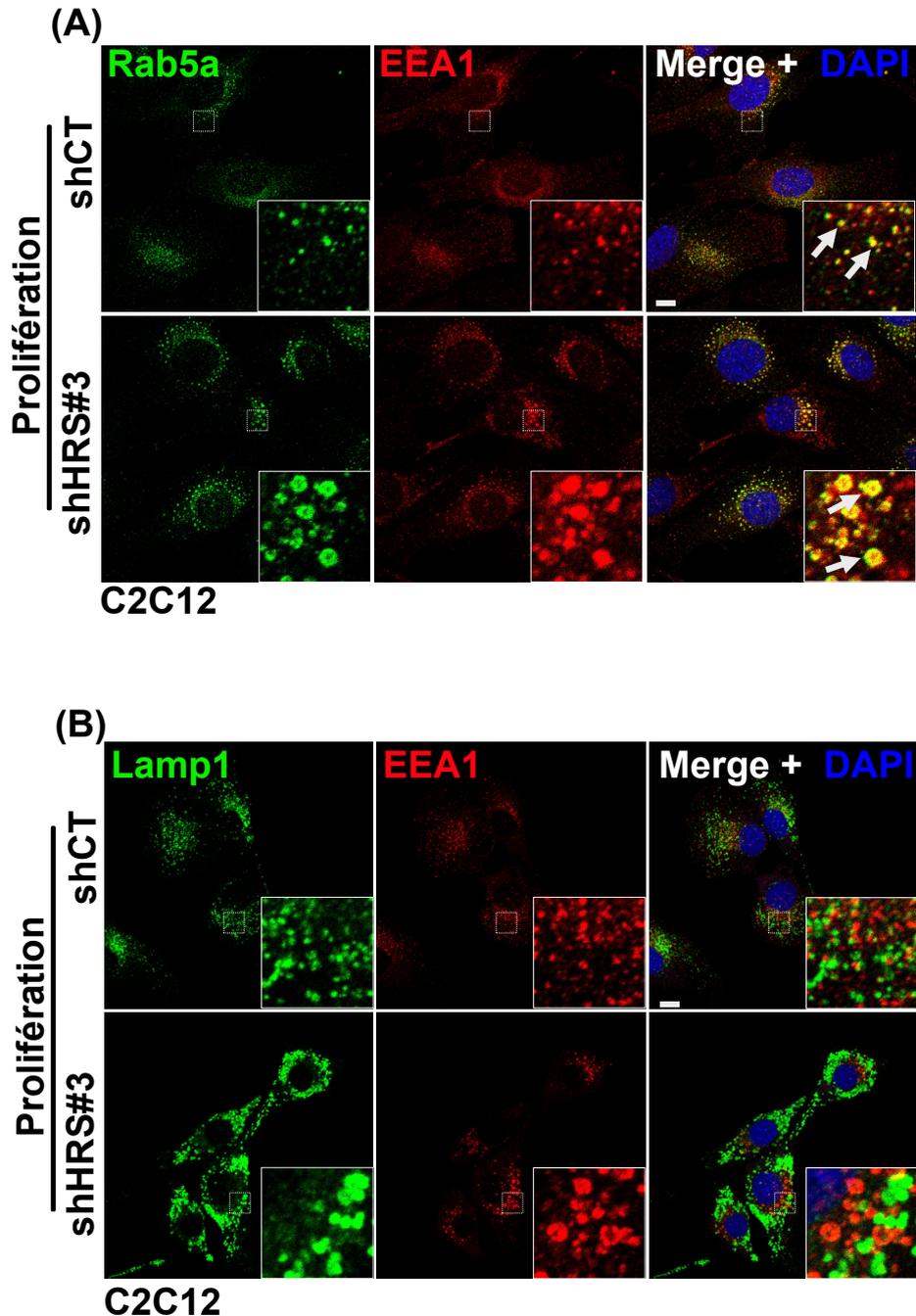


Figure SD 2: Effet de l'inhibition de l'expression de HRS sur la taille et la forme des endosomes précoces et tardifs.

(A) Immuno-marquage de cellules C2C12 transduites avec un shARN ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) ou bien un shARN contrôle (shCT) en phase de prolifération. Les cellules ont été fixées avec une solution de 4% PFA puis ont été marquées avec un anticorps primaire reconnaissant la protéine Rab5 (en vert) et EEA1 (en rouge) pour les endosomes précoces ; les noyaux (en bleu) ont été colorés avec du DAPI. Barre d'échelle, 10µm.

(B) Immuno-marquage de cellules identique à celles décrites en (A). Les cellules ont été marquées avec des anticorps primaires reconnaissant soit EEA1 (en rouge) soit Lamp1 (en

vert) pour les endosomes tardifs ; les noyaux (en bleu) ont été colorés avec du DAPI. Barre d'échelle, 10µm.

3) L'absence de HRS affecte très modérément la localisation de mTOR après 7h de différenciation

Des études ont montré que l'activité de la kinase mTOR était dépendante de sa localisation sur les lysosomes ainsi que de la localisation des lysosomes au sein de la cellule (Castellano et al., 2017; Jia and Bonifacino, 2019; Villegas et al., 2019). Les lysosomes qui sont localisés en bordure des cellules montrent une activité plus importante de mTOR. Puisque la régulation de l'activité de mTOR est importante pour le processus de différenciation, et que nous avons observé une délocalisation, ainsi qu'un élargissement des endosomes tardifs/Ly dans les C2C12 en absence de HRS, nous avons voulu savoir si la localisation de mTOR ainsi que son activité étaient impactées par l'absence de HRS. L'analyse par microscope à immunofluorescence a montré que l'absence de HRS dans les cellules en prolifération provoque l'accumulation et la délocalisation des endosomes tardifs/lysosomes (marquées par la protéine Lamp1) en périphérie des cellules. Cependant la localisation de mTOR n'est pas modifiée de façon significative (**Figure SD3 A**). Par ailleurs, 7h après l'induction de la différenciation, une légère délocalisation de mTOR vers la périphérie des cellules est observée en absence de HRS. La répartition de la protéine mTOR en allant du noyau jusqu'à la bordure de la membrane plasmique ne change pas lorsque les cellules sont en phase de prolifération (**Figure SD3 B**). Cependant, 7h après l'induction de la différenciation un léger aplanissement du profil de localisation de mTOR est visible en absence de HRS, ce qui indique qu'il est délocalisé à la périphérie des cellules (**Figure SD3 B**). Ces données suggèrent que l'absence de HRS n'affecte pas la localisation de mTOR dans les cellules pendant leur prolifération mais a un léger effet au moment de la différenciation des cellules C2C12.

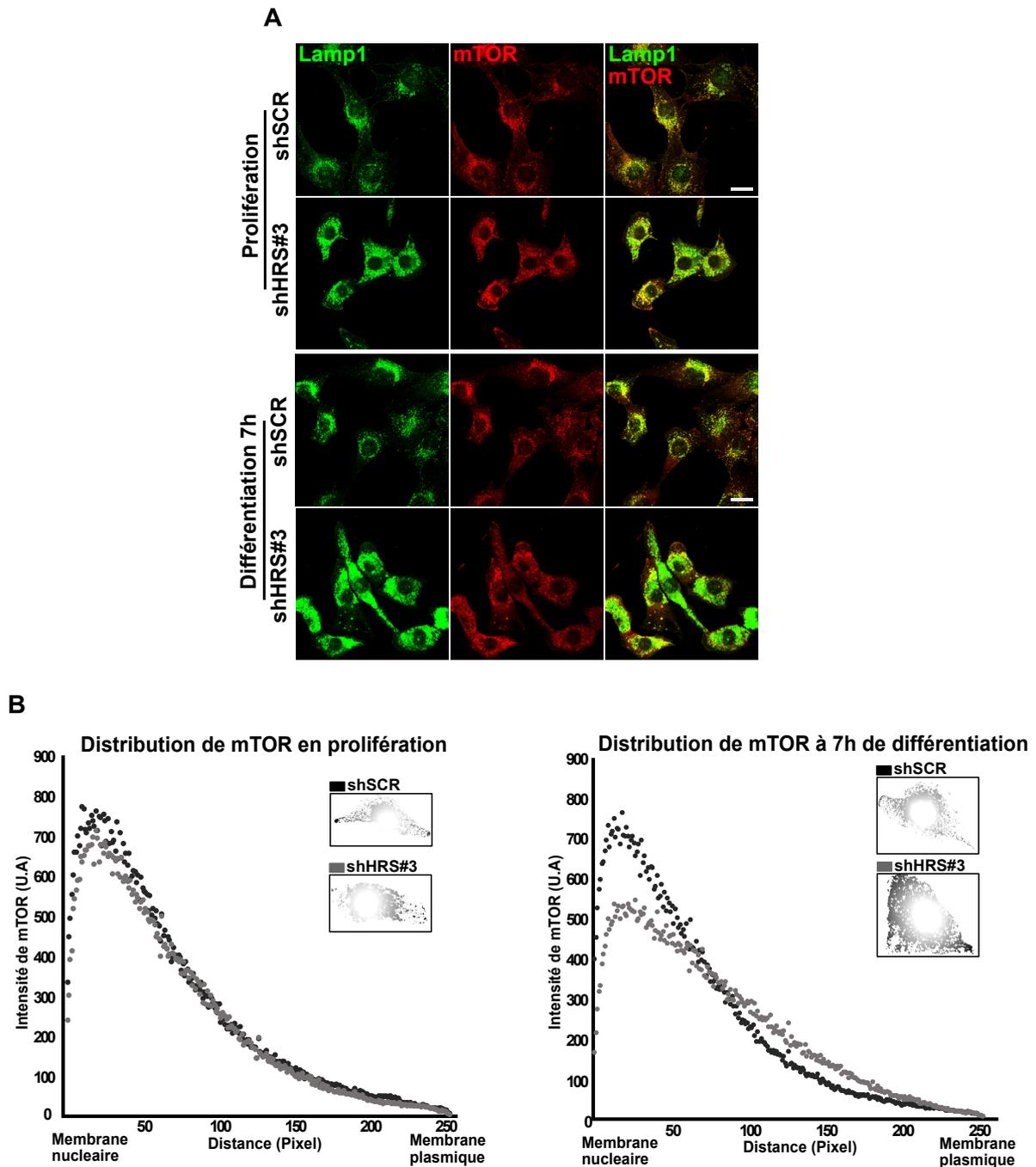


Figure SD 3: Effet de l'absence de HRS sur la localisation de mTOR en prolifération et à 7h de différenciation.

(A) Immuno-marquage de cellules C2C12 transduites avec un shARN ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) ou un contrôle (shSCR) pendant la phase de prolifération ou après 7h de différenciation. Les cellules ont été fixées avec une solution de 4% PFA puis ont été marquées avec des anticorps primaires reconnaissant soit la protéine Lamp1 qui marque les endosomes tardifs/lysosomes (en vert), soit la protéine mTOR (en rouge). Barre d'échelle, 20 μ m.

(B) Histogramme représentant la répartition de la protéine mTOR entre le noyau et la membrane plasmique ; le comptage a été réalisé avec le logiciel ImageJ. Pour chaque cellule, le noyau et la membrane plasmique ont été détournés manuellement afin de déterminer la distance occupée par le cytoplasme des cellules. Par la suite, le niveau d'intensité de mTOR en allant du noyau jusqu'à la membrane plasmique a été retranscrit sur une distance séparée en 255 pixels. Chaque point du graphique représente l'intensité de mTOR pour 1 pixel. Les images dans le graphique représentent l'intensité de mTOR à l'échelle d'une cellule. 90 cellules ont été comptabilisées par condition (shSCR et shHRS#). L'expérience a été reproduite trois fois (en prolifération et en différenciation).

4) L'absence de HRS pourrait affecter l'activité de mTOR

Au regard des résultats observés sur la localisation de mTOR dans les cellules, nous avons voulu déterminer si son activité était affectée par l'absence de HRS. Pour ce faire, nous avons mesuré la translocation du cytoplasme vers le noyau de la protéine TFEB-GFP surexprimée, ainsi que l'état de phosphorylation de la protéine S6. La protéine TFEB est normalement cytoplasmique lorsque mTOR est activé et se retrouve nucléaire lorsque l'activité de mTOR chute. La protéine S6, quant à elle est phosphorylée par la protéine S6 Kinase (S6K), qui est elle-même phosphorylée par mTOR lorsqu'il est actif. L'analyse de la surexpression de TFEB-GFP par immunofluorescence durant la prolifération a montré, une augmentation de sa localisation dans le noyau en absence de HRS (67 +/- 2%) comparé à la condition contrôle (+44 +/- 2%) (**Figure SD4 A**). 7h après l'induction de la différenciation, nous avons constaté que la translocation de TFEB-GFP dans le noyau était plus importante en absence de HRS (77 +/- 1%), que celle observée dans le contrôle (65 +/- 2%). L'ajout de Torine (un inhibiteur de mTOR qui sert de contrôle positif dans cette expérience), a montré une forte translocation de TFEB-GFP en absence de HRS (93 +/- 2%) ainsi que dans le contrôle (83 +/- 0,2%). Ainsi, les données montrent que mTOR semble moins activé en absence de HRS dans la phase de prolifération et après 7h de différenciation. Afin de confirmer les résultats obtenus en immunofluorescence, nous avons analysé l'état de phosphorylation de la protéine S6 (serine 240/244) dans des cellules en prolifération par Western Blotting. Les résultats ont montré une légère augmentation de la phosphorylation de la protéine S6 en absence de HRS, mais la différence n'est statistiquement pas significative (**figure SD4 B**). Ainsi, ces données suggèrent

que l'activité de mTOR n'est pas modulée par l'absence de HRS en phase de prolifération. En raison de ces résultats contradictoires, il est encore difficile de statuer sur l'état d'activation de mTOR dans notre modèle en absence de HRS.

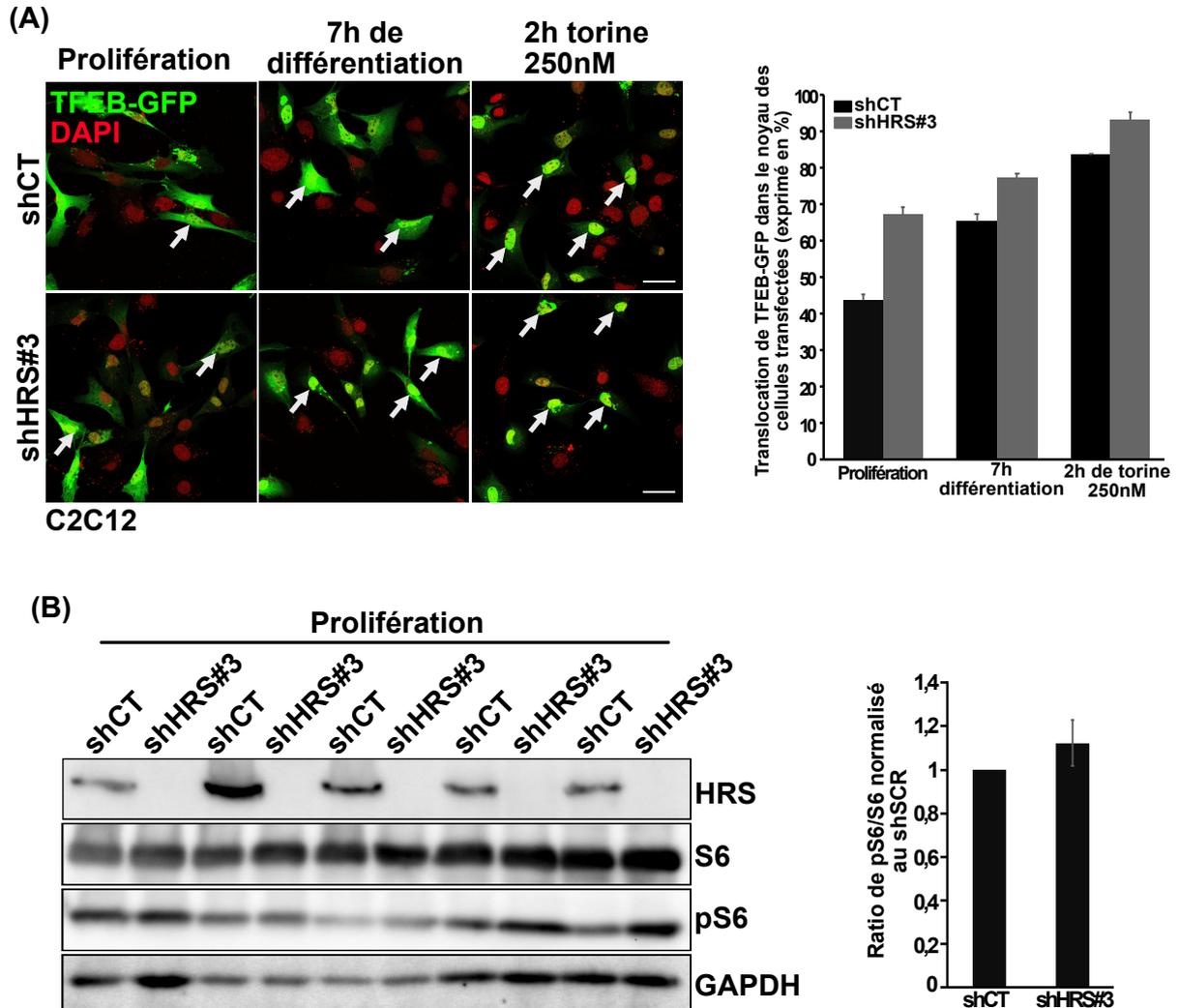


Figure SD 4: État d'activation de mTOR dans les cellules en prolifération et après 7h de différenciation en absence de HRS.

(A) Immuno-marquage de cellules C2C12 transduites avec le shRNA ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) et le contrôle (shCT) puis transfectées avec un plasmide codant pour la protéine de fusion TFEB-GFP. Elles ont été maintenues 24h en phase de prolifération après la transfection, ou induite en différenciation pendant 7h, ou traitées pendant deux heures avec 250nM de Torine. TFEB-GFP est en vert, les noyaux sont marqués au DAPI (en rouge). On note que l'absence de HRS augmente le niveau de TFEB-GFP dans le noyau que ce soit en prolifération ou après 7h de différenciation. n=3 ; 5 champs par conditions ont été analysés. Le pourcentage de translocation correspond au nombre de protéines TFEB-GFP présentes dans le noyau sur le nombre total de cellules transfectées. Barre d'échelle, 20µm.

(B) *Western-Blot* de cellules C2C12 transduites avec le shRNA ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) ou le contrôle (shCT) en phase de prolifération. Les membranes ont été incubées avec des anticorps primaires dirigés contre HRS, S6, phosphoS6 (pS6 ser220/224) et la GAPDH. L'histogramme représente le ratio des signaux pS6/S6 dans les shHRS#3 normalisé par celui de la condition shCT de chaque expérience. (n=5, +/- SD, test-t non paramétrique).

5) La déplétion du cholestérol par l'HP- β CD ne permet pas de diminuer le cholestérol accumulé en absence de HRS ou de NPC1

Lors de nos expériences, nous avons pu observer une forte accumulation de cholestérol, montré par le marquage à la filipin, dans les cellules C2C12 en absence de HRS, confirmant des données expérimentales publiées dans d'autres modèles cellulaires (Du et al., 2012; Vilette et al., 2015). De plus, des travaux menés par Mermelstein *et al*, ont montré que la déplétion du cholestérol par l'ajout méthyl- β -cyclodextrin (MCD) sur des myoblastes de poulet favorisait la différenciation en activant la voie Wnt et en jouant sur la translocation de la β -caténine dans les noyaux (Mermelstein et al., 2007, 2005). De ce fait, il paraissait intéressant d'utiliser la MCD pour diminuer le cholestérol accumulé en absence de HRS et essayer de restaurer la différenciation. Cependant, les données expérimentales n'ont pas montré d'effet de la MCD sur la différenciation, que ce soit dans la condition contrôle (shCT), ou en absence de HRS (shHRS#3) (observation non présentée). Nous avons alors décidé de changer de drogue et avons opté pour la HP- β -cyclodextrine (HP- β CD) qui a montré d'excellents résultats sur l'accumulation de cholestérol provoqué par l'inhibition d'expression de NPC1 (dans des fibroblastes) (Sarkar et al., 2013). Étrangement, dans nos expériences, l'ajout de concentrations croissantes de HP- β CD sur les cellules shCT a provoqué une accumulation de cholestérol (montré par la filipin dans la **Figure SD5**). De plus, l'ajout des différentes concentrations de HP- β CD sur les cellules où l'expression de NPC1 est inhibé ne semble pas avoir d'effet sur le cholestérol accumulé, et semble même au contraire favoriser son accumulation en absence de HRS (**Figure SD5**). Également, l'induction de la différenciation avec la HP- β CD n'a pas favorisé la différenciation avec les cellules shCT n'a pas restauré la différenciation en absence de HRS (observation non présentée). Il apparaît donc que dans nos expériences, l'addition d'agent déplaçant le cholestérol n'affecte ni la concentration de

cholestérol dans les cellules, ni ne permet de restaurer le processus de différenciation en absence de HRS. De ce fait, nous avons choisi d'inhiber l'expression de NPC1 afin de voir l'impact de l'accumulation de cholestérol sur la myogenèse (cf. figure 10).

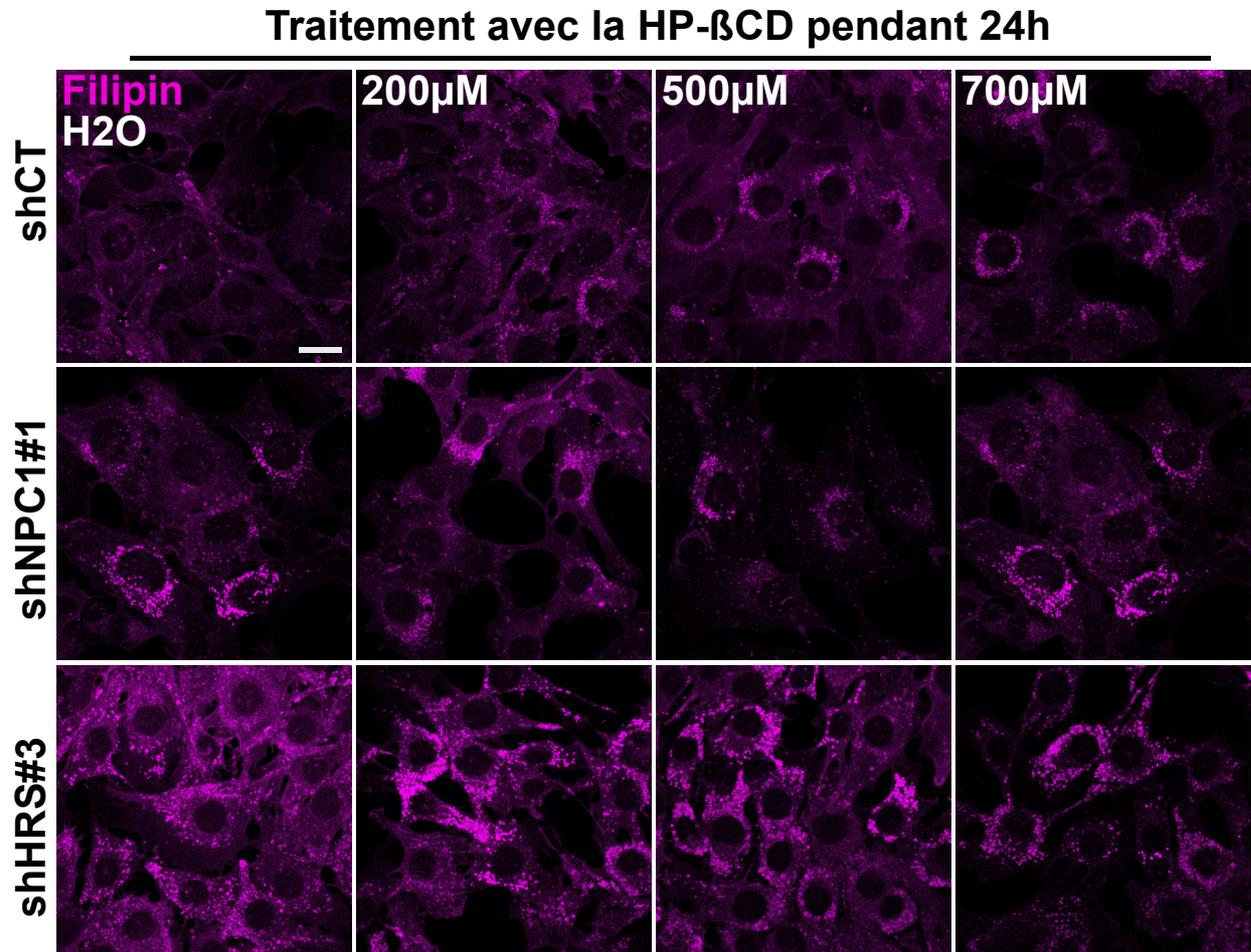


Figure SD 5: Effet de la HP- β CD sur l'accumulation de cholestérol dans les cellules contrôle (shCT), shHRS#3 et shNPC1.

Les cellules C2C12 shCT, shHRS#3 et shNPC1#1 en phase de prolifération ont été traitées pendant 24h avec des concentrations croissantes de HP- β CD puis colorées avec la Filipin reconnaissant le cholestérol intracellulaire. Échelle, 20 μ m.

6) L'absence de HRS diminue la localisation de la β -caténine aux jonctions cellule-cellule, et favorise son accumulation dans le cytoplasme mais n'affecte pas la localisation de la E-cadhérine

La protéine HRS participe à la dégradation de différentes protéines membranaires par la voie endo-lysosomale dont notamment la protéine E-cadhérine (Toyoshima et al., 2007). De plus, des études ont montré que la β -caténine est localisée à la membrane plasmique et est associée avec la protéine E-cadhérine (Toyoshima et al., 2007). Du fait que la β -caténine est importante pour le processus de différenciation via la voie Wnt et qu'elle joue un rôle dans la fusion avec la E-cadhérine (Hindi et al., 2013), nous avons voulu déterminer si l'absence de HRS perturbait la localisation de ces deux protéines dans notre modèle cellulaire. L'observation de la localisation de la β -caténine et de la E-cadhérine par immunofluorescence dans les cellules contrôle (shCT) en prolifération, a révélé que la β -caténine se trouvait majoritairement aux jonctions cellule-cellule alors que la E-cadhérine était plutôt cytosolique, rappelant celle de l'appareil de Golgi (**Figure SD6**). En absence de HRS (shHRS#3), nous avons observé une diminution de la localisation de la β -caténine aux jonctions cellule-cellule et son accumulation sous forme de vacuole dans le cytoplasme de certaines cellules (**Figure SD6**, voir les têtes de flèche). Nous n'avons pas observé de changement de localisation de la E-cadhérine en absence de HRS dans nos cellules. Nos résultats ne sont pas totalement en accord avec ceux publiés dans la ligné cellulaire HeLa, dans laquelle l'absence de HRS provoquait une forte accumulation de β -caténine et de E-cadhérine au niveau de la membrane plasmique (Toyoshima et al., 2007). Ces différences pourraient venir du fait que nous ne travaillons pas dans le même modèle cellulaire que Toyoshima *et al.* Par ailleurs, pour inhiber l'expression de la protéine HRS, les auteurs ont utilisé des ARN interférants (siARN), qui pourrait aboutir à un phénotype légèrement différent de celui obtenu avec des shARN.

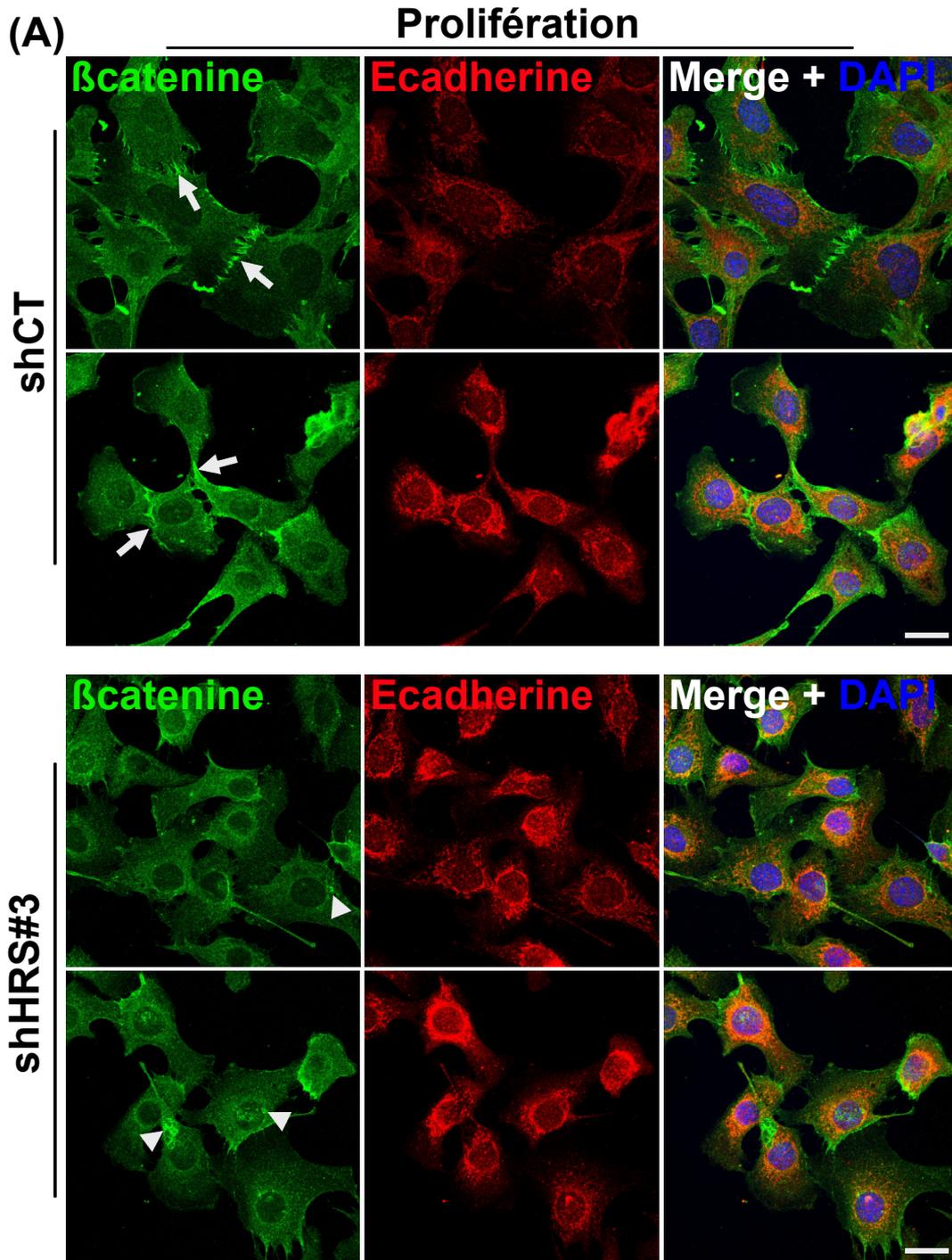


Figure SD 6: Effet de l'absence de HRS sur la localisation de la β -caténine et de la E-cadhérine en prolifération.

(A) Immuno-marquage de cellules C2C12 transduites avec un shRNA contrôle (shCT) ou ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) fixées avec une solution de PFA 4% en phase de prolifération. Les cellules ont été marquées avec des anticorps primaires reconnaissant soit la β -caténine (en vert), soit la E-cadhérine (en rouge), et les noyaux ont été marqués du DAPI (en bleu). Barre d'échelle, 20 μ m. Images représentatives de trois expériences indépendantes.

7) l'absence de HRS n'empêche pas la fusion avec des cellules contrôle

Nous avons montré que l'absence de HRS affecté l'engagement des cellules dans la myogenèse, qui est en amont du processus de fusion des myocytes. Nous avons également montré une altération de la localisation de la β -caténine membranaire, qui intervient dans le processus de fusion des myoblastes en myotubes (Hindi et al., 2013; Krauss et al., 2017). De ce fait, nous avons voulu déterminer si la fusion des cellules pourrait être affectée par l'absence de HRS. Pour répondre à cette question, nous avons transduit les myoblastes shHRS#3 avec un lentivecteur comportant un plasmide induisant l'expression stable de GFP (Green Fluorescence Protein) (shHRS#3-GFP), et les myoblastes contrôle (shCT) avec un lentivecteur comportant un plasmide induisant l'expression stable de la RFP (Red Fluorescence Protein) (shCT-RFP). Par la suite, nous avons mélangé les différentes populations de myoblastes dans des proportions différentes, afin de voir si les cellules shHRS#3-GFP était capable de former des myotubes avec les cellules shCT-RFP. L'analyse par microscopie à immunofluorescence a montré que les cellules ont été en partie bien transfectées et capable de former des myotubes rouges pour la condition contrôle (shCT-RFP), mais sont restés au stade de myoblaste vert en absence de HRS (shHRS#3-GFP) après 96h de différenciation (**Figure SD7 A**). Le mélange des deux populations de cellules et l'induction de la différenciation pendant 96h révèle la présence de myotubes jaunes, indiquant qu'une fusion de myoblastes shHRS#3-GFP avec des shCT-RFP, a eu lieu (**Figure SD7 B**, voir les flèches). De plus, nous avons observé que la formation de myotubes jaunes était proportionnelle à la quantité de cellules shCT-RFP présente. Ces données révèlent que l'absence de HRS, maintient les cellules en capacité de fusionner, et qu'elles n'ont probablement pas perdu leur pouvoir myogénique.

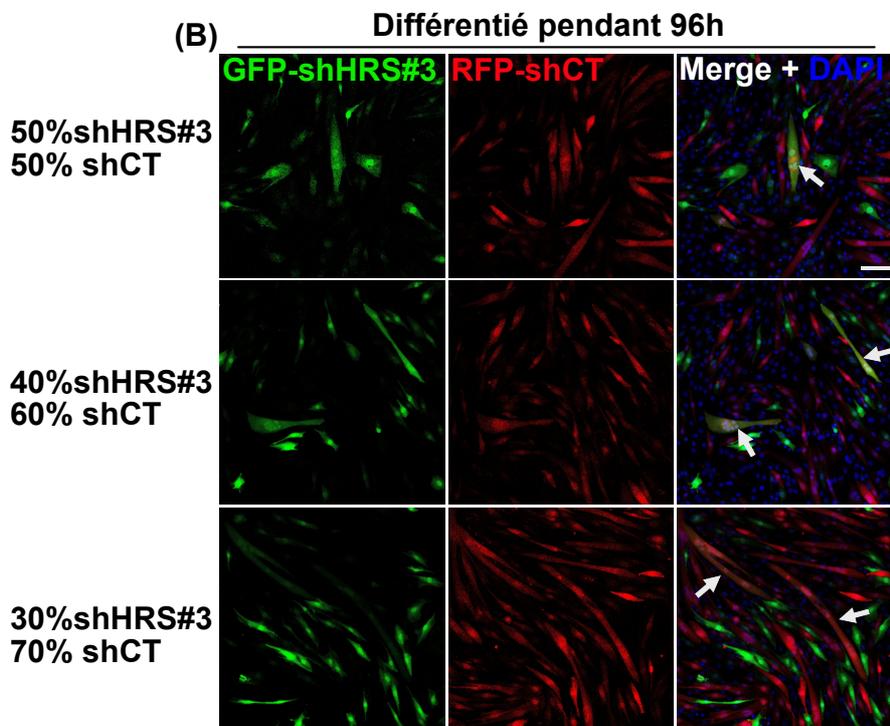
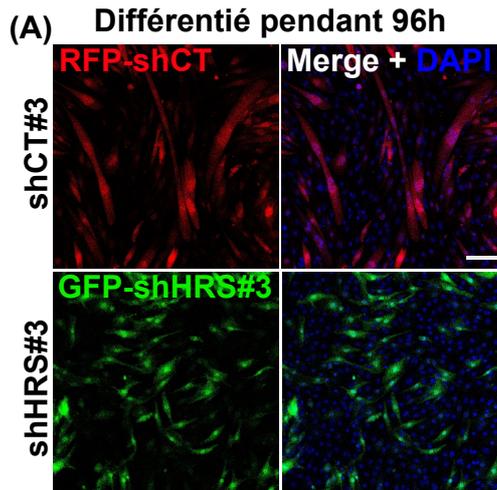


Figure SD 7: Influence de l'association à des proportions différentes de cellule control et en absence de HRS sur la fusion des cellules.

(A) Images en microscopie confocale de cellules C2C12 transduites avec un shRNA contrôle (shCT) puis avec une RFP (shCT-RFP) ou bien transduites avec un shRNA ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) puis avec une GFP (shHRS#3-GFP) après 96 heures de différenciation. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI (en bleu). Barre d'échelle, 200µm

(B) Les cellules shCT-RFP et shHRS#3-GFP ont été mélangées à trois concentrations relatives différentes et mises en différenciation pendant 96h. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI (en bleu). Les flèches montrent la présence de myotubes jaunes, correspondant à la fusion de shCT-RFP avec des cellules shHRS#3-RFP. Barre d'échelle, 200µm

8) Le milieu de différenciation des cellules contrôles est capable de restaurer partiellement la différenciation en absence de HRS.

Pour un bon déroulement de la myogenèse, différentes molécules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par les cellules, comme l'IGF-2, Wnt3A, mais aussi des vésicules extracellulaires comme les exosomes et/ou les microvésicules (Forterre et al., 2014; Girardi and Le Grand, 2018, 2018; Jiao et al., 2013; Le Bihan et al). De notre côté, nous avons observé que la voie PI3K/AKT2 était altérée durant la différenciation en absence de HRS (cf. article). Ceci suggère que l'absence de HRS affecterait la dégradation des récepteurs en amont de cette voie de signalisation ou bien que des régulations négatives sont mises en place sur cette voie. Également, il est possible que les ligands de ces récepteurs comme l'IGF-2 soit mal exprimés et/ou sécrétés en absence de HRS. En outre, différentes études ont montré que l'absence de HRS diminuait la sécrétion d'exosomes par les cellules, ainsi que leur taille et leur composition (Colombo et al., 2014; Edgar et al., 2014; Tamai et al., 2010). De ce fait, nous avons voulu déterminer si l'absence de HRS perturbait la sécrétion de facteurs solubles et/ou associés à des vésicules dans le milieu. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le milieu conditionné issu des cellules contrôles (shCT) en différenciation et l'avons ajouté sur les cellules dans lesquelles l'expression de HRS été inhibée (shHRS#3). Du milieu provenant de cellules shCT en différenciation été collecté chaque jour et a été ajouté sur les cellules shHRS#3 pendant 5 jours. Dans ce contexte, nous avons observé que l'ajout de milieu conditionné provenant des cellules shCT était capable de restaurer la différenciation des cellules shHRS#3 de façon partielle (**Figure SD8**). Cette expérience suggère que l'absence de HRS affecte probablement la sécrétion de facteurs, solubles ou associés à des vésicules extracellulaires, nécessaires à la différenciation. Nous pouvons également suggérer que le milieu conditionné des cellules shHRS contient des facteurs inhibiteur à la différenciation.

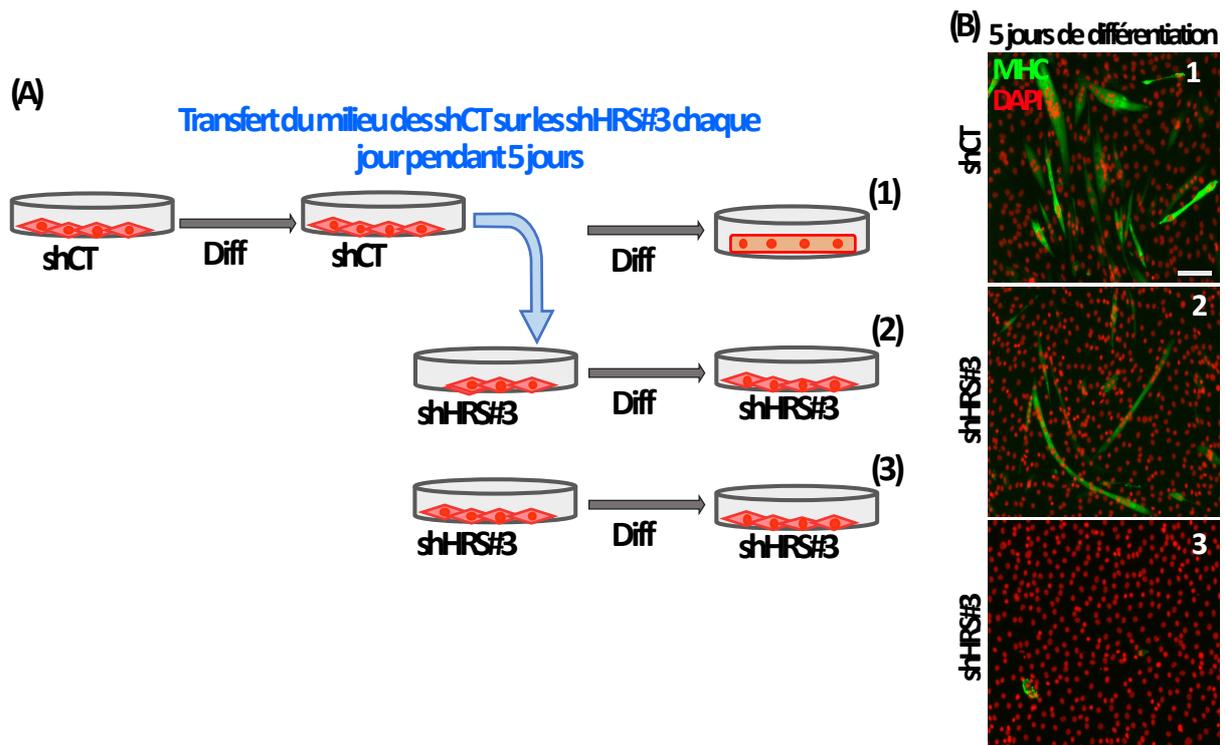


Figure SD 8: Effet de l'apport du milieu de différenciation des cellules contrôle sur les cellules en absence de HRS.

(A) Schéma expliquant la procédure expérimentale : Les cellules C2C12 contrôle (shCT) ont été mises en différenciation 1 jour avant les cellules invalidées pour HRS (shHRS#3), puis le milieu de différenciation des cellules shCT a été ajouté chaque jour sur les cellules shHRS#3 et ce durant 5 jours.

(B) Immuno-marquage des cellules après 5 jours de différenciation avec un anticorps primaire reconnaissant les chaînes lourdes de la myosine (MHC) servant à identifier les myotubes (en vert). Le DAPI sert à visualiser les noyaux (en rouge). Barre d'échelle, 100µm.

9) L'inhibition de l'expression de HRS dans les myotubes perturberait la localisation de la Clathrine et de l' α -Actinine4

Nos données ont révélé une localisation péri-nucléaire importante de la protéine HRS dans les myotubes, qui est co-localisée avec la Clathrine. Afin de comprendre le rôle de cette localisation particulière, nous avons inhibé l'expression de HRS à l'aide d'un siARN, électroporé directement dans des myotubes en culture. Grâce à cette approche, nous avons analysé la localisation par microscopie à fluorescence de deux partenaires protéiques de HRS

qui sont la Clathrine et l' α -Actinine4. Les résultats ont montré que l'expression de HRS était diminuée dans certains myotubes après électroporation, révélé par une diminution de l'intensité du signal de fluorescence (**Figure SD9A**). En parallèle, pour certains myotubes l'analyse a montré que la présence périnucléaire de la Clathrine était diminuée ainsi que son niveau protéique reflété par l'intensité du marquage (**Figure SD9A**). Dans une autre expérience, nous avons pu corréliser directement la diminution du niveau protéique de HRS avec la localisation de l' α -Actinine4. Les résultats montrent que l'absence de HRS dans les myotubes affecte la localisation péri-nucléaire de l' α -Actinine4 sans modifier l'intensité de son signal de fluorescence (**Figure SD9B**). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence de HRS dans les myotubes et la perte de sa localisation péri-nucléaire affectent la localisation périnucléaire de la Clathrine et l' α -Actinine4.

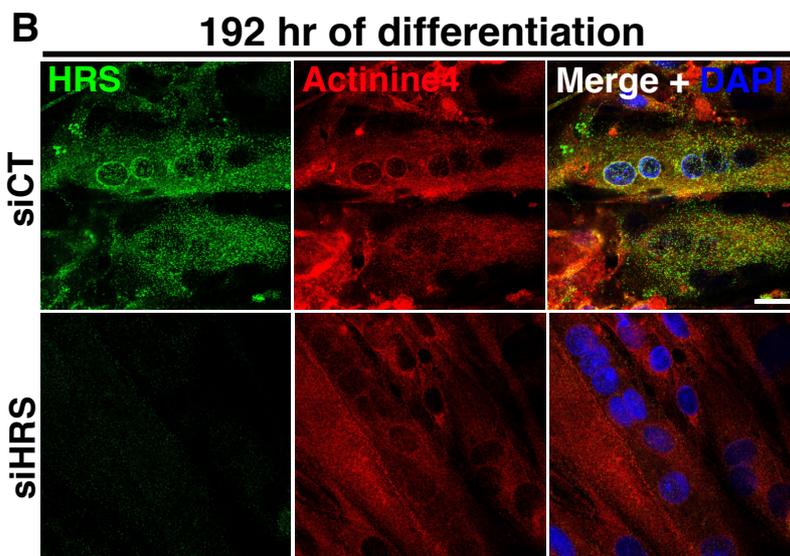
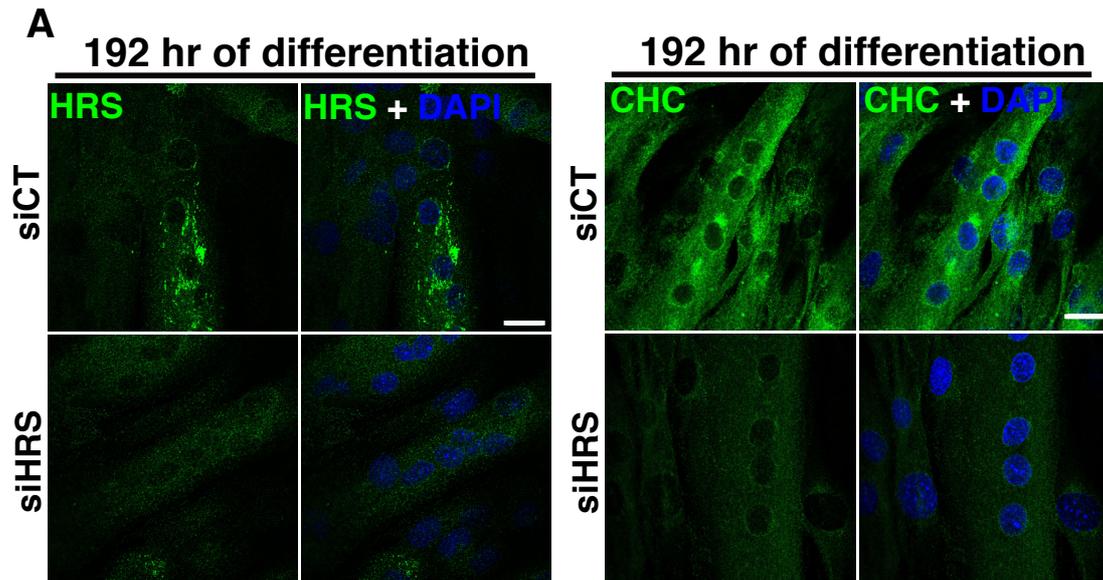


Figure SD 9: Effet de l'inhibition de HRS dans les myotubes sur la localisation de la Clathrine et de l'alpha-Actinine4.

