



HAL
open science

Rôles physiopathologiques et moléculaires d'ASC-1 dans les maladies neuromusculaires congénitales

Justine Meunier

► **To cite this version:**

Justine Meunier. Rôles physiopathologiques et moléculaires d'ASC-1 dans les maladies neuromusculaires congénitales. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5273 . tel-04760578

HAL Id: tel-04760578

<https://theses.hal.science/tel-04760578v1>

Submitted on 30 Oct 2024

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.

Université Paris Cité

École Doctorale BioSPC - Bio Sorbonne Paris Cité – ED 562
*Laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) – Équipe de Myologie
Fondamentale et Translationnelle*

Rôles physiopathologiques et moléculaires d'ASC-1 dans les maladies neuromusculaires congénitales

Par **Justine MEUNIER**

Thèse de doctorat de **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Dirigée par **Ana FERREIRO**

Présentée et soutenue publiquement le **15/12/2023**

Devant un jury composé de :

Helge AMTHOR, MD, PhD
Martin CATALA, MD, PhD
Guillaume BASSEZ, MD, PhD
France PIETRI-ROUXEL, PhD
Véronique MONNIER, PhD
Ana FERREIRO, MD, PhD
Isabelle DUBAND-GOULET, PhD

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-encadrante de thèse

Titre : Rôles physiopathologiques et moléculaires d'ASC-1 dans les maladies neuromusculaires congénitales

Résumé :

L'étude des co-régulateurs transcriptionnels est un domaine émergent en Génétique qui attire une attention croissante dans les dernières années. Par l'identification d'une nouvelle forme de myopathie congénitale autosomique récessive due à des mutations dans le gène TRIP4, codant la sous-unité ASC-1 de l'Activating Signal Co-integrator-1 complex, notre équipe a établi que des défauts dans la corégulation transcriptionnelle représentent un nouveau mécanisme associé aux maladies neuromusculaires héréditaires. D'autres patients présentant des mutations du gène TRIP4 ont été diagnostiqués comme atteints d'amyotrophie spinale. Notre laboratoire a aussi établi qu'ASC-1 régule négativement la prolifération et positivement la différenciation et la croissance des cellules myogéniques. L'objectif de mon travail de thèse était d'identifier les voies et mécanismes régulés par ASC-1, en particulier ceux impliqués dans la myogenèse. J'ai contribué à définir le spectre phénotypique de cette nouvelle maladie et à clarifier les corrélations phénotype-génotype par la description génétique, clinique et histopathologique de quatre nouveaux patients issus de deux familles d'origine Rom présentant une même mutation homozygote sur le gène TRIP4, et par une révision de la littérature. J'ai aussi mis en évidence le rôle d'ASC-1 dans la myogenèse précoce en identifiant un retard dans l'induction de la différenciation et dans l'expression de régulateurs clé de la myogenèse, dans des C2C12 Trip4-knocked down. Sur ce modèle, j'ai réalisé une étude transcriptomique au deuxième jour de différenciation qui a révélé que l'absence d'ASC-1 affectait l'expression des gènes précoces de la myogenèse, et plus particulièrement les cibles des facteurs de transcription SRF et MyoD. Parallèlement, j'ai réalisé une analyse transcriptomique d'un muscle de patient TRIP4-knock-out qui a révélé certaines différences avec le modèle knock-down. J'ai donc fait générer une lignée C2C12 Trip4-knockout, via la technologie CRISPR/Cas9, afin de travailler sur un modèle plus stable et proche de la situation pathologique. L'absence totale d'ASC-1 dans le modèle Trip4-knockout s'est avéré plus délétère pour le phénotype de différenciation myogénique, particulièrement au niveau de la fusion des myoblastes et de la formation des myotubes, par rapport au modèle knockdown. Les C2C12 Trip4-KO surexprimaient SRF, MyoD et la Myogénine à partir du deuxième jour de différenciation, comme observé dans les résultats RNAseq de muscle de patient. J'ai montré qu'ASC-1 régule directement l'expression de MyoD mais pas de SRF mais aussi que SRF, le récepteur aux androgènes et une forme phosphorylée de MyoD co-immunoprécipitent avec ASC-1 dans les C2C12. Enfin, j'ai montré qu'ASC-1 est nécessaire pour l'activité de SRF et MyoD dans les C2C12 et que ASC-1 est capable de transactiver le récepteur aux androgènes. En parallèle, j'ai étudié la régulation transcriptionnelle de la prolifération et du cycle cellulaire par ASC-1. Une analyse transcriptomique sur des fibroblastes de patients a mis en évidence la surexpression des gènes impliqués dans les phases S/G2/M du cycle cellulaire, cibles du complexe répresseur DREAM et du complexe activateur FOXM1-MMB. En travaillant sur une lignée T98G TRIP4-KO, j'ai

confirmé la surexpression des gènes impliqués dans ces voies protéiques en absence d'ASC-1 et montré que le facteur de transcription FOXM1 co-immunoprécipite avec ASC-1. Nous supposons que la présence de la protéine ASC-1 réprime l'activité de ce complexe à certains moments du cycle et que la levée de cette répression en absence d'ASC-1 serait responsable du phénotype cellulaire d'hyperprolifération précédemment décrit. Ces résultats ont révélé un rôle novateur d'un coactivateur transcriptionnel ubiquitaire dans un processus cellulaire spécifique tel que la différenciation musculaire, à travers une interaction ciblée avec des facteurs de transcription qui sont les régulateurs maîtres de la myogenèse.

Mots clefs : ASC-1 ; TRIP4 ; Régulation de la myogenèse ; Co-régulation transcriptionnelle ; Myopathies congénitales ; Amyotrophie spinale ; Maladies génétiques rares ; Transcriptomique ; SRF ; MyoD

Title : Pathophysiological and molecular roles of ASC-1 in congenital neuromuscular diseases

Abstract :

The study of transcriptional co-regulators is an emerging field in genetics, which has attracted increasing attention in recent years. With the identification of a new form of autosomal recessive congenital myopathy due to mutations in the TRIP4 gene, encoding the ASC-1 subunit of the Activating Signal Co-integrator-1 complex, our team has established that defects in transcriptional coregulation represent a new mechanism associated with hereditary neuromuscular diseases. Other patients with TRIP4 mutations have been diagnosed with spinal muscular atrophy. Our laboratory has also established that ASC-1 negatively regulates proliferation and positively regulates differentiation and growth of myogenic cells. The aim of my thesis work was to identify the pathways and mechanisms regulated by ASC-1 in order to understand how defects in this ubiquitous protein cause severe neuromuscular phenotypes. I have helped to define the phenotypic spectrum of this new disease and to clarify the phenotype-genotype correlations through the genetic, clinical and histopathological description of four new patients, from two different families of Rom origin, with the same homozygous frameshift mutation in the TRIP4 gene, and through a critical review of the reported cases. I also demonstrated a role of ASC-1 in early myogenesis by identifying a delay in the induction of differentiation and in the transcriptional expression of key regulators of myogenesis, in Trip4-knockdown murine myogenic cells (Trip4-KD). In this same model, I carried out a transcriptomic study using RNAseq on the second day of differentiation, which revealed that the depletion of ASC-1 affected the expression of early myogenesis genes, and more specifically the targets of the SRF and MyoD transcription factors. In parallel, I performed transcriptomic analysis of a TRIP4-knock-out patient muscle which revealed some differences with the knocked-down model. I then opted for the generation of murine C2C12 Trip4-knock-out myoblasts using CRISPR/Cas9 technology, in order to work on a more stable model closer to the human pathological situation. The complete absence of ASC-1 in this model was more deleterious to the myogenic differentiation phenotype, particularly with respect to myoblast fusion and myotube formation, compared with the knocked-down model. Interestingly, C2C12 Trip4-KO overexpressed SRF, MyoD and Myogenin from the second day of differentiation, as observed in the RNAseq results of the patient muscle sample. I showed that ASC-1 directly regulates the expression of MyoD but not SRF. I also showed that SRF, the androgen receptor and a phosphorylated form of MyoD coimmunoprecipitate with ASC-1 in pre-differentiating C2C12. Finally, I showed that ASC-1 is required for SRF activity but also that ASC-1 is able to transactivate the androgen receptor. In parallel, I studied the transcriptional regulation of proliferation and of cell cycle by ASC-1. Transcriptomic analysis of patient fibroblasts revealed the overexpression of a large number of genes involved in the S/G2/M phases of the cell cycle. These genes are transcriptionally regulated by the DREAM repressor complex and the FOXM1-MMB activator complex during the cell cycle. Using a TRIP4-KO T98G cell line, I confirmed the overexpression of genes involved in these protein