(A) Immuno-marquage de myotubes issus de cellules C2C12, électroporés avec un siRNA contrôle (shCT) ou ciblant l'expression de la protéine HRS (siHRS) et fixé à 9 jours de différenciation. Les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire reconnaissant HRS (en vert) ou reconnaissant la Clathrine (en vert) et avec le DAPI (en bleu) pour marquer les noyaux. Barre d'échelle, 20µm.

(B) Immuno-marquage dans les mêmes conditions expérimentale qu'en (A). Les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire reconnaissant HRS (en vert), et un anticorps reconnaissant l'α-Actinine4 (en rouge). Le DAPI sert à marquer les noyaux (en bleu). Barre d'échelle 20µm.

10) La sur-activation de la GSK3 β pourrait affecter la signalisation de la voie Wnt durant le processus de différenciation en absence de HRS

L'absence de HRS affecte différentes voies de signalisation dont la voie Wnt/GSK3 β (Taelman et al., 2010), qui est un modulateur central de la myogenèse. Dans ce sens, nos données montrent une augmentation de la forme active (Y216) de la GSK3 β , ainsi qu'une localisation plus prononcée autour des endosomes qui suggère une inhibition de son internalisation dans ces derniers. Afin de terminer si l'augmentation de la forme active de la GSK3 β en absence de HRS affecte la voie Wnt, nous avons analysé le niveau d'ARNm de l'Axin2 et de la Follistatine qui sont deux cibles transcriptionnelles de la β -caténine (Jones et al., 2015). Les résultats présentés dans la **figure SD10** ne montrent pas de différence significative du niveau d'ARNm de l'Axin2 en fonction de la présence ou de l'absence de HRS durant la différenciation. Cependant, le niveau d'ARNm de la Follistatine augmente progressivement au cours de la différenciation dans la condition contrôle mais n'augmente pas en absence de HRS (**figure SD10 B**) et pourrait être lié à une inhibition de l'activation de la voie Wnt. Ainsi, ces résultats suggèrent que la sur-activation de la GSK3 β pourrait effectivement impacter négativement la voie Wnt en l'absence de HRS et participer à l'inhibition de la myogenèse. Néanmoins, d'autres cibles reportrices de l'activité de la β -caténine doivent être analysées.

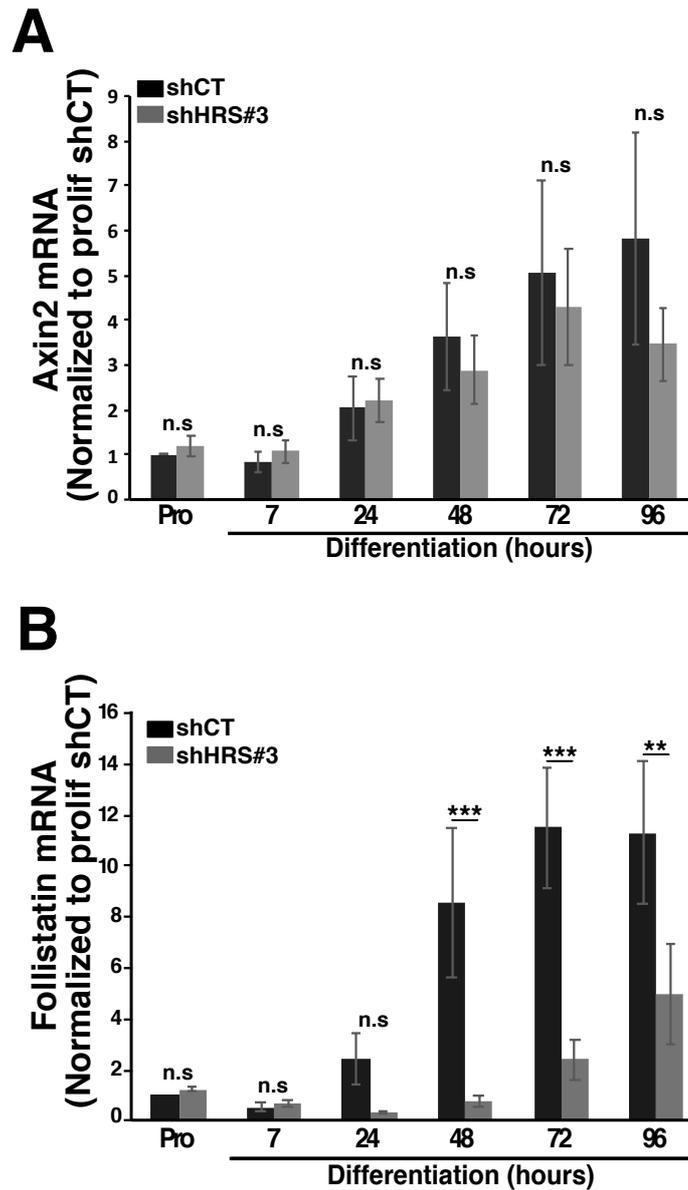


Figure SD 10 : Effet de l'absence de HRS sur le niveau d'ARNm de l'Axi2 et de la Follistatine durant la myogenèse.

Histogramme représentant le niveau d'ARNm de l'Axi2 (A) ou de la Follistatine (B) établi par qPCR. Les cellules C2C12 ont été transduites avec le shRNA ciblant l'expression de la protéine HRS (shHRS#3) ou contrôle (shCT) et collecté en phase de prolifération ou à différents temps de différenciation. n=4 ; +/- SD ; test anova two way ; **P<0,01; ***P<0,001.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en lumière le rôle essentiel de la protéine ESCRT-0 HRS dans le processus de différenciation des myoblastes en myotubes, ainsi qu'une fonction à part entière de HRS dans les myotubes. Nos observations ont révélé que HRS était exprimée de façon dynamique au cours de la myogenèse, et que sa distribution cellulaire variait avec une localisation préférentiellement péri-nucléaire dans les myotubes comparés aux myoblastes. La localisation particulière de HRS autour des noyaux coïncide avec celle du marqueur des endosomes précoces Rab5, mais aussi avec celle de la Clathrine et de l' α -Actinine4. Par ailleurs, la localisation de ces deux protéines normalement péri-nucléaires est perturbée en absence de HRS dans les myotubes. Nous avons montré également, que l'inhibition de l'expression de la protéine HRS dans trois modèles cellulaires de myoblastes (lignée murine C2C12, myoblastes primaires murins et lignée de myoblastes humains) inhibait drastiquement le processus de différenciation, en perturbant l'expression des protéines régulatrices de la myogenèse MyoD, Myogénine et MEF2A. Ceci est associé au fait que l'absence de la protéine HRS affecte la dégradation du récepteur à l'EGF (EGFR) et provoque une activation anormale de la voie de signalisation MAPK-MEK-ERK, une augmentation de l'activité de la kinase GSK3 β , ainsi qu'une perturbation du flux autophagique. Ensemble, nos données montrent que HRS est un facteur qui module différentes voies cellulaires pour orchestrer la myogenèse.

Rôle de la variation du niveau protéique de HRS ainsi que de sa localisation péri-nucléaire au cours de la myogenèse des C2C12.

Durant la myogenèse des myoblastes C2C12, l'analyse biochimique par *Western blotting* (WB) a révélé que le niveau protéique de HRS était haut durant la prolifération, puis chutait durant les premières 48 heures de la différenciation, pour ré-augmenter progressivement lors de la fusion et la maturation des myotubes (voir **figure 1** article1). Ces données ont aussi été confirmées par microscopie à immunofluorescence (voir **figure 1** article1). De plus, l'expression de l'ARNm de HRS ne varie pas au cours de la différenciation et n'est donc pas responsable de la variation du niveau protéique de HRS (voir **Appendixfigure S1** article1). Deux hypothèses pourraient expliquer cette variation. Premièrement, la stabilité

protéique de HRS pourrait être altéré ou deuxièmement, sa traduction pourrait être modulé durant le processus de différenciation. La stabilité protéique de HRS dépend de son état de phosphorylation, qui est régi par des kinases en aval des récepteurs membranaires dont le complexe mTOR. Ce dernier empêche la dégradation de HRS par le protéasome lorsque les cellules sont dans un milieu de culture riche en facteurs sériques (Bache et al., 2002; Dauner et al., 2017; Dobzinski et al., 2015; Row et al., 2005). Différentes études ont montré que les premières étapes de la différenciation étaient réalisées de façon indépendante de l'activité kinase de mTOR, puis de façon kinase dépendante pour la phase d'hypertrophie des myotubes (Ge and Chen, 2012; Rion et al., 2019). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que, HRS pourrait être moins phosphorylée par mTOR durant les premières étapes de la différenciation, ce qui entraînerait sa dégradation par le protéasome. Dans ce sens, nous avons réalisé des expériences en induisant la différenciation des myoblastes C2C12 pendant 16h avec différentes concentrations de MG132 (inhibiteur du protéasome) afin d'éviter la dégradation de HRS. Néanmoins, ces expériences ne nous ont pas données de résultats concluants et réfléchissons donc à des expériences complémentaires afin de relier l'activité kinase de mTOR à la stabilité de HRS durant les premières étapes de la myogenèse. La seconde hypothèse que nous avons émise pourrait être en lien avec une régulation traductionnelle de HRS. En effet, durant le processus de différenciation, certains microARN (miARN) nommés myomiR (myogenesis microRNA) sont exprimés afin d'inhiber la traduction de gènes cibles (Chen et al., 2010; Townley-Tilson et al., 2010). Nous pouvons alors imaginer que HRS soit la cible de certains myomiR qui inhiberaient son expression durant les phases précoces de la différenciation. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions étudier si certains myomiR dont miR-1, miR-133, ou miR-206 seraient capables de cibler une partie de l'ARNm de HRS (Chen et al., 2010).

Un des résultats les plus inattendus de notre étude fut la relocalisation péri-nucléaire de HRS dans les myotubes, ainsi que dans les fibres musculaires de souris en régénération (voir **figure 1** et **Appendixfigure S2** article1). Cette localisation particulière de HRS pourrait être en lien avec une fonction spécifique qu'il occuperait au niveau de l'espace péri-nucléaire. Nous pouvons émettre différentes hypothèses pour tenter d'expliquer ce phénomène et sa fonction. La première, impliquerait des modifications post-traductionnelles. En effet, la protéine HRS est phosphorylée sur différentes tyrosines dont la tyrosine 334 (Tyr334) (Stern

et al., 2007), et ces phosphorylations semblent réguler la localisation de HRS au sein des endosomes précoces (Stern et al., 2007; Urbé et al., 2000). Ainsi, nous pouvons suggérer que, l'état de phosphorylation de la protéine HRS pourrait régir sa relocalisation péri-nucléaire dans les myotubes. Il existe des anticorps commerciaux reconnaissant la Tyr334 phosphorylée de HRS, qui pourraient être utilisés dans des expériences de WB, afin de suivre l'état de phosphorylation de HRS au cours du processus de différenciation. Par une autre approche, nous pourrions réaliser des expériences d'immunoprécipitations de la protéine HRS à partir d'extraits cellulaires de C2C12 à différents temps de différenciation et déterminer le profil global de phosphorylation de HRS par WB avec un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées (PanPhospho-Tyr). Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser par microscopie à immunofluorescence si le marquage périnucléaire que nous avons observé correspond à la forme Tyr334 de HRS. Dans une seconde hypothèse, la relocalisation péri-nucléaire de HRS pourrait être attribuée au fait que les endosomes se trouvent re-structurés dans les myotubes. Effectivement, nous avons observé par microscopie à immunofluorescence un enrichissement de la protéines Rab5a (marqueur des endosomes précoces) autour des noyaux des myotubes. De plus, le marquage péri-nucléaire de Rab5a co-localise fortement avec HRS à ce niveau (voir **figure 2** article1). Dans ce contexte, nous pouvons suggérer que les endosomes précoces, qui sont riches en phosphoinositides PI3P, se re-structurent au niveau péri-nucléaire dans les myotubes et que HRS soit également localisée à ce niveau grâce à son domaine FYVE (liant le PI3P). Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions exprimer une construction GFP-FYVE-FYVE dans les cellules (Wenzel et al., 2018). Cette construction nous permettrait, par microscopie à immunofluorescence, de visualiser la localisation du PI3P dans les myotubes et de déterminer s'il existe effectivement une localisation péri-nucléaire plus importante de ce phospho-inositide associé aux endosomes précoces. Il est à noter que le PI3P ne semble pas être essentiel pour le processus de différenciation (Buj-Bello et al., 2002; Smith et al., 2020). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a analysé la localisation du PI3P dans les myotubes. Enfin, pour comprendre l'importance de la dynamique d'expression et de localisation de HRS au cours de la myogenèse, nous pourrions créer une lignée cellulaire de C2C12 qui serait GFP-HRS par transduction avec des lentivirus. Ceci pourrait nous permettre de déterminer à quel moment précisément HRS vient se localiser autour des noyaux durant la différenciation et si

cette localisation est un phénomène stable dans le temps ou bien s'il existe une dynamique de recrutement/dissociation de HRS au cours de ce processus.

Lors de notre étude, nous avons aussi pu observer que certains partenaires protéiques de HRS, dont la Clathrine et l' α -Actinine4, étaient co-localisés avec HRS et présentaient également un marquage périnucléaire (voir **figure 2** article1 et **figure SD9** thèse). Le rôle exact de la localisation péri-nucléaire de la Clathrine et de α -Actinine4 reste à ce jour peu ou pas abordée dans la littérature. Des études ont néanmoins mentionné une localisation périnucléaire de la Clathrine dans les myotubes (Isobe et al., 2018; Vassilopoulos et al., 2014), et une autre a montré une localisation de l' α -Actinine4 au niveau des stries Z des fibres musculaires (Hsu et al., 2018). Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer si l'absence de HRS dans les myotubes pouvait avoir un effet sur la localisation de la Clathrine et de l' α -Actinine4. Nous avons testé plusieurs méthodes afin d'éteindre l'expression de HRS dans les myotubes : 1) par transduction, en utilisant les lentivecteurs codant des ARN interférents (shARN utilisés pour invalider HRS dans les C2C12), 2) par la création d'une lignée stable de myoblastes C2C12 exprimant un shARN HRS inducible par la molécule IPTG et enfin 3) par électroporation de siARN dans les myotubes. Alors que les lentivecteurs pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe VSVG transduisent efficacement les myoblastes, aucune transduction n'a été observée dans les myotubes, suggérant une possible absence du récepteur dans les myotubes (et myoblastes qui ne sont pas différenciés). L'utilisation de shARN inducibles à l'IPTG n'a éteint que très faiblement l'expression de HRS. La troisième méthode explorée est celle qui a été la plus efficace pour éteindre l'expression de HRS dans les myotubes. Ainsi, nos résultats expérimentaux préliminaires ont révélé, après électroporation du siRNA dirigé contre HRS, une réduction du signal de HRS dans certains myotubes ainsi qu'une perte partielle la localisation péri-nucléaire de la Clathrine et de l' α -Actinine4 (voir **figure SD9** thèse). Ces résultats mettent en avant le fait que HRS pourrait permettre de recruter et/ou de maintenir la Clathrine et l' α -Actinine4 au niveau des noyaux des myotubes. Afin de renforcer ces résultats préliminaires, nous réfléchissons actuellement à utiliser des vecteurs de type adénovirus ou adénovirus associé (AAV) qui semblent plus efficaces pour la transduction de myotubes murins (Arnett et al., 2014). La délocalisation de la Clathrine et de l' α -Actinine4 en absence de HRS dans les myotubes soulèvent plusieurs interrogations quant à la fonction de la localisation périnucléaire de HRS et de ses partenaires.

Nous pouvons, mettre en avant deux hypothèses : Au vu de la localisation périnucléaire de Rab5, nous suggérons qu'il existe un remodelage du système endo-lysosomal dans les myotubes et que les endosomes précoces soient relocalisés à proximité du noyau. A ce niveau, HRS et la Clathrine pourraient jouer un rôle dans la voie d'endocytose en participant à la formation des corps multivésiculaires (MVB). La seconde hypothèse suggère que HRS, avec l' α -Actinine4 et la Clathrine, auraient plutôt une fonction structurale, et pourraient participer au maintien et/ou au mouvement des noyaux dans les myotubes à travers le cytosquelette d'actine (Roman and Gomes, 2018). En effet, des données expérimentales ont montré que HRS, liée à l' α -Actinine4, appartenait au complexe protéique nommé CART (composé de HRS, de l' α -Actinine4, de BERP et de la Myosine V) et était capable de recycler des protéines membranaires en interagissant avec le cytosquelette d'actine (Yan et al., 2005). Ainsi HRS pourrait faire le lien entre le noyau et le cytosquelette d'actine via la protéine α -Actinine4. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons d'étudier le mouvement des noyaux dans les myotubes en l'absence de HRS par microscopie à immunofluorescence. L'utilisation de cellules C2C12 dans lesquelles les noyaux seraient marqués en rouge (mCherry, approche disponible au sein de notre institut) pourrait nous aider dans cette tâche.

Nos données expérimentales ont aussi mis en lumière un enrichissement de HRS au niveau de la jonction neuromusculaire (NMJ, *Neuromuscular Junction*) dans les fibres de muscles de souris (voir **Appendixfigure S2** article1) confirmant des résultats obtenus par d'autres chez la drosophile (Lloyd, 2002). La NMJ est une zone dynamique dans laquelle le recyclage et la dégradation des récepteurs membranaires (dont le récepteur à l'Acétylcholine, AChr) a lieu continuellement (Slater, 2017). Quelle serait la fonction de HRS au niveau de la NMJ ? L'une des hypothèses émises est que HRS participerait activement au recyclage et à la dégradation de certains récepteurs membranaires impliqués dans la mise en place de la jonction. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si l'absence de HRS dans les fibres musculaires ou bien dans des cultures de myotubes perturbe la formation des patches de récepteurs à l'Acétylcholine et donc potentiellement la formation de la NMJ (Osseni et al., 2020). Dans ces expériences, nous souhaiterions aussi étudier l'importance de la protéine Agrin qui est décrite comme essentielle à la mise en place des clusters d'AChr par l'activation du récepteur MUSK1 (Zong and Jin, 2013). D'autre part, des expériences de co-cultures de motoneurones avec des myotubes dans lesquels l'expression de HRS serait éteinte, pourraient

nous éclairer sur la fonction que peut jouer HRS dans la mise en place de la NMJ. Pour aller dans ce sens, une étude dans laquelle l'expression globale de HRS est diminuée dans des souris (HRS *teething*) a montré une altération des NMJs, suggérant une fonction essentielle de HRS dans la mise en place et/ou le maintien de cette dernière (Watson et al., 2015). La création d'un modèle *in vivo* de souris dans laquelle l'expression de hrs serait éteint spécifiquement dans la fibre musculaire squelettique pourrait aussi nous éclairer sur sa fonction dans le maintien de la NMJ.

La fonction des domaines de HRS et de l'ESCRT-0 STAM1/2 au cours de la myogenèse.

Nos données expérimentales ont montré que l'inhibition de l'expression de HRS perturbait fortement le processus de différenciation et que ce phénotype était en partie secouru par la réexpression de HRS. La protéine HRS possède différents domaines qui lui permettent d'interagir avec les récepteurs membranaires ubiquitinés à dégrader et de se localiser sur les endosomes précoces afin de recruter les autres composants de la machinerie ESCRT (voir figure 24 dans ce manuscrit). Certains domaines participent aussi aux fonctions de HRS dans le recyclage de récepteurs membranaires (Hanyaloglu et al., 2005; Huang et al., 2009; MacDonald et al., 2018; Raiborg et al., 2006, 2002; Urbé et al., 2003; Wenzel et al., 2018; Yan et al., 2005). Nous possédons différents mutants de délétion de HRS dans lesquels les domaines UIM et VHS (liaison à l'ubiquitine), FYVE (liaison au PI3P sur les endosomes précoces) ou CBD (liaison à la Clathrine) ont été retirés. L'utilisation de tels mutants pourrait permettre de déterminer si ces différents domaines (seuls ou conjoints) jouent un rôle important dans le processus de différenciation. Nous pourrions sur-exprimer les différents mutants des domaines de HRS dans des myoblastes C2C12 dont l'expression de la protéine HRS endogène est inhibée (cellule shHRS#3), et déterminer à quel moment la différenciation est restaurée. Les résultats obtenus nous permettraient de mieux comprendre comment HRS régule la myogenèse et d'identifier le/les domaines protéiques d'importance dans ce processus.

La protéine HRS et STAM1/2 font partie du complexe ESCRT-0 qui initie le processus de formation des vésicules intra-luminales (ILV) dans les MVBs (Bache et al., 2003b; Henne et al., 2011b). Récemment Hunt *et al.*, ont montré comme nous que l'inhibition de l'expression de HRS par siARN affectait négativement la myogenèse (Hunt et al., 2019). Dans ces travaux,

Hunt *et al.*, ont également inhibé l'expression de STAM mais non pas observé d'effet sur la différenciation des myoblastes en myotubes (Hunt et al., 2019). Il est donc intéressant de voir que deux protéines issues du même complexe ESCRT présentent des effets opposés sur la myogenèse, suggérant que la protéine HRS a probablement des fonctions additionnelles qui la rendent essentielle dans ce processus. Elles pourraient venir des domaines FYVE et CBD que HRS possède en plus de STAM1/2, (Henne et al., 2011a; Kojima et al., 2014; Takahashi et al., 2015).

L'inhibition de l'expression de HRS et de TSG101 affecte différemment la myogenèse

Lors de notre étude, nous avons comparé les effets de l'inhibition de l'expression de HRS à celle de la protéine TSG101 (appartenant au complexe l'ESCRT-I) dans la myogenèse. Nos données ont révélé que l'absence de TSG101 diminue de 35% le processus de différenciation et conduisait à la formation de myotubes plus fins et possédant moins de noyaux (voir **figure EV2** article1). Cependant ce phénotype reste marginal comparé à celui induit par l'inhibition d'expression de HRS dans lequel quasiment aucun myotube n'est formé. De façon globale, en intégrant les données rapportées par Hunt *et al.*, sur la protéine STAM, il est intéressant de remarquer que trois protéines bien qu'appartenant à une même machinerie et participant toutes au processus de formation des MVBs, ont des effets si différents sur la myogenèse. Afin d'identifier le(s) rôle(s) additionnel(s) que la protéine HRS pourrait avoir dans le processus de différenciation, nous avons cherché quelles étaient les fonctions et voies cellulaires affectées par l'absence de HRS. Nous les avons comparées avec celles observées lors de l'inhibition de l'expression de TSG101. Les paragraphes suivants sont présentés dans l'ordre respectant notre cheminement de pensée au fil des résultats obtenus pendant mon travail de doctorat.

L'autophagie : L'autophagie est une voie cellulaire importante pour le bon déroulement de la myogenèse car son inhibition perturbe le processus de différenciation (Bloemberg and Quadriatero, 2016; Fortini et al., 2016; McMillan and Quadriatero, 2014; Sin et al., 2016). Par ailleurs, différentes études soulignent l'importance de HRS et TSG101 dans le contrôle du flux autophagique (Filimonenko et al., 2007; Oshima et al., 2016; Tamai et al., 2008, 2007). D'autres protéines ESCRT dont l'ESCRT-III CHMP2A participent aussi au processus d'autophagie en permettant la fermeture du phagosome (Takahashi et al., 2018). De ce fait,

nous avons déterminé si l'absence de HRS, ou celle de TSG101 altérerait l'autophagie durant le processus de différenciation. Nos données expérimentales montrent que l'absence de HRS et de TSG101 perturbe le flux autophagique durant le processus de différenciation (voir **figure 8 et figure EV4** article1). Ainsi, nous pouvons conclure que cet effet peut expliquer, au moins en partie, les défauts de différenciation observés en absence de HRS et de TSG101. Toutefois, il est important de noter que des myotubes se forment en absence de TSG101, alors que ce n'est pas le cas en absence de HRS, signifiant que la perturbation du flux autophagique n'est pas la seule voie cellulaire affectée par l'absence de HRS. Dans ce contexte, nous avons alors recherché si d'autres voies cellulaires importantes pour la myogenèse pouvaient être impactées par l'absence de HRS, mais sur lesquelles l'absence de TSG101 avait un effet marginal.

Concernant la protéine TSG101, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que son absence affecte d'autres processus cellulaires de la myogenèse. En effet, différentes études ont montré que la protéine TSG101 avait un rôle dans la cytokinèse, qui est une étape clé lors de la séparation des cellules filles durant la division cellulaire (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). Ainsi, l'absence de TSG101 pourrait affecter la séparation des cellules lors de la division cellulaire, créant des cellules multi-nucléées qui pourraient perturber le processus de fusion (Morita et al., 2007).

Lors de notre étude, l'analyse de la distribution de TSG101 par microscopie confocale dans les myoblastes et dans les myotubes a montré une redistribution de TSG101 au cours de la différenciation, passant d'une localisation majoritairement cytoplasmique dans les myoblastes vers une distribution cytoplasmique et nucléaire dans les myotubes. Ces données étonnantes sur la localisation nucléaire de TSG101 pourraient traduire un rôle spécifique à ce niveau. Différentes études ont aussi observé une localisation nucléaire de TSG101 (B. Y. Kim et al., 2007; Xie et al., 1998). La fonction de cette localisation reste néanmoins peu explorée, mais des données expérimentales suggèrent un lien avec le cycle cellulaire, et notamment la phase G1 (Xie et al., 1998). En parallèle, des études ont montré que les myotubes sont capables d'entrer à nouveau en phase G1, malgré le fait qu'ils soient à un stade post-mitotique (Tiainen et al., 1996). On peut donc supposer que TSG101 soit localisée dans des noyaux qui

sont en phase G1. Le rôle exact que joue TSG101 dans le noyau des myotubes, ainsi que les mécanismes moléculaires le conduisant à être localisé à ce niveau restent à déterminer.

Effet additionnel de HRS par rapport à TSG101 sur le processus de différenciation.

Le Cholestérol : Des études antérieures ont montré que l'absence de HRS, mais pas celle de TSG101, dans des lignées cellulaires humaines affectait l'homéostasie du cholestérol (Du et al., 2012; Vilette et al., 2015). Nous avons confirmé ces résultats dans les myoblastes en montrant une augmentation du cholestérol intracellulaire en absence de HRS dans les compartiments endosomes tardifs/lysosomes (Late endosome/lysosome : LE/Ly). De façon intéressante, les travaux de Mermelstein *et al.*, ont montré que l'utilisation de la drogue Methyl- β -cyclodextrine (MCD), permettant de retirer le cholestérol des membranes cellulaires, favorisait la différenciation des myoblastes de poulet (Mermelstein et al., 2005, 2005; Ana C. B. Possidonio et al., 2014). Ces données suggèrent qu'une accumulation de cholestérol, comme celle observée en absence de la protéine HRS, a un effet délétère sur le processus de différenciation. Par ailleurs, le même groupe a aussi observé que le traitement des myoblastes de poulet avec la MCD augmentait l'expression de l'ARNm de hrs, suggérant alors l'existence d'un lien entre le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et la régulation de la transcription de hrs. Cette information ouvre de nouvelles perspectives à l'hypothèse suggérant que hrs serait un gène pro-myogénique dans ce modèle cellulaire (Ana C. B. Possidonio et al., 2014). Dans ce sens, les auteurs font référence à la protéine GEF1 (galactosylceramide expression factor-1), qui est un homologue de HRS chez le rat et qui est capable lorsqu'il est surexprimé, d'induire la myogenèse dans deux modèles cellulaires différents (Ogura et al., 2004). L'ensemble de ces données nous permet d'émettre l'hypothèse que l'accumulation de cholestérol qui se produit en absence de HRS pourrait être délétère pour le bon déroulement du processus de myogenèse. Dans un premier temps, notre objectif fut de restaurer le processus de différenciation en diminuant l'accumulation de cholestérol induite par l'inhibition de l'expression de HRS avec la drogue MCD. Cependant, nous n'avons pas réussi à restaurer le processus de différenciation dans ces conditions, ni à le favoriser dans la condition contrôle, et ce quelle que soit la drogue utilisée (MCD, ou Hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β CD) dont le principe de capture du cholestérol est différent (Wan et al., 2016)). De façon surprenante, les données expérimentales ont montré, au contraire, que l'utilisation de HP-

β CD augmentait significativement l'accumulation de cholestérol intracellulaire (**figure SD5** thèse). Ce résultat en contradiction avec les données de Mermelstein *et al.*, montrent que les effets de ces drogues diffèrent selon le modèle cellulaire utilisé (Myoblastes de poulet *versus* myoblastes C2C12 de souris). Afin de déterminer si l'accumulation de cholestérol a réellement un effet délétère sur le processus de myogenèse, nous avons, dans un second temps, mimé cette accumulation via l'inhibition de l'expression de la protéine NPC1 (Du et al., 2012). Les données expérimentales obtenues ont montré que l'absence de NPC1 dans les myoblastes C2C12, provoquait une forte accumulation de cholestérol dans les LE/Ly, comme observé en absence de la protéine HRS. A l'inverse, cette accumulation n'affecte aucunement le processus de différenciation, suggérant ainsi que la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol n'a pas réellement d'effet sur la myogenèse. Par transposition, nous pouvons penser que l'accumulation de cholestérol observée en absence de HRS n'est certainement pas un élément clé de l'inhibition du processus de différenciation. Toutefois, il est à noter que l'accumulation de cholestérol, observée en absence de HRS (en microscopie à l'aide du marquage à la Filipin), présente certaines subtilités de localisation comparée à la condition sans NPC1. En effet, le cholestérol, ainsi que les LE/Ly semble être accumulés de manière plus prononcée autour des noyaux en absence de NPC1, alors qu'en absence de HRS, cette accumulation se trouve autour des noyaux mais aussi en périphérie des cellules (voir article1, comparer les **figures EV5A** et **EV5C**). Afin de confirmer ces observations, nous pourrions quantifier la répartition du cholestérol et des LE/Ly selon l'absence de HRS ou de NPC1. En effet, des données récentes ont clairement démontré que la localisation et la quantité de cholestérol dans la cellule des LE/Ly où se trouve aussi mTOR pouvait influencer l'activité de ce dernier qui est un régulateur majeur de la myogenèse (Castellano et al., 2017; Ge and Chen, 2012; Hong et al., 2017; Jia and Bonifacino, 2019). En lien avec ces études, nous avons constaté une légère délocalisation de mTOR et des LE/Ly en périphérie des cellules qui pourraient favoriser l'activation de mTOR (Castellano et al., 2017; Hong et al., 2017), et inhiber la différenciation. Néanmoins, nous n'avons exploré pour l'instant que la phase très précoce du processus de différenciation et à ce stade, nous n'observons aucun changement de l'activité de mTOR en absence de HRS (**Figures SD3** et **SD4** thèse). Nous souhaitons maintenant compléter ces résultats par des expériences en l'absence conjointe de HRS et de NPC1, à des temps plus prolongés de différenciation (24h voir 48h)., Ceci pourrait nous aider à confirmer

ou non l'existence d'un effet de la localisation des LE/Ly et de l'accumulation de cholestérol sur l'activation de mTOR.

Les voies de signalisation : Initialement, plusieurs travaux ont montré que HRS participait à la dégradation de différents récepteurs membranaires dont l'EGFR, et par ce fait, régulaient leurs activités (Komada et al., 1997; Komada and Kitamura, 1995; Lloyd et al., 2002b; Urbé et al., 2000). Puisque le récepteur à l'EGF est fortement impliqué dans le processus de différenciation des myoblastes (Leroy et al., 2013), nous avons analysé sa localisation dans nos conditions. Nos données de microscopie à fluorescence ont montré que l'absence de HRS, mais pas celle de TSG101, affectait le trafic de l'EGFR, et qu'il résidait plus longtemps au niveau des endosomes précoces EEA1 positifs (voir **figure 5** pour HRS et **figure EV3** pour TSG101 de l'article1). Dans ce contexte, la cinétique de dégradation de l'EGFR est perturbée et peut affecter les voies de signalisation en aval (Brankatschk et al., 2012; Malerød et al., 2007; Szymanska et al., 2018). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les voies de signalisation issue de l'EGFR, dont la voie MAPK-MEK-ERK, pouvait être perturbée et affecter le processus de myogenèse en absence de HRS. En effet, l'analyse par biochimie du profil de phosphorylation des protéines ERK1/2 a montré une activation plus importante de la voie MAPK-MEK-ERK en absence de HRS, notamment à 1 jour de différenciation (voir **figure 5** article1). Par ailleurs, d'autres études ont suggéré que l'activation constitutive de la voie MAPK-MEK-ERK inhibait la différenciation en affectant la localisation de régulateurs de la myogenèse dont les protéines MEF2A et MyoD (Michailovici et al., 2014, 2014; Perry et al., 2001; Winter and Arnold, 2000; Yohe et al., 2018). En ce qui nous concerne, nos données expérimentales montrent des défauts de localisation de la protéine MyoD, ainsi que des perturbations de l'expression et de la localisation de la Myogénine et de MEF2A (voir **figure 4** article), qui peuvent être corrélés à l'augmentation du ratio de pERK1/ERK1 et de pERK2/ERK durant la différenciation. Des expériences de sauvetage par l'inhibition de la kinase MEK1/2 avec la drogue U0126, nous ont permis d'augmenter la localisation nucléaire de la Myogénine et suggèrent que l'activité de la voie MAPK-MEK-ERK est fortement affectée par l'absence de HRS (voir **figure 6** article). Par conséquent, nous pouvons alors proposer que l'accumulation de l'EGFR au niveau des endosomes précoces favoriserait l'activation des voies de signalisations associées, dont la voie MAPK-MEK-ERK qui elle-même inhiberait l'expression de la Myogénine et affecterait la localisation nucléaire de MyoD et de MEF2A. Le mécanisme que

nous proposons est cohérent avec la notion de « signalosome » ou les endosomes précoces se trouve être de véritable station de signalisation et régule une multitude de voie de signalisation. (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Irannejad et al., 2015; Szymanska et al., 2018). Ces régulations sont orchestrées par les protéines de la machinerie ESCRT, avec à sa tête HRS, qui permettent l'internalisation des récepteurs activés dans une ILV, et stoppe ainsi le signal qui est émise. Dans l'état d'avancement de nos recherches, nous ne savons pas si les kinases MEK1/2 et/ou ERK1/2 agissent directement sur les MRFs en les stabilisant ou déstabilisant via des phosphorylations. Elles pourraient également agir indirectement via d'autres facteurs qui *in fine* joueraient sur la localisation et la stabilité des MRFs. Une récente étude suggère que la sur-activation de la voie MAPK-MEK-ERK réprime l'expression de la Myogénine par l'action de ERK2 qui est capable de bloquer le promoteur de la Myogénine (Yohe et al., 2018). Nous pouvons donc imaginer un mécanisme similaire d'inhibition de la différenciation en absence de HRS dans nos conditions. Pour finir, la dérégulation de la voie MAPK-MEK-ERK durant le processus de différenciation semble être spécifique de l'absence de HRS puisque l'extinction de l'expression de TSG101 ne provoque pas d'hyper-activation de la voie dans notre modèle. Ces données générées concernant TSG101 sont en accord avec certaines études montrant que son inhibition réduit l'activation de la voie MAPK-MEK-ERK (Morris et al., 2012; Zhang et al., 2011), et en désaccord avec d'autres qui montrent au contraire que l'absence de TSG101 induit une augmentation de l'activation de la voie MAPK-MEK-ERK (Bache et al., 2006; Lu et al., 2003). Ces résultats contradictoires peuvent être en partie expliqués par les différences de modèles cellulaires utilisés.

La voie MAPK-MEK-ERK n'est pas la seule à contrôler le processus de myogenèse, mais elle travaille de concert avec d'autres voies de signalisation dont la voie PI3K/Akt, la voie Wnt, et la voie MAPK-p38 (Girardi and Le Grand, 2018; Knight and Kothary, 2011). Différentes études ont montré que la protéine HRS était impliquée dans la dégradation de différents récepteurs membranaires autres que l'EGFR, et donc contrôlerait éventuellement les voies de signalisation issues de ces récepteurs (Chanut-Delalande et al., 2010; Jékely and Rørth, 2003; Lloyd et al., 2002b; Rusten et al., 2011; Szymanska et al., 2018). C'est pourquoi, nous avons analysé l'état d'activation de différentes voies cellulaires supplémentaires dont la voie PI3K/Akt, la voie MAPK-p38 et l'activation de la GSK3 β dans des expériences de cinétique de différenciation en absence de HRS. Nos données ont révélé que l'absence de HRS affectait

négativement le niveau protéique de Akt2 total, ainsi que sa phosphorylation durant la différenciation (voir **Appendixfigure7** article1) ; ces deux composantes étant importantes pour le bon déroulement du processus de myogenèse (Gonzalez et al., 2004a; Rotwein and Wilson, 2009). Ainsi, l'absence de HRS pourrait perturber le trafic et la cinétique d'activation des récepteurs contrôlant la voie PI3K/Akt dont par exemple l'IGF1R ou IGF2R, qui sont des régulateurs majeurs du processus de différenciation (Jiao et al., 2013). Ces données sont cohérentes avec un article récent, montrant que l'absence de la protéine Rab5a affecte négativement l'interaction entre la protéine IRS1 et l'IGF1R et diminue l'activation de la voie PI3K/Akt lors de la myogenèse (Cong et al., 2020). Dans notre contexte, il serait intéressant d'étudier la localisation de l'IRS1 en absence de HRS et son interaction avec l'IGF1/2R. Des perturbations à ces deux niveaux pourraient expliquer les effets observés sur la voie PI3K/Akt. Nos données vont en partie dans ce sens puisque nous avons observé que l'absence de HRS induit la formation de gros endosomes précoces rab5a positifs, ce qui pourrait alors affecter la localisation de l'IRS1 et donc l'activation de la voie PI3K/Akt (en accord avec les données de Cong *et al.*).

Des études ont également montré que HRS était impliquée dans la régulation de la voie Wnt en séquestrant la protéine kinase GSK3 β dans les ILVs des MVBs (Taelman et al., 2010). En l'absence d'HRS, les mêmes auteurs ont montré que le niveau protéique de la β -caténine, qui est une cible de la GSK3 β , était diminué et affectait son rôle de facteur de transcription dans les cellules HeLa. Aujourd'hui, il est clairement établi que la voie Wnt participe activement à la régulation du processus de différenciation (Girardi and Le Grand, 2018). Dans ce contexte, nous avons analysé la localisation de la GSK3 β , ainsi que son état d'activation en étudiant son état de phosphorylation sur la tyrosine 216 (Tyr216). En parallèle, nous avons aussi analysé la localisation de la β -caténine, son niveau protéique ainsi que son activation par l'analyse de sa translocation entre le cytoplasme et le noyau, ainsi que son effet sur la transcription de gènes cibles dont l'Axin2 et la Follistatine. Nos données expérimentales ont montré une augmentation, de la forme phosphorylée active (Tyr216) de la GSK3 β durant le processus de différenciation, ainsi qu'une accumulation plus importante en périphérie de structures vacuolaires exprimant Lamp1 dans les myoblastes en prolifération (voir **figure 7** article1), suggérant comme cela a été proposé par Taelman *et al.*, qu'une inhibition de son internalisation dans les ILVs des MVBs a lieu. De façon intéressante, l'inhibition de la GSK3 β

par le Chlorure de lithium (LiCl) ou par l'Azakenpaulone (inhibiteur spécifique de la GSK3 β) a permis de restaurer de façon significative le processus de différenciation en absence de HRS. Cet effet est associé à une augmentation de la localisation nucléaire des protéines MEF2A et Myogénine (voir **figure 7** article1). Ainsi, nos données suggèrent fortement que l'activité de la GSK3 β serait augmentée en absence de HRS, et que sa dégradation par la voie endo-lysosomale serait inhibée dans les myoblastes C2C12, ce qui participerait ainsi à l'inhibition du processus de différenciation. Par la suite, nous avons étudié si la sur-activation de la GSK3 β pouvait affecter la localisation, l'activité et le niveau protéique de la β -caténine. Nos expériences de microscopie par immunofluorescence ont révélé que l'absence de HRS provoquait une accumulation anormale de β -caténine dans le cytoplasme de certaines cellules, ainsi qu'une diminution de sa localisation aux jonctions cellules-cellules (**figure SD6** thèse). Cette délocalisation de la β -caténine pourrait ainsi affecter son rôle de facteur de transcription et impacter le processus de myogenèse (Krauss et al., 2017). Néanmoins, dans nos conditions, l'absence de HRS n'entraîne pas de modification du niveau protéique de la β -caténine ni de sa translocation entre le cytoplasme et le noyau (reflétant son état d'activation) en phase de prolifération ou de différenciation. L'absence de variation du niveau protéique de la β -caténine lorsque l'expression de HRS est éteint fut récemment confirmé dans une autre étude (Munthe et al., 2020), contrastant avec les résultats obtenus précédemment par Taelman *et al.* (Taelman et al., 2010). Pour statuer sur l'état d'activation de la voie Wnt en absence de HRS, nous avons analysé les niveaux d'ARNm de l'Axin 2 et de la Follistatine, qui sont des cibles transcriptionnelles de la β -caténine, dans des expériences de cinétique de différenciation. Nous n'avons pas mesuré de changement dans la quantité relative de l'ARNm de l'Axin 2, alors que celle de la Follistatine n'a augmenté pas durant la différenciation en absence de HRS comparé au contrôle (voir **Figure SD10** thèse). Collectivement, nos données suggèrent que l'activité de la GSK3 β est augmentée durant la différenciation, et que sa localisation est aussi perturbée, ce qui affecterait négativement le processus de différenciation. D'autre part, la sur-activation de la GSK3 β pourrait aussi altérer la fonction transcriptionnelle de la β -caténine. Pour avancer sur ce point, des expériences complémentaires seront réalisées afin de déterminer si l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est affectée en l'absence de HRS en utilisant notamment des tests d'activité de la β -caténine.

Pour compléter l'étude des voies de signalisation, nous avons également exploré la voie de signalisation p38-MAPK pendant mon doctorat, qui contribue grandement au processus de différenciation (Dionyssiou et al., 2013; Gonzalez et al., 2004a; Knight and Kothary, 2011; Wu et al., 2000b). Par ailleurs, des études ont montré que l'absence de HRS diminuait la phosphorylation de p38 après infection des cellules par un entérovirus (Luo et al., 2017), et que certains des activateurs de p38 dont TAK1, n'étaient plus localisés et activés au niveau des endosomes précoces (Miura and Mishina, 2011). Nous avons donc analysé le profil de phosphorylation de p38, au cours de la différenciation, ainsi que sa translocation dans le noyau (reflétant son activation). Nos données expérimentales en absence de HRS n'ont pas montré de différence sur l'état de phosphorylation de p38 (son activation), ou sur sa localisation cytoplasmique et/ou nucléaire durant la différenciation (voir **Appendixfigure S4** article1). Une des hypothèses émise pour expliquer l'absence de dérégulation de la voie p38MAPK dans notre modèle serait que l'activation de cette voie soit essentiellement régie au niveau de la membrane plasmique, par des interactions cellules-cellules impliquant des protéines membranaires dont la protéine Cdon et la N-Cadhérine (Krauss et al., 2017). Dans le processus de myogenèse, l'activation de p38 pourrait alors différer de celle montrée par Luo *et al.*, laquelle a lieu au niveau des endosomes précoces/tardifs en association avec HRS et TLR7 (Toll like receptor 7) (Luo et al., 2017).

Effet de l'absence de HRS sur la fusion des myoblastes.

Nous avons montré que l'absence de HRS affectait l'engagement des cellules dans le processus de différenciation en affectant l'expression de la Myogénine, mais aussi l'expression et la localisation de MEF2A, ainsi que la localisation de MyoD. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que l'absence de HRS affecte aussi la fusion des cellules pour former les myotubes. En effet, nous avons observé dans les cellules en prolifération que la β -caténine se retrouvait accumulée dans le cytoplasme de certaines cellules, et absente des jonctions cellules-cellules (**Figure SD6** thèse). Or, la β -caténine, avec d'autres protéines membranaires dont la E-cadhérine ou la M-cadhérine, participent aux jonctions cellule-cellule, qui sont impliquées dans le processus de fusion des myocytes (Abmayr and Pavlath, 2012; Charrasse et al., 2013; Krauss et al., 2017). Nous pouvons alors suggérer que la fusion des myoblastes, en absence de HRS, pourrait aussi être affectée, du fait de la mauvaise localisation de protéines d'adhésion.

Toutefois, nous n'avons pas observé de modification de localisation de la E-cadhérine en absence de HRS dans les cellules en prolifération (**Figure SD6** thèse). Il est nécessaire de compléter nos études afin de déterminer si d'autres protéines d'adhésion sont affectées comme par exemple la M-cadhérine. Nous pourrions aussi analyser la localisation de protéines de la machinerie de fusion comme les protéines Myomaker et Myomerger en l'absence de HRS (Sampath et al., 2018).

Il est important de noter ici qu'il est finalement difficile d'étudier le rôle de HRS dans le processus de fusion, du fait que son absence affecte les étapes précoces de la myogenèse. Afin de contourner cette problématique, nous avons mis en place une approche expérimentale dans laquelle nous avons transduit/infecté les cellules contrôles (shCT) et les cellules invalidées pour HRS (shHRS#3), avec des lentivecteurs codant respectivement pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ou la RFP (Red Fluorescent Protein). Nous avons mélangé les deux types cellulaires et avons induit la différenciation. Nos données expérimentales ont montré la formation de myotubes jaunes, indiquant la fusion de cellules shCT et des cellules shHRS#3 (**figure SD7** thèse). Ces résultats suggèrent que malgré l'absence de HRS, ces cellules restent myogéniques et sont capables de fusionner dès lors qu'elles sont en présence de cellules contrôles fonctionnelles.

L'absence de HRS pourrait perturber la sécrétion de facteurs jouant un rôle dans le processus de différenciation.

La myogenèse est contrôlée par différentes voies de signalisation qui sont, pour la plupart, activées par des récepteurs membranaires (Hindi et al., 2013; Knight and Kothary, 2011). Il existe une grande variété de ligands, telle que les myokines dont la Myostatine, mais aussi les facteurs de croissances dont l'IGF ou Wnt3a, qui sont sécrétés par les cellules et activent leurs récepteurs spécifiques (Hindi et al., 2013; Jiao et al., 2013; Lee and Jun, 2019). Différentes études ont aussi souligné le rôle des vésicules extracellulaires comme les exosomes, dans la myogenèse (Aswad et al., 2016; Bittel and Jaiswal, 2019; Forterre et al., 2014; Rome et al., 2019). En parallèle, des travaux ont également montré que la protéine HRS régule le processus de formation des exosomes, et que son absence réduisait leur sécrétion, leur taille, et leur contenu (Colombo et al., 2014; Edgar et al., 2014; Gross et al., 2012; Tamai et al., 2010).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de HRS pourrait perturber la sécrétion de vésicules extracellulaires, ou d'autres facteurs solubles comme des cytokines/myokines pouvant participer au processus de différenciation. Nos expériences préliminaires, consistant à ajouter un milieu conditionné de différenciation issue de cellules contrôles sur des cellules dont l'expression de HRS est éteinte, ont montré une restauration partielle du processus de différenciation (**Figure SD8** thèse). Ces données suggèrent que le milieu de différenciation des cellules contrôles pourrait apporter des facteurs paracrines solubles, ou bien associés à des vésicules extracellulaires permettant de restaurer la différenciation. Il est donc possible que l'absence de HRS affecte la sécrétion de ces facteurs et/ou des vésicules extracellulaires. Ainsi, deux études complémentaires pourraient être menées. Dans la première, nous pourrions réaliser une analyse différentielle des facteurs solubles, ainsi que de la quantité de vésicules extracellulaires présentes dans le milieu de différenciation des cellules, en présence et en absence de HRS (Forterre et al., 2014; Le Bihan et al., 2012; Rome et al., 2019). Effectivement, différentes études suggèrent que les vésicules extracellulaires (en particulier les exosomes) sont aussi capables de transporter des protéines de signalisation, dont les protéines Wnt (Wnt3a et Wnt5a) ou l'IGF (Działo et al., 2019; Gross et al., 2012; He et al., 2014). La présence de ces protéines dans les exosomes pourrait être modulée par HRS, et ainsi participer à au processus de différenciation. Dans une seconde expérience, nous pourrions analyser directement la sécrétion de molécules de signalisation dont par exemple l'IGF-II, qui un régulateur essentiel de la myogenèse en absence de HRS (Erbay et al., 2003; Jiao et al., 2013). En effet, nos résultats ont montré une diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt reflétée par une diminution du niveau de phosphorylation et de la quantité protéique de Akt2 (voir **AppendixFigure S4** article1). Puisque l'IGF-II participe à l'activation de cette voie (Knight and Kothary, 2011), nous pouvons suggérer que son niveau protéique et/ou de sécrétion est affecté par l'absence HRS. D'autres facteurs sécrétés tels que les myokines, comme la Myostatine et l'interleukine 6, pourraient aussi être impactés par l'absence de HRS (Lee and Jun, 2019). Leur abondance pourrait être mesurée à l'aide d'un test ELISA.

A l'inverse, il est aussi possible que les cellules en absence de HRS, sécrètent des facteurs restrictifs au processus de différenciation., Nos données vont dans ce sens en montrant une diminution de l'ARNm de la Follistatine durant la différenciation des cellules en absence de HRS (voir **Figure SD10** thèse). Or, la Follistatine est un inhibiteur de la Myostatine, qui est-elle

même un inhibiteur de la différenciation en activant la voie du TGF β . Ainsi, la diminution de l'expression de la Follistatine, en absence de HRS, pourrait affecter son niveau protéique et sa sécrétion, et diminuer son effet inhibiteur sur la Myostatine. Ainsi, il y aurait plus de Myostatine libre dans le milieu de différenciation, ce qui activerait la voie du TGF β et inhiberait la différenciation. Dans cette hypothèse, nous pouvons penser qu'ajouter du milieu conditionné provenant des cellules contrôles pourrait permettre de diluer la Myostatine libre anormalement présente dans le milieu de différenciation des cellules quand HRS est absent, et ainsi favoriser le processus de différenciation. Toutefois, nous devons tout d'abord déterminer s'il y a plus de Myostatine libre dans le milieu de différenciation des cellules en absence de HRS, et si la voie du TGF β est plus activée. Cependant, dans une première expérience, nous n'avons pas observé de différence de l'activation de la voie du TGF β en absence de HRS. Il sera important de répéter cette expérience avant de pouvoir statuer sur l'état d'activation de la voie du TGF β en absence de HRS.

Rôle général de la voie d'endocytose dans la myogenèse.

Mon travail de thèse s'est finalement focalisé sur une partie de la voie d'endocytose en étudiant deux protéines de la machinerie ESCRT dans la myogenèse. Néanmoins, nous pouvons nous questionner quant à l'effet de l'inhibition d'autres protéines de la voie d'endocytose sur le processus de différenciation ? Pour commencer à répondre à cette question, nous avons inhibé certaines étapes de la voie d'endocytose à l'aide de drogues. Nos données expérimentales ont montré que l'inhibition des voies endosomales de recyclage par la drogue primaquine affectait fortement le processus de différenciation (**figure SD1**). En reliant ces données avec ce que nous savons de HRS dans le processus de différenciation, il est possible que le bon fonctionnement de la voie endosomale de recyclage, jusqu'à la formation des ILVs dans les LE/MVB soit des facteurs clés dans la régulation de la myogenèse. Ceci est en accord avec des données montrant que l'inhibition de la protéine Rab5a (localisée sur les endosomes précoces et participant à leur homéostasie) perturbait fortement la myogenèse (Cong et al., 2020). D'autres études soulignent le fait que l'absence des protéines Rab11 et Rab35, qui sont spécifiques des endosomes de recyclage, affecte négativement le processus de différenciation (Bhuin and Roy, 2009; Charrasse et al., 2013; Singh and Kumar Roy, 2013). L'inhibition de l'expression d'autres composants de la machinerie endosomale,

notamment de ceux impliqués dans la formation des vésicules d'endocytose comme la Clathrine, ou bien l'inhibition de leur transport avec la drogue dynasore qui cible la Dynéine, perturbe également la myogenèse (Leikina et al., 2013; Shin et al., 2014). Mises ensemble, ces données nous laissent penser que la voie d'endocytose est essentielle au bon déroulement de la myogenèse, au moins jusqu'à l'étape de la formation des MVBs par les composants de la machinerie ESCRT dont HRS fait partie. Au niveau moléculaire, nous pouvons alors suggérer que l'intégration des récepteurs membranaires activés dans une ILV est l'un des moyens existant pour stopper leur signalisation et ainsi favoriser le processus de différenciation (Dobrowolski and De Robertis, 2011; Irannejad et al., 2015; Szymanska et al., 2018). Dans ce sens, nous pouvons penser que l'inhibition plus tardive des voies d'endocytoses, notamment après la formation des MVB, n'affecterait pas le processus de différenciation. Les résultats obtenus avec la drogue Apilimode qui bloque les étapes tardives de la voie endo-lysosomale (provoque une accumulation de LE/Ly), confirment cette hypothèse ; car le processus de différenciation n'est pas modifié (voir **Figure SD1** thèse). En accord avec ce résultat, une étude a montré que l'accumulation d'endosomes tardifs (provoqué par la chloroquine qui bloque la dégradation lysosomale), était capable de favoriser la signalisation de la voie Wnt. Cet effet résulterait d'une séquestration plus importante de la GSK3 dans les MVBs (Dobrowolski et al., 2012). Dans ces conditions, les auteurs n'ont pas observé de défaut de formation des ILVs dans les endosomes. A la lumière de ces données, nous pouvons postuler que la formation des MVB permet la séquestration des récepteurs membranaires activité dans les ILV, et ainsi régule les voies de signalisation qui en sont issus. Replacé dans le contexte de la myogenèse, l'ensemble de ces données suggère que la protéine HRS, en participant à la formation des MVB/ILV, est un facteur clé dans la régulation des voies de signalisation qui participent au processus de différenciation.

Implication potentielle de HRS dans la pathologie sIBM

La myosite à corps d'inclusion (sporadic inclusion body myositis : sIBM), est la classe de myopathie inflammatoire touchant le plus les personnes de plus de 50 ans. Au niveau histologique, elle est caractérisée par un aspect inflammatoire important qui touche certaines fibres musculaires en dégénération et par la présence dans ces fibres de protéines accumulées, et ou agrégées dont la protéine p62/SQSTM1, la TDP-43, l' α -Synucléine, la

protéine Prion, le peptide Amyloïde- β et la protéine Tau phosphorylée (Askanas et al., 2015; Keller et al., 2017). Ces protéines sont aussi retrouvées dans différentes maladies neurodégénératives, suggérant des mécanismes communs menant à leur accumulation/agrégation (Askanas et al., 2015; Benveniste et al., 2015; Nakamori et al., 2013). Comme décrit précédemment, différentes études ont mis en lumière le fait que, l'absence de HRS dans des modèles *in vitro* et *in vivo* perturbait le flux autophagique et participait à l'accumulation voire à l'agrégation de protéines (notamment prionoides) impliquées dans les processus neurodégénératifs comme la TDP-43 dans la SLA, l' α -Synucléine dans les synucléopathies, le peptide Amyloïde- β dans la maladie d'Alzheimer (Edgar et al., 2015; Filimonenko et al., 2007; Oshima et al., 2016; Tamai et al., 2007). Par ailleurs, des données expérimentales chez la souris ont montré que l'absence de HRS dans les muscles lisses provoquait une diminution de leur contraction, de leur taille, et une inflammation importante (Chen et al., 2015). De plus, une étude a montré que la diminution d'expression de HRS, causée par une mutation (HRS teetering), diminuait la taille et le poids des souris, provoquait des troubles moteurs, et altérait l'intégrité de la jonction neuromusculaire (Watson et al., 2015). Ainsi, ces données suggèrent que l'inhibition ou la diminution de l'expression de HRS pourrait affecter la physiologie du muscle. Nous pouvons supposer également que l'accumulation, voire l'agrégation de HRS pourrait entraîner une perte de sa fonction. Soutenant cette hypothèse, des études montrent que la protéine ESCRT-III CHMP2B est accumulée et co-localisée avec les protéines TDP-43/pTDP43 et à la protéine Prion également accumulées dans le muscle des patients sIBM (Murata-Shinozaki et al., 2017; Nakamori et al., 2013). Ces données montrent qu'il existe potentiellement un lien entre le dysfonctionnement de la machinerie ESCRT, représenté ici par CHMP2B, et l'accumulation et/ou l'agrégation de protéines de type prion dans la pathologie sIBM. Ainsi, ces informations nous ont poussé à rechercher si la localisation de HRS était perturbée dans des biopsies de muscles issus de patients sIBM. Nos analyses préliminaires par microscopie à fluorescence ont montré dans les muscles de patients sIBM, que la protéine HRS était fortement accumulée à l'extérieur et à l'intérieur des fibres en dégénération contrairement à ce qui est observé dans le muscle contrôle. HRS a aussi été retrouvée au niveau de vacuoles intramusculaires caractéristiques des sIBM (voir flèche **figure SD11**, page suivante). Par ailleurs, nos données ont aussi révélé une co-accumulation de la protéine p62/SQSTM1 avec HRS, à l'intérieur et à l'extérieur des fibres en

dégénérescence, et au niveau des vacuoles intramusculaires (**figure SD11**). Ces résultats montrent pour la première fois que HRS est accumulé, au même titre que p62, dans les fibres en dégénération des patients sIBM. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'accumulation de HRS pourrait provoquer une perte de sa fonction et ainsi affecter le fonctionnement de la machinerie ESCRT, et participer à l'accumulation de la protéine p62. Des analyses supplémentaires sur la co-localisation de HRS avec d'autres protéines de type prion dont la TDP-43, l' α -Synucléine, le peptide Amyloïde- β pourrait nous éclairer sur un éventuel lien entre leurs accumulations/agrégations et la perte de fonction de HRS dans les sIBM. Pour compléter cette étude, la création d'un modèle murin dont HRS serait inhibé spécifiquement dans le muscle (Souris HSA-Cre et HRS flox), pourrait nous éclairer sur sa fonction et sa participation à l'accumulation de protéines retrouvées dans les pathologies neurodégénératives. Dans ce modèle, nous pourrions nous attendre à des défauts d'autophagie, à une forte vacuolisation des fibres, et à l'agrégation de différentes protéines dont p62 ou la TDP-43, déjà observé dans le modèle existant de souris invalidé pour *hrs* dans les neurones (Oshima et al., 2016; Tamai et al., 2008). Si ces données se confirment, ces souris pourraient être un bon modèle pour l'étude de la pathologie sIBM.

Coupe de fibre musculaire humaine

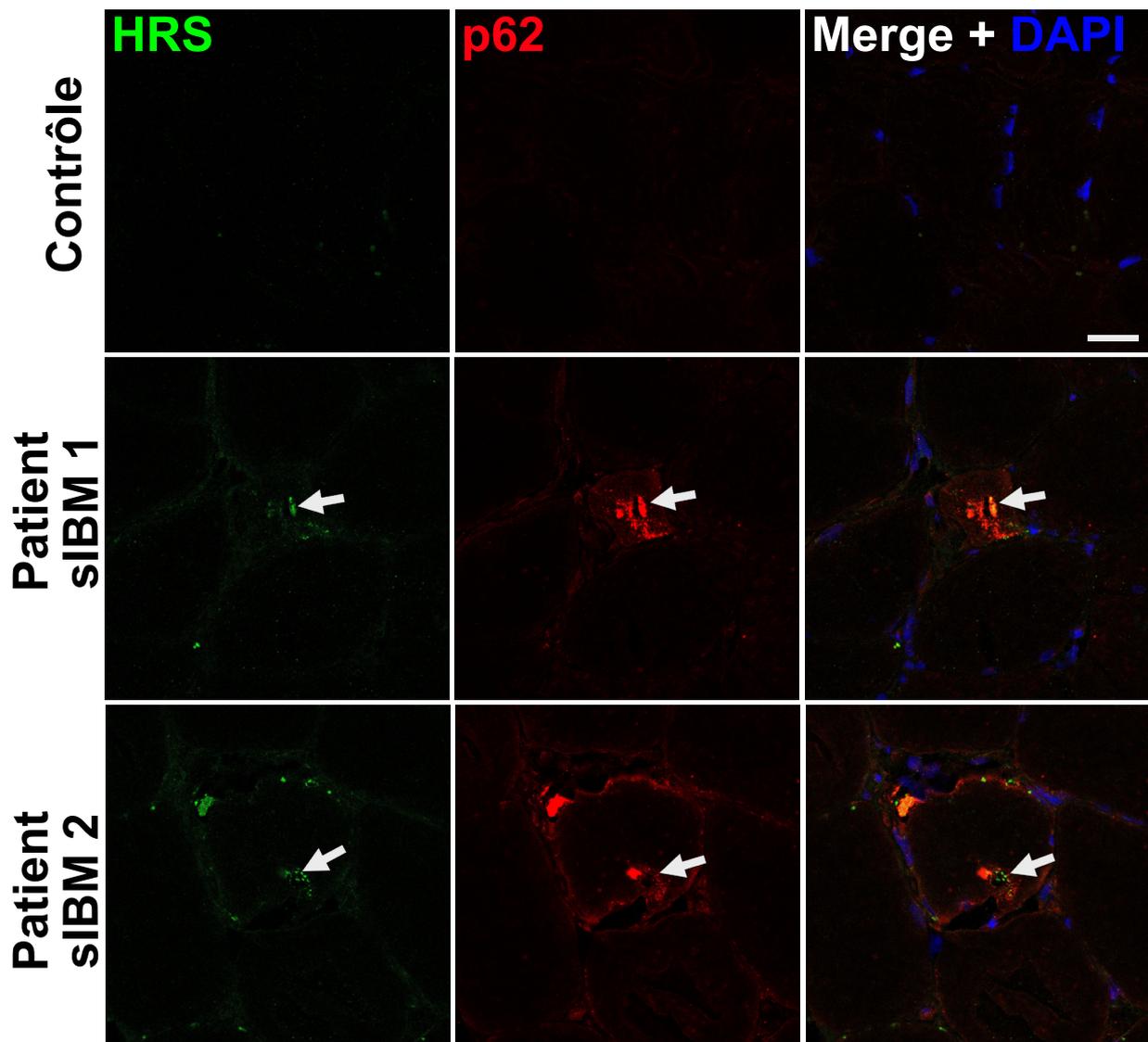


FIGURE SD 11 : LOCALISATION DE HRS ET P62 DANS LES COUPES MUSCULAIRES DE 2 PATIENTS SIBM.

Immuno-marquage de coupes de fibres musculaires (biopsies) d'un individu contrôle et de 2 patients atteints de la pathologie sIBM. Les coupes ont été marquées avec un anticorps primaire reconnaissant la protéine HRS (en vert), la protéine p62 (en rouge) et les noyaux (en bleu) ont été marqués avec le DAPI. Notez la présence d'accumulations protéiques de HRS et p62 au niveau des vacuoles bordées et en périphérie des fibres. Barre d'échelle, 40µm.

Pour conclure ce manuscrit, mon travail de thèse a apporté une nouvelle compréhension du rôle de la protéine ESCRT-0 HRS dans le processus de différenciation des myoblastes en myotubes. Nous avons montré que HRS possédait un rôle multimodal dans ce processus en modulant à la fois, le trafic de récepteur membranaire tel que l'EGFR, des voies de signalisation dont la voie MAPK-MEK-ERK, l'activité de la kinase GSK3 β , l'expression et la localisation des régulateurs de la myogenèse MEF2A, MyoD et Myogénine, mais aussi l'autophagie. Par ailleurs, nos données suggèrent que l'absence de HRS affecte aussi l'expression de facteurs sécrétés pro-myogéniques dont la Follistatine. Ce travail propose également un rôle inattendu de HRS dans les myotubes, lié à sa localisation péri-nucléaire, en maintenant et/ou en recrutant la Clathrine et l' α -Actinine4, mais dont la fonction nécessite encore d'être étudiée de façon plus précise. En accord avec la fonction de HRS dans la myogenèse, son accumulation dans les fibres musculaires des patients SIBM ajoute un rôle possible à HRS dans la mise en place de cette pathologie. Pour élargir les objectifs de notre étude, la création d'un modèle *in vivo*, dans lequel HRS serait inhibé spécifiquement dans les cellules satellites, nous permettrait d'étayer nos données *in vitro*, et de nous intéresser plus spécifiquement au rôle fondamental de HRS dans la réparation musculaire. Ainsi, pour résumer mes travaux de thèse, deux schémas reprenant la fonction de HRS au niveau cellulaire (**Figure 34** page suivante) et au niveau moléculaire (**Figure 35** page suivante) lors du processus de différenciation peuvent être mis en avant.

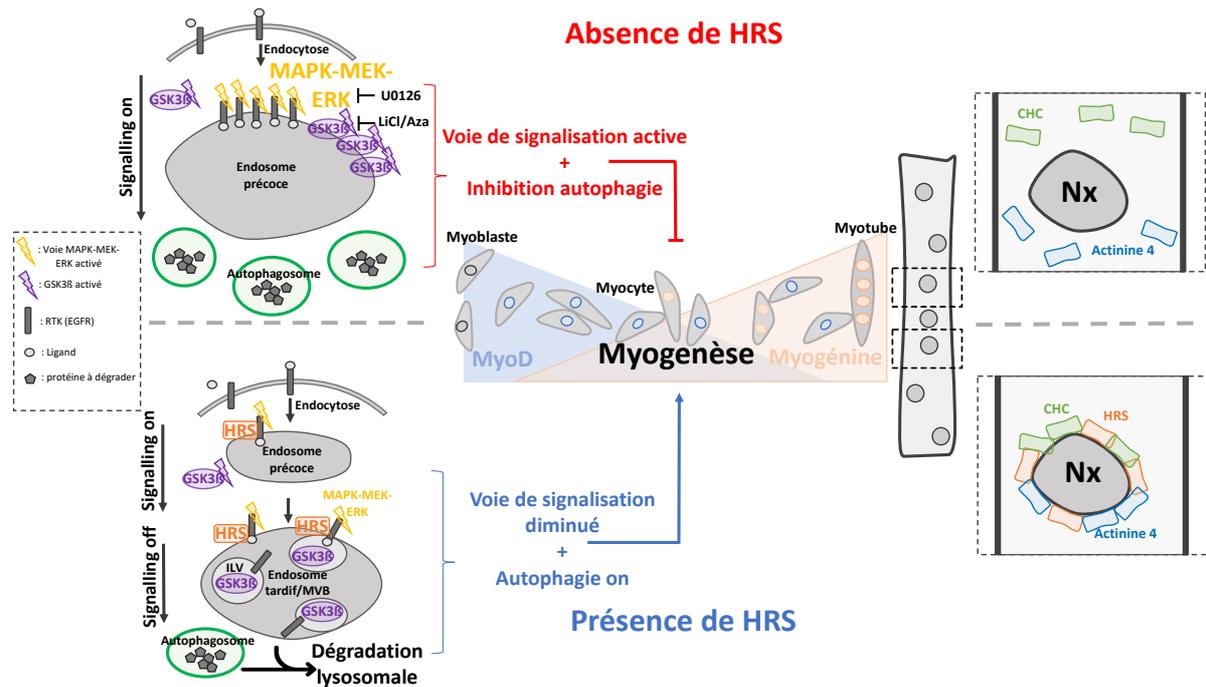


Figure 34: Modèle du rôle de HRS durant le processus de différenciation des C2C12.

L'absence de HRS perturbe le trafic endosomal, aboutissant à l'accumulation de l'EGFR et au maintien de la voie de signalisation MAPK-MEK-ERK au niveau de l'endosome précoce. L'activation de cette voie inhibe l'expression ainsi que la localisation nucléaire des facteurs de transcription MyoD, MEF2A et Myogénine. Ceci peut être inversé grâce à l'inhibiteur U0126. L'absence de HRS perturbe également la localisation et l'activité de la GSK3 β , mais son inhibition par le LiCl ou l'Aza restaure la différenciation. De surcroît, le flux autophagique est aussi inhibé et participe au défaut de myogenèse. L'absence de HRS dans les myotubes entrainerait une perte de la localisation péri-nucléaire de la Clathrine et de l' α -Actinine 4. RTK : Receptor tyrosine kinase ; EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* ; CHC: *Clathrin heavy chain*.

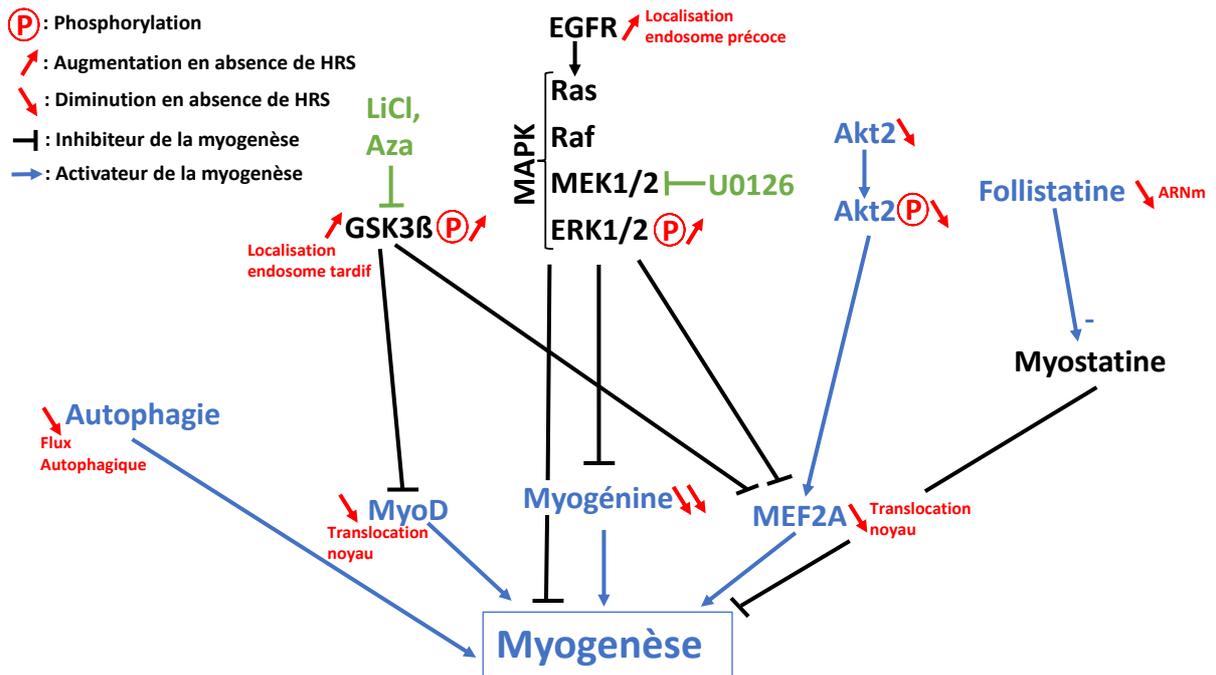


Figure 35: Effet de l'inhibition d'expression de HRS sur les différentes voies de signalisation et voies cellulaires qui participent à la myogenèse.

L'absence de HRS affecte le trafic de l'EGFR, l'activation de la voie MAPK-MEK-ERK, la phosphorylation et le niveau protéique de Akt2, l'activité (phosphorylation) et la localisation de la GSK3β, le niveau d'ARN de la Follistatine et le flux autophagique. Ceci participe à la diminution de la translocation de MyoD et de MEF2A dans le noyau, ainsi qu'à la diminution d'expression de la myogénine qui active la myogenèse.

PUBLICATION 2:

Phosphorylated and aggregated TDP-43 with seeding properties are induced upon mutant Huntingtin (mHtt) polyglutamine expression in human cellular models

Laurent Coudert, Takashi Nonaka, Emilien Bernard, Masato Hasegawa, Laurent Schaeffer, Pascal Leblanc.

Contexte scientifique :

Chez l'homme, on estime que 20 000 à 25 000 protéines sont impliquées dans la plupart des fonctions biologiques de la cellule. Après traduction par les ribosomes, une grande partie des protéines se replient pour adopter une structure tridimensionnelle fonctionnelle. De manière frappante, il a été estimé qu'environ 30% des protéines sont classées comme intrinsèquement non structurées et contiennent des domaines qui peuvent adopter une structure ordonnée uniquement en cas d'interaction avec des partenaires. Ces protéines apparaissent comme métastables et peuvent être sujettes à des événements conduisant à leur accumulation et à leur agrégation dans la cellule. Dans ce contexte, le processus d'agrégation peut s'amplifier et aboutir à l'accumulation d'agrégats protéiques qui peuvent être toxiques pour les cellules. Pour empêcher cette situation, les cellules possèdent un ensemble de systèmes de veille et de défense permettant d'évaluer la situation et de dégrader les protéines accumulées/agrégées, ou de permettre leur retour à un état structurel stable. Parmi ces systèmes, on trouve les protéines chaperonnes impliquées dans le pliage/remodelage/désagrégation des protéines nouvellement synthétisées mal repliées (UPR pour unfolded protein response). Également, les systèmes de dégradation via le couple protéasome/ubiquitine (UPS pour ubiquitin proteasome system), les réseaux endo-lysosomaux et l'autophagie sont des voies cellulaires efficaces impliquées dans la clairance des protéines mal conformées et agrégées. Cependant, ces systèmes de garde de l'intégrité du protéome peuvent être altérés en raison de mutations dans des protéines clés impliquées dans le système de protéolyse, mais aussi lors du vieillissement ou par l'intermédiaire de stress environnementaux (pollution chimique, infections par des pathogènes etc...). Ceci peut alors conduire à une multiplication et une

accumulation de protéines mal conformées dans la cellule qui peuvent s'agréger et entraîner l'agrégation de leurs homologues normaux, provoquant alors l'apparition de protéinopathies. Parmi elles, on trouve les maladies neurodégénératives dont les maladies à prions (encéphalopathies spongiformes transmissibles EST) caractérisées par l'agrégation de protéine prion cellulaire (PrPC) en une protéine pathologique PrP^{Sc} (sc pour scrapie tremblante chez les ovins et les bovins), la maladie d'Alzheimer caractérisée par la formation et l'agrégation du peptide amyloïde β ($A\beta$) ou de la protéine Tau, les synucléopathies (incluant la maladie de Parkinson PD, la démence à corps de Lewy LBD et l'atrophie multisystémique MSA) avec l'agrégation de la protéine α -synucléine (α Syn), la maladie de Huntington via l'agrégation de la protéine Huntingtin ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et SLA associées à la démence lobaire frontotemporale (ASL-FTLD) qui sont caractérisées par des agrégats protéiques des protéines TDP-43 (Tar DNA-Binding Protein 43) FUS ou SOD1. Dans le même contexte, la myosite sporadique à inclusions (sIBM) qui est une pathologie musculaire, est du plus grand intérêt car elle est caractérisée par une agrégation des protéines pathologiques décrites ci-dessus ($A\beta$, Tau, α Syn, TDP-43 et PrP) au niveau des fibres musculaires en dégénération. Ces dernières années, différentes études suggèrent que l'accumulation et l'agrégation de protéines mal conformées n'est pas le résultat d'un dysfonctionnement du réseau de protéolyses mais pourrait en être la cause. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'expression de protéines pathologiques mal conformées pourrait conduire à l'altération d'autres protéines et provoquer leur agrégation conduisant à des co-pathologies. Dans ce contexte, au sein de l'équipe dirigée par le Pr Laurent Schaeffer (Groupe Interactions Neurones-Muscles à l'INMG), mon directeur de thèse Pascal Leblanc développe depuis 2011 une série de thèmes de recherche dédiés aux protéinopathies, et plus précisément articule sa recherche sur les maladies à prions, la SLA/FTLD et la pathologie sIBM. Pascal Leblanc concentre son attention sur les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le processus d'accumulation et d'agrégation de protéines pathologiques telles que PrP, $A\beta$, α Synucléine, Tau, TDP-43 ou Huntingtin, mais aussi comment ces protéines peuvent être dégradées ou libérées dans le milieu extracellulaire (surnageant de culture cellulaire dans des expériences ex vivo ou sang ou liquide céphalo-rachidiens/LCR) sous forme d'agrégats libres ou recrutés dans des vésicules membranaires comme des vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules). Il cherche également à comprendre les

événements moléculaires qui conduisent à l'apparition de co-pathologies en étudiant certaines voies cellulaires dont la machinerie ESCRT et tout particulièrement HRS (Cell Mol Life Sci, 2015). Ainsi, en 2018-2019, j'ai pu participer à un projet en parallèle de mes travaux concernant la protéine HRS dans le processus de différenciation, ou nous avons cherché à déterminer qu'elle facteur pouvait influencer l'agrégation de la TDP-43 dans des modèles *in vitro*. Un crible nous a permis d'identifier que la protéine mutante Huntingtin (Htt ; possédant de multiple répétitions de polyglutamines) était capable lors de son agrégation de favoriser dans le même temps l'agrégation de la TDP-43 endogène, ainsi que sa phosphorylation dans le modèle cellulaire 293T ou neuroblastome humain SHSY5Y. Des analyses plus poussées ont donné lieu à la publication suivante : **Phosphorylated and aggregated TDP-43 with seeding properties are induced upon mutant Huntingtin (mHtt) polyglutamine expression in human cellular models**



Phosphorylated and aggregated TDP-43 with seeding properties are induced upon mutant Huntingtin (mHtt) polyglutamine expression in human cellular models

Laurent Coudert¹ · Takashi Nonaka² · Emilien Bernard^{3,4} · Masato Hasegawa² · Laurent Schaeffer¹ · Pascal Leblanc¹

Received: 20 August 2018 / Revised: 6 February 2019 / Accepted: 1 March 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The Tar DNA-Binding Protein 43 (TDP-43) and its phosphorylated isoform (pTDP-43) are the major components associated with ubiquitin positive/Tau-negative inclusions found in neurons and glial cells of patients suffering of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or frontotemporal lobar degeneration-TDP-43 (FTLD-TDP). Many studies have revealed that TDP-43 is also in the protein inclusions associated with neurodegenerative conditions other than ALS and FTLD-TDP, thus suggesting that this protein may be involved in the pathogenesis of a variety of neurological disorders. In brains of Huntington-affected patients, pTDP-43 aggregates were shown to co-localize with mutant Huntingtin (mHtt) inclusions. Here, we show that expression of mHtt carrying 80–97 polyglutamines repeats in human cell cultures induces the aggregation and the phosphorylation of endogenous TDP-43, whereas non-pathological Htt with 25 polyglutamines repeats has no effect. Mutant Htt aggregation precedes accumulation of pTDP-43 and pTDP-43 co-localizes with mHtt inclusions reminding what it was previously described in brains of Huntington-affected patients. Detergent-insoluble fractions from cells expressing mHtt and containing mHtt–pTDP-43 co-aggregates can function as seeds for further TDP-43 aggregation in human cell culture. The human cellular prion protein PrP^C was previously identified as a negative modulator of mHtt aggregation; here, we show that PrP^C-mediated reduction of mHtt aggregation is tightly correlated with a decrease of TDP-43 aggregation and phosphorylation, thus confirming the close relationships between TDP-43 and mHtt.

Keywords TDP-43 · Huntingtin · Phosphorylation · Seeds · Prion · Huntington · ALS

Laurent Coudert and Takashi Nonaka contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03059-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pascal Leblanc
Pascal.Leblanc@univ-lyon1.fr

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 Dementia Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

³ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique Pierre-Wertheimer, Service de Neurologie C et Centre SLA de Lyon, Bron, France

⁴ Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux, Lyon, France

Introduction

Most of neurodegenerative diseases are characterized by the accumulation of specific characteristic protein aggregates. The amyloid peptide (A β) and Tau protein are mostly associated with Alzheimer diseases and tauopathies, α -Synuclein with synucleopathies like Parkinson disease or Lewy body dementia, the Tar DNA-Binding Protein 43 (TDP-43), the Super Oxide Dismutase-1 (SOD-1), the FUS and dipeptide repeats with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and/or Frontotemporal lobar degeneration (FTLD), the Huntingtin (Htt) in Huntington disease and the prion protein PrP^C in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) (reviewed in Refs. [1–12]).

TDP-43 and its phosphorylated isoform (pTDP-43) are the major pathological signatures of ubiquitin positive Tau-negative inclusions present in motor neurons and glial cells from patients suffering of ALS and ALS-FTLD (referred FTLD-TDP) [13–15]. Since these observations, many

Published online: 12 March 2019

Springer

studies have revealed that TDP-43 aggregates are not exclusively and specifically associated with the ALS/FTLD–TDP pathologies but can also be found in the brain of patients in several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease, tauopathies and synucleopathies [16–23] as well as in the elderly [22, 24].

Combinations of proteinopathies have been shown to be more prevalent than previously thought. This is especially true for Alzheimer and Lewy body diseases in which pure forms of the pathology (i.e., only β -amyloid or α -Synuclein aggregates deposition, respectively) represents a small proportion of the diagnosis [22]. Not surprisingly, increasing evidences indicate that neurodegenerative disorders occurring late in the life may initiate co-pathologies involving the different pathological prion-like/prionoids and aggregated proteins described above. During ageing the accumulation of mutations [25] and the decrease in the efficiency of clearance of obsolete or misfolded proteins [26] are the first suspects that can explain, at least in part, the co-aggregation of pathological misfolded proteins leading to co-pathologies that emerge in elderly. In addition to genetic factors, studies carried out in cell culture and in transgenic animal models also revealed the existence of mutual interactions between pathological proteins involved in neurodegeneration including cross-seeding of pathological aggregates and/or pathological changes of one protein initiating mislocalization and post-translational modifications of another [21, 26].

Huntington disease (HD) is a frequent autosomal dominant, progressive, and fatal neurodegenerative disorder characterized by motor, cognitive, and behavioral impairment. HD is characterized by severe brain atrophy and a fatal clinical course of 15–20 years after the symptoms that usually emerge between 35 and 45 years of age.

HD is caused by a CAG-repeat expansion in the first exon of the huntingtin *htt* gene resulting in an increased number of glutamine residues (polyQ repeats) within the amino terminal part of the Htt protein (reviewed in Refs. [27, 28]). The N-terminus polyQ stretch induces misfolding and aggregation of the protein. The pathogenic threshold of the polyQ expansion is up to 35 repetitions. Htt misfolding and aggregation increased with the number of glutamine residues [29, 30].

Most of mutations associated with the *htt* gene negatively affect its normal function due to aggregation. In addition, mutant Htt (mHtt) can form pathological protein–protein interactions responsible of neuronal leading to dysfunctions including defects in protein degradation, mitochondrial respiration, synaptic function, transcription or translation, vesicle and axonal transport, ultimately leading to neuronal death. Finally, upon proteolytic cleavage of the full-length mHtt protein, the polyQ-containing N-terminal fragments are prone to form intracellular aggregates that can be concentrated into inclusion bodies in both the cytoplasm and the nucleus (reviewed

in Refs. [28, 31]). Interestingly, during the past recent years, different studies revealed that mHtt displayed prion-like properties similar to what it was previously described for the β -amyloid peptide α -Synuclein, TDP-43, SOD1, FUS or the poly-GA dipeptide repeats and can be transmitted from cell to cell through extracellular vesicles (especially exosomes), tunneling nanotubes (TNTs) or through the release of free aggregates/oligomeric forms in the extracellular space thus explaining, at least in part, the progressive spreading of the neurodegeneration in HD brain patients (reviewed in Refs. [12, 32, 33]).

Interestingly, in 2008, Schwab et al. observed the presence of pTDP-43 positive aggregates in the brains of HD-affected patients that co-localized with mHtt inclusions [34]. Strikingly, another study also revealed the simultaneous co-existence of TDP-43-dependent and mHtt-dependent pathogenic processes in two cases but failed to identify co-localization of mHtt with pathological TDP-43 within the same inclusions [35]. Similarly, investigations carried out on late-stage of Huntington's disease confirmed the co-existence of mixed proteinopathies in HD and provided evidence of TDP-43 increased as well as phosphorylated Tau and α -Synuclein in later stages of HD, thus suggesting that ageing and/or neurodegeneration participates in HD mixed co-proteinopathies [36]. Last, TDP-43 was previously found to interact with mHtt [37].

In this study, we have focused our attention on the relationships between mHtt and TDP-43 and investigated whether mHtt expression could promote the aggregation of pathological phosphorylated TDP-43 in human cell culture models. Our findings indicate that mHtt with pathological 80–97 polyQ expansions induces the accumulation of pTDP-43 in human HEK293T and in human neuroblastoma SH-SY5Y cell lines, whereas non pathological Htt has no effect. Phosphorylated TDP-43 co-fractionates with mHtt and co-localizes with mHtt inclusion bodies as depicted in the brains of HD-affected patients. In addition, our data reveal that co-aggregates of polyQ-containing mHtt and pTDP-43 can function as seeds to induce intracellular TDP-43 aggregation. Finally, we showed that the cellular prion protein PrP^C expression can negatively modulate the aggregation of mHtt and pTDP-43. Altogether, our data provide a cellular basis to explain the presence of mHtt and pTDP-43 co-aggregates in the brain of HD patients [34] and open new insights in the biology of co-pathologies in neurodegenerative disorders.

Materials and methods

Constructs and vectors

DNA expression constructs corresponding to exon 1 of the human Htt gene with either 25 (normal) or 97 (mutant)

copies of the imperfect CAG-repeat encoding polyQ fused in-frame with GFP cloned into the lentivirus plasmid FUGW. The FUGW-GFP encodes the GFP and was used as negative control. All the FUGW lentiviral constructs were kindly provided by Dr. Xandra O. Breakefield [38]. The pEGFP-N2-Htt-80Q was provided by Dr. Anne Bertolotti.

The pGW1-GFP-Htt-25Q, -46Q and 72Q were kindly provided by Steve Finkbeiner and were previously described in Refs. [39, 40]. The pCR3-uniTM (Invitrogen) empty control vector (CT) or encoding the human PrP^C were previously described in Ref. [41]. The pEGFP-C1 constructs encoding the α -Synuclein WT (Plasmid #40822) and the mutant form A53T (Plasmid #40823) were a gift from David Rubinsztein and came from Addgene. The pEGFP-C1 was from Clontech. The pcDNA3-TDP-43 WT and Δ NLS were previously described in Refs. [42, 43]. The pSGTat was kindly provided by Pierre Jalinot. The pDsRed plasmid was from clontech. All the constructs described above were verified and confirmed by DNA sequencing.

Cell lines

The human embryonic kidney (HEK293T) cells were cultured in DMEM-glutamax supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and penicillin streptomycin (P/S). The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% of FBS and P/S and MEM-non-essential amino acid (MEM-NEAA). The murine neuroblastoma N2a#58 and scrapie infected N2a#22L were previously described in Ref. [44] and were cultured in OptiMEM supplemented with 10% FBS and P/S. All media came from Gibco-Thermo Fisher Scientific.

Antibodies

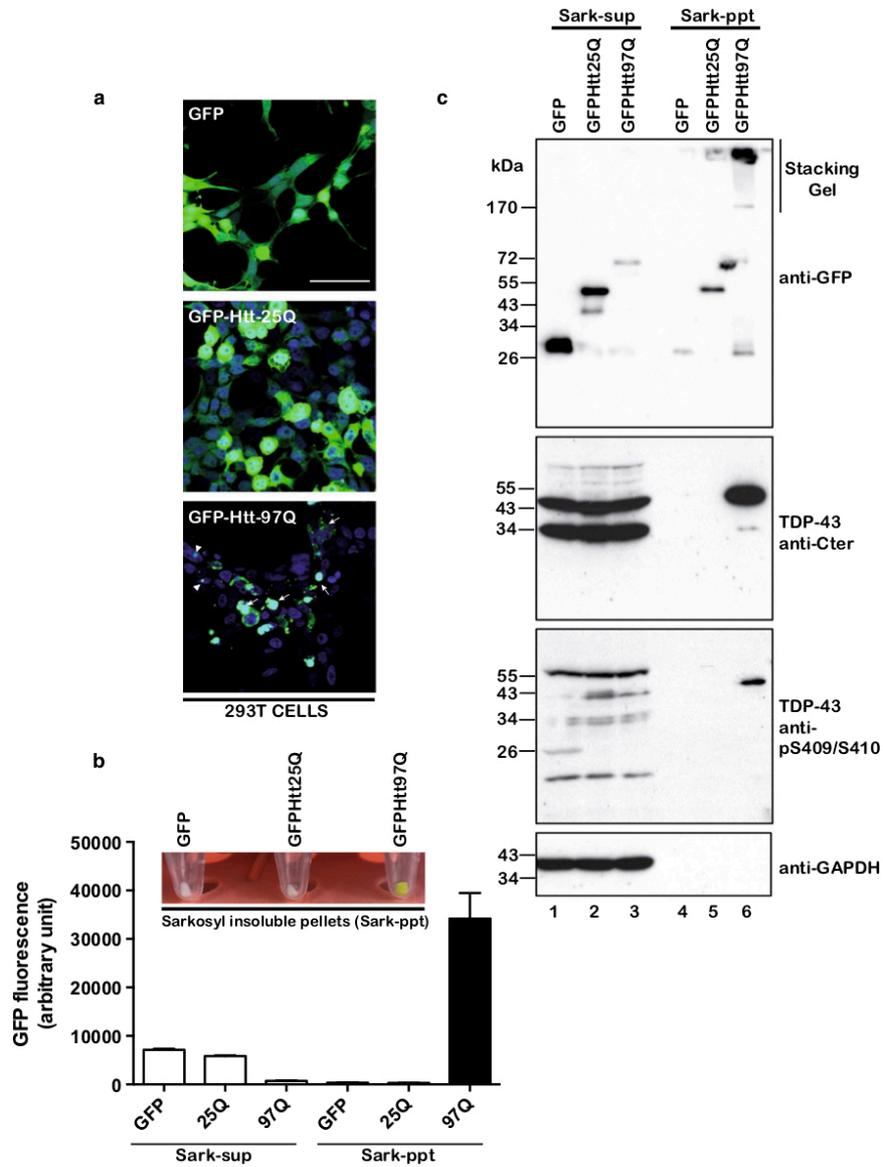
Polyclonal and monoclonal antibodies against a synthetic phospho-peptide of TDP-43 (anti-pS409/410) were previously described in Refs. [45, 46] and purchased from Cosmo Bio (anti-pS409/410, TIP-PTD-P01). The polyclonal antibody directed against the C-terminal part of TDP-43 (12891-1-AP) and the monoclonal anti-TDP43 (60019-2-Ig) were purchased from proteintech. The TIP-PTD-P01 and 12891-1-AP were used at 1:2000 for western blotting (WB) experiments. The TIP-PTD-P01 was used at 1:1000 in immunofluorescence. The monoclonal anti-PrP SAF32 and Sha31 were provided by Bertin Pharma and were used at 1:10,000 for WB. The rabbit anti-GFP (G1544) came from SIGMA and was used at 1:2000 in WB. The rabbit anti-GAPDH (14C10; #2118) came from Cell Signaling and was used at 1:15,000 for WB. The secondary antibodies anti-mouse (NA931V) and anti-rabbit (NA934V) labeled with peroxidase (GE Healthcare UK) were used at 1:10,000 in WB.