pathways in the absence of ASC-1 and I showed that the transcription factor FOXM1 coimmunoprecipitates with ASC-1. We assume that the presence of the ASC-1 protein represses the activity of this complex at certain points in the cycle and transcriptional repression in the absence of ASC-1 would be responsible for the hyperproliferation phenotype previously described. These results revealed a novel role for a ubiquitous transcriptional co-activator in a specific cellular process such as muscle differentiation, through a targeted interaction with transcription factors that are the master regulators of myogenesis.

Key words: ASC-1; TRIP4; Myogenesis regulation; Transcriptional coregulation; Congenital myopathies; Spinal muscular atrophy; Rare genetic diseases; Transcriptomics; SRF; MyoD

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer l'ensemble mon travail de thèse. Je remercie les Pr. Helge Amthor et Pr. Martin Catala d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré du temps à l'évaluation de mon travail. Je remercie également le Dr. Véronique Monnier, qui avait déjà fait partie de mon comité de mi-thèse, ainsi que les Dr. France Pietri-Rouxel et Dr. Guillaume Bassez d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Je remercie également ma directrice de thèse, Ana Ferreira, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans son laboratoire. Merci pour toute la confiance et l'autonomie que tu as su me donner au cours de ces trois années. Je te remercie également de m'avoir inspiré, encouragé, formé et permis d'intégrer un axe clinique dans ma thèse qui m'a beaucoup passionné.

Je remercie infiniment ma co-encadrante de thèse, Isabelle Duband-Goulet, de m'avoir appris toutes les techniques expérimentales (je partais de loin lors de mon arrivée en M2...). Au long de ces années, tu m'as enseigné la patience, la persévérance, à repousser mes limites et parfois à accepter les échecs. Merci pour ta patience, ton soutien, ta gentillesse et ta disponibilité. Notre travail sur TRIP4 nous aura parfois donné du fil à retordre, mais nous avons su relever ensemble les défis. Sans toi, rien n'aurait été possible !

Je tiens également à remercier toute mon équipe d'accueil avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et d'échanger au cours de ces années. Merci à Andrew pour toute ton aide et ton travail sur les analyses de bio-informatique. Sans toi, toutes ces analyses RNAseq n'auraient pas été réalisables ! Merci à Anne pour les expériences d'immunofluorescence, la patience et le courage dont tu as fait preuve pour les comptages, mais surtout merci d'avoir été aussi gentille, bienveillante et attentionnée, particulièrement en cette fin de thèse. Merci à Sabrina pour tous tes conseils sur les MRFs, les expériences de luciférase, les phosphorylations de MyoD (et j'en passe...). Je te suis très reconnaissante de m'avoir partagé ton expertise au long de ma thèse. Enfin, je remercie Nathalie, Florence, Brigitte, Maryline et Alain, pour l'aide et les conseils qu'ils ont su m'accorder ces trois dernières années.

Je souhaite aussi remercier tous les étudiants avec qui j'ai eu le plaisir de partager « mon » bureau pendant ces trois années. Plus particulièrement, merci à mes petits rayons de soleil Justine et Yosra ! Vous m'avez apporté un grand réconfort et une immense aide au cours de ma troisième année de thèse. Et évidemment merci à Marie-Thérèse, qui m'a accueilli dès mon stage de M2 dans ce bureau, avec beaucoup de conseils et de bienveillance. Et merci d'avoir continué de me soutenir après ton départ du laboratoire. Bien que ma thèse soit terminée, je sais qu'on aura toujours le plaisir de faire nos apéros potins !

Je souhaite également remercier Laura Martinez Vicente, Lucía Galán Dávilla, Parcal Cintas, Mireille Cosse et Emanuelle Uro-Coste pour leur collaboration sur l'axe clinique de ma thèse.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à l'Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon) pour avoir apporté le soutien financier nécessaire à la réalisation de mes travaux de recherche.

Cette thèse est l'aboutissement d'une longue formation scientifique dont la genèse ne peut être évoquée sans parler d'un trio de choc : JYM'S. Merci de m'avoir accompagné depuis la classe de première S, en passant par la tant redoutée PACES à P6, et en terminant par la licence de Biologie à Jussieu.

Évidemment je tiens à remercier tous mes amis non-scientifiques d'avoir écouté et supporté tous mes longs discours sur mon sujet de thèse et toutes mes plaintes sur mes manip qui ne fonctionnaient pas. Mais surtout, je tiens à vous remercier pour tout le soutien moral, émotionnel, et évidemment tout l'amour que vous m'avez apporté au cours de ces trois années qui furent pleines de rebondissements, de galères et d'aventures sur bien des domaines. Merci à ma Julie (ma maman de cœur) et mon Clément pour les super week-end et fiesta à Londres, les apéros parisiens, les soirées Vésigondines et j'en passe ! Avec vous ma vie est une fête et remplie de bonheur. Vous êtes mes piliers depuis une dizaine d'année. Vous avez été d'un soutien inconditionnel toutes ces années et je vous aime pour ça (et pas que !). Merci à mon Léo d'avoir été si présent pour moi, d'avoir écouté mes plaintes dès 6h du matin, d'avoir su me faire rire à chaque fois que j'en avais besoin et surtout d'avoir vérifié chaque semaine si j'étais toujours en vie (entre mes accidents de surf, d'escalier ou encore l'explosion de mes fenêtres, ce n'était pas gagné). Merci à ma KitKat pour ta joie de vivre et nos week-end de folie à Bordeaux ; et merci à ma Zozo, mon incroyable voisine depuis nos 13 ans. Merci à ma Chloé pour ta gentillesse, ton soutien et ton écoute. Merci à AV, Oscar et Louis, et nos classiques « Castel's thursday ». Évidemment, merci à Thomas de m'avoir été d'un immense soutien mais surtout d'avoir supporté 26 de mes personnalités ces derniers mois, et plus particulièrement d'avoir affronté Patricia ! Tu m'as donné le courage et la force de me battre chaque matin, et je t'en suis infiniment reconnaissante. Enfin, un immense merci à ma Clara, mon âme sœur amicale. Bien que les aventures avec toi riment parfois avec galères (entre la recale du Machu Picchu, les avions annulés ou loupés, notre karma du lundi, les cérémonies d'élimination en vacances, les entrées douteuses sur le territoire Argentin, et j'en passe !), te rencontrer aura de loin été la meilleure chose qui me soit arrivé au cours de ces 3 années ! Merci de m'avoir soutenu quotidiennement, d'avoir répondu présente à chaque fois que j'avais un coup de mou, et surtout d'avoir supporté mon humeur et mes crises de nerfs.

Je vais m'arrêter là car finalement je pourrais écrire une thèse encore plus longue que celle-ci si je devais citer toutes les raisons pour lesquelles je vous aime et tous les moments merveilleux passés avec vous !