Transfection of expression plasmids

The HEK293T cells were transfected with the phosphate calcium method in 100 mm dishes ($3.5\text{--}4 \times 10^6$ cells plated 1 day before) with 10–20 μ g of DNA constructs or in 6 well plates (4×10^5 cells plated 1 day before) with 2.4 μ g of plasmids. The SH-SY5Y cells were grown to 50% confluence in 6-well culture dishes for transient expression and then transfected with expression plasmids (usually 1 μ g) using FuGENE6 (Promega) or XtreamGENE9 (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Fractionation of cellular proteins and immunoblotting

One to three days after transfection, cells were harvested and lysed in 600 μ L of HB homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.8 M NaCl, 1 mM ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N,N*-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM DTT) containing 1% *N*-laurylsarcosine sodium salt (Sarkosyl) and anti-protease (Complete, EDTA-free) and anti-phosphatase (PhosSTOP) from Roche. Cell lysates were briefly sonicated and resulting lysates (550 μ L) were then ultracentrifuged at 100,000g for 22 min at room temperature in a TLA-100.3 or TLA-110 rotors (optima max ultracentrifuge Beckman). In co-transfection experiments, protein concentration from sonicated lysates was determined and equal amount of protein was ultracentrifuged. The supernatant was recovered as Sarkosyl-soluble fraction (Sark-sup) and treated with 5 \times concentrated sample buffer (312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% 2-mercaptoethanol, 50% glycerol, 10% sodium dodecylsulfate (SDS), bromophenol blue) to obtain a final volume of 660 μ L. The pellet was washed in homogenization buffer and resuspended in 100 μ L of 1 \times sample buffer and sonicated for solubilization. The resulting samples were used as the Sarkosyl-insoluble fraction (Sark-ppt). Each sample (1–15 μ L) was separated by 12% SDS-PAGE, transferred on polyvinylidene difluoride membrane PVDF 0.45 μ m (Millipore) membranes and probed with the indicated antibodies overnight at 4 $^{\circ}$ C. The sample loading was controlled using the anti-GAPDH antibody. After three steps of washing with TBS-Tween buffer (Interchim), membranes were probed with secondary antibodies 1 h at room temperature. Membranes were then washed as depicted before and revelation was performed using the ECL-prime (GE Healthcare UK) detection kit and signals were detected using the chemidoc Gel imaging system (Biorad) or by autoradiography. Alternatively, the blots were also incubated with a biotin-labeled secondary antibody and signals were detected using an ABC staining kit (Vector) as depicted before in Ref. [42].



Proteinase K digestion

HEK293T cells ($3.5\text{--}4 \times 10^6$ cells plated 1 day before) were co-transfected with the PrP^C encoding plasmid (10 μg) with the pDsRed (10 μg) or pSGTat (10 μg) or alternatively

transfected with a double amount of PrP^C encoding plasmid (20 μg). Cells were recovered 48 h after transfection, rinsed in cold PBS and lysed in lysis buffer [150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)] for 20 min at 4 °C. Cell lysates were

◀ **Fig. 1** Mutant Huntingtin Htt97Q expression induces aggregation and phosphorylation of endogenous TDP-43 in HEK293T cells. **a** HEK293T cells were transfected with FUGW-GFP, GFP-Htt25Q or GFP-Htt97Q encoding constructs and were visualized by fluorescence using a spectral confocal microscope. Blue signal corresponds to DAPI staining and green signal to GFP. Scale bar is 50 μ m. **b** Sarkosyl-soluble supernatant (Sark-sup) and insoluble pelleted (Sark-ppt) fractions were isolated. Note the green color of the GFP-Htt97Q Sark-ppt fraction correlated with mutant Htt inclusions compared to GFP or GFP-Htt-25Q. Total GFP fluorescence associated with Sark-sup or sonicated Sark-ppt fraction was evaluated using a fluorescence reader plate. Note the strong GFP signal associated with mHtt97Q Sark-ppt fraction compared to GFP and Htt25Q controls. Oppositely, note the strong GFP signals in GFP and Htt25Q compared to mHtt97Q in Sark-sup fractions. **c** Sark-sup and Sark-ppt fractions, respectively, isolated from HEK293T cells expressing GFP (lanes 1 and 4), GFP-Htt25Q (lanes 2 and 5) or GFP-Htt97Q (lanes 3 and 6) were analyzed by Western blotting. Membranes were probed with antibodies directed against GFP, TDP-43 (Cter), phospho-TDP-43 S409S410 and GAPDH as loading control

centrifuged for 10 min at 1500g (4 °C) to remove nuclei. The amount of protein in the supernatant was then measured using the Bradford kit (Biorad). At this step, aliquot of each lysate was removed to determine by Western blotting the amount of total PrP in the samples. To detect the PK PrP resistant (PrP^{res}), 300 mg of protein was treated with proteinase K (ratios 5, 10 or 16 μ g of proteinase K per mg of protein) for 30 min at 37 °C. Treatment with proteinase K was stopped by addition of PMSF (final concentration 2 mM) during 5 min on ice. Samples were centrifuged at 20,000g for 45 min to pellet the PrP^{res}. The pellet was resuspended in sample buffer containing 3 M urea, and boiled for 5 min at 90 °C. Samples were loaded for SDS-PAGE 13% and transferred onto PVDF membranes. Membranes were probed with the Sha31 monoclonal antibody. As control of PrP^{res} detection, similar experiments were realized in parallel using the murine neuroblastoma N2a#58 and scrapie infected N2a#22L cells.

Immunofluorescence and confocal microscopy

SH-SY5Y cells were grown on coverslips and transfected as described above. After 3 days, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X100 in PBS during 5–10 min at room temperature and stained with the pS409/S410 phospho-TDP-43 primary antibody (1:1000) at 37 °C during 1 h. The cells were washed and further incubated with anti-rabbit IgG-conjugated Alexa-647 (1:1000), and then with Hoechst 33342 (Life Technologies) to counterstain nuclear DNA. The samples were analyzed using an LSM780 confocal laser microscope (Carl Zeiss).

The parameters to obtain images including the laser excitation power and the gain of the detector were as follows: 405 nm for Hoechst: excitation power = 2.0, gain = 650–720, offset = 0. 488 nm for GFP: excitation power = 0.3, gain = 541–630, offset = 0. 647 nm for anti-phosphorylated TDP-43 (pS409/410): excitation power = 2.2, gain = 780–890, offset = –48.

For HEK293T fluorescence microscopy, cells were cultured on glass coverslips. Cells were directly transfected on glass coverslips with the different constructs described above. 24–72 h after transfection, cells were directly fixed in 4% PFA for 15 min and nuclei were stained during 6 min with DAPI 10 μ M (diluted at 1:5000 in PBS). To avoid cell sloughing a rapid washing step was realized and coverslips were immediately mounted on glass slides and analyzed by spectral confocal imaging (Leica TCS-SP5X).

GFP fluorescence evaluation in Sark-sup and Sark-ppt fractions

Sarkosyl-insoluble pellets (Sark-ppt) were sonicated into 100 μ L of PBS. One to 10 μ L of sonicated Sark-ppt were serially diluted into 200 μ L of PBS in 96 well plate and fluorescence was measured using the microplate Victor X2 2030 multilabel reader (Perkin Elmer). For Sark-sup fractions, 10 μ L over 600 μ L of lysates were diluted into 200 μ L of PBS and fluorescence was evaluated as described above.

Introduction of protein aggregates as seeds into human cultured cells

SH-SY5Y cells transfected with plasmids encoding FUGW-GFP, GFP-Htt25Q or GFP-Htt97Q were incubated for 3 days, then harvested and sarkosyl-insoluble fractions (Sark-ppt) were prepared as previously described. For use as seeds, Sark-ppt fractions were resuspended into 200 μ L of PBS for washing and re-ultracentrifuge at 100,000g 20 min. The resulting pellets were resuspended in 100 μ L of PBS and briefly sonicated. The suspensions (5 μ g each) were mixed with 120 μ L of OptiMEM and 62.5 μ L of MultiFectam (Promega) and let 30 min at room temperature. SH-SY5Y cells transfected with pcDNA3-TDP-43-WT or Δ NLS 1 day before were challenged with the seeds–MultiFectam mixture for 5–6 h in CO₂ incubator. Under our conditions, the efficiency of introduction of Sark-ppt seeds was about 10–20%. The medium was then changed and cells were cultured for 2–3 days. The cells were recovered and were prepared for immunoblotting analyses as described above using the HB sarkosyl-lysis buffer. Sark-sup and Sark-ppt insoluble pellets were then analyzed by SDS-PAGE electrophoresis.

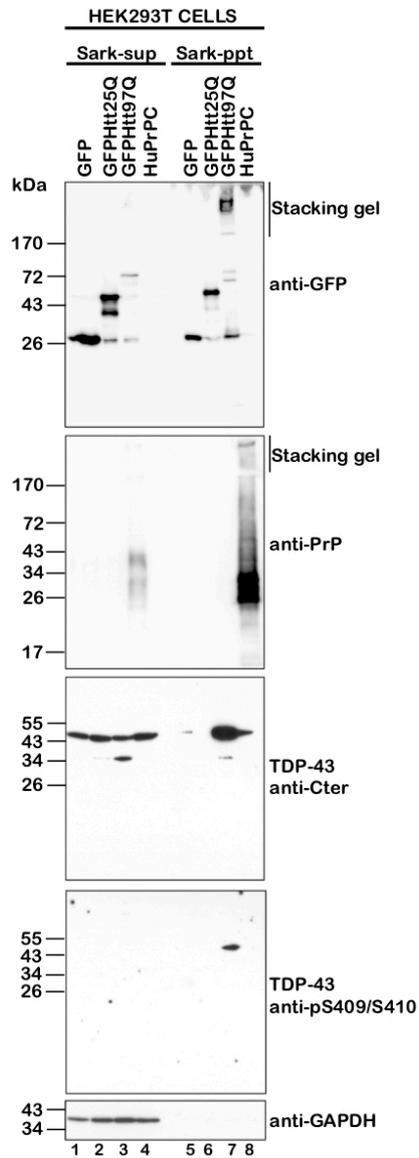


Fig. 2 PK-resistant prion protein PrP does not induce TDP-43 aggregation and phosphorylation. HEK293T cells were transfected with GFP, GFP-Htt25Q, GFP-Htt97Q or human PrP^C encoding constructs. Sark-sup and Sark-ppt fractions were isolated from transfected cells 48 h after transfection and were analyzed by immunoblotting using antibodies directed against GFP, PrP, TDP-43-Cter, phospho-TDP-43 S409/S410 or GAPDH as loading control

Results

Expression of mutant Htt (mHtt) induces the aggregation of endogenous and phosphorylated TDP-43 in HEK293T cells

To investigate whether mHtt polyQ proteins expression could influence the formation of intracellular phosphorylated TDP-43 aggregates, human embryonic kidney HEK293T cellular model expressing endogenous TDP-43 were transiently transfected with the FUGW lentivector DNA constructs encoding the green fluorescent protein (GFP), the Htt containing either 25 polyQ repetitions (Htt25Q, Htt control) or 97 polyQ residues (Htt97Q as Htt disease related or mutant Htt, i.e., mHtt), fused in-frame with the GFP [38]. Forty hours after transfection, GFP expression was evaluated by fluorescence microscopy (Fig. 1a). The data confirmed those previously depicted [38] with a cytoplasmic distribution for cells transfected with GFP and Htt25Q, while those transfected with Htt97Q revealed GFP positive inclusion bodies within the cytoplasm (see white arrows) and in the nucleus (see white arrowheads). To determine if the expression of the disease related GFP-mHtt97Q could induce the aggregation and phosphorylation of the endogenous TDP-43 expressed in HEK293T cells, GFP, GFP-Htt25Q (Htt25Q) and GFP-Htt97Q (mHtt97Q) transfected cells were harvested and lysed in HB buffer containing 1% sarkosyl (Sark). The cell lysates were ultracentrifuged and separated as supernatant-sarkosyl-soluble (Sark-sup) and pelleted-sarkosyl-insoluble (Sark-ppt) fractions. Strikingly, the Sark-ppt corresponding to mHtt97Q samples display an intense GFP-green coloration, whereas GFP and Htt25Q controls were not (Fig. 1b, upper panel). This was confirmed by directly measuring the GFP fluorescence signal in sonicated Sark-ppt and Sark-sup fractions (Fig. 1b, lower panel). Interestingly, while strong fluorescence signal was measured in mHtt97Q insoluble fraction, the fluorescence signal was barely detectable in Sark-sup fraction. Oppositely, strong GFP fluorescence was detected in the Sark-sup fractions from GFP and Htt25Q controls thus suggesting that Sark-ppt of mHtt97Q were mainly composed of mHtt97Q inclusion bodies visualized by fluorescence microscopy (Fig. 1b). Next, Sark-sup and Sark-ppt fractions of GFP, GFP-Htt25Q and GFP-Htt97Q transfected cells were subjected to immunoblotting analysis using the antibodies directed against GFP, TDP-43 Cter, phospho-S409/S410-TDP-43 and GAPDH as loading control. As shown in Fig. 1c, GFP and GFP fusions expression (upper panel) was confirmed for each condition and correlated with previously published data [38]. Interestingly, significant GFP signal corresponding to high molecular weight aggregates was observed in the stacking gel for the mHtt97Q condition thus confirming the strong

aggregation of mHtt97Q (compare lane 6 with lanes 4 and 5 in Fig. 1c). The C-terminal-TDP-43 antibody indicated that the full length and the 34–35 kDa-truncated forms of TDP-43 were similarly expressed in the different conditions of soluble fractions (compare lanes 1–3 in Sark-sup fractions in Fig. 1c). Conversely, a strong TDP-43 signal was specifically present in the insoluble fractions from mHtt97Q transfected cells but not from GFP and Htt25Q controls (compare lane 6 with 4 and 5 in Sark-ppt fractions), suggesting that mHtt97Q inclusion bodies affect TDP-43 trafficking and biochemical properties and favor its aggregation. We next investigated whether the TDP-43 aggregated in the presence of mHtt97Q could be phosphorylated. For this purpose, immunoblots, where probed with the antibody directed against the S409/S410 phosphorylated TDP-43. The data presented in Fig. 1c (lower panel) revealed the presence of pTDP-43 in insoluble fractions isolated from mHtt97Q cells, whereas no signal was observed in GFP and Htt25Q controls.

To determine if moderate mutant polyQ expansion can induce TDP-43 aggregation, constructs encoding mutant Htt with 46Q and -72Q expansions were expressed in HEK293T cells and compared to the Htt25Q negative control. Forty hours after transfection, GFP expression was evaluated by fluorescence confocal microscopy (see Supplementary Fig. 1). The data confirmed those previously depicted [39, 40] with a cytoplasmic distribution for cells transfected with Htt25Q, while those transfected with mHtt-46Q, and -72Q showed the presence of important GFP positive inclusion bodies (see Supplementary Fig. 1a) in the cytoplasm (see white arrows) and in the nucleus (see white arrowheads). Soluble and insoluble-sarkosyl fractions were isolated as depicted before and were analyzed by Western blotting using the anti-GFP, the anti-C-terminus TDP-43 or the anti-GAPDH for loading control. The data presented in Supplementary Fig. 1b show that mHtt-46Q like mHtt-72Q form high molecular weights GFP aggregates (see top panel) and strongly induces the aggregation of endogenous TDP-43 as judged by the accumulation of TDP-43 signals in Sark-ppt fractions compared to the Htt25Q control (compare lanes 5 and 6 with lane 4 in the medium panel). Thus, this set of experiment indicates that mHtt expression with moderate 46 polyQ expansion, favors the aggregation of endogenous TDP-43 in HEK293T cells.

Proteinase K (PK)-resistant prion protein PrP-PrP^{res} does not affect TDP-43

During the course of our study, we previously observed that strong overexpression in HEK293T cells of the cellular prion protein (PrP^C) by DNA transfection or alternatively by co-expressing the PrP^C encoding construct with the HIV-1 Tat transcriptional transactivator encoding plasmid, lead to a strong accumulation of a proteinase (PK) resistant isoform

of human PrP^C (see Supplementary Fig. 2a, b) reminding the pathological and infectious PrP^{Sc} (Sc for Scrapie) well depicted in infected murine neuroblastoma N2a#22L cells (see Supplementary Fig. 2c) [44].

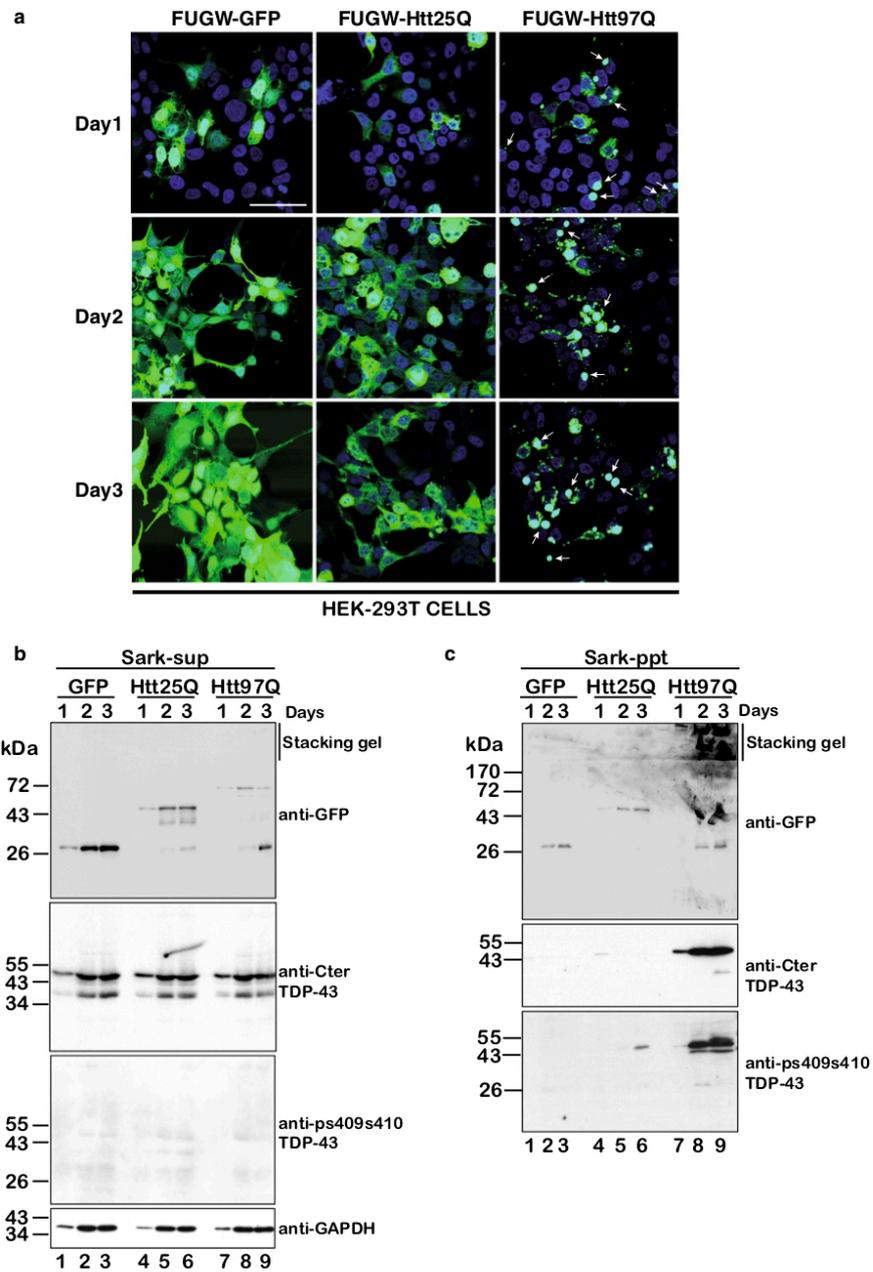
In this context, we investigated whether human PK-resistant PrP formation and aggregation in HEK293T cells could affect TDP-43 aggregation and phosphorylation. For this purpose, strong overexpression of human PrP^C was carried out by transfection of HEK293T cells using a PrP^C encoding construct. As positive and negative controls, cells were transfected with plasmids encoding GFP, GFP-Htt25Q and GFP-mHtt97Q. Cells were harvested 48 h later and subjected to lysis in presence of 1% Sarkosyl. Soluble and insoluble fractions were analyzed by immunoblotting using the antibodies depicted above and the anti-PrP. The data presented in Fig. 2 revealed a strong signal of PrP into the Sark-ppt fraction thus confirming the strong aggregation of PrP in overexpressing HEK293T cells (see lane 8). Except in the presence of mHtt97Q (see lane 7), no aggregation of TDP-43 nor of pTDP43 could be detected in the Sark-ppt fractions in the other conditions (see lanes 5, 6 and 8).

Similarly, overexpression of the GFP-WT-Synuclein or the mutant GFP-Synuclein-A53T fusion proteins in HEK293T cells (see Supplementary Fig. 3a) failed to induce the aggregation and the phosphorylation of endogenous TDP-43 (see Supplementary Fig. 3b).

This set of data confirms that mHtt specifically induces the accumulation and the aggregation of phosphorylated TDP-43 and that overexpression of proteins like PrP or a-Synuclein prone for misfolding and aggregation is not sufficient to induce TDP-43 aggregation and phosphorylation.

Mutant Htt97Q aggregation precedes phosphorylation of TDP-43

To determine if TDP-43 aggregation is stimulated by mHtt97Q inclusions, time course experiments were performed. For this purpose, HEK293T cells were transiently transfected with FUGW-GFP, GFP-Htt25Q and GFP-mHtt97Q. GFP expression was evaluated by fluorescence confocal microscopy (see Fig. 3a and Supplementary Fig. 4a) at days 1, 2 or 3. At each time, cells were harvested and soluble and insoluble fractions were isolated and analyzed by immunoblotting using anti-GFP, anti-Cter-TDP43, anti-S409S410 phospho-TDP-43 or the anti-GAPDH as loading control (see Fig. 3b, c). As depicted in Fig. 1b, Sark-ppt fractions containing mHtt97Q at days 1, 2 and 3 displayed a GFP-green color of increasing intensity correlated with the inclusion bodies visualized in fluorescence microscopy (see Supplementary Fig. 4b). Analysis of Sark-ppt fractions with the anti-GFP antibody confirmed the presence of strong aggregation of mHtt97Q as judged by the strong high molecular weights GFP signals in the stacking gel (Fig. 3c,



◀ **Fig. 3** Time course of co-aggregation of Htt97Q and phosphorylated TDP-43. **a** HEK293T cells were transfected with GFP, GFP-Htt25Q or GFP-Htt97Q encoding constructs and were visualized by fluorescence using a spectral confocal microscope at days 1, 2 and 3 after transfection. White arrows indicate Htt97Q inclusion bodies. Blue signal corresponds to DAPI staining and green signal to GFP. Scale bar is 50 μ m. At each time, cells were harvested and Sark-sup and insoluble Sark-ppt fractions were isolated by ultracentrifugation. Sark-sup (**b**) and Sark-ppt (**c**) fractions at days 1, 2 and 3 from GFP (lanes 1–3), Htt25Q (lanes 4–6) and Htt97Q (lanes 7–9) expressing cells were analyzed by immunoblotting using antibodies directed against GFP, TDP-43-Cter and phospho-TDP-43 S409S410 or GAPDH as loading control

upper panel). Interestingly, probing the blot with the anti-Cter-TDP-43 revealed that aggregation of TDP-43 started at day 1 and progressively increased at days 2 and 3 (see Fig. 3c, compare lanes 1–3 and 4–6 with the respective lanes 7–9 medium panel). However, whereas mHtt97Q inclusions were already strongly visible at day 1 by fluorescence microscopy (see Fig. 3a), phospho-TDP-43 was only faintly detected (lane 7 bottom panel). These results indicate that mHtt97Q inclusion formation are tightly linked to TDP-43 aggregation and suggest that TDP-43 aggregation precedes its phosphorylation at serine positions 409/S410.

mHtt97Q induces accumulation and phosphorylation of endogenous TDP-43 in human neuroblastoma SH-SY5Y cellular model

To confirm our data in a neuronal model, the impact of FUGW-GFP, -Htt25Q and Htt97Q on endogenous TDP-43 was investigated and carried out in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Cells were transiently transfected with the different constructs cited above and were harvested 48 or 72 h post-transfection. The GFP expression and the cellular distribution of GFP, Htt25Q and Htt97Q were evaluated by fluorescence microscopy. The data confirmed those obtained in the HEK293T cells (Fig. 4a). The data presented in Fig. 4b confirmed the presence of mHtt97Q in insoluble fractions (see Fig. 4b, upper panel lanes 11 and 12 in the resolving and stacking gel parts), associated with the aggregation of total and S409S410-phospho-TDP-43 (compare lanes 11 and 12 with lanes 7 and 8 and 9 and 10 medium and bottom panels and see the associated statistics in the graph of panel c). Thus, as in HEK293T cells, expression of mHtt97Q induces the aggregation of pTDP-43 in human neuroblastoma cells.

Phosphorylated TDP-43 co-localizes with mutant Huntingtin inclusions

Mutant aggregated Htt partially co-localizes with phosphorylated TDP-43 into the brain of HD-affected patients, suggesting that mHtt aggregates could trap the TDP-43 [34].

Interestingly, Fuentealba et al. revealed that trapping of TDP-43 was potentially mediated through the interaction of Htt with the C-terminus Q/N region of TDP-43 [37]. In this context, we sought to determine whether S409S410-phosphorylated TDP-43 aggregates co-localized with mHtt97Q inclusions in the human Neuroblastoma cellular model. For this purpose, SH-SY5Y cells transfected with GFP, Htt25Q or mHtt97Q were analyzed by confocal immunofluorescence microscopy using the anti-Phospho-S409S410-TDP-43. The data presented in Fig. 5 revealed that 15.64% \pm 1.59 (mean \pm standard deviation) of mHtt positive inclusions co-localized with pTDP-43 (see white arrowheads) and that all pTDP-43 aggregates were mHtt positive (see Fig. 5, left and right panels). On the opposite, no pTDP-43 aggregates were observed in GFP or Htt25Q expressing control cells thus indicating that mHtt97Q inclusions specifically induced the co-aggregation of pTDP-43. Of importance, as negative controls, the strong GFP emission signal generated by GFP-mHtt97Q does not overlap with Alexa-647 emission (see Fig. 5, right panel and Supplementary Fig. 5) in presence or absence of secondary antibody thus confirming that co-localization between mHtt97Q inclusions and pS409S410-TDP-43-alexa-647 aggregates is specific and not due to overlapping signals. Thus these data are consistent with the observations made on HD brains [34].

Prion-like seeding activity of insoluble mHtt-pTDP-43 co-aggregates

Phosphorylated and aggregated TDP-43 were recently shown to display prion-like seeding properties able to induce the aggregation and consequently the phosphorylation of normal TDP-43 [47, 48]. In this context, we decided to determine whether mHtt97Q-pTDP-43 co-aggregates displayed such seeding properties. For this purpose, insoluble Sark-ppt fractions were prepared from SH-SY5Y cells expressing the GFP, the GFP-Htt25Q or the GFP-Htt97Q. Each fraction was used as seed inoculum and was introduced in presence of MultiFectam reagent into SH-SY5Y cells expressing either wild-type TDP-43 (WT) or the TDP-43 Δ NLS mutant (see Ref. [47]; see Fig. 6a). The cytosolic TDP-43 Δ NLS mutant isoform was chosen because of its increased susceptibility to aggregation (compare lanes 7–9). The data presented in Fig. 6b indicate that GFP-Htt-pTDP43 co-aggregates induced the aggregation and the phosphorylation of the mutant TDP-43 Δ NLS, whereas GFP and GFP-Htt25Q had no effect (see the strong signal of pTDP-43 in lane 10 compared with that of lanes 7–9 in the right panel). Surprisingly, TDP-43 phosphorylation could not be detected in the sarkosyl-insoluble fractions isolated from SH-SY5Y cells expressing the WT-TDP-43 (compare lane 10 from right panel with lane 10 from left panel). This suggests that

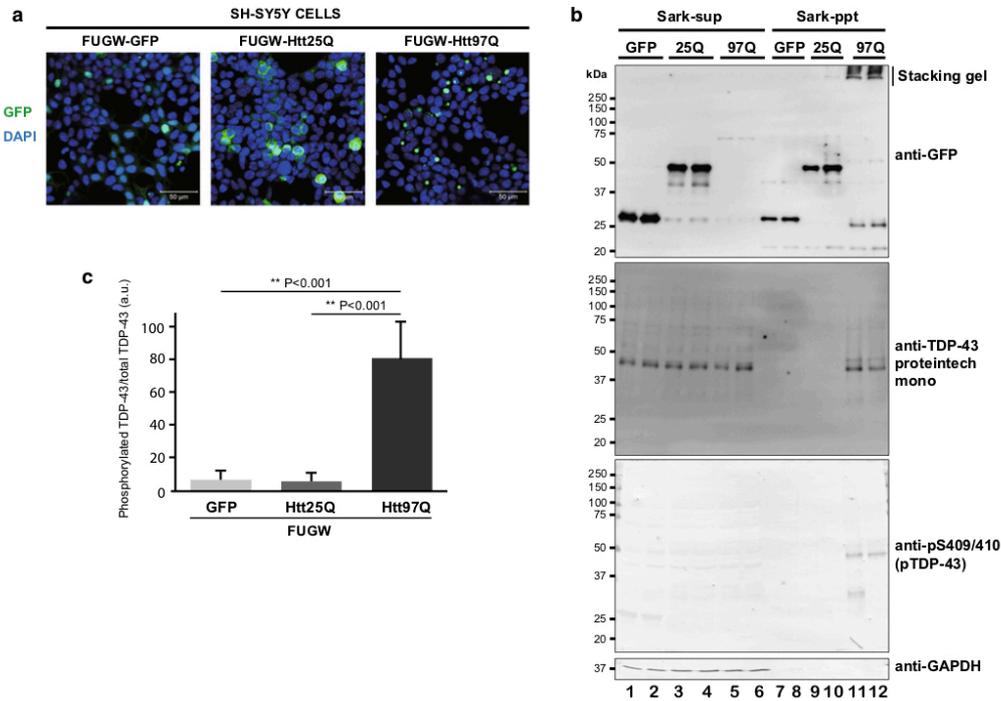


Fig. 4 Mutant Htt97Q expression induces aggregation and phosphorylation of endogenous TDP-43 in human Neuroblastoma SH-SY5Y cells. **a** Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were transfected in duplicate with plasmids encoding GFP, GFP-Htt25Q or GFP-Htt97Q and were analyzed by fluorescence using a confocal microscope. Blue signal corresponds to DAPI staining and green signal to GFP. Scale bar is 50 μ m. **b** Sark-sup and Sark-ppt fractions, respectively, from cells expressing GFP (lanes 1, 2 and 7, 8), GFP-Htt25Q (lanes 3, 4

and 9, 10) and GFP-Htt97Q (lanes 5, 6 and 11, 12) were analyzed by immunoblotting using antibodies directed against GFP, TDP-43 and phospho-TDP-43 S409S410 or GAPDH as loading control. **c** Quantification of phosphorylated TDP-43 formation in SH-SY5Y cells expressing GFP, GFP-Htt25Q, and GFP-Htt97Q. The data are presented as a ratio of phosphorylated TDP-43 over total TDP-43. Values are given as mean \pm SEM with a $P < 0.001$ ($n = 6$, one-way ANOVA)

aggregation seeding by mHtt97Q-pTDP-43 co-aggregates preferentially occurs in cells expressing a mislocalized cytosolic form of TDP-43 (see Discussion). Of note, the absence of pTDP-43 aggregates in the sarkosyl-insoluble fraction from SH-SY5Y cells expressing wild-type TDP-43 confirms that the positive signal observed in lane 10 (right panel) is not due to residual inoculum detection but is induced by mHtt97Q expression and linked with the seeding activity associated with the mHtt97Q-pTDP-43 co-aggregates.

Altogether, our data reveal that mHtt expression and aggregation induces the co-aggregation of pTDP-43 and that mHtt-pTDP-43 co-aggregates display TDP-43 prion-like seeding properties.

The human cellular prion protein PrP^C expression negatively affects mHtt and phosphorylated TDP-43 aggregation

Normal cellular prion protein PrP^C can protect neuronal cells from the deleterious effects of Huntingtin aggregation. Depletion of PrP^C increases the formation of the mHtt103Q Huntingtin aggregates and as a consequence decreases cell viability, whereas PrP^C overexpression as the opposite effects [49].

In this context, we tested whether by inhibiting mHtt aggregation PrP^C could modulate the aggregation and/or the phosphorylation of TDP-43. For this purpose, HEK293T cells were co-transfected with the GFP-mHtt97Q encoding

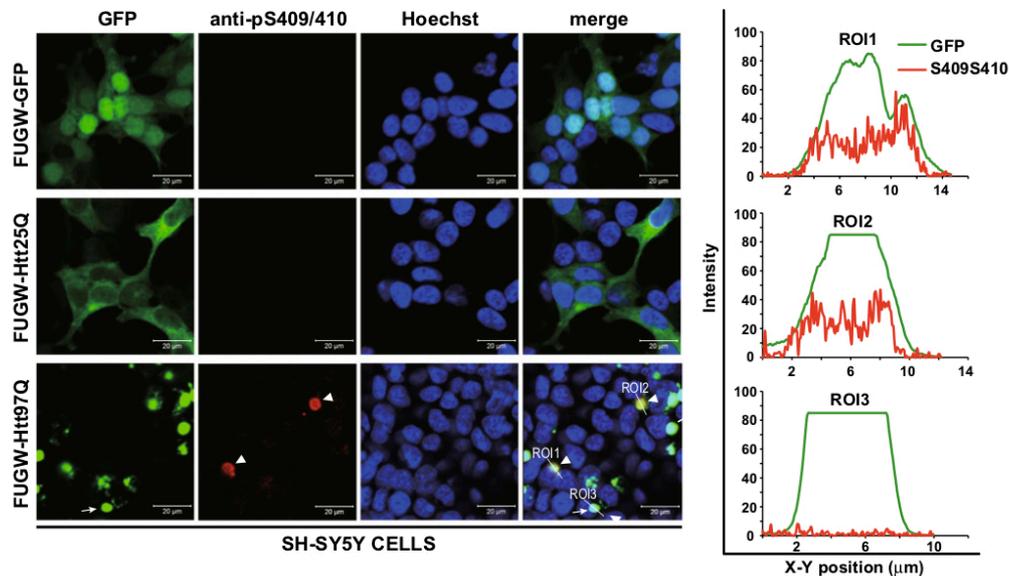


Fig. 5 Phosphorylated TDP-43 aggregates co-localize with mutant Htt97Q inclusions in SH-SY5Y cells. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells transfected with GFP, GFP-Htt25Q or GFP-Htt97Q constructs were analyzed by immunofluorescence confocal microscopy 3 days after transfection. Cells were immunostained with anti-phospho-TDP-43 S409S410 and counterstained with Hoechst for nuclei. Scale bars are 20 μm . White arrowheads indicate co-localization of mutant Htt97Q and phosphorylated TDP-43. Region of interest (ROI;

white lines) 1-3 are depicted in the merge panel. The plot profiles of GFP-mHtt97Q and phosphorylated TDP-43 (Alexa647 labeling) co-localizations (ROI1 and 2) along the ROI lines were constructed and analyzed using Image J software (see right panel). Note that mHtt97Q and pTDP-43 are well co-localized. As negative control, ROI3 shows a mHtt97Q aggregate that does not co-localize with the phosphorylated TDP-43 thus confirming that the strong signal released by GFP-mHtt97Q does not overlap with that of alexa-647 secondary antibody

plasmid and the constructs encoding PrP^C or the empty vector (CT) or the LacZ- β -Galactosidase (β -Gal) encoding constructs as negative. Cells were recovered 48 h after transfection and analyzed first by fluorescence microscopy. The data indicated that PrP^C expression decreases by 40–50% the number of GFP-mHtt aggregates compared to the CT or β -Gal controls (see Fig. 7a and Supplementary Fig. 6a). Interestingly, in these contexts, we also observed that the average size of GFP-mHTT aggregates was significantly reduced upon PrP^C expression compared to the negative controls (see Fig. 7b and Supplementary Fig. 6b). These data indicate that PrP^C expression negatively modulates the aggregation of mHtt97Q, whereas CT or β -Gal has no significant effect.

We next investigated if the aggregation and the phosphorylation of TDP-43 were also affected. Soluble and insoluble fractions were isolated from cells overexpressing PrP^C and analyzed by western blotting. No modulation of total TDP-43 in the Sark-sup fraction was visualized,

suggesting that overexpression of PrP^C or β -Gal have no effect on total TDP-43 levels (see Fig. 8a). The reduction of GFP-mHtt97Q aggregates in the presence of PrP^C was easily confirmed by directly visualizing the green signal in the Sarkosyl-insoluble pellets (see Fig. 8b; compare the PrP^C pellet with the control). Decrease of GFP-mHtt97Q signal was also confirmed in Sark-ppt fractions by western blot (see Fig. 8a and compare lane 3 with lane 4 upper panel and see Supplementary Fig. 7 showing the absence of effect when the β -Gal control was expressed). Interestingly, a reduction of 45–55% of total TDP-43 was observed in insoluble fractions upon PrP^C expression (compare lane 3 with lane 4 in Sark-ppt fraction, Fig. 8a, second panel). Thus, PrP^C affects the aggregation of TDP-43. Consistently, analyses of Sark-ppt fractions using the anti-phospho-TDP-43-S409S410 revealed a 40–60% decrease of phosphorylated TDP-43 upon PrP^C expression (see Fig. 8a, third panel and associated graph in Fig. 8c), whereas β -Gal expression had no effect (see Supplementary Fig. 7).

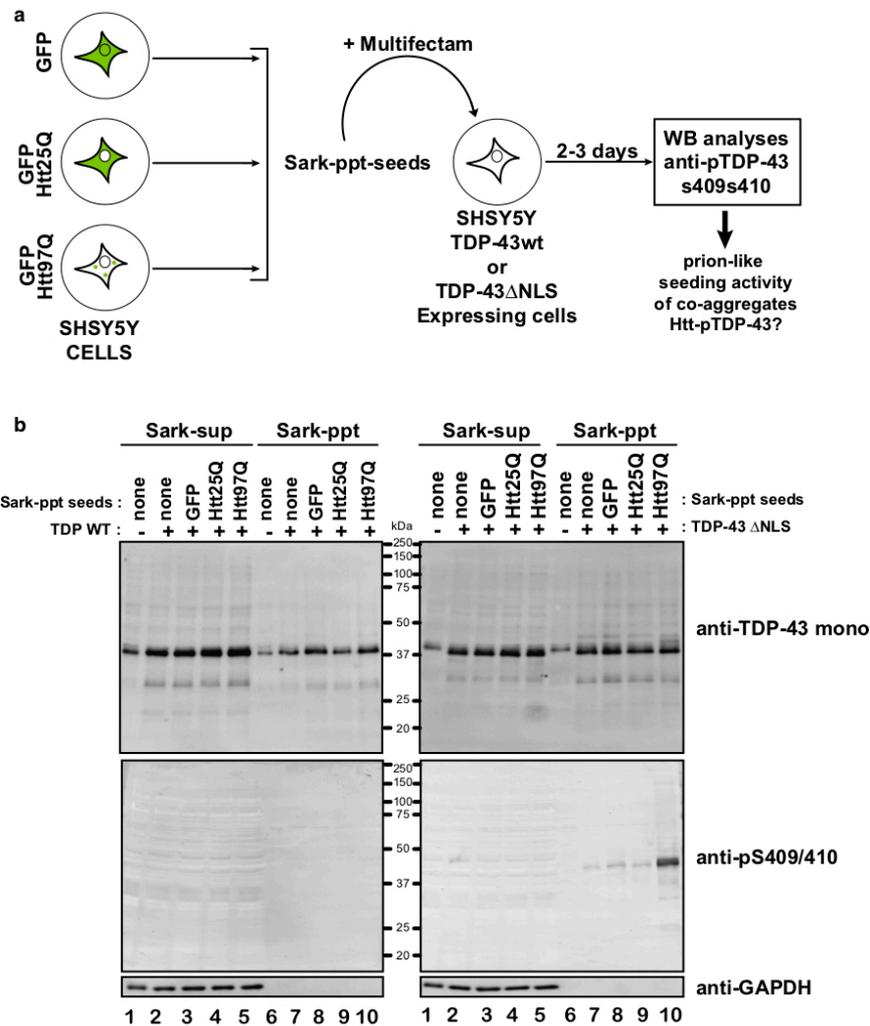


Fig. 6 Insoluble co-aggregates of Htt97Q and phosphorylated TDP-43 function as seeds for intracellular TDP-43 aggregation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **a** Summary of the experiments to test whether Sark-insoluble fraction of cells expressing GFP-Htt polyQ functions as seeds for intracellular aggregation of TDP-43. **b** Immunoblotting of the respective Sark-sup and Sark-ppt fractions from SH-SY5Y cells expressing TDP-43 wild-type (WT, left panel) or Δ NLS (right panel) and challenged with Sark-ppt seeds isolated

from GFP (lanes 3 and 8), GFP-Htt25Q (lanes 4 and 9) or GFP-Htt97Q (lanes 5 and 10) producer cells, were analyzed using antibodies directed against TDP-43 or phospho-TDP-43 S409S410. Sark-sup and Sark-ppt fractions from SH-SY5Y cells expressing TDP-43-WT or Δ NLS not challenged with Sark-ppt seeds were loaded as internal controls. Loading control was assessed using the anti-GAPDH antibody

Discussion

TDP-43 is the major component associated with ubiquitin positive/Tau-negative inclusions found in ALS and ALS-FTLD. However, different studies also revealed that pathological phosphorylated TDP-43 can also be associated with other neurodegenerative diseases including Pick's disease, Alzheimer's disease, corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, Lewy body-related diseases, spinocerebellar ataxia type 2 and 3 (reviewed in Ref. [50]). Co-aggregation of mutant Huntingtin with phosphorylated TDP-43 was observed in brains of HD patients and some patients developing both HD and sporadic ALS were reported [34, 35]. Here we investigated possible relationships between mHtt and TDP-43 at the cellular level and sought to determine whether mHtt affects TDP-43 expression, aggregation and phosphorylation in human cells. We found that expression of pathological mHtt efficiently enhances the aggregation and phosphorylation of endogenous TDP-43, whereas normal Htt has no effect. To avoid cell specific effects, the impact of mHtt on TDP-43 was evaluated in two different cellular models (i.e., HEK293T and SH-SY5Y cell lines). Previous work indicated that TDP-43 aggregation occurs before its phosphorylation [51]. Our findings are consistent with this result and suggest that TDP-43 aggregation induced by mHtt may precede the phosphorylation step.

We observed that 15–16% of total mHtt inclusions co-localize with phosphorylated S409S410-TDP-43 aggregates but that pTDP-43 aggregates always co-localize with mHtt. This suggests that mHtt aggregates can physically interact with TDP-43 and induce its aggregation. This hypothesis is in a total agreement with the data from Fuentealba and collaborators who observed that polyQ and mHtt efficiently binds the Glutamine/Asparagine (Q/N)-rich region in the C-terminal domain of TDP-43 causing its sequestration into polyQ associated aggregates [37]. They also observed that polyQ-expressing constructs can also sequester TDP-43 in the cytosol thus indicating that the polyQ expansion itself is a strong candidate responsible of the co-aggregation process. On the opposite their study also revealed that co-aggregation of TDP-43 with mHtt needs the aggregation of mHtt beforehand. When mHtt is not yet aggregated, no co-aggregation with TDP-43 is visualized. Because phosphorylation of TDP-43 is expected to occur after the aggregation of TDP-43, this can explain, at least in part, why only 15–16% of phosphorylated TDP-43 co-localized with mHtt aggregates in our cellular models. Interestingly, co-aggregation of TDP-43 was also identified in cells expressing other proteins with polyQ expansions. Indeed, in Spino cerebellar ataxia 2 (SCA2), the expansion of polyQ in the mutated Ataxin 2 protein induces an ALS-like phenotype with the

aggregation and the phosphorylation of TDP-43 [52–55]. However, although the polyQ expansion size modulate the interaction of Ataxin 2 with TDP-43 and that intermediate length of polyQ expansions was recently identified as a genetic risk factor for ALS [56]. During the course of our study, we found that intermediate polyQ expansion (mHtt with 46Q) induces the aggregation of TDP-43 like mHtt with 72Q, 80Q or 97Q expansions thus suggesting that once the polyQ expansion size reaches the pathological threshold, aggregation of TDP-43 is induced.

Recent studies revealed that CAG-repeat expansions can produce RNA hairpin-like structures in a similar way to what was described for the GGGGCC hexanucleotide expansion observed in the mutant c9orf72 RNA in familial ALS affected patients (reviewed in Refs. [6, 57]). CAG hairpin-like structures could accumulate as RNA foci and potentially sequester RNA binding proteins. Since mHtt also associates with its own RNA [58], one hypothesis could suggest that such protein–RNA complexes could potentially participate to the co-aggregation of other RNA binding proteins like TDP-43. Once initiated, phosphorylation of aggregated TDP-43 could consequently be initiated.

In 2013, TDP-43 aggregates were shown to display prion-like seeding properties with the capacity to induce the aggregation and the phosphorylation of TDP-43 in human cell culture models challenged with brain inoculum from ALS and ALS-FTLD-affected patients [47]. Here we have found that mHtt expression induces the aggregation and the phosphorylation of endogenous TDP-43 and that mHtt–pTDP-43 co-aggregates display TDP-43 seeding properties. Indeed, using Sarkosyl insoluble pellets isolated from mHtt–TDP-43 co-expressing cells we succeeded to induce the aggregation of phosphorylated TDP-43 in cells expressing TDP-43 Δ NLS but not TDP-43 WT. Absence of aggregation in TDP-43 WT expressing cells is questioning, but can possibly be explained by the fact that seeding activity is detected in a short time window (only 3 days of challenge/incubation) and that TDP-43 Δ NLS was previously depicted to be more prone to aggregation compared to WT–TDP-43. Similar data were also observed when TDP-43 seeds associated with Sark-ppt fractions isolated from cells expressing the truncated Casein kinase-1 δ (CK1 δ^{1-317}) [59] or the poly-GA dipeptide repeat [60] were used as inoculum. This indicates, as depicted for the α -Synuclein in the transgenic mouse model TgM81 (A53T), TDP-43 Δ NLS favors the detection of newly formed TDP-43 strains in a short incubation time window. This result is in agreement with the recently published data of [61].

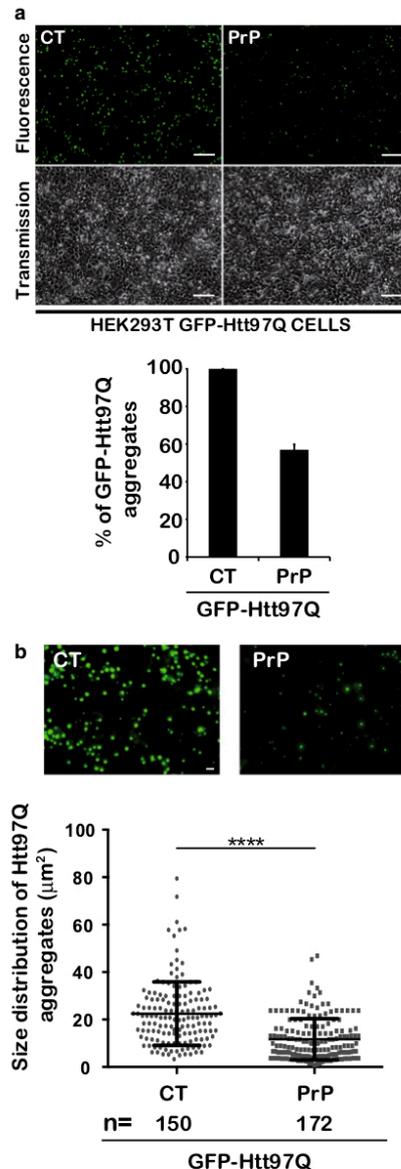
The exact molecular mechanisms by which mHtt induces the aggregation of TDP-43 are not understood as well as how and which factors present in the co-aggregates are responsible of the seeding and aggregation of the TDP-43 in inoculated target cells. We can not exclude that in addition to

Fig. 7 PrP^C expression negatively affects aggregation of GFP-mHtt97Q and phosphorylated TDP-43. **a** HEK293T cells were co-transfected with the GFP-mHtt97Q encoding constructs and the human PrP^C encoding plasmid or the empty vector (CT) as negative control. Fluorescence microscopy was carried out 48 h after transfection. Number of GFP-mHtt97Q aggregates was quantified using the Image J software. Note the decrease of GFP-mHtt97Q aggregates when PrP^C is expressed. The graph on bottom panel illustrates the GFP-mHtt97Q aggregates decrease upon PrP^C expression. The data shown are from 3 independent experiments. Values are given as mean \pm standard deviation (SD). **b** Size of aggregates was determined by measuring the surface of punctuated GFP-mHtt97Q inclusions using the Image J software. The graph on the bottom panel illustrates the size distribution of GFP-mHtt97Q inclusions from $n=150$ and 172 aggregates from CT and PrP^C conditions, respectively. Values are given as mean \pm SEM with a $P < 0.0001$. CT corresponds to 22.50 ± 1.093 and PrP^C to 11.67 ± 0.6649 . Statistic and P value calculation were done using an unpaired t test. Scale bars are 100 μm (upper panels) and 20 μm (bottom panels)

mHtt or aggregated TDP-43, other associated factors could participate in the aggregation of endogenous TDP-43 in challenged target cells. Alternatively, it would be possible that aggregated mHtt may work as scaffolds for intracellular TDP-43 aggregation rather than seeds. Many in vitro experiments using highly purified mHtt and TDP-43 could perhaps help to characterize at least in part the seeding mechanism involved.

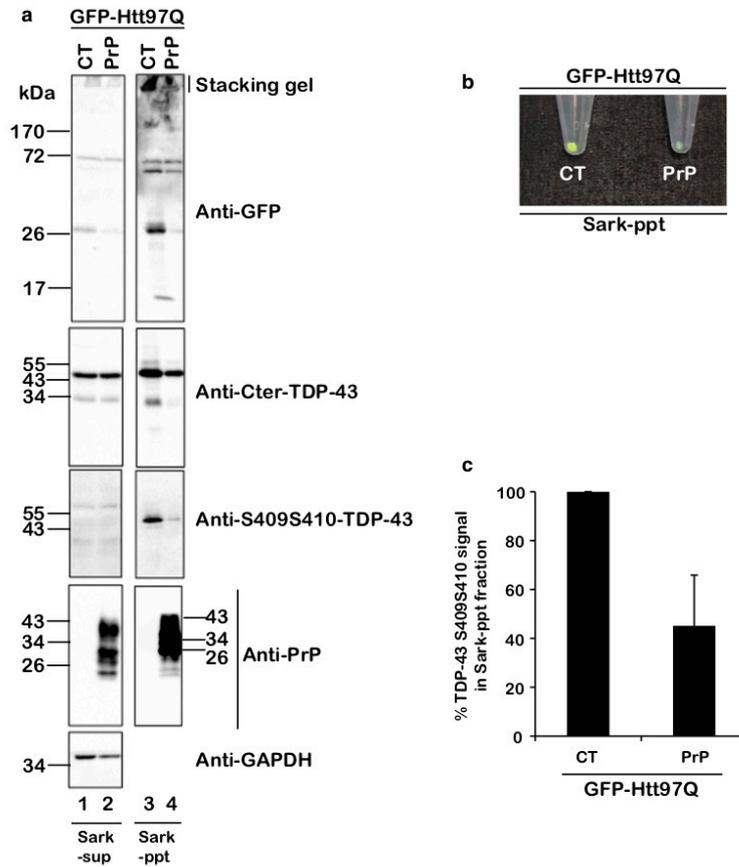
The cellular prion protein PrP^C prevents Huntingtin aggregation in neurons [49]. Consistently, our results show that the number and size of mHtt aggregates is significantly decreased when PrP^C is overexpressed. We further observed that PrP^C expression also strongly reduced the formation of pTDP-43 aggregates.

These data correlate well with the fact that expression of others prionoids like α -Synuclein, TDP-43 or FUS can negatively modulate the aggregation and the toxicity of mHtt [37, 62–65]. However, these data are also questioning, since, on the opposite, different studies also revealed that aggregated proteins with cross-seeding activity can potentially trigger the misfolding of a “sleeping” prion-like protein. This was precisely observed in a recent study, where α -Synuclein aggregates with seeding properties induced the misfolding of the prion protein PrP^C into a PK-resistant PrP^{res} isoform with in vitro and in vivo self-replicating properties [66]. These results confirmed that aggregates of heterologous proteins could provide an imperfect template on which a new prion can be seeded [67]. In this context, the Q, N or Q/N rich domains from two different proteins might form polar zippers enabling heterologous protein aggregates to seed. However, alternatively, we cannot exclude that heterologous prions or prion-like aggregates could capture and titrate a cellular factor that could modulate the conversion process itself. Interestingly, α -Synuclein was also found to accumulate and co-localize with mHtt inclusions. In this context, α -Synuclein and mHtt form independent homomeric



filaments in inclusions thus arguing against mixed cross-seeding and rather fitting with the suggested mHtt-induced progressive disruption of cellular protein misfolding, leading to homomeric aggregation of misfolding-prone proteins and

Fig. 8 PrP negatively affect TDP-43 phosphorylation and aggregation. **a** HEK293T cells co-transfected with the GFP-mHtt97Q encoding construct and with PrP^C, encoding plasmid or the empty control vector (CT) were recovered and Sark-sup and Sark-ppt fractions were isolated and analyzed by Western blotting using the anti-GFP, the anti-Cter-TDP-43, the Anti-phospho-TDP43S409S410 or the anti-PrP or the anti-GAPDH for expression and loading controls. **b** Sark-ppt pellets after ultracentrifugation. Note the decrease of GFP-green signal in PrP condition. **c** Graph illustrates the decrease of phospho-TDP-43S409S410 in the Sark-ppt fraction upon PrP^C expression. The data shown are from four independent experiments. Values are given as mean \pm standard deviation (SD)



subsequent coalescence of independent homomeric micro-aggregates into the same inclusions [68].

Interestingly, our immunofluorescence data revealed that pTDP-43 is always co-localized with mHtt. These data suggest that aggregation of pTDP-43 observed in our seeding experiments could be due to a co-aggregation process and not to mHtt that could titrate a cellular factor essential for TDP-43 aggregation.

Dewey and collaborators as well as Derkatch et al. suggested a model by which prion-like aggregates triggering the misfolding and the aggregation of an heterologous prionoid could afterwards dissociate and favor the conversion of homologous molecules than to cross convert [67, 69]. This model could explain, at least in part, why perfect colocalizations between heterologous prion-like aggregates like mHtt and pTDP-43 are not always well visualized in immunohistochemistry investigations.

In conclusion from this study, we found for the first time that expression of pathological mHtt enhances the aggregation of pTDP-43 and that pTDP-43 aggregates co-localize with mHtt as it was previously visualized in the brain of Huntington-affected patients. In addition pTDP-43-mHtt co-aggregates can function as seeds for further TDP-43 aggregation in a human cell culture.

More generally, our study strongly supports the idea that a pathological protein with prion-like properties involved in a neuroproteinopathy can in turn efficiently wake up the dark side of a "sleeping" prion-like protein and may potentially explains co-pathology phenotypes that emerge in different neurodegenerative disorder contexts.

Acknowledgements This work was supported by the CNRS and the INSERM (PL), and Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Brain Protein Aging and Dementia Control) (JP26117005)

from MEXT (to M.H.), a Grant-in-Aid for Scientific Research on Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies (Brain/MINDS) (JP14533254) from AMED (to M.H.), JST CREST Grant number JP18071300, Japan, and a Grant from Brain Science Foundation (to T.N.). PL received the support of the Association pour la recherche sur la SLA (ARSLA), the NeuroDis Foundation and the AFM (AFM-MyoNeuralp). LC received for his PhD an ARC2 "Qualité de vie et Vieillessement" Grant from the région Auvergne Rhône-Alpes. We thank Didier Vilette (ENVT-Toulouse) for carefully reading the manuscript and helpful discussions. We acknowledge the LYMIC-PLATIM and the CIQLE microscope platforms at ENS Lyon (SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud UMS3444/US8, France) and at the Faculté de médecine Rockefeller (Lyon Est, France) respectively.

Author contributions TN, LC and PL conducted the experiments. All the authors interpreted the data and corrected the paper. PL wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards

Ethical standards Experiments described in this manuscript comply with the current laws of the country.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4):301–307. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>
2. Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M (2010) The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 33(7):317–325. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.04.003>
3. Goedert M, Falcon B, Clavaguera F, Tolnay M (2014) Prion-like mechanisms in the pathogenesis of tauopathies and synucleinopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14(11):495. <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0495-z>
4. Grad LI, Fernando SM, Cashman NR (2015) From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 77:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.009>
5. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501(7465):45–51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>
6. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79(3):416–438. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.033>
7. Mackenzie IR, Frick P, Neumann M (2014) The neuropathology associated with repeat expansions in the C9ORF72 gene. *Acta Neuropathol* 127(3):347–357. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1232-4>
8. Nonaka T, Hasegawa M (2018) TDP-43 prions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(3):a024463. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024463>
9. Prusiner SB (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* 47:601–623. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155524>
10. Renner M, Melki R (2014) Protein aggregation and prionopathies. *Pathol Biol (Paris)* 62(3):162–168. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.003>
11. Sibilla C, Bertolotti A (2017) Prion properties of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis and potential therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9(10):a024141. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024141>
12. Vilette D, Courte J, Peyrin JM, Coudert L, Schaeffer L, Andreoletti O, Leblanc P (2018) Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2823-y>
13. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351(3):602–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.093>
14. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314(5796):130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
15. Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2008) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 116(2):169–182. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0385-z>
16. Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, Personett D, Davies P, Duara R, Graff-Radford NR, Hutton ML, Dickson DW (2007) TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 61(5):435–445. <https://doi.org/10.1002/ana.21154>
17. Geser F, Winton MJ, Kwong LK, Xu Y, Xie SX, Igaz LM, Garruto RM, Perl DP, Galasko D, Lee VM, Trojanowski JQ (2008) Pathological TDP-43 in parkinsonism–dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Acta Neuropathol* 115(1):133–145. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0257-y>
18. Hasegawa M, Arai T, Akiyama H, Nonaka T, Mori H, Hashimoto T, Yamazaki M, Oyanagi K (2007) TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism–dementia complex brains. *Brain* 130(Pt 5):1386–1394. <https://doi.org/10.1093/brain/awm065>
19. Higashi S, Iseki E, Yamamoto R, Minegishi M, Hino H, Fujisawa K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Kosaka K, Arai H (2007) Concurrence of TDP-43, tau and alpha-synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 1184:284–294. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.048>
20. Nakashima-Yasuda H, Uryu K, Robinson J, Xie SX, Hurtig H, Duda JE, Arnold SE, Siderowf A, Grossman M, Leverenz JB, Woltjer R, Lopez OL, Hamilton R, Tsuang DW, Galasko D, Masliah E, Kaye J, Clark CM, Montine TJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Co-morbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta Neuropathol* 114(3):221–229. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0261-2>
21. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M (2018) Molecular mechanisms of the co-deposition of multiple pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 38(1):64–71. <https://doi.org/10.1111/neup.12427>
22. Robinson JL, Lee EB, Xie SX, Rennett L, Suh E, Bredenberg C, Caswell C, Van Deerlin VM, Yan N, Yousef A, Hurtig HI, Siderowf A, Grossman M, McMillan CT, Miller B, Duda JE, Irwin DJ, Wolk D, Elman L, McCluskey L, Chen-Plotkin A, Weintraub D, Arnold SE, Brettschneider J, Lee VM, Trojanowski

- JQ (2018) Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain* 141(7):2181–2193. <https://doi.org/10.1093/brain/awy146>
23. Uryu K, Nakashima-Yasuda H, Forman MS, Kwong LK, Clark CM, Grossman M, Miller BL, Kretschmar HA, Lee VM, Trojanowski JQ, Neumann M (2008) Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(6):555–564. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31817713b5>
 24. Robinson JL, Corrada MM, Kovacs GG, Dominique M, Caswell C, Xie SX, Lee VM, Kawas CH, Trojanowski JQ (2018) Non-Alzheimer's contributions to dementia and cognitive resilience in the 90 + study. *Acta Neuropathol*. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1872-5>
 25. Lodato MA, Rodin RE, Bohrsen CL, Coulter ME, Barton AR, Kwon M, Sherman MA, Vitzthum CM, Luquette LJ, Yandava CN, Yang P, Chittenden TW, Hatem NE, Ryu SC, Woodworth MB, Park PJ, Walsh CA (2018) Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science* 359(6375):555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aao4426>
 26. Kaushik S, Cuervo AM (2015) Proteostasis and aging. *Nat Med* 21(12):1406–1415. <https://doi.org/10.1038/nm.4001>
 27. Huang WJ, Chen WW, Zhang X (2016) Huntington's disease: molecular basis of pathology and status of current therapeutic approaches. *Exp Ther Med* 12(4):1951–1956. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3566>
 28. McColgan P, Tabrizi SJ (2018) Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol* 25(1):24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
 29. Gusella JF, MacDonald ME (2000) Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 1(2):109–115. <https://doi.org/10.1038/nrd1077>
 30. Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Heiser V, Lurz R, Hasenbank R, Bates GP, Lehrach H, Wanker EE (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8):4604–4609
 31. Rub U, Seidel K, Heinsen H, Vonsattel JP, den Dunnen WF, Korf HW (2016) Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathol* 26(6):726–740. <https://doi.org/10.1111/bpa.12426>
 32. Costanzo M, Zurzolo C (2013) The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 452(1):1–17. <https://doi.org/10.1042/BJ20121898>
 33. Masnata M, Cicchetti F (2017) The evidence for the spread and seeding capacities of the mutant huntingtin protein in in vitro systems and their therapeutic implications. *Front Neurosci* 11:647. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00647>
 34. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL (2008) Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(12):1159–1165. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818e8951>
 35. Tada M, Coon EA, Osmund AP, Kirby PA, Martin W, Wieler M, Shiga A, Shirasaki H, Makifuchi T, Yamada M, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Paulson HL (2012) Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 124(5):749–760. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1005-5>
 36. St-Amour I, Turgeon A, Goupil C, Planel E, Hebert SS (2018) Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 135(2):249–265. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1786-7>
 37. Fuentealba RA, Udan M, Bell S, Węgorzewska I, Shao J, Diamond MI, Weihl CC, Baloh RH (2010) Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. *J Biol Chem* 285(34):26304–26314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.125039>
 38. Zhang X, Abels ER, Redzic JS, Margulis J, Finkbeiner S, Breakefield XO (2016) Potential transfer of polyglutamine and CAG-repeat RNA in extracellular vesicles in Huntington's disease: background and evaluation in cell culture. *Cell Mol Neurobiol* 36(3):459–470. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0350-7>
 39. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431(7010):805–810. <https://doi.org/10.1038/nature02998>
 40. Miller J, Arrasate M, Shaby BA, Mitra S, Masliah E, Finkbeiner S (2010) Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into Huntington's disease molecular pathogenesis. *J Neurosci* 30(31):10541–10550. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0146-10.2010>
 41. Alais S, Soto-Rifo R, Balter V, Gruffat H, Manet E, Schaeffer L, Darlix JL, Cimarelli A, Raposo G, Ohlmann T, Leblanc P (2012) Functional mechanisms of the cellular prion protein (PrP(C)) associated anti-HIV-1 properties. *Cell Mol Life Sci* 69(8):1331–1352. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0879-z>
 42. Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583(2):394–400. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.031>
 43. Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18(18):3353–3364. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp275>
 44. Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G, Darlix JL, Leblanc P (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100(10):603–615. <https://doi.org/10.1042/BC20080025>
 45. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64(1):60–70. <https://doi.org/10.1002/ana.21425>
 46. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M (2008) Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D-U and ALS. *FEBS Lett* 582(19):2899–2904. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.07.027>
 47. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M (2013) Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4(1):124–134. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.007>
 48. Smethurst P, Newcombe J, Troakes C, Simone R, Chen YR, Patani R, Sidle K (2016) In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol Dis* 96:236–247. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.007>
 49. Lee KJ, Panzera A, Rogawski D, Greene LE, Eisenberg E (2007) Cellular prion protein (PrP^C) protects neuronal cells from the effect of huntingtin aggregation. *J Cell Sci* 120(Pt 15):2663–2671. <https://doi.org/10.1242/jcs.004598>
 50. Toyoshima Y, Takahashi H (2014) TDP-43 pathology in polyglutamine diseases: with reference to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 34(1):77–82. <https://doi.org/10.1111/neup.12053>
 51. Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga S, Hasegawa M (2016) Templated aggregation of TAR DNA-binding protein

- of 43 kDa (TDP-43) by seeding with TDP-43 peptide fibrils. *J Biol Chem* 291(17):8896–8907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.713552>
52. Becker LA, Huang B, Bieri G, Ma R, Knowles DA, Jafar-Nejad P, Messing J, Kim HJ, Soriano A, Auburger G, Pulst SM, Taylor JP, Rigo F, Gitler AD (2017) Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature* 544(7650):367–371. <https://doi.org/10.1038/nature22038>
 53. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rub U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Deerlin VM, Bonini NM, Gitler AD (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466(7310):1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature09320>
 54. Hart MP, Gitler AD (2012) ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci* 32(27):9133–9142. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0996-12.2012>
 55. Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Takahashi H (2011) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 122(3):375–378. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0862-7>
 56. Bonini NM, Gitler AD (2011) Model organisms reveal insight into human neurodegenerative disease: ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are a risk factor for ALS. *J Mol Neurosci* 45(3):676–683. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9548-9>
 57. Marti E (2016) RNA toxicity induced by expanded CAG repeats in Huntington's disease. *Brain Pathol* 26(6):779–786. <https://doi.org/10.1111/bpa.12427>
 58. Culver BP, DeClercq J, Dolgalev I, Yu MS, Ma B, Heguy A, Tanese N (2016) Huntington's disease protein huntingtin associates with its own mRNA. *J Huntingtons Dis* 5(1):39–51. <https://doi.org/10.3233/JHD-150177>
 59. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M (2016) Phosphorylation of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) by truncated casein kinase 1delta triggers mislocalization and accumulation of TDP-43. *J Biol Chem* 291(11):5473–5483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695379>
 60. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Shimozawa A, Hirai S, Okado H, Hasegawa M (2018) C9ORF72 dipeptide repeat poly-GA inclusions promote intracellular aggregation of phosphorylated TDP-43. *Hum Mol Genet*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy174>
 61. Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, Lee EB, Trojanowski JQ, Lee VM (2018) Patient-derived fronto-temporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun* 9(1):4220. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06548-9>
 62. Herrera F, Outeiro TF (2012) alpha-Synuclein modifies huntingtin aggregation in living cells. *FEBS Lett* 586(1):7–12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.019>
 63. Kayatekin C, Matlack KE, Hesse WR, Guan Y, Chakrabortee S, Russ J, Wanker EE, Shah JV, Lindquist S (2014) Prion-like proteins sequester and suppress the toxicity of huntingtin exon 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12085–12090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412504111>
 64. Pocas GM, Branco-Santos J, Herrera F, Outeiro TF, Domingos PM (2015) alpha-Synuclein modifies mutant huntingtin aggregation and neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 24(7):1898–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu606>
 65. Tauffenberger A, Chitramuthu BP, Bateman A, Bennett HP, Parker JA (2013) Reduction of polyglutamine toxicity by TDP-43, FUS and progranulin in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 22(4):782–794. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds485>
 66. Katorcha E, Makarava N, Lee YJ, Lindberg I, Monteiro MJ, Kovacs GG, Baskakov IV (2017) Cross-seeding of prions by aggregated alpha-synuclein leads to transmissible spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog* 13(8):e1006563. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006563>
 67. Derkatch IL, Uptain SM, Outeiro TF, Krishnan R, Lindquist SL, Liebman SW (2004) Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo formation of the [PSI⁺] prion in yeast and aggregation of Sup35 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(35):12934–12939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404968101>
 68. Tomas-Zapico C, Diez-Zaera M, Ferrer I, Gomez-Ramos P, Moran MA, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ (2012) alpha-Synuclein accumulates in huntingtin inclusions but forms independent filaments and its deficiency attenuates early phenotype in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 21(3):495–510. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr507>
 69. Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, Yu G (2012) TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res* 1462:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.032>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ANNEXE 1

Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions

Didier Vilette, Josquin Courte ; Jean Michel Peyrin, Laurent Coudert, Laurent Schaeffer, Olivier Andréoletti, Pascal Leblanc.



Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions

Didier Vilette¹ · Josquin Courte^{2,4} · Jean Michel Peyrin² · Laurent Coudert³ · Laurent Schaeffer³ · Olivier Andréoletti¹ · Pascal Leblanc³

Received: 17 January 2018 / Revised: 4 April 2018 / Accepted: 23 April 2018
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

Prions are infectious agents that cause fatal neurodegenerative diseases. Current evidence indicates that they are essentially composed of an abnormally folded protein (PrP^{Sc}). These abnormal aggregated PrP^{Sc} species multiply in infected cells by recruiting and converting the host PrP^C protein into new PrP^{Sc}. How prions move from cell to cell and progressively spread across the infected tissue is of crucial importance and may provide experimental opportunity to delay the progression of the disease. In infected cells, different mechanisms have been identified, including release of infectious extracellular vesicles and intercellular transfer of PrP^{Sc}-containing organelles through tunneling nanotubes. These findings should allow manipulation of the intracellular trafficking events targeting PrP^{Sc} in these particular subcellular compartments to experimentally address the relative contribution of these mechanisms to *in vivo* prion pathogenesis. In addition, such information may prompt further experimental strategies to decipher the causal roles of protein misfolding and aggregation in other human neurodegenerative diseases.

Keywords Prion diseases · Protein aggregation · Extracellular vesicles · Exosomes · Multivesicular bodies

Abbreviations

BMDCs Bone-marrow-derived dendritic cells
ESCRT Endosomal sorting complex required for transport
EVs Extracellular vesicles
FDC Follicular dendritic cells
MVBs Multivesicular bodies
PMCA Protein misfolding cyclic amplification

TNTs Tunneling nanotubes
TSEs Transmissible spongiform encephalopathies
PrP^C Normal form of the PrP protein in uninfected tissues or cells
PrP^{Sc} Misfolded form of PrP found in infected cells and tissues

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative diseases affecting humans and animals [1–3]. These include scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, chronic wasting disease (CWD) in cervids, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans. TSEs are characterized by the conformational conversion of the normally soluble, protease-sensitive membrane-associated cellular prion protein (PrP^C) into an abnormally folded, detergent-insoluble, and generally partially protease-resistant isoform called PrP^{Sc} [4]. Aggregates of PrP^{Sc} accumulate specifically in infected tissues, *i.e.*, in the central nervous system (CNS) and in the lymphoid tissues. Neuropathology is strictly confined to restricted regions of the CNS. It includes vacuolar spongiosis (hence the name of the disease), neuronal cell

- ✉ Didier Vilette
d.vilette@envt.fr
- ✉ Jean Michel Peyrin
jean-michel.peyrin@upmc.fr
- ✉ Pascal Leblanc
pascal.leblanc@univ-lyon1.fr

¹ UMR1225, INRA, ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 Chemin des Capelles, Toulouse, France

² Neurosciences Paris Seine, UMR8246, Inserm U1130, IBPS, UPMC, Sorbonne Universités, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

³ Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

⁴ Laboratoire Physico Chimie Curie, UMR168, UPMC, IPGG, Sorbonne Universités, 6 Rue Jean Calvin, 75005 Paris, France

death, and extensive gliosis. A distinctive feature that sets apart TSEs from other neurodegenerative diseases caused by protein aggregation is that prion diseases are infectious. Diseased tissues accumulate considerable levels of infectivity which can be evidenced experimentally through biological titration [5]. Typically, intracerebral inoculation of infected brain tissue diluted 10^6 -fold or even more transmits the disease to 100% of inoculated animals from the same species. Transmission of infection can also be observed in humans in natural conditions as exemplified by the Kuru epidemic in the Fore people of Papua New Guinea [6, 7] and by the transmission of bovine BSE prions [8] to human resulting in variant CJD [9]. In animals, scrapie [10] and CWD [11] are notoriously contagious in sheep and cervids, respectively. Infectivity is tightly linked to the PrP^{Sc} protein [12]. Introduction of PrP^{Sc} into an uninfected host initiates the conformational conversion of the PrP^C into new PrP^{Sc} that will recruit further PrP^C and progressively build up, eventually leading to neuron dysfunction followed by neuronal death. Prion propagation (i.e., the self-templating, seeding-based conversion process, and the progressive accumulation of PrP^{Sc}) can also occur in permissive cultured cell lines and in primary neurons [13]. Since permissive cultured cells inoculated with brain-derived prions accumulate dose-dependent amounts of PrP^{Sc}, robust and rapid cell-based assays have been designed for titration of some prion strains [14, 15]. Finally, prion propagation can also be recapitulated in test tubes through a procedure named protein misfolding cyclic amplification (PMCA) [16]. In this technique, brain or cell extracts containing the PrP^C protein and inoculated with minutes amounts of exogenous PrP^{Sc} are incubated to allow for PrP^C conversion and growth of PrP^{Sc} polymers. The samples are then sonicated to break down the newly formed polymers, thus multiplying the number of seeding units. Serial incubation and sonication steps allow indefinite amplification of PrP^{Sc} and its associated infectivity. Efficient multiplication in a cell-free environment, along with the findings that infectious prions can be obtained from recombinant PrP protein produced in bacteria [17, 18], provides definitive evidence that prion diseases are not due to the conventional infectious agents like viruses [19]. However, one of the most challenging features in the field is the existence of different prion strains. These strains are distinguished by the characteristics of the disease which they trigger in genetically identical animals (e.g., in inbred mice) [20]. They target and damage distinct brain areas, have different incubation periods, and may produce different clinical signs [21]. These characteristics are stable on serial mouse passages provided constant passaging conditions. The strain phenomenon has long been interpreted as evidence for a hidden nucleic acid as the informational molecule specifying the strain [22, 23]. It is now widely accepted that the main differences among strains are enciphered in different conformations of PrP^{Sc}

that are stably and faithfully propagated during infection of animals, cells [24, 25], or in vitro propagation by PMCA [26]. Indeed, the PrP^{Sc} accumulating upon inoculation with different strains can show distinct biochemical features, the best characterized being the molecular weight after protease digestion [27], the glycosylation pattern [28], the extent of resistance to denaturation [29], and the sedimentation profile in velocity gradients [30]. The diversity of PrP^{Sc} entities may thus be the molecular basis of prion strains, although the direct causal relationship between structure and biological properties is still missing evidence.

Prion spreading from the periphery to the brain and within tissues

In natural infections, infectious prions generally enter the host gastrointestinal tract through oral exposure to contaminated food or environment. Most of prion agents are subsequently detected in the periphery long before they reach the central nervous system where they induce the pathology [2, 31]. After oral exposition, infectivity and/or PrP^{Sc} are detected in gut-associated lymphoid tissues such as Peyer's patches (PPs) and lymph nodes [32]. In infected lymphoid tissues, PrP^{Sc} multiplies in follicular dendritic cells (FDCs) located in the germinal centers which are crucially required for subsequent neuroinvasion [33–35]. FDCs are immobile, non-phagocytic cells, so the question is how they are early infected by orally acquired prions and how they transmit them to lymphoid sympathetic innervation for neuroinvasion.

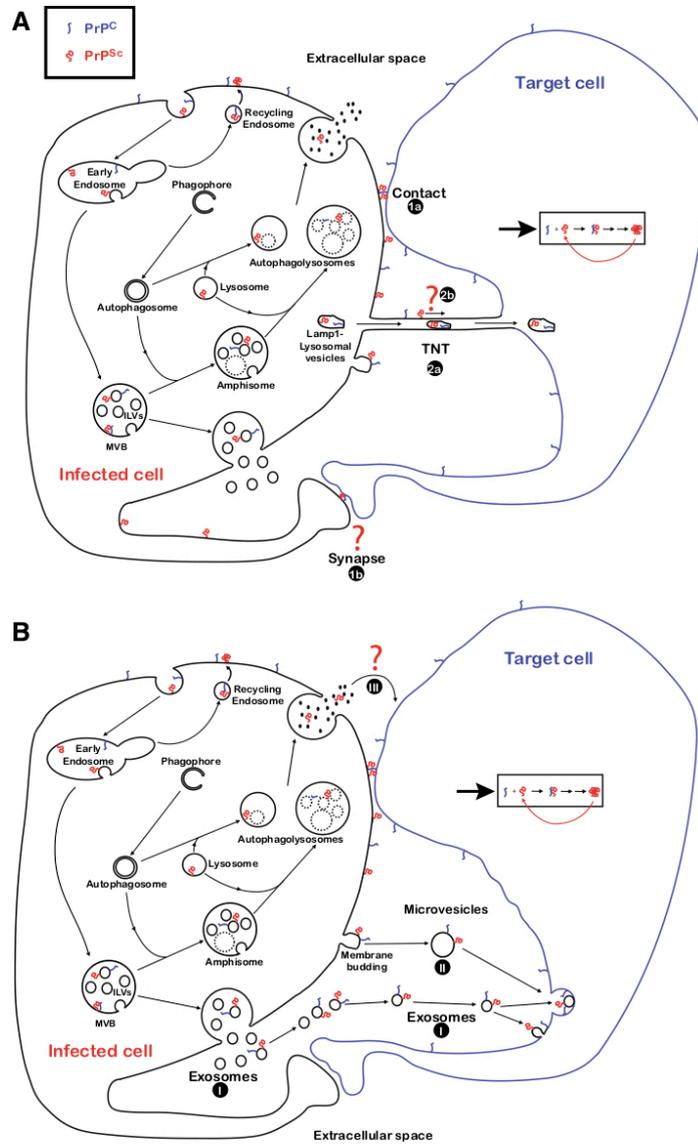
Prions surviving the digestive track passage have to cross the intestinal epithelium. Follicle-associated epithelium (FAE) covers the luminal surface of PPs and contains M cells, a highly phagocytic epithelial cell specialized in transcytosis of pathogens from the lumen [36, 37]. PrP^{Sc} is detected in M cells in vivo [38, 39] and an in vitro study showed that M-like cells actively transcytose prions [40]. The crucial role of M cells to establish infection upon oral challenge was further established in animals [41, 42]. Other studies reported the detection of PrP^{Sc} in enterocytes [43, 44], suggesting that PrP^{Sc} may cross the intestinal epithelium through different pathways. However, the causal role of M-independent transcytosis in the establishment of infection has not been established. Migratory hematopoietic dendritic cells (DCs) sample antigens in tissues and transport them to lymphoid tissues including PPs and mesenteric lymph nodes. Cell-based assays of immuno-purified DCs from infected mice revealed that DCs sequester high levels of infectivity very early postinoculation [45]. Transient depletion of CD11c⁺ at the time of oral exposition blocked accumulation of prions in FDCs of the gut-associated lymphoid tissues and markedly delayed the course of neuroinvasion [46].

demonstrating that DCs play a crucial role to transfer prions from the gut to the lymphoid organs. How prions are then transported from FDC to sympathetic nerves innervating the lymphoid organs? Since no physical contact is observed between FDCs and nerve endings [47], it is not known if prions can be delivered directly by FDCs (e.g., by passive diffusion of cell-free prion particles such as extracellular vesicles [48, 49]) or if additional mobile cells, such as macrophages, must acquire prions from FDCs for transport to the nerves. An initial study suggested that DCs could deliver prions to the peripheral nervous system in *RAG1*^{-/-} mice devoid of FDCs [50]. A later study did not find evidence for such a transfer in FDC-deficient *TNFR1*^{-/-} mice [51]. These contrasting results might be due to higher spleen innervation in *RAG1*^{-/-} compared to wild-type or *TNFR1*^{-/-} mice and to the possibility that contaminating B cells in the DCs populations might have transiently restored FDCs networks in *RAG1*^{-/-} mice. The fact that the relative positioning of FDCs and nerve endings controls the efficiency of peripheral infection [52] is consistent with a transfer mediated by mobile cell carriers and/or cell-free prion particles. Also, macrophages which exhibit long distant migration capacities and brain invasion properties, remains attractive candidates potentially involved in convey *PrP*^{Sc} to distant areas. Expression of *PrP*^C is not required for uptake and transport of *PrP*^{Sc} by mobile cells [39, 43, 53]. In contrast, active prion multiplication both in peripheral sites (e.g., in lymphoid tissues [33] and in peripheral nerves [54]) and in brain [55] is dependent on *PrP*^C. This very brief overview of orally acquired prions' cell pathogenesis illustrates that establishment of natural prion infections in a host is a complex and dynamic process (for a whole picture of the current knowledge on propagation of prions from various peripheral sites to the brain, see [31]). However, the ability of prions to be transferred from one cell to another either in peripheral compartments or between cells within the CNS is a critical feature of the prion life cycle and the first clues on the mechanisms underlying cell-to-cell spreading came from cell culture experiments.

The cell biology of *PrP*^{Sc}

Although the first cell culture model to be permissive to prion multiplication was identified in 1970, most of the *PrP*^C-expressing cell lines tested so far are, for unknown reasons, refractory to prion infection [56]. Intense search led to the identification of a number of cell lines supporting the propagation of prion strains from different animal species including mouse, hamster, sheep, cervids [13], and human [57]. In contrast to primary neurons where prion infection induces apoptosis [58], chronically infected cell lines stably propagate prions over multiple cell passages

without any substantial cytopathic effect. These models have been useful for experimental tools to investigate the cellular biological properties of the *PrP*^C protein as well as the molecular and cellular events controlling the conversion of *PrP*^C into *PrP*^{Sc} in living cells [59]. *PrP*^C is a small glycoprotein, associated with membranes through a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor, particularly in rafts. The central and carboxy domains of *PrP*^C are essentially structured in alpha helices, while the amino terminus is thought to be unstructured [60]. Within the plasma membrane, *PrP*^C is subjected to endocytosis, traffics to early endosomes where it is sorted either to recycling endosomes and sent back to the cell surface or to multivesicular bodies (MVBs), some of which being fused to lysosomes for degradation [61] (Fig. 1). In sharp contrast to *PrP*^C, *PrP*^{Sc} in infected cells and tissues has high beta-sheet content, is aggregated (i.e., it is insoluble in non-ionic detergents) and its central and carboxy domains are resistant to degradation by proteases (e.g., proteinase K, PK) leading to a much more stable form. Importantly, upon biochemical fractionation, prion infectivity has been showed to be tightly associated with lipidic fractions [62–64], while lipidic fraction enhances either bona fide [65] or synthetic [18] prion infectivity. Since *PrP*^C and *PrP*^{Sc} are both detected at the plasma membrane, in the recycling compartments, in the MVBs, and in lysosomes [66, 67], these different compartments have been proposed as sites where *PrP*^C is converted into *PrP*^{Sc}. While a study identified the endosomal recycling compartment as the likely site of prion conversion [68, 69], two later works revealed that inhibition of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) components or other proteins involved in the MVB biogenesis and/or trafficking affects *PrP* conversion, thus suggesting that MVBs could also be a potential intracellular site of *PrP*^{Sc} formation [70, 71]. The use of different cell lines and different prions strains in these three studies may explain these apparent conflicting results, along with different interpretations regarding the role of ALIX in MVBs maturation pathway [70]. However, a pertinent issue regarding the mechanisms of cell-to-cell spreading is how and where the infection process is initiated. Given that *PrP*^C and *PrP*^{Sc} are both present at the cell surface, could *PrP*^{Sc} on the cell surface of an infected cell interact in trans with *PrP*^C on the plasma membrane of an adjacent target cell and promote the initial conversion in the recipient cell and eventual infection? Consistent with this possibility, aldehyde-fixed infected cells are able to infect target cells, albeit at a relative low efficiency [72–74]. In addition, *PrP*^{Sc} thought to be irreversibly bound to physical supports such as stainless steel wires can infect neuroblastoma N2a cells [75]. Later, elegant studies with a cell model expressing an epitope-tagged *PrP*^C formally demonstrated that the first



conversion events occur primarily at the plasma membrane [76, 77]. Nevertheless, the finding that the plasma membrane is the initial site of prion conversion when cells are infected de novo by extracellular prions does not exclude

that conversions can also occur later, in other subcellular compartments, especially along the endocytic pathway [66, 78].

Fig. 1 Cell-to-cell transmission of infectious prions. In infected cells, PrP^C (blue color) and PrP^{Sc} (red color) at the cell surface can be endocytosed, transported to the early endosome (EE) compartments, and recycled through the Rab11-recycling endosomes (RE). After maturation of the EE into the late endosomal multivesicular body compartments (MVB), PrP^C and PrP^{Sc} are recovered on the surface of intra luminal vesicles (ILVs), released in the lumen of the MVB after a mechanism of budding and scission of its limiting membrane. From then, the MVB compartment can travel in the cytoplasm to reach and fuse with the plasma membrane (PM) and release the ILVs as exosomes in the extracellular space. Alternatively, MVBs can also fuse with the phagophore-derived autophagosome structures to form amphisomes those further fuse with lysosomes to form autophagolysosomes. Direct fusion of autophagosomes with lysosomes also occurs. The two latter structures can fuse with the PM and release proteolysis products in the extracellular space. PrP^C and PrP^{Sc} have been detected in all these intracellular compartments. **a** Transmission of infectious prions mediated through cell–cell contacts. Three potential sites of PrP^C to PrP^{Sc} conversion have been proposed. At the plasma membrane or in intracellular compartments, i.e., in recycling endosomes and in late endosomal MVBs. Transmission of infectious prions through cell–cell contacts can be carried out through different pathways mediated by direct close cell–cell contacts and/or synapses (pathways 1a, b) and through tunneling nanotubes (TNTs) either in intra-TNT-Lamp1-lysosomal vesicles (pathway 2a) or possibly through transport at the surface of the TNT (pathway 2b). **b** Transmission of infectious prions mediated through released of extracellular vesicles and particles. PrP^C and PrP^{Sc} have been located on the surface of released exosomes and on microvesicles/shedding vesicles after budding from the PM. In addition to the cell–cell contact pathways, the transmission of infectious prions can be mediated through the extracellular medium via extracellular vesicles (EVs) including exosomes and microvesicles (pathways I and II, respectively). EVs can enter the cells through different mechanisms including fusion and endocytosis. The release of membrane-free infectious prion particles through the release of proteolysis products is still elusive but remains possible (pathway III). For the sake of clarity, no intracellular compartment was depicted in the target cell

Cell-to-cell spreading of prions in cultured cells

The wide subcellular distribution of PrP^{Sc} in infected cells offers to prions several possibilities for cell-to-cell spreading. As detailed below, whereas the exact intercellular mechanisms in the CNS remain elusive, experimental evidence with cultured cells indicates that spreading may involve direct cell–cell contacts, nanotubes, and also contact independent mechanisms via secretion of extracellular vesicles (EVs).

Trans-neuronal/transsynaptic spreading

Prions spread both in the CNS and peripheral organs and have been shown to target neuronal and non-neuronal cells. In the brain, the spread of prions along neuronal circuits has been observed for decades, with specific strains targeting specific brain areas. The synapse is an attractive candidate as the vector of neuron-to-neuron spread of pathology. Indeed, in this context, plasma membranes are tightly

linked, and the sequential development of pathology in brain regions supports a trans-synaptic spread scenario. Surprisingly, although prions behave as neurotropic transmissible agents, how they are transported in neurons and whether or not prions are actively transferred through synaptic contact is still unknown. Analysis of PrP^{Sc} spreading along neuronal pathways is made complex by the intrinsically intermingled topology of brain networks and neuroglial interactions. Therefore, to date, the role of synaptic contacts in prion spreading has only been inferred from studies aiming at deciphering the impact of networks topology in prion spreading along neuronal pathways. Several studies showed that, at the single cell level, upon uptake, prion seeds are actively transported in neurons and axons through axonal transport [79, 80]. Yet, evidence gathered from experiments where axonal transport was rationally impaired *in vivo* suggests that PrP^{Sc} can spread in the brain independently of intact axonal conduit [81, 82]. In a recent study, Shearin and Bessen [83] described the temporal and spatial movement of prions from the brain stem along cranial nerves into skeletal muscle. PrP^{Sc} was found in nerve fibers of the tongue 2 weeks prior PrP^{Sc} deposition in skeletal muscle, followed by a replication phase in muscle cells, thus suggesting that transsynaptic spread of prions can occur at the neuromuscular junction. Should transsynaptic transfer be a crucial mechanism controlling prion spreading in the brain, one could reasonably expect that prion targeting would depend on the region where prion has been initially inoculated. In regard to that hypothesis, conflicting results have been reported in the literature. Indeed, while some studies showed that variations in the infection route significantly impact the endpoint regional distribution of PrP^{Sc} and the phenotype of scrapie strains [84], others suggested that prions have an invariant brain regional distribution that mostly depends on the prion strains [85]. In addition, prion strains efficiently propagate in mice expressing cellular PrP solely in glial cell compartment [86, 87]. The presence of intracellular PrP^{Sc} can also be detected in microglia [88], consistent with a possible role in dissemination within the SNC, but available evidence, rather, suggests that microglia are protective by degrading PrP^{Sc} and slowing down the progression of the disease (for a review, see [89]). While these suggest that prions can spread independently of synaptic connectivity, this does not formally exclude a role for synaptic contacts and neuronal activity in shaping some aspects of prion spreading (pathway 1b in Fig. 1a). In a context where no direct evidence of prion transfer occurring through synapses has been brought forward, a strong argument that prions spread through trans-neuronal and/or trans-synaptic contact would rely on the observation that prion dispersion in the CNS respects brain connectomics and structural connections, as this is the case with strict trans-synaptic neuroviruses such as rabies virus. Yet, considering the mechanisms involved

in prion dispersion and amplification, one could not expect such a straightforward link between structural connectivity and propagation pattern. Indeed, prion propagation involves at least two distinct steps that are necessary but not sufficient. (1) A fast intracellular and trans-cellular spread of PrP^{Sc} aggregates seeds that can occur independently of PrP^C expression. (2) A slow nucleation process in the targeted cell that is strictly dependent on PrP^C expression. Therefore, considering the role of synaptic contact in prion spreading, it is conceivable to postulate that PrP^{Sc} seeds may travel across un-susceptible neurons to reach distant brain area where efficient seeding could take place. Thus, discrepancies between the pattern of prion propagation and synaptic strength do not refute the hypothesis of a synaptic mechanism of trans-neuronal spreading.

Modeling of PrP^{Sc} dispersal in the brain (i.e., axonal transport, trans-neuronal transfer, and target cell PrP^{Sc} amplification through nucleation of prion seeds) would greatly benefit from *in vitro* models allowing to control neuronal connectivity and reconstructs ordered neuronal networks that could be locally infected [90, 91].

Cell-to-cell transfer of prion infection is best analyzed in coculture experiments in which *de novo* infection of naive cells is monitored during culture with prion-infected cells. Several groups, using various cell types and different prion strains, consistently showed that *de novo* infection of new cells is much more efficient when infectivity is administered by living cells rather than by cells killed by various treatments [72–74]. Although these studies did not address the underlying mechanisms, they suggest that, in these experimental conditions, some active biological processes are required in addition to mere *in trans* contacts between closely apposed PrP^C and PrP^{Sc} isoforms (pathway 1a in Fig. 1a). The transfer of plasma membrane fragments might allow PrP^{Sc} to be incorporated in the membrane of a closely apposed acceptor cells. This process, named trogocytosis, occurs at the immune synapse when antigen presenting cells interact with T cells [92], and it has been hypothesized that circulating DCs may exploit such a pathway to transmit PrP^{Sc} [49]. However, experimental evidence that PrP^{Sc} may follow this pathway to move from cell to cell has not yet been obtained.

Extracellular vesicles

The presence of infectivity in the cell culture media of numerous prion-infected cell lines (e.g., [93]) raised the possibility that infection can be transmitted, at least among cultured cells, through the release of cell-free forms of prions. However, the physical nature of secreted prion infectivity has long remained unexplored. In 2004, Fevrier and coworkers first reported that PrP^{Sc} and infectivity actively released from two prion-infected cell lines were in fact associated

with extracellular vesicles (EVs) [94]. These EVs were isolated by differential centrifugation and further purified by sucrose gradients before analysis. Their size, density, morphology, and protein composition indicated their similarity to exosomes, defined as 50- to 90-nm vesicles of endosomal origin that are released into the extracellular environment upon fusion of MVBs with the plasma membrane. These vesicles contained prions, as assessed by detection of aggregated and PK-resistant PrP, were infectious for uninfected cells and transmit prion disease upon inoculation into mice. Exosomes, whose secretion was originally observed during reticulocyte maturation [95], are, in fact, secreted by most (if not all) cultured cells. Indeed, further studies by other groups showed that exosomes released by a variety of different prion-infected cell lines (neuroblastoma cells, hypothalamic GT1-7 cells, fibroblasts, and epithelial cells) do carry PrP^{Sc} and the associated infectivity [96–99]. Finally, infectivity was found in the culture supernatants of freshly isolated splenic cells from infected mice, along with the presence of immunoisolated EVs bearing exosomes markers [45]. Collectively, these findings firmly establish that the targeting of PrP^{Sc} to the exosomal secretion pathway is a general feature of prions cell cycle, at least in cell lines (pathway I in Fig. 1b). What about brain cells involved in prion multiplication? While brain prions multiply mostly in neurons, there is *in vivo* [100] and *in vitro* [57, 58] evidence that astrocytes also propagate prions. Both primary cultured astrocytes [101, 102] and cortical neurons [103] release EVs, a process regulated by neuronal activity [104]. Therefore, it is likely, although not formally demonstrated, that prions detected in the culture media of both cell types [58, 105] are also associated with EVs.