Enfin, un immense merci à ma famille à qui je dédie cette thèse (j'espère que vous arrivez à bout de ce pavé sans trop de migraines...). Je remercie mon frère, Maxime, d'avoir répondu présent à chaque fois j'en avais besoin, de m'avoir protégé et soutenu depuis ma naissance et d'avoir maintenu son rôle de super grand frère tout au long de ma thèse ! Merci à ma grand-mère pour tout l'amour que tu m'apportes depuis toujours ! Merci d'avoir supporté mes nombreux changements d'humeurs lors de nos appels quotidiens, d'avoir écouté toutes mes râleries et surtout de m'avoir conseillé avec bienveillance et sagesse chaque jour de cette thèse. Et enfin, merci à mes incroyables parents qui m'ont accompagné, soutenu, écouté, conseillé et inspiré quotidiennement dans ce long parcours. Merci de m'avoir fait confiance dans mes choix professionnels et personnels, de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même et surtout de m'avoir accompagné dans la réalisation de mes rêves. Vous êtes un modèle de réussite et de persévérance, et c'est grâce à vous que j'en suis la aujourd'hui. Mais surtout, merci pour tous les moments de détente en famille, les sorties, les voyages, les fêtes, les restaurants (etc...) qui m'ont permis d'affronter les moments de doute. Merci pour tout, vous êtes les meilleurs parents de l'univers ! Je vous aime !

Enfin, croyez-le ou non, mais j'ai terminé les études !!!!!!!!!!!!!!!

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
SOMMAIRE	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX	23
INTRODUCTION	24
I. Organisation du muscle strié squelettique	25
A. Fonction et structure du muscle squelettique.....	25
B. Contraction du muscle squelettique.....	27
1. Les filaments fins.....	28
2. Les filaments épais.....	30
3. Réticulum sarcoplasmique et tubules T.....	30
C. Les types de fibres musculaires	31
II. Formation du muscle squelettique	33
A. Origine embryonnaire.....	33
B. Les facteurs de régulation myogéniques (MRF).....	34
1. Caractérisation des facteurs de régulation myogéniques.....	34
2. Fixation à l'ADN et spécificité musculaire	35
3. Spécificités individuelles des MRFs	36
4. Cofacteurs des MRFs : la famille MEF2	37
C. La détermination myogénique.....	39
D. La sortie du cycle cellulaire	40
1. Généralités sur le cycle cellulaire.....	40
a) Les phases du cycle cellulaire	40
b) Les complexes CDK/Cycline	41
c) Les CDKI : des régulateurs négatifs du cycle cellulaire	42
d) Régulation de l'expression des gènes du cycle cellulaire	42
2. Rôle des acteurs de régulation du cycle cellulaire dans la prolifération des myoblastes et la différenciation myogénique	44
a) Expression et activité des complexes CDK/Cycline.....	45
b) Les protéines de poche pRb, p107 et p130 et les facteurs de transcription E2Fs.....	46
c) Les CDKI	48
E. L'activation du programme myogénique.....	50
F. La maturation et le maintien des fibres musculaires.....	51
III. Serum Response Factor (SRF) : un acteur majeur de la différenciation myogénique	52
A. Expression de SRF	52
B. Cibles de SRF	53
C. Régulation de l'activité de SRF.....	55
1. Voie MAPK/TCF	55

2.	La voie Rho/actine/MRTFs	56
3.	Autres modes de régulation.....	57
4.	Invalidation de SRF dans les systèmes cardiovasculaire et neuromusculaire	58
a)	Le système cardiovasculaire.....	58
b)	Le système nerveux.....	59
c)	Le système musculaire squelettique	59
IV.	Le complexe ASC-1	61
A.	Les sous-unités du complexe ASC-1.....	61
B.	Les différentes conformations du complexe ASC-1 révèlent des rôles spécifiques d'ASC-1 et d'ASCC1 63	
1.	Le complexe ASC-1.....	63
2.	Le complexe ASCC.....	64
3.	Le complexe hRQT.....	65
C.	ASC-1, régulateur de la prolifération, de la croissance et du cycle cellulaire	65
V.	Pathologies neuromusculaires congénitales : les myopathies congénitales et l'amyotrophie spinale	68
A.	Généralités sur les myopathies congénitales.....	68
1.	Caractéristiques cliniques et histopathologiques	68
2.	Caractéristiques génétiques.....	70
3.	Mécanismes physiopathologiques et moléculaires impliqués dans les myopathies congénitales.....	71
B.	Généralités sur l'amyotrophie spinale (SMA)	74
1.	Caractéristiques cliniques et histopathologiques	74
2.	Bases génétiques de la SMA.....	75
VI.	Pathologies du système neuromusculaire associées au complexe ASC-1	77
A.	Maladies neuromusculaires pédiatriques associées à ASC-1 : un large spectre de phénotypes cliniques et histopathologiques.....	77
1.	Myopathies congénitales associées à ASC-1	77
2.	Amyotrophies spinales associées à ASC-1.....	81
3.	Bases génétiques des troubles neuromusculaires associés à ASC-1	83
B.	Maladies neuromusculaires associées à ASCC1.....	83
1.	Myopathie congénitale ou SMA ? : une atteinte létale du système nerveux central, du muscle squelettique et des os	83
2.	Bases génétiques des troubles neuromusculaires associés à ASCC1	86
VII.	Objectifs de l'étude.....	87
MATÉRIEL ET METHODES		89
I.	Cultures cellulaires et traitements.....	90
A.	Lignée cellulaire de myoblastes murins C2C12	90
1.	Prolifération	90
2.	Différenciation	91
B.	Lignée cellulaire de glioblastome humain T98G	91
1.	Prolifération	91
2.	Quiescence.....	92
C.	Transfections.....	92
1.	Transfections d'ARN interférents.....	92
2.	Transfection du vecteur d'expression TRIP4 humain.....	93
II.	Génération de lignées knockout via l'édition génomique CRISPR/Cas9.....	95

A.	C2C12 <i>Trip4</i> -knockout (KO).....	96
B.	T98G <i>TRIP4</i> -knockout (KO).....	98
III.	Analyses transcriptomiques	100
A.	Extraction d'ARN.....	100
B.	RNAseq.....	100
C.	Transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel (qRT-PCR)	101
D.	Expériences de luciférase.....	102
IV.	Analyses protéiques.....	103
A.	Génération d'un nouvel anticorps ASC-1.....	103
B.	Extraction des protéines	104
C.	Traitement lambda phosphatase.....	104
D.	Western-Blot (WB).....	105
E.	Immunoprécipitations	105
1.	Immunoprécipitation avec billes d'agarose	106
2.	Immunoprécipitation avec billes magnétiques	107
3.	Immunoprécipitation avec Dynabeads	108
F.	Immunofluorescence	109
V.	Analyses statistiques.....	110
	RÉSULTATS.....	111
I.	Caractérisation d'un nouveau variant <i>TRIP4</i> et analyse des corrélations phénotype-génotype.....	112
A.	Caractérisation d'un nouveau variant homozygote dans deux familles de la population Rom atteintes d'une myopathie congénitale	112
1.	Phénotypes cliniques	113
2.	Examens complémentaires	115
3.	Phénotypes histopathologiques.....	116
B.	Étude des corrélations phénotype-génotype des maladies neuromusculaires associées au complexe ASC-1118	
II.	ASC-1 contrôle le démarrage de la différenciation myogénique en régulant l'expression, la localisation et l'activité de facteurs clés de la myogenèse précoce	135
A.	La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte la myogenèse précoce et entraîne un retard d'expression au niveau transcriptionnel de régulateurs clés de la myogenèse	135
B.	L'absence d'ASC-1 affecte le transcriptome pendant la différenciation myogénique, modulant particulièrement les gènes cibles de SRF et MyoD.....	140
C.	ASC-1 régule l'expression, la localisation et l'activité des acteurs clés de la myogenèse précoce ..	146
1.	Caractérisation de la différenciation myogénique dans le nouveau modèle C2C12 <i>Trip4</i> -KO ...	146
2.	ASC-1 régule l'expression de MyoD mais pas celle de SRF	151
3.	L'absence d'ASC-1 affecte la localisation subcellulaire de Myogénine au cours de la myogenèse	153
4.	ASC-1 interagit avec SRF, MyoD et le récepteur aux androgènes.....	156
5.	ASC-1 corégule l'activité de SRF, MyoD et du récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques	159
III.	ASC-1 régule transcriptionnellement l'expression des gènes du cycle cellulaire, cibles du complexe MMB-FOXM1, dans différents types cellulaires	163
A.	L'absence d'ASC-1 entraîne une réactivation du cycle cellulaire au cours de la myogenèse	163

B.	La transcription des gènes du cycle cellulaire est différenciellement affectée dans les fibroblastes de patients.....	166
C.	ASC-1 interagit avec FOXM1 et affecte l'expression des gènes cibles du complexe FOXM1-MMB en prolifération et en quiescence	168
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		171
I.	Les atteintes tissulaires des pathologies neuromusculaires associées au complexe ASC-1173	
A.	La question troublante de l'implication des motoneurones par rapport à l'atteinte musculaire primaire : Myopathie congénitale ou SMA ?.....	173
B.	Implication du complexe ASC-1 dans les pathologies neurodégénératives.....	175
C.	Implication du complexe ASC-1 dans le développement osseux.....	177
II.	ASC-1 dans la régulation de l'expression, de l'activité et de la localisation des MRFs.....	178
A.	ASC-1 est un partenaire de MyoD et régule son expression et son activité	178
B.	L'absence d'ASC-1 perturbe l'expression et la localisation subcellulaire de Myogénine	180
III.	ASC-1 transactive des facteurs de transcription ubiquitaires : SRF et le récepteur aux androgènes	181
IV.	Interaction entre ASC-1, ASCC2, SRF, MyoD et AR : un ou plusieurs complexes ?.....	183
V.	ASC-1 dans la régulation de la transcription des gènes du cycle cellulaire.....	184
A.	Implication d'ASC-1 dans la sortie du cycle cellulaire	184
B.	ASC-1 : oncogène ou suppresseur de tumeur ?.....	186
CONCLUSION.....		188
BIBLIOGRAPHIE.....		190
ANNEXES.....		224
	Annexe 1 : Anticorps utilisés pour les expériences de Western-Blot et d'Immunofluorescence	226
	Annexe 2 : Amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR	227
	Annexe 3 : Gènes différenciellement exprimés dans les résultats RNAseq de muscle du patient FIII.1 et de muscle contrôle	228
	Annexe 4 : Bilan des actions de diffusion et des productions scientifiques et techniques.....	230

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acides Aminés

ACTA1 : Alpha-actine squelettique

ACTB : Actine bêta

ACTG2 : Actine gamma 2

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ALKBH3 : AlkB Homologue 3

AP-1 : Activator Protein 1

AR : Androgen Receptor

ARE : Androgen Responsive Element

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

sgARN : single guide RNA

ASC-1 : Activating signal co-integrator-1

ASCC1 : Activating signal co-integrator-1 subunit 1

ASCC2 : Activating signal co-integrator-1 subunit 2

ASCC3 : Activating signal co-integrator-1 subunit 3

ASCH : Activating signal co-integrator homology domain

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

Bandes A : Bandes Anisotropes

Bandes I : Bandes Isotropes

bHLH : basique hélice-boucle-hélice (basic Helix-Loop-Helix)

BiPAP : Bilevel Positive Airway Pressure

BSA : Bovin Serum Albumin

Ca²⁺ : Calcium

Cas9 : CRISPR associated protein 9

CBP : CREB Binding Protein

CCD : Central Core Disease

CDK : Kinase dépendante des cyclines (Cyclin-Dependant Kinase)

CDKI : Inhibiteur des CDK (CDK Inhibitor)

CKM : Créatine Kinase Musculaire

CREB : C-AMP Response Element-Binding protein

CRISPR : Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats

CVF : Capacité Vitale Forcée

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phénylindole

DCM : Cardiomyopathie dilatée (Dilated Cardiomyopathy)

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Media

DPHR : Dihydropyridine

DTT : Dithiothréitol

EBS : Ets Binding Sites

ECG : Électrocardiogramme

EDTA : Ethylène-diamine-tétra-acétique

EEG : Électroencéphalogramme

EMG : Électromyogramme

ER : Oestrogen Receptor

E2F : Early gene Factor 2

FC : Fold Change

FCS : Sérum de veau foetal (Fetal Calfs Serum)

FOXM1 : Forkhead Box M1

G1/G2: Gap1/Gap2

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GO : Gene Ontology

HAT : Histone AcétylTransférase

HDAC : Histone Désacétylase

HRP : Horseradish peroxidase

HS : Sérum de cheval (Horse Serum)

ID1 : Inhibitor of DNA binding 1

IEG : Immediate Early Genes

IF : Immunofluorescence

IMG : Interruption Médicale de Grossesse

Indel : Insertion/Délétion

INK4 : Inhibiteur de CDK4

IP : Immunoprécipitation (co-IP : co-immunoprécipitation)

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KD : Knock-Down

kDa : Kilodalton

KIP1 : Kinase Interacting Protein 1

KLF : Kruppel-Like Factor

KO : Knock-Out

M : Mitose

MADS : MCM-1, Agamous, Deficiens, Srf

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogens (Mitogen Activated Protein Kinase)

ME : Microscopie Électronique

MEF2 : Muscle Enhancer Factor 2

MEM : Minimum Essential Medium

MmD : Multimicore disease

MRC : Medical Research Council (échelle de gradation de la force musculaire)

MRF : Facteur de régulation myogénique (Myogenic Regulatory Factor)

MRTF : Myocardin Related Transcription Factor

MuvB : Multi-vulva class B

MYBL2 : MYB Proto-Oncogene Like 2 (B-Myb)

MyBP : Protéine de liaison à la myosine (Myosin Binding Protein)

Myf5 : Myogenic Factor 5

MyHC : Chaînes lourdes de myosine (Myosin Heavy Chain)

MyLC : Chaînes légères de myosine (Myosin Light Chain)

MyoD : Myogenic Determination Factor 1

MyoG : Myogénine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NHEJ: Non-Homologous End-Joining

NLS : Signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal)

NT : Non Traité

ORF : Open reading frame

PAI2 : Anti-apoptotic plasminogen activator inhibitor-2

PAM : Protospacer Adjacent Motif

PBS : Tampon phosphate salin

PCA : Principal Component Analysis

PCAF : p300/CBP-Associated Factor

PFA : Paraformaldéhyde

PLK1 : Polo-Like Kinase 1

P/S : Pénicilline/Streptomycine

pRb : protéine du Rétinoblastome

p300 : E1A binding protein p300

RBBP4 : RB Binding Protein 4

RIN : RNA integrity number

RNAseq : séquençage ARN (RNA sequencing)

RNAPII : RNA Polymerase II

rpm : tours par minute (round per minute)

RQC : Voie cytoplasmique de contrôle qualité associée aux ribosomes

RS : Réticulum sarcoplasmique

RT : Température ambiante (Room Temperature)

qRT-PCR : Transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel

RXR : Retinoid X Receptor

RyR1 : Ryanodyne receptor 1

SARS-Cov-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Scbl : Scramble

SDH : Succinate déshydrogénase

SEM : Erreur Standard de la Moyenne

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SMA : Amyotrophie spinale (Spinal Muscular Atrophy)

SMABF2 : Spinal Muscular Atrophy with congenital Bone Fractures 2

SMN1 : Survival of Motor Neuron 1

SNC : Système Nerveux Central

SRE : Serum Responsive Element

SRF : Serum response factor

SWI/SNF : SWItch/Succrose NonFermentable

TBP : TATA-box binding protein

TBST : Tris-Buffered Saline with Tween20

TCF : Ternary Complex Factor

TFIIA : Transcription factor IIA

TR : Thyroid Receptor

TRIP4 : Thyroid hormone receptor interactor 4

WB : Western-Blot (= IB : Immunoblot)

WT : Wild-Type

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les myoblastes fusionnent pour former une fibre musculaire multinucléée.