EV-mediated dissemination of pathogens is not unprecedented. Numerous studies indicate that viruses hijack the host exosomes in multiple ways to increase their persistence, pathogenesis, and transmission [106]. In the recent years, it was recognized that viruses across many different families have evolved to insert numerous viral components in EVs to manipulate the local host environment and promote viral multiplication, leading to the ‘Trojan Exosome Hypothesis’ [107], whereby HIV-1 uses host exosomes for generation of infectious viruses that may use envelope-independent host uptake pathways for entry. Exosome biogenesis and release is a very complex, tightly regulated process which has been recently reviewed [108, 109]. It begins in the endosomal system when the early endosomes mature into late endosomes or multivesicular bodies (MVBs). During this process, cargos are segregated laterally in the endosomal limiting membrane which then invaginates to form and release small intraluminal vesicles (ILVs) in the lumen of the organelle. ILVs-containing MVBs can either fuse to autophagosomes or directly to lysosomes for degradation, or can be transported to the plasma membrane. Transport requires MVBs

interaction with actin and microtubules. Proteins involved in the fusion of MVBs with the plasma membrane include SNAREs, tethering factors, Rab proteins, and other Ras GTPases. Upon fusion with the cell surface, ILVs are released into the extracellular space where they become bona fide exosomes. Exosomes contain numerous proteins, lipids, and nucleic acids whose nature obviously depends on the producing cell type. There is ample evidence that incorporation of at least some macromolecules into ILVs is a selective process, but the underlying mechanisms are poorly understood. As a result, some cargoes are enriched in EVs, while others are under-represented. The endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) machinery is composed of four multiprotein complexes (ESCRT-0, -I, -II, and -III, with other accessory proteins such as Alix and VPS4). This machinery, well described in yeast, is responsible for the recognition and the sequestration of ubiquitinated proteins, the invagination, and the scission of the membrane to finally release ILVs into the lumen [110]. However, ESCRT-independent pathways for MVBs formation have been described [111] that may require ceramide production in some cell lines [112] or tetraspanins [113, 114].

Different studies revealed that cellular stress can enhance the release of exosomes [108]. One possible explanation is that the release of exosomes (or EVs) may contribute to eliminate toxic products. Interestingly, Fader and coworkers observed that induction of the autophagy process inhibits exosome secretion by stimulating the fusion of MVBs with autophagosomes to form amphisomes, thus suggesting that MVB biogenesis and autophagy are two tightly linked processes [115]. This was also confirmed by inhibition of ESCRT components resulting in autophagy inhibition and accumulation of protein aggregates [116, 117]. As expected, the inhibition of the autophagy process was found to favor the release of exosomes [108]. Interestingly, intracellular PrP^{Sc} level was also modulated by autophagy. Induction of autophagy reduces intracellular PrP^{Sc} level, whereas its inhibition leads to PrP^{Sc} accumulation [118, 119]. The impact of autophagy inhibition on the release of EV's associated prion infectivity/PrP^{Sc} has not yet been reported.

Arellano-Anaya and coworkers studied the efficiency of prion exosomal secretion using a single cell type (epithelial RK13 cells) infected by three different prion strains [25], and demonstrated that exosome preparations were infectious in each paradigm. Interestingly, using a cell-based assay to compare the relative infectivities, they showed that one strain was much more efficiently secreted (20–40-fold) than the two others [120]. As detailed before, strain-specific PrP^{Sc} assemblies that breed true via self-templating are thought to represent the molecular basis of the phenotypically different prion strains. Fractionation of PrP^{Sc} by velocity and equilibrium sedimentations showed marked strain-dependent variations of infectivity, most probably related to the different

sizes that PrP^{Sc} entities can adopt [30, 121]. Clustering of proteins at the plasma membrane stimulates their targeting to exosomes [122, 123], indicating that aggregation of proteins may act as a general signal for exosomal sorting. Although the mechanisms by which PrP^{Sc} is targeted to the exosomal pathway remain to be established (see below), these findings raise the possibility that some prion strains may display PrP^{Sc} molecular arrangements more prone to efficient targeting to the exosomes constitutively secreted by the RK13 cell line.

Apart from carrying PrP^{Sc} and associated infectivity, there is evidence that EVs released from infected cells may differ in other ways. Coleman and coworkers analyzed gradient-purified EVs released by GT1-7 cells. Cryo-electron tomography revealed spherical vesicles of diverse sizes and surprisingly with different membrane structures, i.e., vesicles with 1, 2, or 3 membranes. Interestingly, the set of secreted EVs subpopulations (in terms of size and of number of membranes) was affected by prion infection [97]. However, it is not known to which extent these observations are specific to GT1-7 cells and whether the subpopulations with altered features are actually those carrying PrP^{Sc}. The same group further showed that EVs from infected GT1-7 cells carried a distinct signature of miRNAs, some of which being up-represented and others under-represented [124]. The miRNA profile appeared to be different in EVs and in the secreting cells, illustrating that incorporation into ILVs is selective rather than random. Whether PrP^C and/or PrP^{Sc} are directly involved in miRNA selection deserves further investigation. In addition, whether miRNAs profiling may eventually lead to sensitive preclinical diagnosis of prion infections *in vivo* is far from being established.

In oligodendroglial cells, functional impairment of some components of the ESCRT machinery showed that exosomal release of the proteolipid protein (PLP) was ESCRT-independent. Instead, the sphingolipid ceramide was identified as an alternative pathway for the sorting of PLP into membrane domains to be selected for inward budding into MVBs [112]. Guo and colleagues provided evidence that such a mechanism is also involved for targeting PrP^C and PrP^{Sc} to exosomes. Treatment of GT1-7 cells with the GW4869 inhibitor of the ceramide-producing nSMase pathway lowered the release of exosomes and of PrP^C. When the cells were infected with mouse prions, GW4869 treatment also diminished the exosomal secretion of PrP^{Sc} [125]. In a follow-up study, the same group showed that treatment of prion-infected cells with the ionophore monensin, previously shown to stimulate exosomes release from K562 cells [126], increased exosomal secretion of PrP^{Sc}, and associated infectivity, as detected by a transwell assay [127]. In another study involving two cell lines infected with ovine prions, genetic or pharmacological targeting of the exosomal pathway efficiently inhibited the release of prions

[71]. Inhibition of the ESCRT-I tsg101 (described to inhibit exosomes release from HeLa CIITA cells [110]) or GW4869 treatment strongly inhibited the release of prions. Down-regulation of tsg101 had no detectable impact on prion propagation in the transduced cells, but exosomal release of PrP^C, alix, PrP^{Sc}, and associated infectivity were strongly inhibited. Finally, GW4869 treatment did not, or only marginally, affect the release of exosomal proteins (including PrP^C), but the release of PrP^{Sc} and infectivity was dramatically inhibited, suggesting that PrP^{Sc} was selectively excluded from the secreted exosomes. Collectively, these different studies indicate that exosomal secretion of prions is amenable to experimental intervention. Furthermore, the possibility that PrP^{Sc} may be selectively excluded from secreted exosomes [71] provides potential tools for in vivo interventional strategies.

Striking morphological and biochemical diversity is observed upon analysis of EVs from bodily fluids or from cultured cells [128, 129]. Such heterogeneity is also observed for MVBs as cells can contain different MVBs, each harboring ILVs with various sizes, suggesting distinct mechanisms of formation/secretion and distinct functional properties [110, 114, 130]. In this context, whether PrP^{Sc} is widely distributed among EVs or is associated with a small subset of EVs is unknown. However, purification of PrP^{Sc}-bearing EVs will be very challenging as no antibody specific for the abnormal form of PrP is readily available and because immunodetection of PrP^{Sc} requires strong denaturation by chaotropic agents to expose buried epitopes.

Whether prion infection might stimulate EVs release has not yet been thoroughly addressed. Tunable-resistive pulse-sensing analysis showed that size distributions and EVs numbers were similar for infected and uninfected GT1-7 cells [125]. In several other studies, estimation of EVs release was inferred from immunoblotting analysis of EVs proteins in the 100K pellet fractions. These analyses did not provide any evidence for an infection-mediated increase of EVs [71, 120, 124]. However, if PrP^{Sc} is associated with a small subset of EVs, a potential stimulation of their release may have been not detected by immunoblotting analysis of the whole EVs population.

It is important to note that prions hijacking of the exosomal pathway do not imply that the endosomal pathway is the only route for extracellular release of prions. Indeed, exosomes have long been described as small vesicles requiring high speed (e.g., 100,000×g) to pellet, while microvesicles budding at the plasma membrane are considered bigger and can be pelleted at intermediate g forces (e.g., 10,000×g). However, the strict separation of these vesicle types by size has not been established beyond doubt [128], and it is increasingly recognized that (1) exosomes preparations may also contain small vesicles (< 100 nm) budding at the plasma membrane [131], (2) vesicles with exosomes markers may be larger than 100 nm in size. Therefore, it cannot be

excluded that small infectious EVs budding at the plasma membrane of infected cells may also be present in exosomes preparations. There are also suggestions that infected cells may release large infectious EVs derived from the plasma membrane (pathway II in Fig. 1b). Mattei and coworkers used media conditioned by mouse neuroblastoma cells infected with a mouse prion strain to show that EVs pelleted after centrifugation at intermediate speed (20,000×g) contained PrP^{Sc} and infectivity [132]. A similar finding was reported with epithelial Rov cells infected with sheep prions [120]. Conditioned media were serially centrifuged with increasing g forces (2000×g, 10,000×g, 100,000×g), and all the resulting supernatants and pellets were tested for prion infectivity. The vast majority of infectivity required 100,000×g ultracentrifugation to be pelleted, confirming the previous work on the association of prions with exosomes [94]. However, detectable levels of infectivity were documented in 2000×g and 10,000×g pellets, consistent with large EVs, possibly budding at the plasma membrane. It should be noted, however, that, in these two studies, the preparations containing large EVs were not characterized in depth. A further pathway for potential prion dissemination was identified by showing that virus infection strongly stimulates the release of PrP^{Sc} and infectivity through their incorporation not only in exosomes but also on the retroviral particles [98]. However, there is currently no suggestion that prion pathogenesis may be affected by prion-transporting viruses, since coinfection of mice with prions and Murine Leukemia retroviruses did not change the incubation period to clinical prion disease [133, 134].

Collectively, this substantial body of studies firmly points to the fact that secretion through association with EVs is a general feature of the prion life cycle. The ongoing studies suggest that experimental tools are being identified to manipulate/interfere with prion secretion. EVs being potential vehicles for prion spreading in vivo are an appealing hypothesis that has to be substantiated by experimental studies in animals.

Tunneling nanotubes

Tunneling nanotubes (TNTs), originally observed and described in animal cells by Ruston and colleagues [135], are transient cytoplasmic extensions that bridge two distant cells together. TNTs consist in open-ended channels, typically 50–200 nm in diameter, although 800 nm in thickness can be observed [136]. These structures contain F-actin and, in contrast to filopodia, are not attached to the substratum. TNTs are not empty tubes as they allow the transfer of whole organelles (mitochondria, lysosomes, and different types of vesicles) and also of proteins, lipids, nucleic acids, and other signaling factors [137]. Based on time-lapse imaging, two non-mutually exclusive models

have been proposed for TNT formation [138]. The actin-driven protrusion mechanism involves the outgrowth of a protrusion that will eventually fuse with the plasma membrane of a distant cell. In the cell-dislodgment mechanism, typical of motile cells, cells are in close apposition and TNT is formed when the two cells migrate away from each other. Numerous pathogens use TNTs to spread between cells. For instance, bacteria or HIV can surf on the surface of TNTs [139, 140]. In addition, either whole viral particles or viral genomes and replication components are detected within TNTs in cells infected by a variety of viruses, including retroviruses [141], herpes [142], influenza [143], or PRRSV [144]. The first evidence for a link between cell to-cell spreading of prions and TNTs came in the late 2000s [145] (pathway 2 in Fig. 1a). The group of C. Zurzolo showed that cultured mouse neuron-like CAD cells establish numerous TNT-like structures and that the PrP^C protein can move from one cell to another via TNT [at the surface of the TNTs (pathway 2b) or through vesicles transport of inside the TNTs (pathway 2a)]. In coculture experiments, PrP^{Sc} endogenously produced by infected CAD cells was found to travel within vesicles inside the TNTs connecting infected cells to uninfected CAD cells [145]. Dendritic cells are known to form TNTs [146, 147] and are involved in prion transport from the gut to the lymphoid organs [46, 148] in which follicular dendritic cells will actively multiply prions. As detailed before, whether dendritic cells could also deliver prions to the lymphoid peripheral nervous system is controversial [50, 51]. To model this situation, the authors established co-cultures between bone-marrow-derived dendritic cells (BMDCs) and hippocampal or granule primary neurons. Since chronically infected BMDCs are not available, BMDCs were loaded with purified, Alexa-labeled PrP^{Sc} before cocultivation. TNTs between BMDCs and neurons were observed, in which the exogenously added Alexa-labeled PrP^{Sc} was imaged in association with LysoTracker-positive vesicles. Further experiments showed that neurons exposed to loaded BMDCs became infected [145]. This study provided evidence that PrP^{Sc} can use TNTs for intercellular spreading between neuronal CAD cells, and suggested that TNT transfer of PrP^{Sc} might also operate between BMDCs and neurons. Because loading cells with high amounts of purified, labeled PrP^{Sc} may be seen as an artificial system to study the transfer of endogenously produced PrP^{Sc}, the same group turned to infected astrocytes as a more relevant way to deliver prions to uninfected astrocytes or neurons. Infected primary cerebellar astrocytes were co-cultured with Cell-Tracker Green labeled uninfected astrocytes. Transfer of PrP^{Sc} was observed in the recipient astrocytes and some of the numerous PrP^{Sc}-stained intercellular connections were true TNTs [105]. To model the potential transfer of prions between

astrocytes and neurons in the brain, prion-infected astrocytes were co-cultured with cerebellar granule primary neurons. Transfer of PrP^{Sc} from astrocytes to neurons did occur, but no positive indication for a TNT-mediated transfer was provided in this particular setting [105].

The favored current hypothesis is that TNT-mediated spreading of PrP^{Sc} occurs through the transfer of PrP^{Sc}-containing endocytic vesicles within the lumen of TNTs [149]. How PrP^{Sc} eventually escapes these vesicles to interact with PrP^C in the recipient cells is not yet known. However, TNTs also results in plasma membrane fusion allowing continuity between two cells, providing the opportunity for cell surface PrP^{Sc} to travel and reach the plasma membrane of the naïve cell (pathway 2b in Fig. 1a). Since time-lapse imaging showed that PrP^{Sc}-containing cell surface entities, named “strings”, are relatively immobile (less than 3 µm per 5 min) [150], it has been argued that the dynamic and transient nature of TNTs may not allow the long-distance travelling of PrP^{Sc} strings on the surface of TNTs [149]. On the other hand, the fact that PrP^{Sc} strings seem to be poorly endocytosed and thus remain on the cell surface for long periods of time [150] may give them the opportunity to be passively transported on a growing membrane protrusion towards a new cell. After fusion with the contacting plasma membrane, it may promote PrP^C conversion within the plasma membrane [76, 151].

There are some suggestions that prion infection might stimulate TNT formation and vesicles transfer between CAD cells. In prion-infected CAD cultures, the percentage of TNT-forming cells was increased by 20% compared to uninfected controls [149]. One may see TNT-mediated transfer as a mean to get rid of aggregated PrP^{Sc} (or possibly damaged PrP^{Sc}-containing lysosome) and/or acquisition by infected cells of organelles from healthy, non-infected ones. In any case, the mechanisms leading to induction of TNT formation are under investigation. The current hypothesis involves aggregation-mediated stress (through ROS and/or induction of unfolded protein response) possibly leading to stressed or damaged lysosomes [152].

It has been argued that TNTs may be more efficient than EVs to transfer prions, at least in some experimental cell models [105, 145]. This is based on the fact that crude-conditioned media are apparently less efficient than TNTs to infect new cells, and that EVs must be concentrated to detect their infectious potential. It must be pointed that in vivo and notably in solid tissue, the local concentrations of secreted EVs are probably much higher than in vitro settings where released vesicles are highly diluted in the cell culture medium. However, the relative contribution of EVs versus TNTs may not be pertinent and crucial questions unless these mechanisms are actually relevant to the in vivo situation.

EVs and TNTs in vivo

While the involvement of EVs or TNTs for cell-to-cell spreading of prions is well documented in cultured cells, corroboration to the *in vivo* situation is a significant challenge. As detailed below, EVs are widespread in the organisms, but there is so far very little evidence for infectious EVs in infected individuals. In addition, the possible contribution of infectious EVs to the spread of prions *in vivo* has not yet been addressed experimentally. Regarding TNTs, the situation is even more challenging as these peculiar structures are notoriously difficult to detect *in vivo* and because experimental tools specifically targeting TNTs functionality are still lacking.

In vivo, EVs can be isolated from most biological fluids, including blood and plasma, urine, cerebrospinal fluid, milk, or saliva. The PrP^C protein is detected in these *in vivo*-derived EVs preparations (notably urine [153], plasma [154–156], cerebrospinal fluid [157], and milk [158]). Importantly, several of them (urine, cerebrospinal fluid, saliva, blood, plasma, and milk) become infectious during the course of prion diseases [159–163], consistent with a possible contribution of EVs to the infectivity of these fluids. However, there are yet very few published studies unambiguously showing that thoroughly purified, *in vivo*-derived EVs are associated with PrP^{Sc}/infectivity. Two groups reported that EVs isolated from plasma of infected animals were positive for prions. In one study, EVs were isolated from the plasma of infected mice. These preparations did not transmit disease upon inoculation into further mice [164]. However, the same or similar preparations had seeding activity when subjected to amplification by PMCA reactions [164, 165], prompting the authors to conclude that PrP^{Sc} is associated with plasma EVs. While these studies confirmed the previous work, indicating that plasma contains prion infectivity [160], it is our opinion that these data should be interpreted with caution. Indeed, EVs were isolated by precipitation of crude plasma with a commercial polymer. This reagent is very efficient at precipitating EVs from biological fluids, but these preparations also contain a number of other plasma components (see the position paper of the International Society for Extracellular Vesicles [166]), as illustrated by the heavy contamination of their EVs fractions by immunoglobulins [165]. Since the possible contribution of contaminants to the seeding activity of the so-called plasma exosome fractions was not assessed, further purification of EVs is required to conclusively show that the seeding activity is actually associated with EVs. In another study, EVs were isolated from plasma of hamsters by differential ultracentrifugation and further purified by flotation on a sucrose gradient. In these conditions, plasma EVs from uninfected

animals were recovered in fractions from 1.11 to 1.57 g/ml as assessed by immunoblotting and immune-electron microscopy. When the starting material was plasma from prion-infected hamsters, PrP^{Sc} was successfully identified by western blot in the EVs-containing fractions [167]. Although the infectivity of these fractions was not reported, this work suggests that *in vivo*-generated EVs may carry prions, a finding that has now to be confirmed and generalized in other animal models of TSE. Interestingly, recent accumulating evidence shows that EVs can cross the blood–brain barrier from both directions, with EVs from neuronal origin being possibly recovered in blood [168] as well as with EVs from peripheral origin also detected in the CNS [169, 170]. Further time-course experiments should reveal whether blood infectious EVs are detected late in the disease (i.e., subsequently to neuroinvasion), or if their peripheral production is an early event, possibly contributing to CNS infection.

Intercellular communication in brain parenchyma occurs through many mechanisms which involves electrical and neurochemical coupling through synaptic structures, as well as complex neuron–glia interactions. EVs-mediated transfer of cell-derived material such as RNA, proteins, or mitochondria has been recently documented in physiological or pathological conditions between glial cells and neurons [171–174], suggesting that EVs play a role in neuroglial communication. While EVs can readily be purified from the interstitial fluid of brain tissue [175], it is currently not yet known whether such EVs might carry prions when isolated from infected animals.

Since their original description, TNTs as a mode of communication between cultured cells has gained a huge attention [137]. Because the *in vivo* detection of these peculiar structures is extremely challenging, their biological relevance *in vivo* remains an open question, especially in solid tissues [176]. Indeed, only a few studies reported on their identification in mammalian tissue, including developing embryonic tissues [177, 178], between dendritic cells in the mouse cornea [147], in human mesothelioma, lung, and ovarian tumors [179, 180]. The lack of TNT markers and the optical technical limitations to detect TNTs in solid tissues along with the harsh conditions required to immunodetect PrP^{Sc} are likely to make *in vivo* detection of prion-containing TNTs particularly difficult.

Generalization to misfolded proteins associated with other neurodegenerative diseases

The prion paradigm was recently extended to a large spectrum of other neurodegenerative diseases including synucleinopathies (Parkinson disease: PD, Lewy body dementia:

LBD or multiple systemic atrophy: MSA, amyotrophic lateral sclerosis: ALS, frontotemporal lobar degeneration: FTLD, tauopathies, Alzheimer disease: AD and Huntington disease: HD). It is important to note that while a wealth of epidemiological and experimental evidence has demonstrated that prions are infectious in animals including humans, there is so far no epidemiological evidence that AD, synucleinopathies, and tauopathies are transmissible among humans by iatrogenic procedures or other routes [181]. Nevertheless, these pathologies display striking similarities with prion diseases. First, they are all characterized by inclusions or deposits of aggregated, misfolded proteins into specific brain areas. In addition, pathological lesions develop sequentially in anatomically connected brain regions during the course of the disease, thus strongly suggesting a step-by-step spreading mechanism [182, 183]. Interestingly, *in vitro* and *in vivo* investigations revealed that the culprit aggregated proteins or peptides (α -synuclein: α syn [184, 185] in synucleinopathies; super oxide dismutase-1: SOD-1 [186, 187], TAR-DNA-binding protein 43: TDP-43 [188], FUS [189, 190], or the C9orf72-associated dipeptide repeats: DPR [191, 192] in ALS; huntingtin [193, 194] in Huntington disease or tau [195–197] and A β amyloid peptide [198, 199] in tauopathies and AD) all display seeding properties towards their normal counterparts. While all of these proteins were recovered in the extracellular space including cell culture supernatants of disease cellular models or biological fluids like CSF or blood (reviewed in [200]), it was also observed that A β [201], α syn [202], tau [203], SOD1 [204], TDP-43 [205], Fus [206], the DPR [207], or the huntingtin [193, 208] proteins were all found to be released in association with EVs (for a review, see [209]). Collectively, these studies have led to the pathogenic protein spreading hypothesis which posits that abnormal forms of proteins move from neuron to neuron to induce aggregation and spatiotemporal progression of the disease [182]. However, it is important to note that selective neuronal vulnerability may also be an important driving force for the sequential progression of brain pathology [210].

Interestingly, experimental research on this group of proteins has yielded evidence supporting a trans-synaptic spread scenario of the associated pathologies. Indeed, the sequential apparition of neuronal lesions containing aggregated forms of these proteins in patients' brains can be linked to neuro-anatomical connections [183]. Moreover, a number of these proteins are present or even enriched in synapses, supporting the hypothesis that this subcellular compartment could be the site of early seeding events [211–215]. In addition, synapses may be a hot-spot of intercellular exchange of material. It has, indeed, been shown that signaling molecules such as Wnt could be transferred between neurons in a trans-synaptic fashion in *Drosophila*, putatively through EVs [216]. Interestingly,

neuronal activity has been shown to control the production and release of synaptic A β peptides [217–219], and more recently tau and α syn [220, 221]. A number of studies following injection of synthetic or bonafide α syn aggregates have showed that the site of injection preconditioned the regions to which pathology could spread, thus supporting a trans-synaptic scenario [185, 222, 223]. The patterns of aggregation spreading that were observed were compatible with one or more trans-synaptic jumps. Importantly, an elegant set of experiments performed by Calafate and colleagues demonstrated that the presence of synaptic contacts increased the spreading of tau aggregation between neurons [224]. Taken together, these results support a role for synaptic structures in the spread of pathology in tauopathies and synucleinopathies, but as argued by Walsh and colleagues, “the incredible complexity of neuronal connectivity in the human nervous system suggests that almost any regional pattern of lesions that one might observe could be said to follow some neuro-anatomical pathways” [210]. Besides, experimental evidence obtained in Brahic's lab showed that α syn synthetic fibrils could be transported from axons to the somatodendritic compartments as well as the other way around, and then secreted in the extracellular medium [225]. They also demonstrated that neuron-to-neuron transfer of these fibrils could occur in an immature network, thus supporting the existence of non-synaptic spread mechanisms [226].

Strikingly, a number of studies have now shown that EVs isolated *in vivo*, from either patients or animal models, contain aggregated proteins or peptides and/or are able to seed further aggregation *in vivo* or in reporter cell lines. EVs isolated from brain extracellular space of transgenic mice expressing the human tau with the P301L hereditary tauopathy mutation carry tau seeds triggering further aggregation in tau biosensor cells [227]. In addition, EVs isolated from brain of LBD patients contained α syn, A β , and phospho-tau, and induced host α syn aggregation when stereotactically injected into the brain of wild-type mice [228]. In other studies, EVs from brains of AD patients or from transgenic mice expressing mutated APP contain forms of APP and A β amyloid peptide [175, 228]. These findings show that brain EVs could potentially shuttle these abnormal proteins/peptides and participate in their dissemination within the brain. Notably, EVs bearing aggregated proteins/peptides were also detected in biological fluids such as blood or CSF. EVs isolated from the CSF of patients with PD and LDB, but not those from control subjects, were able to seed α syn oligomerization in a reporter cell line [229]. EVs from CSF of ALS-FTD patients were enriched in C-terminal fragments of TDP-43 and induced further aggregation and mislocalization in target glioblastoma cells [230]. Specific increase in phospho-tau was detected in EVs from CSF patients with the early AD [231]. Similarly, increase of phospho-tau or

A β was observed with EVs from blood of preclinical or declared Alzheimer's patients [232].

In contrast to prions, where non-vesicular release of PrP^{Sc} has not been readily characterized (pathway III in Fig. 1b), pathological seeds can also be recovered in the extracellular environment as free aggregates, released through a direct translocation from the cytoplasm across the plasma membrane via the endosomal exocytosis, the lysosomal secretory pathway, or after synaptic release or cell death. This was well depicted for TDP-43 [233] and for huntingtin [194, 234, 235], but similar results have been also extended for other proteins like SOD1 [204], tau [236, 237], α syn [202], and the A β amyloid peptide [198].

Similar to infectious prions, there is also evidence that TNTs might participate to the spreading of protein aggregates associated with these neurodegenerative diseases [152]. In U251 glioblastoma cells, endogenous TDP-43 aggregates were visualized within TNTs connecting the cells [230]. In CAD cells, expression of polyglutamine huntingtin resulted in the transfer of aggregates from the transfected cells to naïve CAD cells and TNTs containing aggregates were imaged [238]. Similar findings were obtained with CAD cells [239] or human astrocytes [240] loaded with fluorescent aggregated fibrils of α syn, and also in CAD cells exposed to fluorescent tau fibrils [241]. Fibrils aggregates also spread between primary neurons in culture [238, 239], but due to the lack of specific marker to image TNTs in the dense primary cultures, only a single study has so far provided positive indication for a TNT-mediated transfer between these biologically relevant cells [241].

In conclusion, these studies indicate that EVs and TNTs can mediate the intercellular transfer of misfolded proteins with seeding activities and toxic properties. They suggest that beyond PrP^{Sc} spread in prion diseases, these pathways may contribute to pathology progression in a wide range of neurodegenerative diseases associated with protein misfolding.

Future directions

As detailed above, studies from independent groups working with different cell models infected with various murine and ovine prion strains have provided compelling evidence that prions can exploit secreted EVs and/or TNTs to move from cell to cell. There is some suggestion that the efficiency of PrP^{Sc} targeting to EVs may be strain-dependent [120]. The recent discovery that astrocytes derived from human induced pluripotent stem cells can be infected with CJD prions [57] should enable confirmation that EV- and/or TNT-mediated transfer holds true for human prions as well. An exciting yet challenging area for further research will be to establish the biological relevance of these mechanisms in the progression

of prion diseases in vivo. If infectious EVs contribute to cell-to-cell dissemination, targeting the recruitment of PrP^{Sc} to the extracellular vesicles might have a therapeutic potential. Supports for such a strategy have been reported in two neurodegenerative mice models where inhibition of exosomes releases reduced A β plaque load [242] or progression of tau pathology [243]. On the other hand, if exosomes release contributes to the cellular clearance of aggregated proteins, its inhibition could potentially provoke adverse effects on the cells homeostasis [244]. Regarding prions, the proportion of intracellular PrP^{Sc} released through EVs is very low (a few percent or even less) [94, 120]. Inhibition of PrP^{Sc} release on its intracellular steady-state levels and cellular homeostasis should be very limited and represents a possible strategy to limit its dissemination. Should we get evidence that infectious EVs are causally involved in intercellular transfer of PrP^{Sc} during prion pathogenesis, further research to inhibit EVs interactions with target cells would be prompted. Further basic research on TNTs formation and in vivo imaging is expected to provide the crucially required experimental tools to establish their actual contribution to prion pathogenesis.

Acknowledgements We thank Marie-Christine Miquel for comments and for carefully reading the manuscript.

Note added in proof: After acceptance of this manuscript, Abdulrahman B.A. et al. reported that autophagy controls exosomal release of prions. The reference of the corresponding study is: Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Schatzl HM. *J Biol Chem.* 2018 Apr 26. pii: jbc.RA117.000713. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000713>. [Epub ahead of print].

References

- Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24:519–550
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89:1105–1152
- Weissmann C (2004) The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2:861–871
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363–13383
- Prusiner SB, Cochran SP, Groth DF, Downey DE, Bowman KA et al (1982) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* 11:353–358
- Liberski PP, Sikorska B, Brown P (2012) Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol* 724:143–153
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943–960
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD et al (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419–420
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K et al (1996) A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921–925
- van Keulen LJ, Bossers A, van Zijderveld F (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* 39:24

11. Haley NJ, Hoover EA (2015) Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. *Annu Rev Anim Biosci* 3:305–325
12. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309–1311
13. Vilette D (2008) Cell models of prion infection. *Vet Res* 39:10
14. Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Lacroix C et al (2011) A simple, versatile and sensitive cell-based assay for prions from various species. *PLoS One* 6:e20563
15. Klohn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11666–11671
16. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121:195–206
17. Choi JK, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Gambetti P et al (2016) Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:13851–13856
18. Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327:1132–1135
19. Soto C (2011) Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* 36:151–158
20. Bruce ME (1993) Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 49:822–838
21. Morales R, Abid K, Soto C (2007) The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta* 1772:681–691
22. Chesebro B (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* 279:42–43
23. Bruce ME, Dickinson AG (1987) Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* 68(Pt 1):79–89
24. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R et al (2005) Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *J Virol* 79:7104–7112
25. Courageot MP, Daude N, Nonno R, Paquet S, Di Bari MA et al (2008) A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* 89:341–347
26. Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P et al (2008) Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J* 27:2557–2566
27. Bessen RA, Marsh RF (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68:7859–7868
28. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I et al (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389(448–450):526
29. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H et al (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4:1157–1165
30. Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J et al (2010) The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog* 6:e1000859
31. Mabbott NA (2017) Immunology of prion protein and prions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150:203–240
32. Glaysyer BR, Mabbott NA (2007) Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* 178:3757–3766
33. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A et al (1999) Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 5:1308–1312
34. Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt–Jakob disease. *J Virol* 65:6292–6295
35. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F et al (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288:1257–1259
36. Lorenz RG, Newberry RD (2004) Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1029:44–57
37. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345–348
38. Foster N, Macpherson GG (2010) Murine cecal patch M cells transport infectious prions in vivo. *J Infect Dis* 202:1916–1919
39. Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K et al (2011) Orally administered prion protein is incorporated by M cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* 179:1301–1309
40. Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M et al (2001) Trans epithelial prion transport by M cells. *Nat Med* 7:976–977
41. Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR et al (2012) M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol* 5:216–225
42. Donaldson DS, Sehgal A, Rios D, Williams IR, Mabbott NA (2016) Increased abundance of M cells in the gut epithelium dramatically enhances oral prion disease susceptibility. *PLoS Pathog* 12:e1006075
43. Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsve SF, van Kasteren SI et al (2011) Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* 7:e1002449
44. Okamoto M, Furuoka H, Horiuchi M, Noguchi T, Hagiwara K et al (2003) Experimental transmission of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in the small intestinal epithelial cells of neonatal mice. *Vet Pathol* 40:723–727
45. Castro-Seoane R, Hummerich H, Sweeting T, Tattum MH, Linehan JM et al (2012) Plasmacytoid dendritic cells sequester high prion titres at early stages of prion infection. *PLoS Pathog* 8:e1002538
46. Raymond CR, Aucouturier P, Mabbott NA (2007) In vivo depletion of CD11c⁺ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* 179:7758–7766
47. Heinen E, Bosseloir A, Bouzahzah F (1995) Follicular dendritic cells: origin and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 201:15–47
48. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C et al (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165:1259–1265
49. Klohn PC, Castro-Seoane R, Collinge J (2013) Exosome release from infected dendritic cells: a clue for a fast spread of prions in the periphery? *J Infect* 67:359–368
50. Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D, Saborio GP, Meeker HC et al (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Investig* 108:703–708
51. Raymond CR, Mabbott NA (2007) Assessing the involvement of migratory dendritic cells in the transfer of the scrapie agent from the immune to peripheral nervous systems. *J Neuroimmunol* 187:114–125
52. Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M et al (2003) Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* 425:957–962
53. McCulloch L, Brown KL, Bradford BM, Hopkins J, Bailey M et al (2011) Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen. *PLoS Pathog* 7:e1002402

54. Glatzel M, Aguzzi A (2000) PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* 81:2813–2821
55. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P et al (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339–1347
56. Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I (2013) Cellular aspects of prion replication in vitro. *Viruses* 5:374–405
57. Krejciova Z, Alibhai J, Zhao C, Krencik R, Rzechorzek NM et al (2017) Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med* 214:3481–3495
58. Cronier S, Laude H, Peyrin JM (2004) Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12271–12276
59. Krauss S, Vorberg I (2013) Prions ex vivo: what cell culture models tell us about infectious proteins. *Int J Cell Biol* 2013:704546
60. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413:282–288
61. Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* 15:102–111
62. Clarke MC, Millson GC (1976) The membrane location of scrapie infectivity. *J Gen Virol* 31:441–445
63. Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D (1998) Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* 379:655–666
64. Prusiner SB, Hadlow WJ, Eklund CM, Race RE (1977) Sedimentation properties of the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4656–4660
65. Gabizon R, Prusiner SB (1990) Prion liposomes. *Biochem J* 266:1–14
66. Veith NM, Plattner H, Stuermer CA, Schulz-Schaeffer WJ, Burkle A (2009) Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 88:45–63
67. Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E et al (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703–717
68. Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C (2009) Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5:e1000426
69. Godsave SF, Wille H, Kujala P, Latawiec D, DeArmond SJ et al (2008) Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. *J Neurosci* 28:12489–12499
70. Yim YI, Park BC, Yadavalli R, Zhao X, Eisenberg E et al (2015) The multivesicular body is the major internal site of prion conversion. *J Cell Sci* 128:1434–1443
71. Vilette D, Laulagnier K, Huor A, Alais S, Simoes S et al (2015) Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 72:4409–4427
72. Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR et al (2002) Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* 12:523–530
73. Langevin C, Goussset K, Costanzo M, Richard-Le Goff O, Zurzolo C (2010) Characterization of the role of dendritic cells in prion transfer to primary neurons. *Biochem J* 431:189–198
74. Paquet S, Langevin C, Chapuis J, Jackson GS, Laude H et al (2007) Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J Gen Virol* 88:706–713
75. Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E (2002) Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(Suppl 4):16378–16383
76. Goold R, Rabbanian S, Sutton L, Andre R, Arora P et al (2011) Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* 2:281
77. Goold R, McKinnon C, Rabbanian S, Collinge J, Schiavo G et al (2013) Alternative fates of newly formed PrPSc upon prion conversion on the plasma membrane. *J Cell Sci* 126:3552–3562
78. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267:16188–16199
79. Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D et al (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25:5207–5216
80. Moya KL, Hassig R, Creminon C, Laffont I, Di Giamberardino L (2004) Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J Neurochem* 88:155–160
81. Kratzel C, Kruger D, Beekes M (2007) Prion propagation in a nerve conduit model containing segments devoid of axons. *J Gen Virol* 88:3479–3485
82. Kunzi V, Glatzel M, Nakano MY, Greber UF, Van Leuven F et al (2002) Unhindered prion neuroinvasion despite impaired fast axonal transport in transgenic mice overexpressing four-repeat tau. *J Neurosci* 22:7471–7477
83. Shearin H, Bessen RA (2014) Axonal and transynaptic spread of prions. *J Virol* 88:8640–8655
84. Langevin C, Andreoletti O, Le Dur A, Laude H, Beringue V (2011) Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 41:219–225
85. Casaccia-Bonnel P, Kascsak RJ, Fersko R, Callahan S, Carp RI (1993) Brain regional distribution of prion protein PrP27-30 in mice stereotactically microinjected with different strains of scrapie. *J Infect Dis* 167:7–12
86. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S et al (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302:871–874
87. Raeber AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A et al (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J* 16:6057–6065
88. Guiroy DC, Wakayama I, Liberski PP, Gajdusek DC (1994) Relationship of microglia and scrapie amyloid-immunoreactive plaques in kuru, Creutzfeldt–Jakob disease and Gerstmann–Straussler syndrome. *Acta Neuropathol* 87:526–530
89. Aguzzi A, Zhu C (2017) Microglia in prion diseases. *J Clin Invest* 127:3230–3239
90. Alleaume-Butaux A, Nicot S, Pietri M, Baudry A, Dakowski C et al (2015) Double-edge sword of sustained ROCK activation in prion diseases through neurogenesis defects and prion accumulation. *PLoS Pathog* 11:e1005073
91. Peyrin JM, Deleglise B, Saïas L, Vignes M, Gougis P et al (2011) Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 11:3663–3673
92. Dhainaut M, Moser M (2014) Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Front Immunol* 5:112
93. Schatzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ et al (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* 71:8821–8831
94. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W et al (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9683–9688
95. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942–948

96. Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G et al (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100:603–615
97. Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF (2012) Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *FASEB J* 26:4160–4173
98. Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J et al (2006) Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J* 25:2674–2685
99. Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R et al (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211:582–590
100. Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT (1991) Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:375–379
101. Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffe M, Costa-Silva B et al (2013) The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 70:3211–3227
102. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol* 67:1815–1829
103. Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C et al (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31:642–648
104. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A et al (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 46:409–418
105. Victoria GS, Arkhipenko A, Zhu S, Syan S, Zurzolo C (2016) Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. *Sci Rep* 6:20762
106. Raab-Traub N, Dittmer DP (2017) Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat Rev Microbiol* 15:559–572
107. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10592–10597
108. Hessvik NP, Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75:193–208
109. Kowal J, Tkach M, Thery C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29:116–125
110. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J et al (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126:5553–5565
111. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10:925–937
112. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D et al (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244–1247
113. Boker KO, Lemus-Diaz N, Rinaldi Ferreira R, Schiller L, Schneider S et al (2018) The impact of the CD9 tetraspanin on lentivirus infectivity and exosome secretion. *Mol Ther* 26:634–647
114. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L et al (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21:708–721
115. Fader CM, Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 16:70–78
116. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L et al (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179:485–500
117. Oshima R, Hasegawa T, Tamai K, Sugeno N, Yoshida S et al (2016) ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways. *Sci Rep* 6:24997
118. Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM (2009) Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem* 109:25–34
119. Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K et al (2015) Strain-dependent effect of macroautophagy on abnormally folded prion protein degradation in infected neuronal cells. *PLoS One* 10:e0137958
120. Arellano-Anaya ZE, Huor A, Leblanc P, Lehmann S, Provansal M et al (2015) Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 72:1185–1196
121. Laferriere F, Tixador P, Moudjou M, Chapuis J, Sibille P et al (2013) Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics. *PLoS Pathog* 9:e1003702
122. Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC et al (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol* 5:e158
123. Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110(Pt 16):1867–1877
124. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF (2012) Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 40:10937–10949
125. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF (2015) The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes. *J Biol Chem* 290:3455–3467
126. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278:20083–20090
127. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF (2016) Stimulating the release of exosomes increases the intercellular transfer of prions. *J Biol Chem* 291:5128–5137
128. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
129. Zabeo D, Cvjetkovic A, Lasser C, Schorb M, Lotvall J et al (2017) Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *J Extracell Vesicles* 6:1329476
130. Edgar JR, Eden ER, Futter CE (2014) Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 15:197–211
131. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE et al (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172:923–935
132. Mattei V, Barenco MG, Tasciotti V, Garofalo T, Longo A et al (2009) Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One* 4:e5057
133. Krasemann S, Neumann M, Luepke JP, Grashorn J, Wurr S et al (2012) Persistent retroviral infection with MoMuLV influences neuropathological signature and phenotype of prion disease. *Acta Neuropathol* 124:111–126
134. Leblanc P, Hasenkrug K, Ward A, Myers L, Messer RJ et al (2012) Co-infection with the friend retrovirus and mouse scrapie does not alter prion disease pathogenesis in susceptible mice. *PLoS One* 7:e30872

135. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303:1007–1010
136. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X (2014) Tunneling nanotubes: diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol* 7:e27934
137. Sisakhtnezhad S, Khosravi L (2015) Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* 94:429–443
138. Gerdes HH, Carvalho RN (2008) Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 20:470–475
139. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S et al (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 177:8476–8483
140. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A et al (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10:211–219
141. Eugenin EA, Gaskill PJ, Berman JW (2009) Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 254:142–148
142. Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Adriaensens D, Nauwynck HJ (2005) Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8990–8995
143. Kumar A, Kim JH, Ranjan P, Metcalfe MG, Cao W et al (2017) Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Sci Rep* 7:40360
144. Guo R, Katz BB, Tomich JM, Gallagher T, Fang Y (2016) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes nanotubes for intercellular spread. *J Virol* 90:5163–5175
145. Goussset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A et al (2009) Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11:328–336
146. Watkins SC, Salter RD (2005) Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 23:309–318
147. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG (2008) Cutting edge: membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class I⁺ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 180:5779–5783
148. Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* 83:267–271
149. Zhu S, Victoria GS, Marzo L, Ghosh R, Zurzolo C (2015) Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. *Prion* 9:125–135
150. Rouvinski A, Karniely S, Kounin M, Moussa S, Goldberg MD et al (2014) Live imaging of prions reveals nascent PrPSc in cell-surface, raft-associated amyloid strings and webs. *J Cell Biol* 204:423–441
151. Baron GS, Magalhaes AC, Prado MA, Caughey B (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol* 80:2106–2117
152. Victoria GS, Zurzolo C (2017) The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol* 216:2633–2644
153. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, Gil D et al (2010) Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteom Clin Appl* 4:416–425
154. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF et al (2006) Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 107:3907–3911
155. Berrone E, Corona C, Mazza M, Vallino Costassa E, Faro ML et al (2015) Detection of cellular prion protein in exosomes derived from ovine plasma. *J Gen Virol* 96:3698–3702
156. Ritchie AJ, Crawford DM, Ferguson DJ, Burthem J, Roberts DJ (2013) Normal prion protein is expressed on exosomes isolated from human plasma. *Br J Haematol* 163:678–680
157. Vella LJ, Greenwood DL, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF (2008) Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 124:385–393
158. van Herwijnen MJ, Zonneveld MI, Goerdal S, Nolte Hoen EN, Garssen J et al (2016) Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol Cell Proteom* 15:3412–3423
159. Gough KC, Maddison BC (2010) Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4:275–282
160. Turner ML, Ludlam CA (2009) An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol* 144:14–23
161. Lacroix C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J et al (2008) Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* 4:e1000238
162. Franceschini A, Baiardi S, Hughson AG, McKenzie N, Moda F et al (2017) High diagnostic value of second generation CSF RT-QulC across the wide spectrum of CJD prions. *Sci Rep* 7:10655
163. Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP et al (1994) Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 35:513–529
164. Cervenakova L, Saa P, Yakovleva O, Vasilyeva I, de Castro J et al (2016) Are prions transported by plasma exosomes? *Transfus Apher Sci* 55:70–83
165. Saa P, Yakovleva O, de Castro J, Vasilyeva I, De Paoli SH et al (2014) First demonstration of transmissible spongiform encephalopathy-associated prion protein (PrPTSE) in extracellular vesicles from plasma of mice infected with mouse-adapted variant Creutzfeldt-Jakob disease by in vitro amplification. *J Biol Chem* 289:29247–29260
166. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C et al (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
167. Properzi F, Logozzi M, Abdel-Haq H, Federici C, Lugini L et al (2015) Detection of exosomal prions in blood by immunocytochemistry techniques. *J Gen Virol* 96:1969–1974
168. Mustapic M, Eitan E, Werner JK Jr, Berkowitz ST, Lazaropoulos MP et al (2017) Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Front Neurosci* 11:278
169. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S et al (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 29:341–345
170. Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J et al (2014) Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol* 12:e1001874
171. Frubbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S et al (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 11:e1001604
172. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y et al (2016) Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535:551–555

173. Lewis S (2013) Glia: transporting cargo from A to B. *Nat Rev Neurosci* 14:589
174. Xin H, Katakowski M, Wang F, Qian JY, Liu XS et al (2017) MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 48:747–753
175. Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A, Levy E (2012) The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem* 287:43108–43115
176. Gerdes HH, Rustom A, Wang X (2013) Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev* 130:381–387
177. Pyrgaki C, Trainor P, Hadjantonakis AK, Niswander L (2010) Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Dev Biol* 344:941–947
178. Salas-Vidal E, Lomeli H (2004) Imaging filopodia dynamics in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 265:75–89
179. Lou E, Fujisawa S, Barlas A, Romin Y, Manova-Todorova K et al (2012) Tunneling nanotubes: a new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Commun Integr Biol* 5:399–403
180. Lou E, Fujisawa S, Morozov A, Barlas A, Romin Y et al (2012) Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 7:e33093
181. Beekes M, Thomzig A, Schulz-Schaeffer WJ, Burger R (2014) Is there a risk of prion-like disease transmission by Alzheimer- or Parkinson-associated protein particles? *Acta Neuropathol* 128:463–476
182. Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* 16:109–120
183. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45–51
184. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P et al (2012) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338:949–953
185. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A et al (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol Commun* 2:88
186. Ayers JI, Fromholt S, Koch M, DeBosier A, McMahon B et al (2014) Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 128:791–803
187. Munch C, O'Brien J, Bertolotti A (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3548–3553
188. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H et al (2013) Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4:124–134
189. Nomura T, Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N et al (2014) Intracellular aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 289:1192–1202
190. Sun Z, Diaz Z, Fang X, Hart MP, Chesi A et al (2011) Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS Biol* 9:e1000614
191. Chang YJ, Jeng US, Chiang YL, Hwang IS, Chen YR (2016) The glycine-alanine dipeptide repeat from C9orf72 hexanucleotide expansions forms toxic amyloids possessing cell-to-cell transmission properties. *J Biol Chem* 291:4903–4911
192. Zhou Q, Lehmer C, Michaelsen M, Mori K, Alterauge D et al (2017) Antibodies inhibit transmission and aggregation of C9orf72 poly-GA dipeptide repeat proteins. *EMBO Mol Med* 9:687–702
193. Jeon I, Cicchetti F, Cisbani G, Lee S, Li E et al (2016) Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol* 132:577–592
194. Tan Z, Dai W, van Erp TG, Overman J, Demuro A et al (2015) Huntington's disease cerebrospinal fluid seeds aggregation of mutant huntingtin. *Mol Psychiatry* 20:1286–1293
195. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S et al (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909–913
196. Holmes BB, Diamond MI (2014) Prion-like properties of Tau protein: the importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J Biol Chem* 289:19855–19861
197. Woerman AL, Aoyagi A, Patel S, Kazmi SA, Lobach I et al (2016) Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E8187–E8196
198. Langer F, Eisele YS, Fritsch SK, Staufenbiel M, Walker LC et al (2011) Soluble Abeta seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition. *J Neurosci* 31:14488–14495
199. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C et al (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781–1784
200. Costanzo M, Zurzolo C (2013) The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 452:1–17
201. Rajendran L, Honscho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD et al (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11172–11177
202. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR et al (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 7:42
203. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Kruger L, Irsen S et al (2017) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12:5
204. Grad LI, Yerbury JJ, Turner BJ, Guest WC, Pokrishevsky E et al (2014) Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3620–3625
205. Feiler MS, Strobel B, Freischmidt A, Helfferich AM, Kappel J et al (2015) TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol* 211:897–911
206. Kamelgarn M, Chen J, Kuang L, Arenas A, Zhai J et al (2016) Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochim Biophys Acta* 1862:2004–2014
207. Westergard T, Jensen BK, Wen X, Cai J, Kropf E et al (2016) Cell-to-cell transmission of dipeptide repeat proteins linked to C9orf72-ALS/FTD. *Cell Rep* 17:645–652
208. Zhang X, Abels ER, Redzic JS, Margulis J, Finkbeiner S et al (2016) Potential transfer of polyglutamine and CAG-repeat RNA in extracellular vesicles in Huntington's disease: background and evaluation in cell culture. *Cell Mol Neurobiol* 36:459–470
209. Howitt J, Hill AF (2016) Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 291:26589–26597
210. Walsh DM, Selkoe DJ (2016) A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 17:251–260
211. Gutekunst CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H et al (1995) Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8710–8714
212. Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M et al (2013) Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci* 33:6298–6309

213. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8:2804–2815
214. Rodrigues DI, Gutierrez J, Pliassova A, Oliveira CR, Cunha RA et al (2014) Synaptic and sub-synaptic localization of amyloid-beta protein precursor in the rat hippocampus. *J Alzheimers Dis* 40:981–992
215. Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spire-Jones TL et al (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin–proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426–1435
216. Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R et al (2009) Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 139:393–404
217. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Cicciotosto GD, Ruff E et al (2009) Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12:1567–1576
218. Bero AW, Yan P, Roh JH, Cirrito JR, Stewart FR et al (2011) Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nat Neurosci* 14:750–756
219. Yamamoto K, Tanei ZI, Hashimoto T, Wakabayashi T, Okuno H et al (2015) Chronic optogenetic activation augments abeta pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Rep* 11:859–865
220. Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A et al (2016) Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci* 19:1085–1092
221. Sacino AN, Brooks M, Thomas MA, McKinney AB, Lee S et al (2014) Intramuscular injection of alpha-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:10732–10737
222. Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S et al (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 75:351–362
223. Rey NL, Petit GH, Bousset L, Melki R, Brundin P (2013) Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathol* 126:555–573
224. Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G et al (2015) Synaptic contacts enhance cell-to-cell tau pathology propagation. *Cell Rep* 11:1176–1183
225. Brahic M, Bousset L, Bieri G, Melki R, Gitler AD (2016) Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Abeta42 peptide and HTTexon 1. *Acta Neuropathol* 131:539–548
226. Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L et al (2012) Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol* 72:517–524
227. Polanco JC, Scicluna BJ, Hill AF, Gotz J (2016) Extracellular vesicles isolated from the brains of rTg4510 mice seed tau protein aggregation in a threshold-dependent manner. *J Biol Chem* 291:12445–12466
228. Ngolab J, Trinh I, Rockenstein E, Mante M, Florio J et al (2017) Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol Commun* 5:46
229. Stuedl A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W et al (2016) Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain* 139:481–494
230. Ding X, Ma M, Teng J, Teng RK, Zhou S et al (2015) Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* 6:24178–24191
231. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S et al (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287:3842–3849
232. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E et al (2015) Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: a case–control study. *Alzheimers Dement* 11(600–607):e601
233. Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K (2017) Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One* 12:e0179375
234. Pecho-Vrieseling E, Rieker C, Fuchs S, Bleckmann D, Esposito MS et al (2014) Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nat Neurosci* 17:1064–1072
235. Trajkovic K, Jeong H, Krainc D (2017) Mutant huntingtin is secreted via a late endosomal/lysosomal unconventional secretory pathway. *J Neurosci* 37:9000–9012
236. Chai X, Dage JL, Citron M (2012) Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis* 48:356–366
237. Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI (2012) Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* 287:19440–19451
238. Costanzo M, Abounit S, Marzo L, Danckaert A, Chamoun Z et al (2013) Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J Cell Sci* 126:3678–3685
239. Abounit S, Bousset L, Loria F, Zhu S, de Chaumont F et al (2016) Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J* 35:2120–2138
240. Rostami J, Holmqvist S, Lindstrom V, Sigvardson J, Westermark GT et al (2017) Human astrocytes transfer aggregated alpha-synuclein via tunneling nanotubes. *J Neurosci* 37:11835–11853
241. Tardivel M, Begard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A et al (2016) Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to-neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun* 4:117
242. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E (2014) Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35:1792–1800
243. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J et al (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18:1584–1593
244. Iguchi Y, Eid L, Parent M, Soucy G, Bareil C et al (2016) Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain* 139:3187–3201



Correction to: Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions

Didier Vilette¹ · Josquin Courte^{2,4} · Jean Michel Peyrin² · Laurent Coudert³ · Laurent Schaeffer³ · Olivier Andréoletti¹ · Pascal Leblanc³

© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Correction to: Cellular and Molecular Life Sciences
<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2823-y>

In the original publication, part of acknowledgement text was missing. The complete acknowledgement section should read as follows.