Figure 2 : Structure du muscle squelettique.

Figure 3 : Structure de l'appareil contractile du muscle squelettique.

Figure 4 : Relation entre le réticulum sarcoplasmique (RS) et les tubules T avec les myofibrilles du muscle squelettique.

Figure 5 : Origine embryonnaire du muscle squelettique des membres et du tronc.

Figure 6 : Représentation schématique de la structure des MRFs : MyoD, Myf5, Myogénine et MRF4.

Figure 7 : Dynamique de formation des complexes CDK/Cycline au cours des différentes phases du cycle cellulaire.

Figure 8 : Les complexes Rb-E2F, DREAM et MMB-FOXM1.

Figure 9 : Régions de SRF.

Figure 10 : Isoformes de SRF.

Figure 11 : Les classes de gènes cibles de SRF.

Figure 12 : La voie MAPK/TCF.

Figure 13 : Représentation schématique de la protéine ASC-1.

Figure 14 : Modèle proposé pour les différents complexes contenant les sous-unités ASC-1, ASCC1, ASCC2 et ASCC3 ainsi que leur localisation subcellulaire.

Figure 15 : Conformation du complexe ASC-1.

Figure 16 : ASC-1 régule la transition G0/G1-S en régulant l'expression de la cycline D et la phosphorylation de pRb.

Figure 17 : ASC-1 inhibe la progression du cycle cellulaire dans les cellules myogéniques en régulant l'expression et la phosphorylation de protéines du cycle, et favorise la croissance des cellules musculaires.

Figure 18 : Caractéristiques histopathologiques des différents groupes de myopathies congénitales.

Figure 19 : Protéines impliquées et principales voies affectées dans les myopathies congénitales.

Figure 20 : Spectre histologique des myopathies congénitales associées à ASC-1.

Figure 21 : Schéma chronologique du protocole de différenciation des C2C12.

Figure 22 : Efficacité du siARN dirigé contre *Trip4*.

Figure 23 : Transfection du vecteur d'expression *hTRIP4* dans les C2C12 en prolifération.

Figure 24 : Guide ARN utilisé pour générer la lignée C2C12 *Trip4*-KO.

Figure 25 : Résultats du séquençage Sanger des clones H6 et A8 C2C12 *Trip4*-KO.

Figure 26 : Vérification du knockout du gène *Trip4* dans la lignée C2C12.

Figure 27 : Résultats du séquençage Sanger des clones H6 et E2 T98G *TRIP4*-KO.

Figure 28 : Vérification du knockout du gène *Trip4* dans la lignée T98G.

Figure 29 : Validations expérimentales du nouvel anticorps dirigé contre ASC-1.

Figure 30 : Identification d'un nouveau variant *TRIP4* localisé à la fin du domaine de liaison à l'ARN ASCH.

Figure 31 : IRM des muscles des membres inférieurs du patient G.2.

Figure 32 : Lésions ultrastructurales du patient H.4.

Figure 33 : Localisation des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCC1* associées au phénotype de la myopathie congénitale associée au complexe ASC-1.

Figure 34 : Localisation des mutations du gène *TRIP4* et du gène *ASCC1* associées à la forme néonatale léthale.

Figure 35 : Efficacité du knock-down de *Trip4* dans les C2C12 au cours de la différenciation myogénique.

Figure 36 : Les C2C12 *Trip4*-KD présentent un retard de différenciation et un défaut de croissance des myotubes.

Figure 37 : La déplétion transitoire d'ASC-1 entraîne un retard d'expression protéique des MRFs et de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) dans les C2C12 au cours de la différenciation myogénique.

Figure 38 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte significativement l'expression de Myog, Myh4 et Myh7 au niveau transcriptionnel à J2.

Figure 39 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 retarde le clivage de la caspase 3 au cours de la différenciation myogénique.

Figure 40 : Extraction d'ARN des C2C12 *Trip4*-KD à J2 pour analyse par RNAseq.

Figure 41 : Analyse transcriptomique par RNAseq du modèle C2C12 *Trip4*-KD au deuxième jour de différenciation (J2).

Figure 42 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression des gènes cibles de SRF au niveau transcriptomique à J2.

Figure 43 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression de nombreux gènes cibles de MyoD au niveau transcriptomique à J2.

Figure 44 : L'expression des MRFs est affectée différemment dans le muscle de patient *TRIP4*-KO et dans les C2C12 *Trip4*-KD à J2.

Figure 45 : Validation du knock-out d'ASC-1 dans les C2C12 *Trip4*-KO en prolifération.

Figure 46 : Le knock-out de *Trip4* dans les C2C12 entraîne un retard et un défaut de différenciation.

Figure 47 : Le knock-out de *Trip4* dans les C2C12 entraîne une absence d'expression de la MyHC et une forte surexpression de Myogénine au cours de la myogenèse.

Figure 48 : Analyse transcriptomique par RNAseq du modèle C2C12 *Trip4*-KO en différenciation à J2.

Figure 49 : L'absence d'ASC-1 affecte l'expression des gènes cibles de SRF et MyoD au niveau transcriptomique dans le modèle C2C12 *Trip4*-KO à J3.

Figure 50 : Le knock-out de *Trip4* dans les C2C12 entraîne la surexpression protéique de SRF et MyoD à partir du deuxième jour de la myogenèse.

Figure 51 : La surexpression d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression protéique de MyoD mais pas celle de SRF.

Figure 52 : La localisation subcellulaire de MyoD n'est pas affectée par l'absence d'ASC-1 dans les C2C12 en différenciation.

Figure 53 : L'absence d'ASC-1 perturbe la localisation subcellulaire de Myogénine dans les C2C12 à J2 et J3.

Figure 54 : ASC-1, SRF et MyoD ont des partenaires communs.

Figure 55 : Interaction d'ASC-1 avec le facteur de transcription SRF.

Figure 56 : Interaction d'ASC-1 avec une forme phosphorylée de MyoD.

Figure 57 : ASC-1 transactive et est nécessaire à l'activité de SRF dans les cellules myogéniques.

Figure 58 : ASC-1 transactive et est nécessaire à l'activité de MyoD dans les cellules myogéniques.

Figure 59 : ASC-1 transactive le récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques.

Figure 60 : Les C2C12 *Trip4*-KO se remettent à proliférer au jour 2 de différenciation.

Figure 61 : Les C2C12 *Trip4*-KO surexpriment la cycline D1 et sous-expriment p27 au cours de la myogenèse.

Figure 62 : L'absence ou la diminution de l'expression d'ASC-1 affecte l'expression des gènes du cycle cellulaires de façon hétérogène dans les fibroblastes de patients.

Figure 63 : ASC-1 interagit avec FOXM1 dans la lignée de glioblastome humain T98G.

Figure 64 : L'absence d'ASC-1 perturbe l'expression des gènes cibles de FOXM1 et affecte la quiescence dans les T98G.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques générales des différents types de fibres musculaires.

Tableau 2 : Formes de SMA non liées à SMN1.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients atteints de myopathies congénitales associées à ASC-1.

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients atteints de SMA associées à ASC-1.

Tableau 5 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients présentant des troubles neuromusculaires associées à ASCC1

Tableau 6 : Composition des tampons pour l'immunoprécipitation avec billes d'agarose.

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques des quatre nouveaux patients caractérisés.

Tableau 8 : Résumé des caractéristiques cliniques des pathologies neuromusculaires associées à des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCCI*.

Tableau 9 : Résumé des caractéristiques cliniques observées chez 21 patients, issus de 14 familles, atteints de formes légères, intermédiaires et sévères associées à des mutations du gène *TRIP4*.

Tableau 10 : Résumé des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCCI* associées aux formes légères, intermédiaires et sévères des myopathies congénitales associées à ASC-1.

Tableau 11 : Résumé des caractéristiques cliniques observées chez 28 patients, issus de 17 familles, atteints de la forme néonatale létale de pathologies neuromusculaires associées à des mutations du gène *TRIP4* ou *ASCCI*.

Tableau 12 : Résumé des mutations *TRIP4* et *ASCCI* associées à la forme néonatale.

Tableau 13 : Surexpression des transcrits des gènes du cycle cellulaire dans les C2C12 *Trip4*-KO à J3.

INTRODUCTION

I. Organisation du muscle strié squelettique

Notre organisme est constitué de trois types de tissus musculaires : le muscle lisse, le muscle strié cardiaque et le muscle strié squelettique. Chaque type possède une structure unique ainsi qu'un rôle spécifique. Les muscles striés squelettiques assurent la motricité (locomotion, mimique, maintien postural). Le muscle strié cardiaque est responsable de la contraction du cœur et les muscles lisses se trouvent au niveau de la couche musculeuse de la paroi des organes et des vaisseaux. La contraction du muscle strié cardiaque et du muscle lisse est modulée par le système nerveux autonome. Les myopathies congénitales étant des pathologies affectant typiquement le muscle strié squelettique, nous avons donc choisi ce tissu comme objet d'étude.

A. Fonction et structure du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est le tissu le plus abondant chez les mammifères puisqu'il représente près de la moitié de la masse corporelle. Les propriétés d'excitabilité, de contractilité et d'élasticité du muscle squelettique lui confèrent son rôle dans la motricité et le maintien postural, sous le contrôle du système nerveux volontaire. Les motoneurons sont en contact avec les fibres musculaires au niveau de la jonction neuromusculaire, constituant la première synapse chimique décrite (« Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings - Dale - 1936 - The Journal of Physiology - Wiley Online Library » s. d.). Les muscles squelettiques ont aussi un rôle au niveau métabolique puisqu'ils assurent le stockage d'acides aminés, relâchés dans le sang en cas de jeûne, ils aident au maintien de la température corporelle (thermogénèse) et participent au stockage d'énergie via les réserves de glycogène.

Le muscle squelettique est composé d'un assemblage de fibres musculaires, aussi appelées myofibres (Konigsberg 1960). Leur processus de formation implique les cellules progénitrices musculaires, ayant pour origine les somites (Shahragim Tajbakhsh 2003), qui seront converties en myoblastes à la suite de l'étape de détermination myogénique. Les myoblastes mononucléés,

qui sont des cellules souches prolifératives mais déterminées, vont ensuite sortir du cycle cellulaire et fusionner afin de se différencier en myotubes, qui exprimeront des protéines spécifiques du muscle telles que la chaîne lourde de myosine (MyHC, Myosin Heavy Chain) ou la créatine kinase musculaire (CKM). Enfin, ces myotubes multinucléés vont subir une étape de maturation afin de devenir des myofibres (**Figure 1**). Ces fibres musculaires ont un diamètre de 10 à 100 μm et peuvent atteindre jusqu'à 10 cm de longueur.

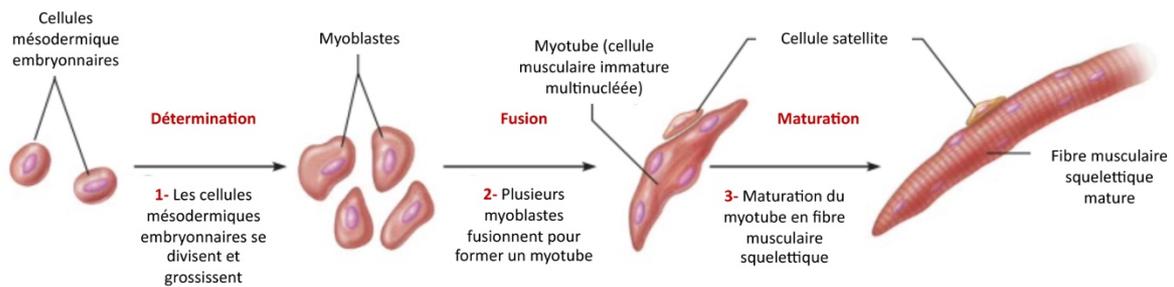


Figure 1 : Les myoblastes fusionnent pour former une fibre musculaire squelettique multinucléée. Figure adaptée de © 2006 Pearson Education, Inc (publishing as Benjamin Cummings).

Les myofibres contiennent un cytosquelette hautement organisé (**Figure 2**) avec des milliers de myofibrilles alignés dans le cytoplasme (aussi appelé sarcoplasme) alors que les noyaux se concentrent à la périphérie sous la membrane cellulaire (sarcolemme). Entre le sarcolemme et la lame basale, on retrouve des cellules quiescentes appelées cellules satellites. Décrites pour la première fois au début des années 60 (Mauro 1961), ces cellules souches musculaires contribuent à la croissance, la régénération et l'homéostasie musculaire (Collins et al. 2005; Morgan et Partridge 2003). Une fois activées, suite à une blessure par exemple, ces cellules vont retourner dans le cycle afin de proliférer, puis vont fusionner avec des fibres musculaires existantes ou bien avec d'autres cellules satellites en prolifération.

Chaque fibre musculaire est enveloppée d'un tissu conjonctif appelé endomysium. Ces myofibres se regroupent ensuite par 20 à 40 afin de former le faisceau musculaire, entouré par le pérимыsium. Enfin, le muscle entier, constitué de plusieurs faisceaux musculaires, est lui-même recouvert de l'épимыsium. Ce tissu conjonctif recouvre aussi les vaisseaux sanguins, chargés de l'apport en oxygène et nutriments des muscles, ainsi que les fibres nerveuses, assurant la transduction des signaux nerveux, qui circulent entre les faisceaux musculaires.

Chaque muscle est relié à ses extrémités au périoste de l'os par l'intermédiaire du tendon, constitué de filaments de collagène.

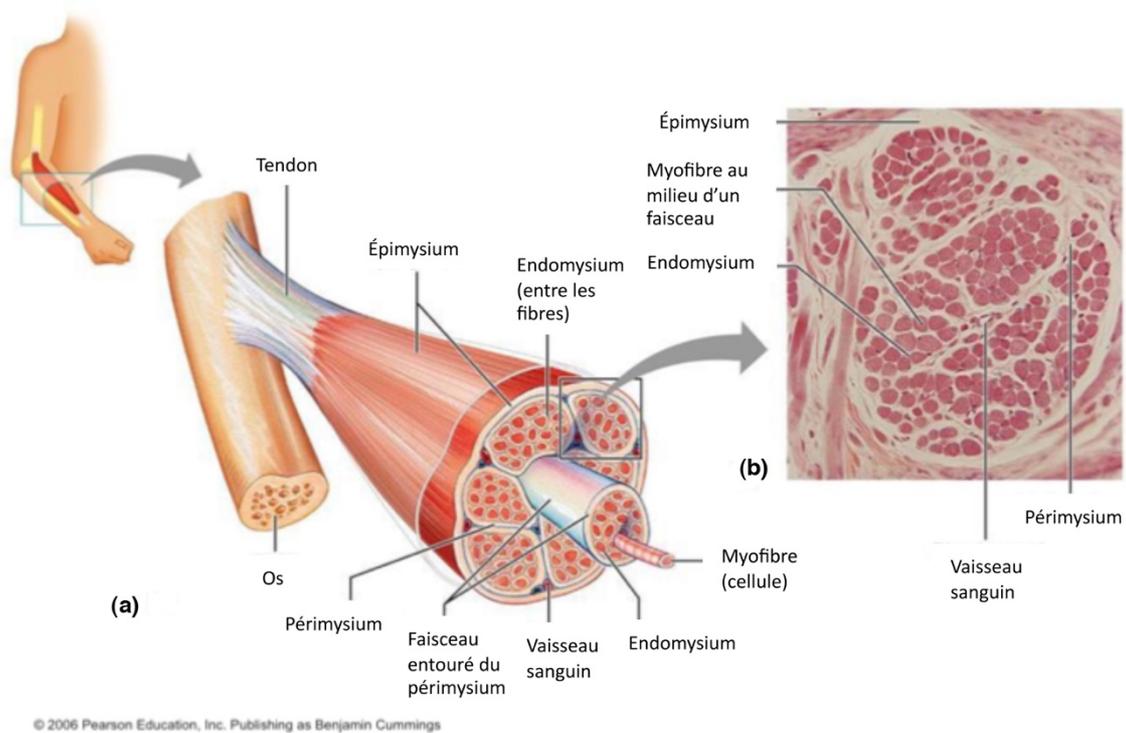


Figure 2 : Structure du muscle squelettique. (a) Schéma de l'organisation du muscle squelettique (b) Histologie d'une coupe transversale de muscle squelettique coloré à l'hématoxyline-éosine. Figure adaptée de © 2006 Pearson Education, Inc (publishing as Benjamin Cummings).