Acknowledgements We thank Marie-Christine Miquel for comments and for carefully reading the manuscript. PL

received the support of the Association pour la recherche sur la SLA (ARSLA), the NeuroDis Foundation and the AFM. LC received for his PhD an ARC2 “Qualité de vie et Vieillesse” Grant from the région Auvergne Rhône-Alpes.

The original article can be found online at <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2823-y>.

- ✉ Didier Vilette
d.vilette@envt.fr
- ✉ Jean Michel Peyrin
jean-michel.peyrin@upmc.fr
- ✉ Pascal Leblanc
pascal.leblanc@univ-lyon1.fr

¹ UMR1225, INRA, ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 Chemin des Capelles, Toulouse, France

² Neurosciences Paris Seine, UMR8246, Inserm U1130, IBPS, UPMC, Sorbonne Universités, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

³ Insitut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

⁴ Laboratoire Physico Chimie Curie, UMR168, UPMC, IPGG, Sorbonne Universités, 6 Rue Jean Calvin, 75005 Paris, France

Published online: 11 June 2018



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abmayr, S.M., Pavlath, G.K., 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Dev. Camb. Engl.* 139, 641–656. <https://doi.org/10.1242/dev.068353>
- Adell, M.A.Y., Teis, D., 2011. Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *FEBS Lett.* 585, 3191–3196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.001>
- Adell, M.A.Y., Vogel, G.F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M.W., Teis, D., 2014. Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J. Cell Biol.* 205, 33–49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310114>
- Alais, S., Simoes, S., Baas, D., Lehmann, S., Raposo, G., Darlix, J.L., Leblanc, P., 2008. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol. Cell* 100, 603–615. <https://doi.org/10.1042/BC20080025>
- Alam, S.L., Sun, J., Payne, M., Welch, B.D., Blake, B.K., Davis, D.R., Meyer, H.H., Emr, S.D., Sundquist, W.I., 2004. Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J.* 23, 1411–1421. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600114>
- Alfred, V., Vaccari, T., 2016. When membranes need an ESCRT: endosomal sorting and membrane remodelling in health and disease. *Swiss Med. Wkly.* 146, w14347. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14347>
- Allen, D.L., Unterman, T.G., 2007. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C188–199. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00542.2005>
- Anderson, J.E., 2000. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 1859–1874. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1859>
- Andreucci, J.J., Grant, D., Cox, D.M., Tomc, L.K., Prywes, R., Goldhamer, D.J., Rodrigues, N., Bédard, P.-A., McDermott, J.C., 2002. Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 16426–16432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110891200>
- Arellano-Anaya, Z.E., Huor, A., Leblanc, P., Lehmann, S., Provansal, M., Raposo, G., Andréoletti, O., Vilette, D., 2015. Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 1185–1196. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1735-8>
- Arnett, A.L., Konieczny, P., Ramos, J.N., Hall, J., Odom, G., Yablonka-Reuveni, Z., Chamberlain, J.R., Chamberlain, J.S., 2014. Adeno-associated viral vectors do not efficiently target muscle satellite cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1, 14038. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.38>
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., Chazaud, B., 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204, 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., Takeshita, T., Endo, Y., Fujita, T., Sugamura, K., 1997. Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *J. Biol. Chem.* 272, 32785–32791. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32785>
- Asfour, H.A., Allouh, M.Z., Said, R.S., 2018. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 243, 118–128. <https://doi.org/10.1177/1535370217749494>
- Askanas, V., Engel, W.K., Nogalska, A., 2015. Sporadic inclusion-body myositis: A degenerative muscle disease associated with aging, impaired muscle protein homeostasis and abnormal mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.005>
- Aswad, H., Jalabert, A., Rome, S., 2016. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol.* 16.

<https://doi.org/10.1186/s12896-016-0262-0>

Babst, M., 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic Cph. Den.* 6, 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00246.x>

Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., Emr, S.D., 2002a. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3, 271–282. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00220-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00220-4)

Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., Emr, S.D., 2002b. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3, 283–289. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00219-8](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00219-8)

Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E.J., Emr, S.D., 2000. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic Cph. Den.* 1, 248–258. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010307.x>

Bach, A.-S., Enjalbert, S., Comunale, F., Bodin, S., Vitale, N., Charrasse, S., Gauthier-Rouvière, C., 2010. ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates Mammalian Myoblast Fusion through Phospholipase D1 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Signaling Pathways. *Mol. Biol. Cell* 21, 2412–2424. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-12-1063>

Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., Stenmark, H., 2003a. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162, 435–442. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302131>

Bache, K.G., Raiborg, C., Mehlum, A., Madhus, I.H., Stenmark, H., 2002. Phosphorylation of Hrs downstream of the epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Biochem.* 269, 3881–3887. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03046.x>

Bache, K.G., Raiborg, C., Mehlum, A., Stenmark, H., 2003b. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 12513–12521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210843200>

Bache, K.G., Stuffers, S., Malerød, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Wälchli, S., Lukacs, G.L., Brech, A., Stenmark, H., 2006. The ESCRT-III Subunit hVps24 Is Required for Degradation but Not Silencing of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol. Biol. Cell* 17, 2513–2523. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-10-0915>

Barbieri, M.A., Li, G., Mayorga, L.S., Stahl, P.D., 1996. Characterization of Rab5:Q79L-stimulated endosome fusion. *Arch. Biochem. Biophys.* 326, 64–72. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0047>

Benveniste, O., Stenzel, W., Hilton-Jones, D., Sandri, M., Boyer, O., van Engelen, B.G.M., 2015. Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 611–624. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1384-5>

Berkes, C.A., Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2005.07.006>

Bhuin, T., Roy, J.K., 2009. Rab11 is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 336, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0782-1>

Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C., Piper, R.C., 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat. Cell Biol.* 4, 534–539. <https://doi.org/10.1038/ncb815>

Bittel, D.C., Jaiswal, J.K., 2019. Contribution of Extracellular Vesicles in Rebuilding Injured Muscles. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00828>

Black, B.L., Olson, E.N., 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 167–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.167>

Blackwell, T.K., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104–1110. <https://doi.org/10.1126/science.2174572>

- Bloemberg, D., Quadrilatero, J., 2016. Autophagic flux data in differentiated C2C12 myotubes following exposure to acetylcholine and caffeine. *Data Brief* 7, 692–696. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.008>
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P., Tremblay, P., 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 120, 603–612.
- Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., Théry, C., 2012. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* 1. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014–1019. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014>
- Bongiovanni, A., Romancino, D.P., Campos, Y., Paterniti, G., Qiu, X., Moshich, S., Di Felice, V., Vergani, N., Ustek, D., d’Azzo, A., 2012. Alix Protein Is Substrate of Ozz-E3 Ligase and Modulates Actin Remodeling in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 287, 12159–12171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297036>
- Bonifacino, J.S., Rojas, R., 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 568–579. <https://doi.org/10.1038/nrm1985>
- Bosnakovski, D., Xu, Z., Li, W., Thet, S., Cleaver, O., Perlingeiro, R.C.R., Kyba, M., 2008. Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 3194–3204. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1017>
- Bowers, K., Piper, S.C., Edeling, M.A., Gray, S.R., Owen, D.J., Lehner, P.J., Luzio, J.P., 2006. Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *J. Biol. Chem.* 281, 5094–5105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508632200>
- Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., Rando, T.A., 2008a. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.006>
- Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., Rando, T.A., 2008b. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.006>
- Brankatschk, B., Wichert, S.P., Johnson, S.D., Schaad, O., Rossner, M.J., Gruenberg, J., 2012. Regulation of the EGF transcriptional response by endocytic sorting. *Sci. Signal.* 5, ra21. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002351>
- Broniarczyk, J., Bergant, M., Goździcka-Józefiak, A., Banks, L., 2014. Human papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery. *Virology* 460–461, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.005>
- Broniarczyk, J., Olejnik-Schmidt, A.K., Luczak, M.W., Schmidt, M.T., Dabrowski, M., Józefiak, A., Kedzia, W., Kwasniewska, A., Goździcka-Józefiak, A., 2010. Analysis of expression and structure of the TSG101 gene in cervical cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 25, 777–783. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000404
- Brzozowski, J.S., Jankowski, H., Bond, D.R., McCague, S.B., Munro, B.R., Predebon, M.J., Scarlett, C.J., Skelding, K.A., Weidenhofer, J., 2018. Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines. *Lipids Health Dis.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0854-x>
- Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.-F., Mandel, J.-L., 2002. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15060–15065. <https://doi.org/10.1073/pnas.212498399>
- Canal, F., Anthony, E., Lescure, A., Del Nery, E., Camonis, J., Perez, F., Ragazzon, B., Perret, C., 2015. A kinome siRNA screen identifies HGS as a potential target for liver cancers with oncogenic mutations in CTNNB1. *BMC*

Cancer 15, 1020. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-2037-8>

Cao, Y., Yao, Z., Sarkar, D., Lawrence, M., Sanchez, G.J., Parker, M.H., MacQuarrie, K.L., Davison, J., Morgan, M.T., Ruzzo, W.L., Gentleman, R.C., Tapscott, S.J., 2010. Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. *Dev. Cell* 18, 662–674. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.014>

Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>

Carlton, J.G., Martin-Serrano, J., 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1143422>

Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannou, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T.Y., Liscum, L., Strauss, J.F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R.R., van Diggelen, O.P., Elleder, M., Patterson, M.C., Brady, R.O., Vanier, M.T., Pentchev, P.G., Tagle, D.A., 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>

Castellano, B.M., Thelen, A.M., Moldavski, O., Feltes, M., van der Welle, R.E.N., Mydock-McGrane, L., Jiang, X., van Eijkeren, R.J., Davis, O.B., Louie, S.M., Perera, R.M., Covey, D.F., Nomura, D.K., Ory, D.S., Zoncu, R., 2017. Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science* 355, 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.aag1417>

Cereghino, J.L., Marcusson, E.G., Emr, S.D., 1995. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* 6, 1089–1102. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.9.1089>

Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., Caplan, M.J., 2010. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190, 1079–1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>

Chanut-Delalande, H., Jung, A.C., Baer, M.M., Lin, L., Payre, F., Affolter, M., 2010. The Hrs/Stam Complex Acts as a Positive and Negative Regulator of RTK Signaling during Drosophila Development. *PLOS ONE* 5, e10245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010245>

Charrasse, S., Comunale, F., De Rossi, S., Echard, A., Gauthier-Rouvière, C., 2013. Rab35 regulates cadherin-mediated adherens junction formation and myoblast fusion. *Mol. Biol. Cell* 24, 234–245. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0167>

Chen, D., Chen, F., Xu, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zhang, H., Pan, T., Su, Y., Wan, M., Wang, X., Ye, J., 2017. AKT2 deficiency induces retardation of myocyte development through EndoG-MEF2A signaling in mouse heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493, 1410–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.149>

Chen, E.H., Pryce, B.A., Tzeng, J.A., Gonzalez, G.A., Olson, E.N., 2003. Control of Myoblast Fusion by a Guanine Nucleotide Exchange Factor, Loner, and Its Effector ARF6. *Cell* 114, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00720-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00720-7)

Chen, J., Hou, N., Zhang, C., Teng, Y., Cheng, X., Li, Z., Ren, J., Zeng, J., Li, R., Wang, W., Yang, X., Lan, Y., 2015. Smooth Muscle Hgs Deficiency Leads to Impaired Esophageal Motility. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 794–802. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12248>

Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., Wang, D.-Z., 2010. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* 190, 867–879. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911036>

Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G., Koh, T.J., 2008. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C1183–1191. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00568.2007>

- Chiang, C.-Y., Engel, A., Opaluch, A.M., Ramos, I., Maestre, A.M., Secundino, I., De Jesus, P.D., Nguyen, Q.T., Welch, G., Bonamy, G.M.C., Miraglia, L.J., Orth, A.P., Nizet, V., Fernandez-Sesma, A., Zhou, Y., Barton, G.M., Chanda, S.K., 2012. Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* 11, 306–318. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.002>
- Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Colom, A., Humbert, F., Lenz, M., Scheuring, S., Roux, A., 2015. Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* 163, 866–879. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.017>
- Cho, Y.-Y., Yao, K., Bode, A.M., Bergen, H.R., Madden, B.J., Oh, S.-M., Ermakova, S., Kang, B.S., Choi, H.S., Shim, J.-H., Dong, Z., 2007. RSK2 mediates muscle cell differentiation through regulation of NFAT3. *J. Biol. Chem.* 282, 8380–8392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611322200>
- Choi, J., Costa, M.L., Mermelstein, C.S., Chagas, C., Holtzer, S., Holtzer, H., 1990. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7988–7992. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.7988>
- Christ, B., Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol. (Berl.)* 191, 381–396. <https://doi.org/10.1007/bf00304424>
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C., Stenmark, H., 2017. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* 42, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.016>
- Christ, L., Wenzel, E.M., Liestøl, K., Raiborg, C., Campsteijn, C., Stenmark, H., 2016. ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. *J. Cell Biol.* 212, 499–513. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507009>
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., Gherardi, R.K., 2007. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397–1409. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0693>
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S., Emr, S.D., 2006. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J. Cell Biol.* 175, 815–823. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608053>
- Clague, M.J., Liu, H., Urbé, S., 2012. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Dev. Cell* 23, 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.011>
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Comai, G., Tajbakhsh, S., 2014. Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 110, 1–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405943-6.00001-4>
- Conejo, R., Valverde, A.M., Benito, M., Lorenzo, M., 2001. Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities. *J. Cell. Physiol.* 186, 82–94. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200101\)186:1<82::AID-JCP1001>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200101)186:1<82::AID-JCP1001>3.0.CO;2-R)
- Cong, X.X., Gao, X.K., Rao, X.S., Wen, J., Liu, X.C., Shi, Y.P., He, M.Y., Shen, W.L., Shen, Y., Ouyang, H., Hu, P., Low, B.C., Meng, Z.X., Ke, Y.H., Zheng, M.Z., Lu, L.R., Liang, Y.H., Zheng, L.L., Zhou, Y.T., 2020. Rab5a activates IRS1 to coordinate IGF-AKT-mTOR signaling and myoblast differentiation during muscle regeneration. *Cell Death Differ.* 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0508-1>
- Crescenzi, M., Fleming, T.P., Lassar, A.B., Weintraub, H., Aaronson, S.A., 1990. MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8442–8446.
- Curtiss, M., Jones, C., Babst, M., 2007. Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol. Biol. Cell* 18, 636–645.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0588>

Cusella-De Angelis, M.G., Molinari, S., Le Donne, A., Coletta, M., Vivarelli, E., Bouche, M., Molinaro, M., Ferrari, S., Cossu, G., 1994. Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF beta: a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 120, 925–933.

Dauner, K., Eid, W., Raghupathy, R., Presley, J.F., Zha, X., 2017. mTOR complex 1 activity is required to maintain the canonical endocytic recycling pathway against lysosomal delivery. *J. Biol. Chem.* 292, 5737–5747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771451>

Davie, J.K., Cho, J.-H., Meadows, E., Flynn, J.M., Knapp, J.R., Klein, W.H., 2007. Target gene selectivity of the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor myogenin in embryonic muscle. *Dev. Biol.* 311, 650–664. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.014>

Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-x)

de Melker, A.A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H., Borst, J., 2001. c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J. Cell Sci.* 114, 2167–2178.

De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., Mongini, C., 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* 6, 203. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203>

Denais, C.M., Gilbert, R.M., Isermann, P., McGregor, A.L., te Lindert, M., Weigel, B., Davidson, P.M., Friedl, P., Wolf, K., Lammerding, J., 2016. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* 352, 353–358. <https://doi.org/10.1126/science.aad7297>

Dewulf, M., Köster, D.V., Sinha, B., Lesegno, C.V. de, Chambon, V., Bigot, A., Bensalah, M., Negroni, E., Tardif, N., Podkalicka, J., Johannes, L., Nassoy, P., Butler-Browne, G., Lamaze, C., Blouin, C.M., 2019. Dystrophy-associated caveolin-3 mutations reveal that caveolae couple IL6/STAT3 signaling with mechanosensing in human muscle cells. *Nat. Commun.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09405-5>

Dikic, I., Elazar, Z., 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Dionyssiou, M.G., Nowacki, N.B., Hashemi, S., Zhao, J., Kerr, A., Tsushima, R.G., McDermott, J.C., 2013. Cross-talk between glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and p38MAPK regulates myocyte enhancer factor 2 (MEF2) activity in skeletal and cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 54, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.013>

Dobrowolski, R., De Robertis, E.M., 2011. Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 53–60. <https://doi.org/10.1038/nrm3244>

Dobrowolski, R., Vick, P., Ploper, D., Gumper, I., Snitkin, H., Sabatini, D.D., De Robertis, E.M., 2012. Presenilin deficiency or lysosomal inhibition enhances Wnt signaling through relocalization of GSK3 to the late-endosomal compartment. *Cell Rep.* 2, 1316–1328. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.026>

Dobzinski, N., Chuartzman, S.G., Kama, R., Schuldiner, M., Gerst, J.E., 2015. Starvation-Dependent Regulation of Golgi Quality Control Links the TOR Signaling and Vacuolar Protein Sorting Pathways. *Cell Rep.* 12, 1876–1886. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.026>

Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009a. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009b. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Doyotte, A., Mironov, A., McKenzie, E., Woodman, P., 2008. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required

for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6308–6313. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707601105>

Du, X., Kazim, A.S., Brown, A.J., Yang, H., 2012. An essential role of Hrs/Vps27 in endosomal cholesterol trafficking. *Cell Rep.* 1, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2011.10.004>

Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T.A., Ong, Y.S., Hong, W., Prinz, W.A., Parton, R.G., Brown, A.J., Yang, H., 2011. A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell Biol.* 192, 121–135. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004142>

Dunn, W.A., Connolly, T.P., Hubbard, A.L., 1986. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J. Cell Biol.* 102, 24–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.1.24>

Dziąło, E., Rudnik, M., Koning, R.I., Czepiel, M., Tkacz, K., Baj-Krzyworzeka, M., Distler, O., Siedlar, M., Kania, G., Błyszczuk, P., 2019. WNT3a and WNT5a Transported by Exosomes Activate WNT Signaling Pathways in Human Cardiac Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20061436>

Eden, E.R., Huang, F., Sorkin, A., Futter, C.E., 2012. The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic. *Traffic Cph. Den.* 13, 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01305.x>

Edgar, J.R., Eden, E.R., Futter, C.E., 2014. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic* 15, 197–211. <https://doi.org/10.1111/tra.12139>

Edgar, J.R., Willén, K., Gouras, G.K., Futter, C.E., 2015. ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid- β accumulation. *J. Cell Sci.* 128, 2520–2528. <https://doi.org/10.1242/jcs.170233>

Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H., Sasaki, Y., Tanaka, N., Asao, H., Kikuchi, K., Yamada, M., Chenb, M., O’Shea, J.J., Sugamura, K., 2000. STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS Lett.* 477, 55–61. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01760-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01760-9)

Engelenburg, S.B.V., Shtengel, G., Sengupta, P., Waki, K., Jarnik, M., Ablan, S.D., Freed, E.O., Hess, H.F., Lippincott-Schwartz, J., 2014. Distribution of ESCRT Machinery at HIV Assembly Sites Reveals Virus Scaffolding of ESCRT Subunits. *Science* 343, 653–656. <https://doi.org/10.1126/science.1247786>

Erbay, E., Chen, J., 2001. The mammalian target of rapamycin regulates C2C12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 36079–36082. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100406200>

Erbay, E., Park, I.-H., Nuzzi, P.D., Schoenherr, C.J., Chen, J., 2003. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *J. Cell Biol.* 163, 931–936. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307158>

Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A.G., Weissenhorn, W., Kozlov, M.M., 2009. Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III. *PLOS Comput. Biol.* 5, e1000575. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000575>

Fielding, R.A., Manfredi, T.J., Ding, W., Fiatarone, M.A., Evans, W.J., Cannon, J.G., 1993. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 265, R166-172. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.1.R166>

Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E.M.C., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., Simonsen, A., 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* 179, 485–500. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702115>

Flores-Rodriguez, N., Kenwright, D.A., Chung, P.-H., Harrison, A.W., Stefani, F., Waigh, T.A., Allan, V.J., Woodman, P.G., 2015. ESCRT-0 marks an APPL1-independent transit route for EGFR between the cell surface and the EEA1-positive early endosome. *J. Cell Sci.* 128, 755–767. <https://doi.org/10.1242/jcs.161786>

Florini, J.R., Magri, K.A., Ewton, D.Z., James, P.L., Grindstaff, K., Rotwein, P.S., 1991. “Spontaneous” differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J. Biol.*

Chem. 266, 15917–15923.

Forterre, A., Jalabert, A., Berger, E., Baudet, M., Chikh, K., Errazuriz, E., De Larichaudy, J., Chanon, S., Weiss-Gayet, M., Hesse, A.-M., Record, M., Geloën, A., Lefai, E., Vidal, H., Couté, Y., Rome, S., 2014. Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? *PLoS One* 9, e84153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084153>

Fortini, P., Ferretti, C., Iorio, E., Cagnin, M., Garribba, L., Pietraforte, D., Falchi, M., Pascucci, B., Baccarini, S., Morani, F., Phadngam, S., De Luca, G., Isidoro, C., Dogliotti, E., 2016. The fine tuning of metabolism, autophagy and differentiation during in vitro myogenesis. *Cell Death Dis.* 7, e2168–e2168. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.50>

Franke, T.F., 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473–6488. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.313>

Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J., 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039–1049. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90278-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90278-x)

Gagliardi, M., Hernandez, A., McGough, I.J., Vincent, J.-P., 2014. Inhibitors of endocytosis prevent Wnt/Wingless signalling by reducing the level of basal β -catenin/Armadillo. *J. Cell Sci.* 127, 4918–4926. <https://doi.org/10.1242/jcs.155424>

Gamarra, J., Engels, N., Blue, R.E., Hoerr, I., Giudice, J., 2019. The Synaptosome Associated Protein-23 is Necessary for Skeletal Muscle Myogenesis. *FASEB J.* 33, 459.3-459.3. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.459.3

García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M.L., Ramírez-Rangel, I., Robles-Molina, E., Balla, T., Vázquez-Prado, J., Reyes-Cruz, G., 2008. G Protein-coupled Receptor-promoted Trafficking of G β 1 γ 2 Leads to AKT Activation at Endosomes via a Mechanism Mediated by G β 1 γ 2-Rab11a Interaction. *Mol. Biol. Cell* 19, 4188–4200. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1089>

Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M.P., Minetti, C., 2010. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 137–145. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.103>

Ge, Y., Chen, J., 2012. Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling network in skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 43928–43935. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406942>

Ge, Y., Sun, Y., Chen, J., 2011a. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J. Cell Biol.* 192, 69–81. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007165>

Ge, Y., Wu, A.-L., Warnes, C., Liu, J., Zhang, C., Kawasome, H., Terada, N., Boppart, M.D., Schoenherr, C.J., Chen, J., 2009. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C1434-1444. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2009>

Ge, Y., Yoon, M.-S., Chen, J., 2011b. Raptor and Rheb negatively regulate skeletal myogenesis through suppression of insulin receptor substrate 1 (IRS1). *J. Biol. Chem.* 286, 35675–35682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262881>

Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Gallouzi, I.-E., Rosenfeld, M.G., Briata, P., 2010. Akt2-mediated phosphorylation of Pitx2 controls Ccnd1 mRNA decay during muscle cell differentiation. *Cell Death Differ.* 17, 975–983. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.194>

Giacinti, C., Musarò, A., De Falco, G., Jourdan, I., Molinaro, M., Bagella, L., Simone, C., Giordano, A., 2008. Cdk9-55: a new player in muscle regeneration. *J. Cell. Physiol.* 216, 576–582. <https://doi.org/10.1002/jcp.21361>

Girardi, F., Le Grand, F., 2018. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 153, 157–179. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.026>

Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.

<https://doi.org/10.1002/path.2697>

Goliand, I., Adar-Levor, S., Segal, I., Nachmias, D., Dadosh, T., Kozlov, M.M., Elia, N., 2018. Resolving ESCRT-III Spirals at the Intercellular Bridge of Dividing Cells Using 3D STORM. *Cell Rep.* 24, 1756–1764. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.051>

Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E.J., Cobb, L.J., Salih, D.A.M., Lovett, F.A., Holding, C., Pell, J.M., 2004a. Akt2, a novel functional link between p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3607–3622. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.9.3607-3622.2004>

Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E.J., Cobb, L.J., Salih, D.A.M., Lovett, F.A., Holding, C., Pell, J.M., 2004b. Akt2, a novel functional link between p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3607–3622. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.9.3607-3622.2004>

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

Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009a. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>

Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009b. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>

Gredinger, E., Gerber, A.N., Tamir, Y., Tapscott, S.J., Bengal, E., 1998. Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273, 10436–10444. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10436>

Grefte, S., Kuijpers-Jagtman, A.M., Torensma, R., Von den Hoff, J.W., 2007. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 16, 857–868. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0058>

Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., Boutros, M., 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036–1045. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>

Gruenbaum-Cohen, Y., Harel, I., Umansky, K.-B., Tzahor, E., Snapper, S.B., Shilo, B.-Z., Schejter, E.D., 2012. The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11211–11216. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116065109>

Gruenberg, J., 2003. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 382–388. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00078-4)

Guo, K., Walsh, K., 1997. Inhibition of Myogenesis by Multiple Cyclin-Cdk Complexes COORDINATE REGULATION OF MYOGENESIS AND CELL CYCLE ACTIVITY AT THE LEVEL OF E2F. *J. Biol. Chem.* 272, 791–797. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.791>

Gustafsson, G., Lööv, C., Persson, E., Lázaro, D.F., Takeda, S., Bergström, J., Erlandsson, A., Sehlin, D., Balaj, L., György, B., Hallbeck, M., Outeiro, T.F., Breakefield, X.O., Hyman, B.T., Ingelsson, M., 2018. Secretion and Uptake of α -Synuclein Via Extracellular Vesicles in Cultured Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1539–1550. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0622-5>

Hadders, M.A., Agromayor, M., Obita, T., Perisic, O., Caballe, A., Kloc, M., Lamers, M.H., Williams, R.L., Martin-Serrano, J., 2012. ESCRT-III binding protein MITD1 is involved in cytokinesis and has an unanticipated PLD fold that binds membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17424–17429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206839109>

Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., Lassar, A.B., 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018–1021. <https://doi.org/10.1126/science.7863327>

Han, X.H., Jin, Y.-R., Tan, L., Kosciuk, T., Lee, J.-S., Yoon, J.K., 2014. Regulation of the follistatin gene by RSPO-LGR4 signaling via activation of the WNT/ β -catenin pathway in skeletal myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 752–764.

<https://doi.org/10.1128/MCB.01285-13>

Hanson, P.I., Cashikar, A., 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 337–362. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>

Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., Heuser, J.E., 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180, 389–402. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707031>

Hanyaloglu, A.C., McCullagh, E., von Zastrow, M., 2005. Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *EMBO J.* 24, 2265–2283. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600688>

Hanyaloglu, A.C., von Zastrow, M., 2007. A novel sorting sequence in the beta2-adrenergic receptor switches recycling from default to the Hrs-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 3095–3104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605398200>

Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., Klein, W.H., 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506. <https://doi.org/10.1038/364501a0>

Haugen, L.H., Skjeldal, F.M., Bergeland, T., Bakke, O., 2017. Endosomal binding kinetics of Eps15 and Hrs specifically regulate the degradation of RTKs. *Sci. Rep.* 7, 17962. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17320-2>

Hayes, S., Chawla, A., Corvera, S., 2002. TGF β receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes. *J. Cell Biol.* 158, 1239–1249. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204088>

He, M., Crow, J., Roth, M., Zeng, Y., K. Godwin, A., 2014. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab. Chip* 14, 3773–3780. <https://doi.org/10.1039/C4LC00662C>

Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011a. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>

Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011b. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>

Hernández-Hernández, J.M., García-González, E.G., Brun, C.E., Rudnicki, M.A., 2017. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.11.010>

Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., 2006. Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell Biol.* 26, 8267–8280. <https://doi.org/10.1128/MCB.00201-06>

Hessvik, N.P., Øverbye, A., Brech, A., Torgersen, M.L., Jakobsen, I.S., Sandvig, K., Llorente, A., 2016. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 4717–4737. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2309-8>

Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A.S., Kim, J., Prag, G., Emr, S.D., Hurley, J.H., 2004. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* 431, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature02914>

Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M.J., Martin, S., Hancock, J.F., Parton, R.G., 2008. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042>

Hindi, S.M., Tajrishi, M.M., Kumar, A., 2013. Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Sci. Signal.* 6, re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003832>

Hoeller, D., Crosetto, N., Blagojev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanetz, K., Breitling, R., Mann, M.,

- Stenmark, H., Dikic, I., 2006. Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat. Cell Biol.* 8, 163–169. <https://doi.org/10.1038/ncb1354>
- Hong, Z., Pedersen, N.M., Wang, L., Torgersen, M.L., Stenmark, H., Raiborg, C., 2017. PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning. *J. Cell Biol.* 216, 4217–4233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611073>
- Hsu, C.P., Moghadaszadeh, B., Hartwig, J.H., Beggs, A.H., 2018. Sarcomeric and nonmuscle α -actinin isoforms exhibit differential dynamics at skeletal muscle Z-lines. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 75, 213–228. <https://doi.org/10.1002/cm.21442>
- Hu, P., Geles, K.G., Paik, J.-H., DePinho, R.A., Tjian, R., 2008. Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev. Cell* 15, 534–546. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.018>
- Huang, S.-H., Zhao, L., Sun, Z.-P., Li, X.-Z., Geng, Z., Zhang, K.-D., Chao, M.V., Chen, Z.-Y., 2009. Essential role of Hrs in endocytic recycling of full-length TrkB receptor but not its isoform TrkB.T1. *J. Biol. Chem.* 284, 15126–15136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809763200>
- Huet, C., Ash, J.F., Singer, S.J., 1980. The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts. *Cell* 21, 429–438. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90479-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90479-1)
- Hulin, J.-A., Nguyen, T.D.T., Cui, S., Marri, S., Yu, R.T., Downes, M., Evans, R.M., Makarenkova, H., Meech, R., 2016. Barx2 and Pax7 Regulate Axin2 Expression in Myoblasts by Interaction with β -Catenin and Chromatin Remodelling. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 2169–2182. <https://doi.org/10.1002/stem.2396>
- Hunt, L.C., Stover, J., Haugen, B., Shaw, T.I., Li, Y., Pagala, V.R., Finkelstein, D., Barton, E.R., Fan, Y., Labelle, M., Peng, J., Demontis, F., 2019. A Key Role for the Ubiquitin Ligase UBR4 in Myofiber Hypertrophy in Drosophila and Mice. *Cell Rep.* 28, 1268–1281.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.094>
- Huotari, J., Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hurley, J.H., 2015. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* 34, 2398–2407. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592484>
- Iguchi, Y., Eid, L., Parent, M., Soucy, G., Bareil, C., Riku, Y., Kawai, K., Takagi, S., Yoshida, M., Katsuno, M., Sobue, G., Julien, J.-P., 2016. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain* 139, 3187–3201. <https://doi.org/10.1093/brain/aww237>
- Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Shisheva, A., 2001. Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *J. Biol. Chem.* 276, 26141–26147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101722200>
- Irannejad, R., Tsvetanova, N.G., Lobingier, B.T., von Zastrow, M., 2015. Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.005>
- Isobe, M., Lee, S., Waguri, S., Kametaka, S., 2018. Clathrin adaptor GGA1 modulates myogenesis of C2C12 myoblasts. *PLOS ONE* 13, e0207533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207533>
- Jahn, L., Sadoshima, J., Izumo, S., 1994. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp. Cell Res.* 212, 297–307. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1147>
- Jékely, G., Rørth, P., 2003. Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila. *EMBO Rep.* 4, 1163–1168. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400019>
- Jia, R., Bonifacino, J.S., 2019. Lysosome Positioning Influences mTORC2 and AKT Signaling. *Mol. Cell* 75, 26–38.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.009>
- Jiao, S., Ren, H., Li, Y., Zhou, J., Duan, C., Lu, L., 2013. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 107–113. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1479-4>
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., Perez, F., 2014. ESCRT machinery is required for

plasma membrane repair. *Science* 343, 1247136. <https://doi.org/10.1126/science.1247136>

Jo, C., Cho, S.-J., Jo, S.A., 2011. Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) stabilizes MyoD through direct phosphorylation at tyrosine 156 during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 18903–18913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225128>

Johannes, L., Popoff, V., 2008. Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* 135, 1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.009>

Jones, A.E., Price, F.D., Le Grand, F., Soleimani, V.D., Dick, S.A., Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 2015. Wnt/ β -catenin controls follistatin signalling to regulate satellite cell myogenic potential. *Skelet. Muscle* 5. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0038-6>

Jones, N.C., Tyner, K.J., Nibarger, L., Stanley, H.M., Cornelison, D.D.W., Fedorov, Y.V., Olwin, B.B., 2005. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J. Cell Biol.* 169, 105–116. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408066>

Kaksonen, M., Roux, A., 2018. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>

Kassar-Duchossoy, L., Giaccone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., Tajbakhsh, S., 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19, 1426–1431. <https://doi.org/10.1101/gad.345505>

Katzmann, D.J., Babst, M., Emr, S.D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145–155. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00434-2)

Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., Emr, S.D., 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* 162, 413–423. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302136>

Keller, C.W., Schmidt, J., Lünemann, J.D., 2017. Immune and myodegenerative pathomechanisms in inclusion body myositis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 422–445. <https://doi.org/10.1002/acn3.419>

Kelly, B.T., Graham, S.C., Liska, N., Dannhauser, P.N., Höning, S., Ungewickell, E.J., Owen, D.J., 2014. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* 345, 459–463. <https://doi.org/10.1126/science.1254836>

Kim, B.Y., Olzmann, J.A., Barsh, G.S., Chin, L.-S., Li, L., 2007. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* 18, 1129–1142. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-09-0787>

Kim, C.-H., Neiswender, H., Baik, E.J., Xiong, W.C., Mei, L., 2008. Beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2941–2951. <https://doi.org/10.1128/MCB.01682-07>

Kim, J.H., Jin, P., Duan, R., Chen, E.H., 2015. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.006>

Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S.N., Sens, K.L., Bo, J., Gonzalez, G.A., Chen, E.H., 2007. A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev. Cell* 12, 571–586. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.019>

Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A.Y., Ossendorp, F., Melief, C.J., Stoorvogel, W., Geuze, H.J., 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* 155, 53–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103071>

Knapp, J.R., Davie, J.K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E.N., Klein, W.H., 2006. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development* 133, 601–610. <https://doi.org/10.1242/dev.02249>

- Knight, J.D., Kothary, R., 2011. The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skelet. Muscle* 1, 29. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-29>
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., de Moerloose, P., Parton, R.G., Gruenberg, J., 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193–197. <https://doi.org/10.1038/32440>
- Kojima, K., Amano, Y., Yoshino, K., Tanaka, N., Sugamura, K., Takeshita, T., 2014. ESCRT-0 protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) is targeted to endosomes independently of signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the complex formation with STAM promotes its endosomal dissociation. *J. Biol. Chem.* 289, 33296–33310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578245>
- Komada, M., Kitamura, N., 1995. Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6213–6221. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.11.6213>
- Komada, M., Masaki, R., Yamamoto, A., Kitamura, N., 1997. Hrs, a tyrosine kinase substrate with a conserved double zinc finger domain, is localized to the cytoplasmic surface of early endosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 20538–20544. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20538>
- Komada, M., Soriano, P., 1999. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev.* 13, 1475–1485. <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1475>
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>
- Kostelansky, M.S., Schluter, C., Tam, Y.Y.C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., Conibear, E., Hurley, J.H., 2007. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.016>
- Kostelansky, M.S., Sun, J., Lee, S., Kim, J., Ghirlando, R., Hierro, A., Emr, S.D., Hurley, J.H., 2006. Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. *Cell* 125, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.049>
- Krauss, R.S., Joseph, G.A., Goel, A.J., 2017. Keep Your Friends Close: Cell-Cell Contact and Skeletal Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029298>
- Krempler, A., Henry, M.D., Triplett, A.A., Wagner, K.-U., 2002. Targeted Deletion of the Tsg101 Gene Results in Cell Cycle Arrest at G1/S and p53-independent Cell Death. *J. Biol. Chem.* 277, 43216–43223. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207662200>
- Kuang, S., Chargé, S.B., Seale, P., Huh, M., Rudnicki, M.A., 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J. Cell Biol.* 172, 103–113. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508001>
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M.A., 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>
- Kuang, S., Rudnicki, M.A., 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.004>
- Kunzmann, S., Wohlfahrt, J.G., Itoh, S., Asao, H., Komada, M., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B., 2003. SARA and Hgs attenuate susceptibility to TGF-beta1-mediated T cell suppression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 194–202. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0550com>
- Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Infante, R.E., 2009. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* 137, 1213–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>

- Kyuuma, M., Kikuchi, K., Kojima, K., Sugawara, Y., Sato, M., Mano, N., Goto, J., Takeshita, T., Yamamoto, A., Sugamura, K., Tanaka, N., 2007. AMSH, an ESCRT-III associated enzyme, deubiquitinates cargo on MVB/late endosomes. *Cell Struct. Funct.* 31, 159–172. <https://doi.org/10.1247/csf.06023>
- Langelier, C., von Schwedler, U.K., Fisher, R.D., De Domenico, I., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D., Sundquist, W.I., 2006. Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* 80, 9465–9480. <https://doi.org/10.1128/JVI.01049-06>
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831–49840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204291200>
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Lassar, A.B., Paterson, B.M., Weintraub, H., 1986. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 47, 649–656. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90507-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90507-6)
- Laulagnier, K., Javalet, C., Hemming, F.J., Chivet, M., Lachenal, G., Blot, B., Chatellard, C., Sadoul, R., 2018. Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 757–773. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2664-0>
- Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., Corvera, S., 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J. Biol. Chem.* 275, 3699–3705. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3699>
- Lazaro, J.B., Kitzmann, M., Poul, M.A., Vandromme, M., Lamb, N.J., Fernandez, A., 1997. Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J. Cell Sci.* 110, 1251–1260.
- Le Bihan, M.-C., Bigot, A., Jensen, S.S., Dennis, J.L., Rogowska-Wrzesinska, A., Lainé, J., Gache, V., Furling, D., Jensen, O.N., Voit, T., Mouly, V., Coulton, G.R., Butler-Browne, G., 2012. In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts. *J. Proteomics* 77, 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.008>
- Lee, I.-H., Kai, H., Carlson, L.-A., Groves, J.T., Hurley, J.H., 2015. Negative membrane curvature catalyzes nucleation of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15892–15897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518765113>
- Lee, J.H., Jun, H.-S., 2019. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front. Physiol.* 10, 42. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00042>
- Lee, S., Chang, J., Renvoisé, B., Tipirneni, A., Yang, S., Blackstone, C., 2012. MITD1 is recruited to midbodies by ESCRT-III and participates in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 23, 4347–4361. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0292>
- Leikina, E., Melikov, K., Sanyal, S., Verma, S.K., Eun, B., Gebert, C., Pfeifer, K., Lizunov, V.A., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., 2013. Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion. *J. Cell Biol.* 200, 109–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207012>
- Lemos, D.R., Babaeijandaghi, F., Low, M., Chang, C.-K., Lee, S.T., Fiore, D., Zhang, R.-H., Natarajan, A., Nedospasov, S.A., Rossi, F.M.V., 2015. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* 21, 786–794. <https://doi.org/10.1038/nm.3869>
- Lepper, C., Conway, S.J., Fan, C.-M., 2009. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 460, 627–631. <https://doi.org/10.1038/nature08209>
- Leroy, M.C., Perroud, J., Darbellay, B., Bernheim, L., Konig, S., 2013. Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation Triggers Human Myoblast Differentiation. *PLOS ONE* 8, e71770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071770>