B. Contraction du muscle squelettique

Les myofibrilles, alignées parallèlement dans le sarcoplasme des myofibrilles, sont formées par la succession régulière de petits cylindres allongés, les sarcomères, qui constituent l'unité contractile de base du muscle. Ces sarcomères, d'environ 2 μm de longueur et délimités par deux disques Z, sont constitués de deux types de filaments orientés dans l'axe longitudinal de la myofibrille (**Figure 3**) : les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine. La fonction contractile du muscle repose sur l'interaction entre ces filaments fins et épais ainsi que sur la libération d'énergie lors de l'hydrolyse de l'ATP.

Le motif strié spécifique des muscles squelettiques et cardiaques résulte de l'alternance de bandes foncées et claires observables en microscopie électronique (**Figure 3**) : respectivement les bandes A (anisotropes) et I (isotropes) (Hall, Jakus, et Schmitt 1946). Un sarcomère est composé de deux demi bandes I, où l'on retrouve les filaments fins d'actine, et d'une bande A, composée des filaments épais myosine et fins d'actine. En plus des deux protéines contractiles, l'actine et la myosine, on retrouve dans le sarcomère d'autres protéines dont une très grande protéine de 4200kDa, la titine (Bang et al. 2001), qui en assure l'élasticité et l'intégrité structurale.

1. Les filaments fins

L'alpha-actine squelettique est une petite protéine globulaire monomérique de 42kDa capable de se polymériser afin de former les filaments fins d'actine qui seront à l'équilibre entre dissociation aux extrémités (-) et polymérisation aux extrémités (+).

Ces microfilaments, bien que composés principalement d'actine, sont aussi associés à d'autres protéines comme par exemple la tropomoduline qui permet de réguler la longueur de ces filaments en s'attachant aux extrémités (+) (Littlefield, Almenar-Queralt, et Fowler 2001). La nébuline, une protéine géante d'environ 800kDa, s'associe aux filaments fins afin de faire le lien entre les sarcomères, de réguler la longueur des filaments d'actine et de les stabiliser (Pappas et al. 2008). Cette protéine est aussi impliquée dans la contraction, la formation des disques Z et l'organisation et l'assemblage des myofibrilles (Chu, Gregorio, et Pappas 2016).

La troponine et la tropomyosine composent aussi les filaments fins. La troponine est composée de 3 sous unités différentes : troponine T (Tropomyosin Binding) qui se lie à la tropomyosine, la troponine I (Inhibitory) qui constitue la sous-unité inhibitrice, et la troponine C (Calcium Binding) capable de lier le Ca^{2+} (Greaser et Gergely 1971). La tropomyosine est une protéine homo-dimérique capable d'inhiber la contraction en se déplaçant le long des filaments fins et bloquant les sites de liaison à la myosine.

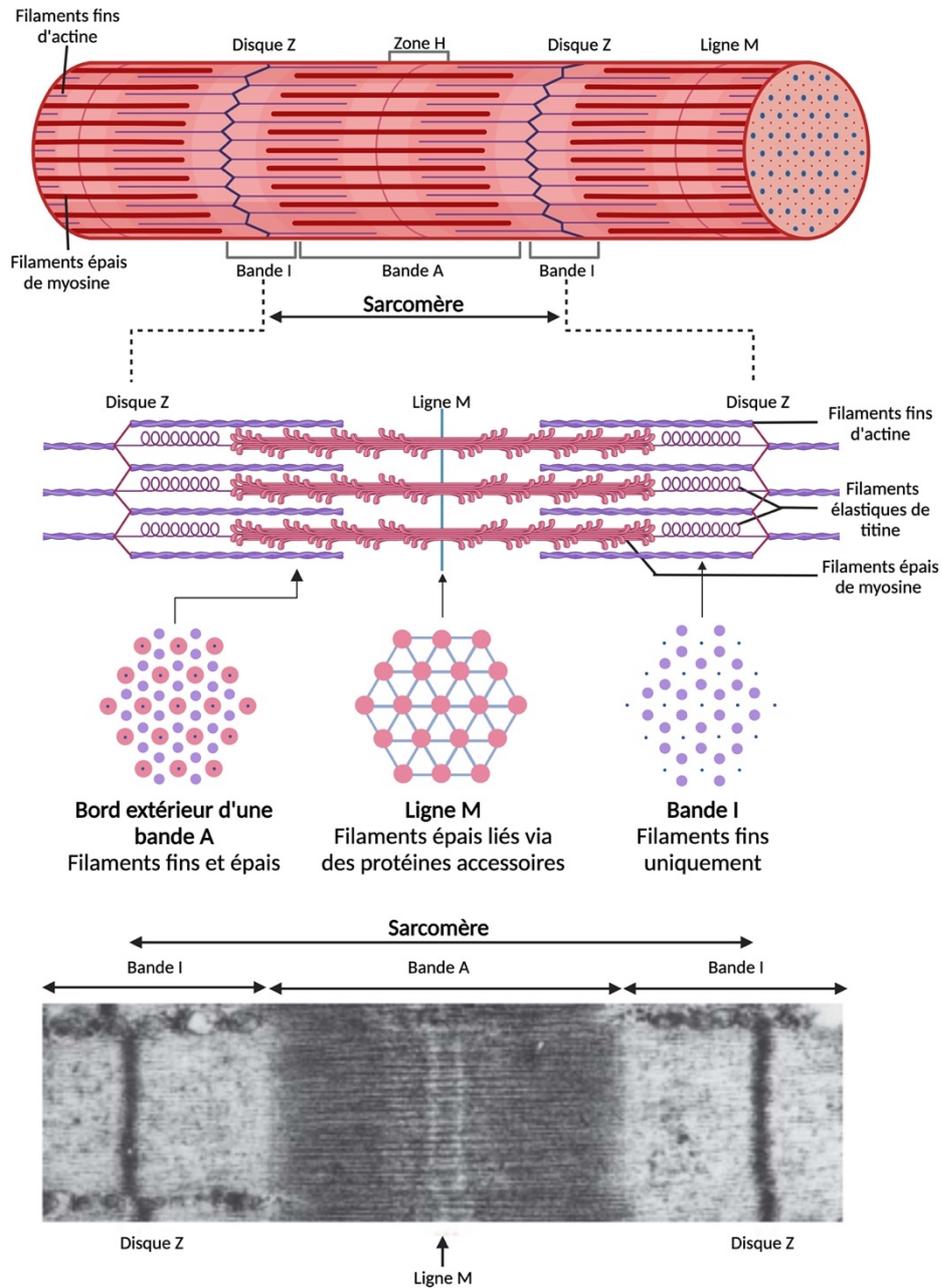


Figure 3 : Structure de l'appareil contractile du muscle squelettique. Représentation schématique du sarcomère, montrant l'alignement antiparallèle des filaments fins d'actine (violet) et des filaments épais de myosine (rouge). La figure du bas montre l'observation en microscopie électronique d'un sarcomère complet entouré de deux sarcomères partiels. Cette figure a été réalisée via l'application @BioRender.