- Li, J., Johnson, S.E., 2006. ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1425–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.051>
- Li, L., Cohen, S.N., 1996. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* 85, 319–329. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81111-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81111-3)
- Lim, J., Yue, Z., 2015. Neuronal aggregates: formation, clearance and spreading. *Dev. Cell* 32, 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.002>
- Lim, S., Kaldis, P., 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Liu, N., Nelson, B.R., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2014. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4109–4114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401732111>
- Liu, Q.-C., Zha, X.-H., Faralli, H., Yin, H., Louis-Jeune, C., Perdiguero, E., Prankeviciene, E., Muñoz-Cánoves, P., Rudnicki, M.A., Brand, M., Perez-Iratxeta, C., Dilworth, F.J., 2012. Comparative expression profiling identifies differential roles for Myogenin and p38 α MAPK signaling in myogenesis. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 386–397. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs045>
- Liu, Y., Shepherd, E.G., Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases — regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 202–212. <https://doi.org/10.1038/nri2035>
- Lloyd, T.E., Atkinson, R., Wu, M.N., Zhou, Y., Pennetta, G., Bellen, H.J., 2002a. Hrs Regulates Endosome Membrane Invagination and Tyrosine Kinase Receptor Signaling in *Drosophila*. *Cell* 108, 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00611-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00611-6)
- Lloyd, T.E., Atkinson, R., Wu, M.N., Zhou, Y., Pennetta, G., Bellen, H.J., 2002b. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* 108, 261–269. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00611-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00611-6)
- Lohi, O., Poussu, A., Mao, Y., Quioco, F., Lehto, V.P., 2002. VHS domain -- a longshoreman of vesicle lines. *FEBS Lett.* 513, 19–23. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03287-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03287-2)
- Lu, Q., Hope, L.W., Brasch, M., Reinhard, C., Cohen, S.N., 2003. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7626–7631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932599100>
- Luhtala, N., Odorizzi, G., 2004. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* 166, 717–729. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403139>
- Luo, Z., Ge, M., Chen, J., Geng, Q., Tian, M., Qiao, Z., Bai, L., Zhang, Q., Zhu, C., Xiong, Y., Wu, K., Liu, F., Liu, Y., Wu, J., 2017. HRS plays an important role for TLR7 signaling to orchestrate inflammation and innate immunity upon EV71 infection. *PLoS Pathog.* 13, e1006585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006585>
- Ma, L., Umasankar, P.K., Wrobel, A.G., Lyman, A., McCoy, A.J., Holkar, S.S., Jha, A., Pradhan-Sundd, T., Watkins, S.C., Owen, D.J., Traub, L.M., 2016. Transient Fcho1/2-Eps15/RAP-2 Nanoclusters Prime the AP-2 Clathrin Adaptor for Cargo Binding. *Dev. Cell* 37, 428–443. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.003>
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- MacDonald, E., Brown, L., Selvais, A., Liu, H., Waring, T., Newman, D., Bithell, J., Grimes, D., Urbé, S., Clague, M.J., Zech, T., 2018. HRS-WASH axis governs actin-mediated endosomal recycling and cell invasion. *J. Cell Biol.* 217, 2549–2564. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710051>
- Mahul-Mellier, A.-L., Strappazzon, F., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Béal, D., Torch, S., Hemming, F., Petiot, A., Verna, J.-M., Fraboulet, S., Sadoul, R., 2009. Alix and ALG-2 make a link between endosomes and neuronal death. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 200–203. <https://doi.org/10.1042/BST0370200>

- Malerød, L., Stuffers, S., Brech, A., Stenmark, H., 2007. Vps22/EAP30 in ESCRT-II mediates endosomal sorting of growth factor and chemokine receptors destined for lysosomal degradation. *Traffic Cph. Den.* 8, 1617–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00630.x>
- Mamińska, A., Bartosik, A., Banach-Orłowska, M., Pilecka, I., Jastrzębski, K., Zdzalik-Bielecka, D., Castanon, I., Poulain, M., Neyen, C., Wolińska-Nizioł, L., Toruń, A., Szymańska, E., Kowalczyk, A., Piwocka, K., Simonsen, A., Stenmark, H., Fürthauer, M., González-Gaitán, M., Miaczynska, M., 2016. ESCRT proteins restrict constitutive NF- κ B signaling by trafficking cytokine receptors. *Sci. Signal.* 9, ra8–ra8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad0848>
- Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T.E., Wu, M.N., Bellen, H., Quiocho, F.A., 2000. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100, 447–456. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80680-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80680-7)
- Massagué, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Mateescu, B., Kowal, E.J.K., van Balkom, B.W.M., Bartel, S., Bhattacharyya, S.N., Buzás, E.I., Buck, A.H., de Candia, P., Chow, F.W.N., Das, S., Driedonks, T.A.P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A.F., Jones, J.C., Van Keuren-Jensen, K.R., Lai, C.P., Lässer, C., Liegro, I. di, Lunavat, T.R., Lorenowicz, M.J., Maas, S.L.N., Mäger, I., Mittelbrunn, M., Momma, S., Mukherjee, K., Nawaz, M., Pegtel, D.M., Pfaffl, M.W., Schiffelers, R.M., Tahara, H., Théry, C., Tosar, J.P., Wauben, M.H.M., Witwer, K.W., Nolte-'t Hoen, E.N.M., 2017. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1286095. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F., Gruenberg, J., 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531–534. <https://doi.org/10.1126/science.1092425>
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
- Maxfield, F.R., 2014. Role of Endosomes and Lysosomes in Human Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016931–a016931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016931>
- Mayor, S., Parton, R.G., Donaldson, J.G., 2014. Clathrin-Independent Pathways of Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016758>
- McCullough, J., Colf, L.A., Sundquist, W.I., 2013. Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 663–692. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-101058>
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., Urbé, S., 2006. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol. CB* 16, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.073>
- McKinnell, I.W., Ishibashi, J., Le Grand, F., Punch, V.G.J., Addicks, G.C., Greenblatt, J.F., Dilworth, F.J., Rudnicki, M.A., 2008. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat. Cell Biol.* 10, 77–84. <https://doi.org/10.1038/ncb1671>
- McMillan, E.M., Quadriatero, J., 2014. Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochem. J.* 462, 267–277. <https://doi.org/10.1042/BJ20140312>
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>
- Meadows, E., Cho, J.-H., Flynn, J.M., Klein, W.H., 2008. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev. Biol.* 322, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.024>
- Mebarek, S., Komati, H., Naro, F., Zeiller, C., Alvisi, M., Lagarde, M., Prigent, A.-F., Némoz, G., 2007. Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *J. Cell Sci.* 120, 407–416. <https://doi.org/10.1242/jcs.03331>

Megoney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 73, 723–732. <https://doi.org/10.1139/o95-080>

Mehra, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., Köster, S., Penberthy, K., Kubota, Y., Dricot, A., Rogan, D., Vidal, M., Hill, D.E., Bean, A.J., Philips, J.A., 2013. Mycobacterium tuberculosis type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathog.* 9, e1003734. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003734>

Meissner, J.D., Freund, R., Krone, D., Umeda, P.K., Chang, K.-C., Gros, G., Scheibe, R.J., 2011. Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of p300 enhances myosin heavy chain I/β gene expression via acetylation of nuclear factor of activated T cells c1. *Nucleic Acids Res.* 39, 5907–5925. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr162>

Meister, M., Tikkanen, R., 2014. Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View. *Membranes* 4, 356–371. <https://doi.org/10.3390/membranes4030356>

Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Medeiros, R.B., Matos, A.R., Einicker-Lamas, M., Tortelote, G.G., Vieyra, A., Costa, M.L., 2005. Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. *Cell Tissue Res.* 319, 289–297. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1004-5>

Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Mendes, F.A., Costa, M.L., Abreu, J.G., 2007. Wnt/beta-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. *Differ. Res. Biol. Divers.* 75, 184–192. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00129.x>

Michailovici, I., Harrington, H.A., Azogui, H.H., Yahalom-Ronen, Y., Plotnikov, A., Ching, S., Stumpf, M.P.H., Klein, O.D., Seger, R., Tzahor, E., 2014. Nuclear to cytoplasmic shuttling of ERK promotes differentiation of muscle stem/progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 141, 2611–2620. <https://doi.org/10.1242/dev.107078>

Mierzwa, B.E., Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., von Filseck, J.M., König, J., Larios, J., Poser, I., Müller-Reichert, T., Scheuring, S., Roux, A., Gerlich, D.W., 2017. Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 19, 787–798. <https://doi.org/10.1038/ncb3559>

Millar, C.A., Powell, K.A., Hickson, G.R., Bader, M.F., Gould, G.W., 1999. Evidence for a role for ADP-ribosylation factor 6 in insulin-stimulated glucose transporter-4 (GLUT4) trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 17619–17625. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17619>

Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301–305. <https://doi.org/10.1038/nature12343>

Miller, D.S.J., Bloxham, R.D., Jiang, M., Gori, I., Saunders, R.E., Das, D., Chakravarty, P., Howell, M., Hill, C.S., 2018. The Dynamics of TGF-β Signaling Are Dictated by Receptor Trafficking via the ESCRT Machinery. *Cell Rep.* 25, 1841-1855.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.056>

Miller, K.J., Thaloor, D., Matteson, S., Pavlath, G.K., 2000. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C174-181. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.1.C174>

Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., Sadoul, R., 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.* 6, 124–129. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400456>

Miura, S., Mishina, Y., 2011. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs) is involved in BMP signaling through phosphorylation of SMADS and TAK1 in early mouse embryo. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 2474–2481. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22750>

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J.I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J.L., Miyazono, K., Sugamura, K., 2000. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through

- cooperation with SARA. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9346–9355. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.24.9346-9355.2000>
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., Komada, M., 2003. STAM Proteins Bind Ubiquitinated Proteins on the Early Endosome via the VHS Domain and Ubiquitin-interacting Motif. *Mol. Biol. Cell* 14, 3675–3689. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-12-0823>
- Monroe, N., Han, H., Gonciarz, M.D., Eckert, D.M., Karren, M.A., Whitby, F.G., Sundquist, W.I., Hill, C.P., 2014. The oligomeric state of the active Vps4 AAA ATPase. *J. Mol. Biol.* 426, 510–525. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.043>
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., Buckingham, M., 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064–2067. <https://doi.org/10.1126/science.1114758>
- Montealegre, S., Abramova, A., Manceau, V., Kanter, A.-F. de, Endert, P. van, 2019. The role of MHC class I recycling and Arf6 in cross-presentation by murine dendritic cells. *Life Sci. Alliance* 2. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900464>
- Morgan, J., Partridge, T., 2020. Skeletal muscle in health and disease. *Dis. Model. Mech.* 13. <https://doi.org/10.1242/dmm.042192>
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., Sundquist, W.I., 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26, 4215–4227. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601850>
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., Sundquist, W.I., 2011. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.02.004>
- Morooka, T., Nishida, E., 1998. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 24285–24288. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24285>
- Morris, C.R., Stanton, M.J., Manthey, K.C., Oh, K.B., Wagner, K.-U., 2012. A knockout of the Tsg101 gene leads to decreased expression of ErbB receptor tyrosine kinases and induction of autophagy prior to cell death. *PLoS One* 7, e34308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034308>
- Morvan, J., Rinaldi, B., Friant, S., 2012. Pkh1/2-dependent phosphorylation of Vps27 regulates ESCRT-I recruitment to endosomes. *Mol. Biol. Cell* 23, 4054–4064. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-01-0001>
- Mukund, K., Subramaniam, S., 2020. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 12, e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Munthe, E., Raiborg, C., Stenmark, H., Wenzel, E.M., 2020. Clathrin regulates Wnt/ β -catenin signaling by affecting Golgi to plasma membrane transport of transmembrane proteins. *J. Cell Sci.* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.244467>
- Murata-Shinozaki, Y., Takahashi, T., Matsubara, T., Maruyama, H., Izumi, Y., Matsumoto, M., 2017. The origins of rimmed vacuoles and granulovacuolar degeneration bodies are associated with the Wnt signaling pathway. *Neurosci. Lett.* 638, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.014>
- Murk, J.-L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., 2002. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 303–311. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000605>
- Nagata, Y., Partridge, T.A., Matsuda, R., Zammit, P.S., 2006. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 174, 245–253. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605028>
- Nakamori, M., Takahashi, T., Nishikawa, T., Yamazaki, Y., Kurashige, T., Maruyama, H., Arihiro, K., Matsumoto, M., 2013. Molecular markers for granulovacuolar degeneration are present in rimmed vacuoles. *PLoS One* 8, e80995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080995>
- Nakamura, S., Yoshimori, T., 2017. New insights into autophagosome–lysosome fusion. *J. Cell Sci.* 130, 1209–

1216. <https://doi.org/10.1242/jcs.196352>

Naureckiene, S., Sleat, D.E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R., Jadot, M., Lobel, P., 2000. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298–2301. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2298>

Ogura, K., Niino, Y.S., Tai, T., 2004. Galactosylceramide expression factor-1 induces myogenesis in MDCK and C3H10T1/2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight Issue on Glycobiology Dedicated to the Memory of Victor Ginsburg 426, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.029>

Oh, K.B., Stanton, M.J., West, W.W., Todd, G.L., Wagner, K.-U., 2007. Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation. *Oncogene* 26, 5950–5959. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210401>

Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, T., Yamada, M., Fujimoto, T., Sakai, Y., 2017. Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J. Cell Biol.* 216, 3263–3274. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611029>

Okumura, M., Ichioka, F., Kobayashi, R., Suzuki, H., Yoshida, H., Shibata, H., Maki, M., 2009. Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca²⁺-dependent adaptor that bridges Alix and TSG101. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.015>

Olguín, H.C., Pisconti, A., 2012. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1013–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01348.x>

Olwin, B.B., Hauschka, S.D., 1988. Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. *J. Cell Biol.* 107, 761–769. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.761>

Oshima, R., Hasegawa, T., Tamai, K., Sugeno, N., Yoshida, S., Kobayashi, J., Kikuchi, A., Baba, T., Futatsugi, A., Sato, I., Satoh, K., Takeda, A., Aoki, M., Tanaka, N., 2016. ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways. *Sci. Rep.* 6, 24997. <https://doi.org/10.1038/srep24997>

Osseni, A., Ravel-Chapuis, A., Thomas, J.-L., Gache, V., Schaeffer, L., Jasmin, B.J., 2020. HDAC6 regulates microtubule stability and clustering of AChRs at neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.* 219. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901099>

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M.C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L.F., Thery, C., 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30; sup pp 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>

Palacios, D., Mozzetta, C., Consalvi, S., Caretti, G., Saccone, V., Proserpio, V., Marquez, V.E., Valente, S., Mai, A., Forcales, S.V., Sartorelli, V., Puri, P.L., 2010. TNF/p38 α /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell* 7, 455–469. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.013>

Park, I.-H., Chen, J., 2005. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Is Required for a Late-stage Fusion Process during Skeletal Myotube Maturation. *J. Biol. Chem.* 280, 32009–32017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506120200>

Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.-Y., Kunz, S., 2011. Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog.* 7, e1002232. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002232>

Pastoret, C., Sebillé, A., 1993. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* NMD 3, 471–475. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(93\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0960-8966(93)90099-6)

Pawlikowski, B., Vogler, T.O., Gadek, K., Olwin, B.B., 2017. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Dev. Dyn.* 246, 359–367. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24495>

- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., Weissenhorn, W., 2011. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.004>
- Pepperl, J., Reim, G., Lüthi, U., Kaech, A., Hausmann, G., Basler, K., 2013. Sphingolipid depletion impairs endocytic traffic and inhibits Wingless signaling. *Mech. Dev.* 130, 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.04.001>
- Perdiguerro, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardí, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M., Caelles, C., Serrano, A.L., Wagner, E.F., Muñoz-Cánoves, P., 2007. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J.* 26, 1245–1256. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601587>
- Perry, M.M., Gilbert, A.B., 1979. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J. Cell Sci.* 39, 257–272.
- Perry, R.L., Parker, M.H., Rudnicki, M.A., 2001. Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol. Cell* 8, 291–301. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00302-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00302-1)
- Petiot, A., Faure, J., Stenmark, H., Gruenberg, J., 2003. PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J. Cell Biol.* 162, 971–979. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303018>
- Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M., Koutsilieris, M., 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 7, 208–218.
- Philips, J.A., Porto, M.C., Wang, H., Rubin, E.J., Perrimon, N., 2008. ESCRT factors restrict mycobacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3070–3075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707206105>
- Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H., Stevens, T.H., 1995. VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 603–617. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.603>
- Piper, R.C., Dikic, I., Lukacs, G.L., 2014. Ubiquitin-Dependent Sorting in Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016808>
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., Di Fiore, P.P., 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451–455. <https://doi.org/10.1038/416451a>
- Pon, J.R., Marra, M.A., 2015. MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes. *Oncotarget* 7, 2297–2312. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6223>
- Porto-Carreiro, I., Février, B., Paquet, S., Vilette, D., Raposo, G., 2005. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.06.013>
- Possidonio, Ana C. B., Miranda, M., Gregoracci, G.B., Thompson, F.L., Costa, M.L., Mermelstein, C., 2014. Cholesterol depletion induces transcriptional changes during skeletal muscle differentiation. *BMC Genomics* 15, 544. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-544>
- Possidonio, Ana Claudia Batista, Soares, C.P., Portilho, D.M., Midlej, V., Benchimol, M., Butler-Browne, G., Costa, M.L., Mermelstein, C., 2014. Differences in the Expression and Distribution of Flotillin-2 in Chick, Mice and Human Muscle Cells. *PLoS ONE* 9, e103990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103990>
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., Spang, A., 2010. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011>
- Potthoff, M.J., Olson, E.N., 2007. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Dev. Camb. Engl.* 134, 4131–4140. <https://doi.org/10.1242/dev.008367>
- Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., Emerson, C.P., 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 747–783. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105758>

- Prag, G., Watson, H., Kim, Y.C., Beach, B.M., Ghirlando, R., Hummer, G., Bonifacino, J.S., Hurley, J.H., 2007. The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev. Cell* 12, 973–986. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.013>
- Pridgeon, J.W., Webber, E.A., Sha, D., Li, L., Chin, L.-S., 2009. Proteomic analysis reveals Hrs ubiquitin-interacting motif-mediated ubiquitin signaling in multiple cellular processes. *FEBS J.* 276, 118–131. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06760.x>
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Lindsay, M.R., Gray, S.R., Richardson, S.C.W., Stewart, A., James, D.E., Piper, R.C., Luzio, J.P., 2004. Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5, 590–595. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400150>
- Qi, S., Su, L., Li, J., Zhang, C., Ma, Z., Liu, G., Zhang, Q., Jia, G., Piao, Y., Zhang, S., 2019. Arf6-driven endocytic recycling of CD147 determines HCC malignant phenotypes. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 471. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1464-9>
- Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., Piel, M., 2016. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* 352, 359–362. <https://doi.org/10.1126/science.aad7611>
- Rahman, M.A., Terasawa, M., Mostofa, M.G., Ushimaru, T., 2018. The TORC1-Nem1/Spo7-Pah1/lipin axis regulates microautophagy induction in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.011>
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., Stenmark, H., 2002. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* 4, 394–398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>
- Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E., Stenmark, H., 2001a. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.* 20, 5008–5021. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.5008>
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E., Stenmark, H., 2001b. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell Sci.* 114, 2255–2263.
- Raiborg, C., Wesche, J., Malerød, L., Stenmark, H., 2006. Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J. Cell Sci.* 119, 2414–2424. <https://doi.org/10.1242/jcs.02978>
- Rao, S.S., Chu, C., Kohtz, D.S., 1994. Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5259–5267. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.8.5259>
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., Stevens, T.H., 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol. Biol. Cell* 3, 1389–1402. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.12.1389>
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., Buckingham, M., 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953. <https://doi.org/10.1038/nature03594>
- Ridgeway, A.G., Petropoulos, H., Wilton, S., Skerjanc, I.S., 2000. Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J. Biol. Chem.* 275, 32398–32405. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004349200>
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122, 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
- Rion, N., Castets, P., Lin, S., Enderle, L., Reinhard, J.R., Eickhorst, C., Rüegg, M.A., 2019. mTOR controls embryonic and adult myogenesis via mTORC1. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.172460>
- Roman, W., Gomes, E.R., 2018. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin. Cell Dev. Biol., SI: Nuclear positioning* 82, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.11.005>

- Rome, S., Forterre, A., Mizgier, M.L., Bouzakri, K., 2019. Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00929>
- Rotwein, P., Wilson, E.M., 2009. Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Physiol.* 219, 503–511. <https://doi.org/10.1002/jcp.21692>
- Row, P.E., Clague, M.J., Urbé, S., 2005. Growth factors induce differential phosphorylation profiles of the Hrs-STAM complex: a common node in signalling networks with signal-specific properties. *Biochem. J.* 389, 629–636. <https://doi.org/10.1042/BJ20050067>
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., Urbé, S., 2006. The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* 281, 12618–12624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512615200>
- Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., Jaenisch, R., 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383–390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90508-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90508-a)
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., Jaenisch, R., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351–1359. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90621-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90621-v)
- Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M.M., Le Grand, F., 2016. β -Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* 15, 1277–1290. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.022>
- Ruiz-Bonilla, V., Perdiguero, E., Gresh, L., Serrano, A.L., Zamora, M., Sousa-Victor, P., Jardí, M., Wagner, E.F., Muñoz-Cánoves, P., 2008. Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 2208–2214. <https://doi.org/10.4161/cc.7.14.6273>
- Ruland, J., Sirard, C., Elia, A., MacPherson, D., Wakeham, A., Li, L., Luis de la Pompa, J., Cohen, S.N., Mak, T.W., 2001. p53 Accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1859–1864.
- Rusten, T.E., Rodahl, L.M.W., Pattni, K., Englund, C., Samakovlis, C., Dove, S., Brech, A., Stenmark, H., 2006. Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors. *Mol. Biol. Cell* 17, 3989–4001. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0239>
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Stenmark, H., 2011. Shaping development with ESCRTs. *Nat. Cell Biol.* 14, 38–45. <https://doi.org/10.1038/ncb2381>
- Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., Rudnicki, M.A., 1999. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 144, 631–643. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.631>
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Poticchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L., 2011. MICROAUTOPHAGY OF CYTOSOLIC PROTEINS BY LATE ENDOSOMES. *Dev. Cell* 20, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., Emr, S.D., 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.013>
- Sampath, Srihari C., Sampath, Srinath C., Millay, D.P., 2018. Myoblast fusion confusion: the resolution begins. *Skelet. Muscle* 8, 3. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3>
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sarkar, S., Carroll, B., Buganim, Y., Maetzel, D., Ng, A.H.M., Cassidy, J.P., Cohen, M.A., Chakraborty, S., Wang, H., Spooner, E., Ploegh, H., Gsponer, J., Korolchuk, V.I., Jaenisch, R., 2013. Impaired autophagy in the lipid-storage

disorder Niemann-Pick type C1 disease. *Cell Rep.* 5, 1302–1315. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.042>

Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., Colombo, M.I., 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 20083–20090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301642200>

Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., Jaiswal, J.K., 2014. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* 5, 5646. <https://doi.org/10.1038/ncomms6646>

Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., Sandri, M., 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280, 4294–4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253>

Schmidt, M.H.H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F.B., Cavenee, W.K., Dikic, I., Bögler, O., 2004. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8981–8993. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8981-8993.2004>

Schmidt, O., Teis, D., 2012. The ESCRT machinery. *Curr. Biol.* CB 22, R116-120. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>

Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S.W., Simons, M., 2008. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2874–2882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008>

Schöneberg, J., Pavlin, M.R., Yan, S., Righini, M., Lee, I.-H., Carlson, L.-A., Bahrami, A.H., Goldman, D.H., Ren, X., Hummer, G., Bustamante, C., Hurley, J.H., 2018. ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. *Science* 362, 1423–1428. <https://doi.org/10.1126/science.aat1839>

Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O.M., Ruegg, U.T., Schittny, J., Müller, U., 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* 4, 673–685. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00118-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00118-7)

Scott, C.C., Vacca, F., Gruenberg, J., 2014. Endosome maturation, transport and functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 31, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A., 2000. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* 102, 777–786. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00066-0)

Seto, E.S., Bellen, H.J., 2006. Internalization is required for proper Wingless signaling in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 173, 95–106. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510123>

Sheehan, S.M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C.J., Allen, R.E., 2000. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 23, 239–245. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(200002\)23:2<239::aid-mus15>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(200002)23:2<239::aid-mus15>3.0.co;2-u)

Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C.B., Warren, G., Mellman, I., 2002. Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 156, 797–804. <https://doi.org/10.1083/jcb.20111048>

Shekhtman, A., Cowburn, D., 2002. A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1222–1227. [https://doi.org/10.1016/S0006-291x\(02\)02006-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291x(02)02006-5)

Sheng, Z., Yu, L., Zhang, T., Pei, X., Li, X., Zhang, Z., Du, W., 2016. ESCRT-0 complex modulates Rbf-mutant cell survival by regulating Rhomboid endosomal trafficking and EGFR signaling. *J. Cell Sci.* 129, 2075–2084. <https://doi.org/10.1242/jcs.182261>

Shewan, A.M., van Dam, E.M., Martin, S., Luen, T.B., Hong, W., Bryant, N.J., James, D.E., 2003. GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol. Biol. Cell* 14, 973–986. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0315>

- Shim, S., Kimpler, L.A., Hanson, P.I., 2007. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic Cph. Den.* 8, 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00584.x>
- Shin, N.-Y., Choi, H., Neff, L., Wu, Y., Saito, H., Ferguson, S.M., De Camilli, P., Baron, R., 2014. Dynamin and endocytosis are required for the fusion of osteoclasts and myoblasts. *J. Cell Biol.* 207, 73–89. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401137>
- Shu, L., Houghton, P.J., 2009. The mTORC2 Complex Regulates Terminal Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4691–4700. <https://doi.org/10.1128/MCB.00764-09>
- Sierra, M.I., Wright, M.H., Nash, P.D., 2010. AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. *J. Biol. Chem.* 285, 13990–14004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061309>
- Sin, J., Andres, A.M., Taylor, D.J.R., Weston, T., Hiraumi, Y., Stotland, A., Kim, B.J., Huang, C., Doran, K.S., Gottlieb, R.A., 2016. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy* 12, 369–380. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1115172>
- Singh, D., Kumar Roy, J., 2013. Rab11 Plays an Indispensable Role in the Differentiation and Development of the Indirect Flight Muscles in *Drosophila*. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073305>
- Singh, K., Dilworth, F.J., 2013. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J.* 280, 3991–4003. <https://doi.org/10.1111/febs.12188>
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R.G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., Nassoy, P., 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>
- Skapek, S.X., Rhee, J., Kim, P.S., Novitch, B.G., Lassar, A.B., 1996. Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7043–7053. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.7043>
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M.N., Gade, A., Johannsen, P., Sørensen, S.A., Gydesen, S., Fisher, E.M.C., Collinge, J., 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* 37, 806–808. <https://doi.org/10.1038/ng1609>
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., Stenmark, H., 2005. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J. Biol. Chem.* 280, 19600–19606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501510200>
- Slater, C.R., 2017. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18102183>
- Smith, L., Fabian, L., Al-Maawali, A., Noche, R.R., Dowling, J.J., 2020. De novo phosphoinositide synthesis in zebrafish is required for triad formation but not essential for myogenesis. *PLOS ONE* 15, e0231364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231364>
- Sorkin, A., von Zastrow, M., 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 609–622. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>
- Springael, J.Y., Nikko, E., André, B., Marini, A.M., 2002. Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett.* 517, 103–109. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02586-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02586-3)
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H., D'Arrigo, A., 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is

mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 271, 24048–24054. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.24048>

Stern, K.A., Visser Smit, G.D., Place, T.L., Winistorfer, S., Piper, R.C., Lill, N.L., 2007. Epidermal growth factor receptor fate is controlled by Hrs tyrosine phosphorylation sites that regulate Hrs degradation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 888–898. <https://doi.org/10.1128/MCB.02356-05>

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., Göttlinger, H.G., 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689–699. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00653-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00653-6)

Stringer, D.K., Piper, R.C., 2011. A single ubiquitin is sufficient for cargo protein entry into MVBs in the absence of ESCRT ubiquitination. *J. Cell Biol.* 192, 229–242. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008121>

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., Brech, A., 2009. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* 10, 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>

Sumitani, S., Goya, K., Testa, J.R., Kouhara, H., Kasayama, S., 2002. Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology* 143, 820–828. <https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8687>

Sun, S., Zhou, X., Zhang, W., Gallick, G.E., Kuang, J., 2015. Unravelling the pivotal role of Alix in MVB sorting and silencing of the activated EGFR. *Biochem. J.* 466, 475–487. <https://doi.org/10.1042/BJ20141156>

Szymanska, E., Budick-Harmelin, N., Miaczynska, M., 2018. Endosomal “sort” of signaling control: The role of ESCRT machinery in regulation of receptor-mediated signaling pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* 74, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.012>

Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., De Robertis, E.M., 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136–1148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.034>

Takahashi, H., Mayers, J.R., Wang, L., Edwardson, J.M., Audhya, A., 2015. Hrs and STAM Function Synergistically to Bind Ubiquitin-Modified Cargoes In Vitro. *Biophys. J.* 108, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.004>

Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M.M., Serfass, J.M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., Wills, C.A., Atkinson, J.M., Chen, H., Abraham, T., Wang, H.-G., 2018. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat. Commun.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05254-w>

Takata, H., Kato, M., Denda, K., Kitamura, N., 2000. A hrs binding protein having a Src homology 3 domain is involved in intracellular degradation of growth factors and their receptors. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 5, 57–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00303.x>

Takeshita, T., Arita, T., Asao, H., Tanaka, N., Higuchi, M., Kuroda, H., Kaneko, K., Munakata, H., Endo, Y., Fujita, T., Sugamura, K., 1996. Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 1035–1039. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1290>

Talbot, J., Maves, L., 2016. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, 518–534. <https://doi.org/10.1002/wdev.230>

Tamai, K., Tanaka, N., Nakano, T., Kakazu, E., Kondo, Y., Inoue, J., Shiina, M., Fukushima, K., Hoshino, T., Sano, K., Ueno, Y., Shimosegawa, T., Sugamura, K., 2010. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>

Tamai, K., Tanaka, N., Nara, A., Yamamoto, A., Nakagawa, I., Yoshimori, T., Ueno, Y., Shimosegawa, T., Sugamura, K., 2007. Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.105>

Tamai, K., Toyoshima, M., Tanaka, N., Yamamoto, N., Owada, Y., Kiyonari, H., Murata, K., Ueno, Y., Ono, M.,

- Shimosegawa, T., Yaegashi, N., Watanabe, M., Sugamura, K., 2008. Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am. J. Pathol.* 173, 1806–1817. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080684>
- Tamir, Y., Bengal, E., 2000. Phosphoinositide 3-Kinase Induces the Transcriptional Activity of MEF2 Proteins during Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* 275, 34424–34432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005815200>
- Tang, S., Buchkovich, N.J., Henne, W.M., Banjade, S., Kim, Y.J., Emr, S.D., 2016. ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15507>
- Tang, S., Henne, W.M., Borbat, P.P., Buchkovich, N.J., Freed, J.H., Mao, Y., Fromme, J.C., Emr, S.D., 2015. Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.12548>
- Tapscott, S.J., 2005. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2685–2695. <https://doi.org/10.1242/dev.01874>
- Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., Allen, R.E., 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* 194, 114–128. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8803>
- Taylor, M.J., Perrais, D., Merrifield, C.J., 2011. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLOS Biol.* 9, e1000604. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000604>
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., Emr, S.D., 2010. ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* 29, 871–883. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.408>
- Teo, H., Perisic, O., González, B., Williams, R.L., 2004. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev. Cell* 7, 559–569. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.003>
- Thien, C.B., Langdon, W.Y., 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 294–307. <https://doi.org/10.1038/35067100>
- Thorley, M., Duguez, S., Mazza, E.M.C., Valsoni, S., Bigot, A., Mamchaoui, K., Harmon, B., Voit, T., Mouly, V., Duddy, W., 2016. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. *Skelet. Muscle* 6. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0115-5>
- Tiainen, M., Pajalunga, D., Ferrantelli, F., Soddu, S., Salvatori, G., Sacchi, A., Crescenzi, M., 1996. Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1039–1050.
- Tidball, J.G., 2017. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 165–178. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>
- Tortorella, L.L., Milasincic, D.J., Pilch, P.F., 2001. Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 13709–13717. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100091200>
- Townley-Tilson, W.H.D., Callis, T.E., Wang, D., 2010. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1252–1255. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.002>
- Toyoshima, M., Tanaka, N., Aoki, J., Tanaka, Y., Murata, K., Kyuuma, M., Kobayashi, H., Ishii, N., Yaegashi, N., Sugamura, K., 2007. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Depletion of Vesicular Sorting Protein Hrs: Its Regulatory Role on E-Cadherin and β -Catenin. *Cancer Res.* 67, 5162–5171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2756>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M.,

2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Urbé, S., Mills, I.G., Stenmark, H., Kitamura, N., Clague, M.J., 2000. Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol. Cell Biol.* 20, 7685–7692. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.20.7685-7692.2000>
- Urbé, S., Sachse, M., Row, P.E., Preisinger, C., Barr, F.A., Strous, G., Klumperman, J., Clague, M.J., 2003. The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation. *J. Cell Sci.* 116, 4169–4179. <https://doi.org/10.1242/jcs.00723>
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., Göttinger, H., 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 181–184. <https://doi.org/10.1042/BST0370181>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van der Velden, J.L.J., Langen, R.C.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M., Janssen-Heininger, Y.M.W., Schols, A.M.W.J., 2006. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C453–462. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00068.2005>
- van der Velden, J.L.J., Schols, A.M.W.J., Willems, J., Kelders, M.C.J.M., Langen, R.C.J., 2008. Glycogen synthase kinase 3 suppresses myogenic differentiation through negative regulation of NFATc3. *J. Biol. Chem.* 283, 358–366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707812200>
- van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., Fisher, E.M., Collinge, J., Isaacs, A.M., Van Broeckhoven, C., 2008. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 17, 313–322. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm309>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., Raposo, G., 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* 21, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- van Weert, A.W.M., Geuze, H.J., Groothuis, B., Stoorvogel, W., 2000. Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 394–399. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00062>
- Vassilopoulos, S., Gentil, C., Lainé, J., Buclez, P.-O., Franck, A., Ferry, A., Précigout, G., Roth, R., Heuser, J.E., Brodsky, F.M., Garcia, L., Bonne, G., Voit, T., Piétri-Rouxel, F., Bitoun, M., 2014. Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *J. Cell Biol.* 205, 377–393. <https://doi.org/10.1083/jcb.201309096>
- Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H., Birchmeier, C., 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8935–8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902501106>
- Veetil, M.V., Kumar, B., Ansari, M.A., Dutta, D., Iqbal, J., Gjyshi, O., Bottero, V., Chandran, B., 2016. ESCRT-0 Component Hrs Promotes Macropinocytosis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *J. Virol.* 90, 3860–3872. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-15>
- Vida, T.A., Emr, S.D., 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128, 779–792. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.779>
- Vietri, M., Radulovic, M., Stenmark, H., 2020a. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 25–42. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>
- Vietri, M., Radulovic, M., Stenmark, H., 2020b. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 25–42.

<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>

Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., Stenmark, H., 2015. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* 522, 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature14408>

Vilette, D., Courte, J., Peyrin, J.M., Coudert, L., Schaeffer, L., Andréoletti, O., Leblanc, P., 2018. Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 2557–2574. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2823-y>

Vilette, D., Laulagnier, K., Huor, A., Alais, S., Simoes, S., Maryse, R., Provansal, M., Lehmann, S., Andreoletti, O., Schaeffer, L., Raposo, G., Leblanc, P., 2015. Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 4409–4427. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1945-8>

Villegas, F., Lehalle, D., Mayer, D., Rittirsch, M., Stadler, M.B., Zinner, M., Olivieri, D., Vabres, P., Duplomb-Jego, L., De Bont, E.S.J.M., Duffourd, Y., Duijkers, F., Avila, M., Geneviève, D., Houcinat, N., Jouan, T., Kuentz, P., Lichtenbelt, K.D., Thauvin-Robinet, C., St-Onge, J., Thevenon, J., van Gassen, K.L.I., van Haelst, M., van Koningsbruggen, S., Hess, D., Smallwood, S.A., Rivière, J.-B., Faivre, L., Betschinger, J., 2019. Lysosomal Signaling Licenses Embryonic Stem Cell Differentiation via Inactivation of Tfe3. *Cell Stem Cell* 24, 257-270.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.021>

Von Bartheld, C.S., Altick, A.L., 2011. Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog. Neurobiol.* 93, 313–340. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.003>

von Maltzahn, J., Bentzinger, C.F., Rudnicki, M.A., 2011. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 14, 186–191. <https://doi.org/10.1038/ncb2404>

von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Müller, B., Ward, D.M., Chung, H.-Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.-P., Cimborá, D.M., Scott, A., Kräusslich, H.-G., Kaplan, J., Morham, S.G., Sundquist, W.I., 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701–713. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00714-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00714-1)

von Zastrow, M., Sorkin, A., 2007. Signaling on the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.021>

Vonderheit, A., Helenius, A., 2005. Rab7 Associates with Early Endosomes to Mediate Sorting and Transport of Semliki Forest Virus to Late Endosomes. *PLOS Biol.* 3, e233. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030233>

Wan, G.-W., Xie, H., Mao, C.-Q., Tang, R.-Q., Yao, C., Wang, Z., 2016. [Difference in inclusion behavior of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin with menthol]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* 41, 3336–3341. <https://doi.org/10.4268/cjcm20161805>

Wang, C., Liu, W., Nie, Y., Qaher, M., Horton, H.E., Yue, F., Asakura, A., Kuang, S., 2017. Loss of MyoD Promotes Fate Transdifferentiation of Myoblasts Into Brown Adipocytes. *EBioMedicine* 16, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.01.015>

Wang, H., Xu, Q., Xiao, F., Jiang, Y., Wu, Z., 2008. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, and gamma isoforms in myogenic differentiation. *Mol. Biol. Cell* 19, 1519–1528. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0817>

Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., 2017. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol. Neurodegener.* 12, 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>

Wang, Y.X., Rudnicki, M.A., 2012. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 127–133. <https://doi.org/10.1038/nrm3265>

Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M.Z., Segal, R.A., 2001. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat. Neurosci.* 4, 981–988. <https://doi.org/10.1038/nn720>

- Watson, J.A., Bhattacharyya, B.J., Vaden, J.H., Wilson, J.A., Icyuz, M., Howard, A.D., Phillips, E., DeSilva, T.M., Siegal, G.P., Bean, A.J., King, G.D., Phillips, S.E., Miller, R.J., Wilson, S.M., 2015. Motor and Sensory Deficits in the teetering Mice Result from Mutation of the ESCRT Component HGS. *PLoS Genet.* 11, e1005290. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005290>
- Wegner, C.S., Rodahl, L.M.W., Stenmark, H., 2011. ESCRT proteins and cell signalling. *Traffic Cph. Den.* 12, 1291–1297. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01210.x>
- Wenzel, E.M., Schultz, S.W., Schink, K.O., Pedersen, N.M., Nähse, V., Carlson, A., Brech, A., Stenmark, H., Raiborg, C., 2018. Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. *Nat. Commun.* 9, 2932. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05345-8>
- White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., Zammit, P.S., 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev. Biol.* 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-21>
- Winter, B., Arnold, H.H., 2000. Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. *J. Cell Sci.* 113 Pt 23, 4211–4220.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., Polo, S., 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* 2, 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-11>
- Wollert, T., Hurley, J.H., 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869. <https://doi.org/10.1038/nature08849>
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., Hurley, J.H., 2009a. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature07836>
- Wollert, T., Yang, D., Ren, X., Lee, H.H., Im, Y.J., Hurley, J.H., 2009b. The ESCRT machinery at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 2163–2166. <https://doi.org/10.1242/jcs.029884>
- Wu, A.-L., Kim, J.-H., Zhang, C., Unterman, T.G., Chen, J., 2008. Forkhead box protein O1 negatively regulates skeletal myocyte differentiation through degradation of mammalian target of rapamycin pathway components. *Endocrinology* 149, 1407–1414. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1470>
- Wu, Z., Woodring, P.J., Bhakta, K.S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J.R., Karin, M., Wang, J.Y.J., Puri, P.L., 2000a. p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3951–3964.
- Wu, Z., Woodring, P.J., Bhakta, K.S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J.R., Karin, M., Wang, J.Y.J., Puri, P.L., 2000b. p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3951–3964.
- Xie, S.-J., Li, J.-H., Chen, H.-F., Tan, Y.-Y., Liu, S.-R., Zhang, Y., Xu, H., Yang, J.-H., Liu, S., Zheng, L.-L., Huang, M.-B., Guo, Y.-H., Zhang, Q., Zhou, H., Qu, L.-H., 2018. Inhibition of the JNK/MAPK signaling pathway by myogenesis-associated miRNAs is required for skeletal muscle development. *Cell Death Differ.* 25, 1581–1597. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0063-1>
- Xie, W., Li, L., Cohen, S.N., 1998. Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1595–1600. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1595>
- Xu, M., Chen, X., Chen, D., Yu, B., Huang, Z., 2017. FoxO1: a novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type specification. *Oncotarget* 8, 10662–10674. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12891>
- Xu, S., Wang, J., Ding, N., Hu, W., Zhang, X., Wang, B., Hua, J., Wei, W., Zhu, Q., 2015. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol.* 12, 1355–1363. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1100795>
- Yablonka-Reuveni, Z., Seger, R., Rivera, A.J., 1999. Fibroblast Growth Factor Promotes Recruitment of Skeletal

Muscle Satellite Cells in Young and Old Rats. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 23–42. <https://doi.org/10.1177/002215549904700104>

Yaffe, D., Saxel, O., 1977. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differ. Res. Biol. Divers.* 7, 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1977.tb01507.x>

Yamada, M., Sankoda, Y., Tatsumi, R., Mizunoya, W., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K., Allen, R.E., 2008. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2183–2191. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.02.017>

Yan, Q., Sun, W., Kujala, P., Lotfi, Y., Vida, T.A., Bean, A.J., 2005. CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol. Biol. Cell* 16, 2470–2482. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1014>

Yang, B., Stjepanovic, G., Shen, Q., Martin, A., Hurley, J.H., 2015. Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 492–498. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3015>

Ye, Y., Gao, J.-X., Tian, H., Yearsley, K., Lange, A.R., Robertson, F.M., Barsky, S.H., 2012. Early to intermediate steps of tumor embolic formation involve specific proteolytic processing of E-cadherin regulated by Rab7. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 713–726. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0009>

Yohe, M.E., Gryder, B.E., Shern, J.F., Song, Y.K., Chou, H.-C., Sindiri, S., Mendoza, A., Patidar, R., Zhang, X., Guha, R., Butcher, D., Isanogle, K.A., Robinson, C.M., Luo, X., Chen, J.-Q., Walton, A., Awasthi, P., Edmondson, E.F., Difilippantonio, S., Wei, J.S., Zhao, K., Ferrer, M., Thomas, C.J., Khan, J., 2018. MEK inhibition induces MYOG and remodels super-enhancers in RAS-driven rhabdomyosarcoma. *Sci. Transl. Med.* 10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4470>

Yu, J.S.L., Cui, W., 2016. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Dev. Camb. Engl.* 143, 3050–3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>

Yu, Z., Zeng, J., Wang, J., Cui, Y., Song, X., Zhang, Y., Cheng, X., Hou, N., Teng, Y., Lan, Y., Chen, Y., Yang, X., 2020. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate is essential for endothelial cell polarity and cerebrovascular stability. *Cardiovasc. Res.* <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa016>

Zammit, P.S., 2017. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.011>

Zanou, N., Gailly, P., 2013. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 4117–4130. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1330-4>

Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., Bogoyevitch, M.A., 2016. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 80, 793–835. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-14>

Zelnikar, M., Benčina, M., Jerala, R., Manček-Keber, M., 2014. Vanadate from Air Pollutant Inhibits Hrs-Dependent Endosome Fusion and Augments Responsiveness to Toll-Like Receptors. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099287>

Zerial, M., McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>

Zetser, A., Gredinger, E., Bengal, E., 1999. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Promotes Skeletal Muscle Differentiation PARTICIPATION OF THE MEF2C TRANSCRIPTION FACTOR. *J. Biol. Chem.* 274, 5193–5200. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5193>

Zhang, J., Du, J., Lei, C., Liu, M., Zhu, A.J., 2014. Ubpy controls the stability of the ESCRT-0 subunit Hrs in development. *Dev. Camb. Engl.* 141, 1473–1479. <https://doi.org/10.1242/dev.099564>

- Zhang, K., Sha, J., Harter, M.L., 2010. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *J. Cell Biol.* 188, 39–48. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904144>
- Zhang, Q., Duplany, A., Moncollin, V., Mouradian, S., Goillot, E., Mazelin, L., Gauthier, K., Streichenberger, N., Angleraux, C., Chen, J., Ding, S., Schaeffer, L., Gangloff, Y.-G., 2019. Lack of muscle mTOR kinase activity causes early onset myopathy and compromises whole-body homeostasis. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* 10, 35–53. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12336>
- Zhang, Y., Song, M., Cui, Z.S., Li, C.Y., Xue, X.X., Yu, M., Lu, Y., Zhang, S.Y., Wang, E.H., Wen, Y.Y., 2011. Down-regulation of TSG101 by small interfering RNA inhibits the proliferation of breast cancer cells through the MAPK/ERK signal pathway. *Histol. Histopathol.* 26, 87–94. <https://doi.org/10.14670/HH-26.87>
- Zhen, Y., Spangenberg, H., Munson, M.J., Brech, A., Schink, K.O., Tan, K.-W., Sørensen, V., Wenzel, E.M., Radulovic, M., Engedal, N., Simonsen, A., Raiborg, C., Stenmark, H., 2020. ESCRT-mediated phagophore sealing during mitophagy. *Autophagy* 16, 826–841. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1639301>
- Zhou, F., Wu, Z., Zhao, M., Murtazina, R., Cai, J., Zhang, A., Li, R., Sun, D., Li, W., Zhao, L., Li, Q., Zhu, J., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Li, L., Huang, X., Xue, Y., Chen, L., Xu, Hui, Xu, Haiqian, Liang, Y., Segev, N., 2019. Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J. Cell Biol.* 218, 1908–1927. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811173>
- Zong, Y., Jin, R., 2013. Structural Mechanisms of the Agrin-LRP4-MuSK Signaling Pathway in Neuromuscular Junction Differentiation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 3077–3088. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1209-9>