2. Les filaments épais

La myosine est un hexamère composé de deux chaînes lourdes (MyHC) et de deux paires de chaînes légères (MyLC, Myosin Light Chain). Les chaînes lourdes de la myosine permettent l'assemblage avec les filaments fins d'actine et contiennent des sites de liaison à l'actine et à l'ATP. Différents isoformes sont exprimés au cours du développement (MYH3, MYH8) et dans le muscle squelettique adulte (MYH1, MYH2, MYH4, MYH7). Ils se distinguent par leur activité ATPase et définissent les propriétés fonctionnelles des myofibrilles. Les protéines de liaison à la myosine (MyBP) sont localisées au niveau des bandes A et participent à la contraction musculaire (Gruen et Gautel 1999).

3. Réticulum sarcoplasmique et tubules T

Les fibres musculaires contiennent deux ensembles de tubules intracellulaires qui leur permettent de réguler la contraction du muscle squelettique : le réticulum sarcoplasmique (RS) et les tubules T (**Figure 4**).

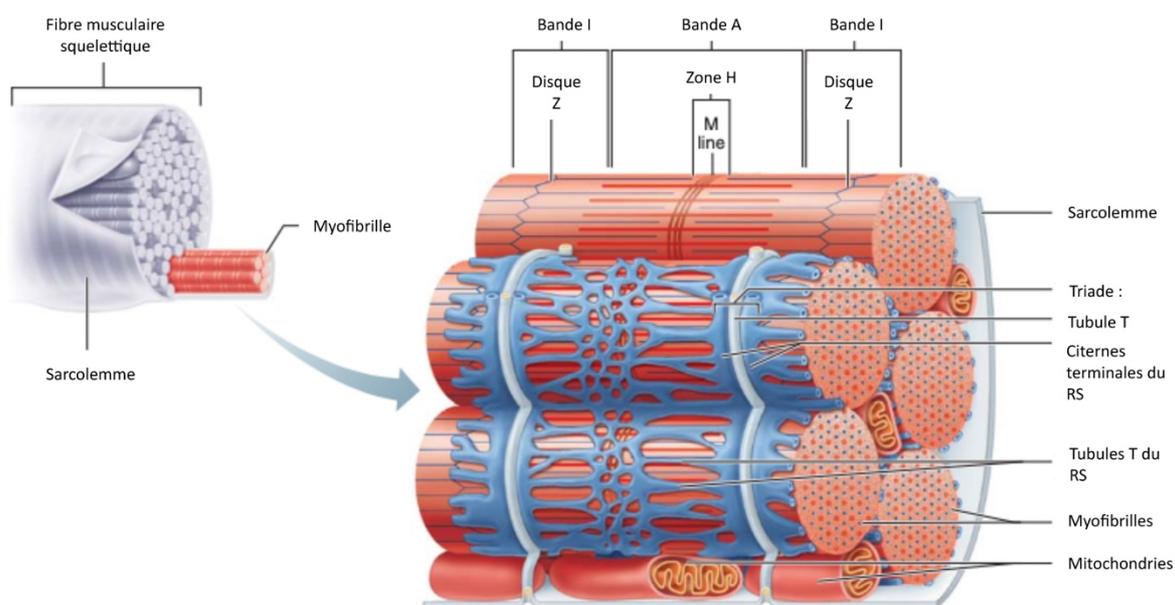


Figure 4 : Relation entre le réticulum sarcoplasmique (RS) et les tubules T avec les myofibrilles du muscle squelettique. Les tubules du RS (bleu) fusionnent pour former un réseau de canaux interconnectés au niveau de la zone H, ainsi que des citernes terminales en forme de sac situées près de la jonction A-I. Les tubules T

(gris) sont des invaginations internes de la membrane cellulaire, le sarcolemme, qui pénètrent profondément dans la cellule entre deux citernes terminales. Les sites de contact étroit entre ces trois composantes (citerne terminale - tubule T - citerne terminale) sont communément appelés triades. Figure adaptée de © 2006 Pearson Education, Inc (publishing as Benjamin Cummings).

Le réticulum sarcoplasmique est un réticulum endoplasmique lisse interconnecté aux tubules entourant chaque myofibrille. Il est étroitement associé à un grand nombre de mitochondries et de granules de glycogène, tous deux impliqués dans la production d'énergie nécessaire à la contraction. Le réticulum permet la régulation des niveaux intracellulaires de calcium en le stockant et le relarguant pour la contraction musculaire.

C. Les types de fibres musculaires

Les muscles squelettiques sont composés de différents types de fibres musculaires classifiées selon leur vitesse de contraction, majoritairement déterminée par l'isoforme de MyHC exprimé, ou selon leur degré de phosphorylation oxydative. Les caractéristiques principales de ces différents types de fibres sont résumées ci-dessous (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Caractéristiques générales des différents types de fibres musculaires.

Type de fibres	1	2A	2B
Contraction	Lente	Rapide	Très rapide
Résistance à la fatigue	Haute	Intermédiaire	Faible
Force produite	Faible	Intermédiaire	Haute
Activité	Aérobie	Anaérobie au long terme	Anaérobie au court terme
Densité mitochondriale	Haute	Haute	Faible
Capacité oxydative	Haute	Haute	Faible
Capacité glycolytique	Faible	Haute	Haute
Principale source d'ATP	Triglycérides	Glycogène	Glycogène
Couleur	Rouge	Rouge	Blanc

Les fibres de type 1 sont des fibres à contraction lente. Elles expriment la MyHC I qui présente une forte activité myosine ATPase à bas pH ainsi qu'une coloration dense pour les enzymes mitochondriales NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide, réduite) et SDH (Succinate Dehydrogenase). Elles ont un fort métabolisme oxydatif, sont résistantes à la fatigue et présentent un grand nombre de mitochondries et de capillaires. La présence de myoglobine en grande quantité est responsable de leur coloration rouge. Ces fibres sont parfaitement adaptées pour une contraction aérobie soutenue et confèrent une haute résistance à la fatigabilité musculaire.

Les fibres à contraction rapide, de type II, ont au contraire une forte activité myosine à haut pH. Elles sont divisées en deux principaux sous-types : 2A et 2B. Les fibres de type 2A sont plus riches en mitochondries, glycogène et enzymes glycolytiques que les fibres de type 2B, ce qui les rend plus résistantes à la fatigue en conditions aérobie et anaérobie.

La proportion de ces différents types de fibres est variable dans les muscles squelettiques. Bien que les muscles soient majoritairement composés à 50% de fibres de type 1, 30% de type 2A et 15% de type 2B, cette proportion peut varier en fonction de la localisation et de la fonction du muscle (Ahmetov, Vinogradova, et Williams 2012). Certaines conditions pathologiques peuvent aussi modifier la distribution de ces fibres musculaires comme dans la dystrophie musculaire de Duchenne (Webster et al. 1988).

II. Formation du muscle squelettique

A. Origine embryonnaire

Les muscles squelettiques ont une origine mésodermique et sont dérivés des somites, des structures sphériques épithéliales se formant de part et d'autre du tube neural et de la notochorde (Ordahl et Le Douarin 1992). La différenciation et la régionalisation des somites se produit en réponse à des signaux provenant du tube neural et de la notochorde (**Figure 5**). La partie ventrale mésenchymateuse des somites, le sclérotome, est à l'origine des côtes, des vertèbres et du cartilage. La partie dorsale épithéliale, le dermomyotome, est à l'origine des muscles squelettiques du tronc et des membres. Le dermomyotome se subdivise ensuite en myotome, source des précurseurs de la lignée myogénique (Gros et al. 2005), et en dermatome, à l'origine du derme (Brill et al. 1995).

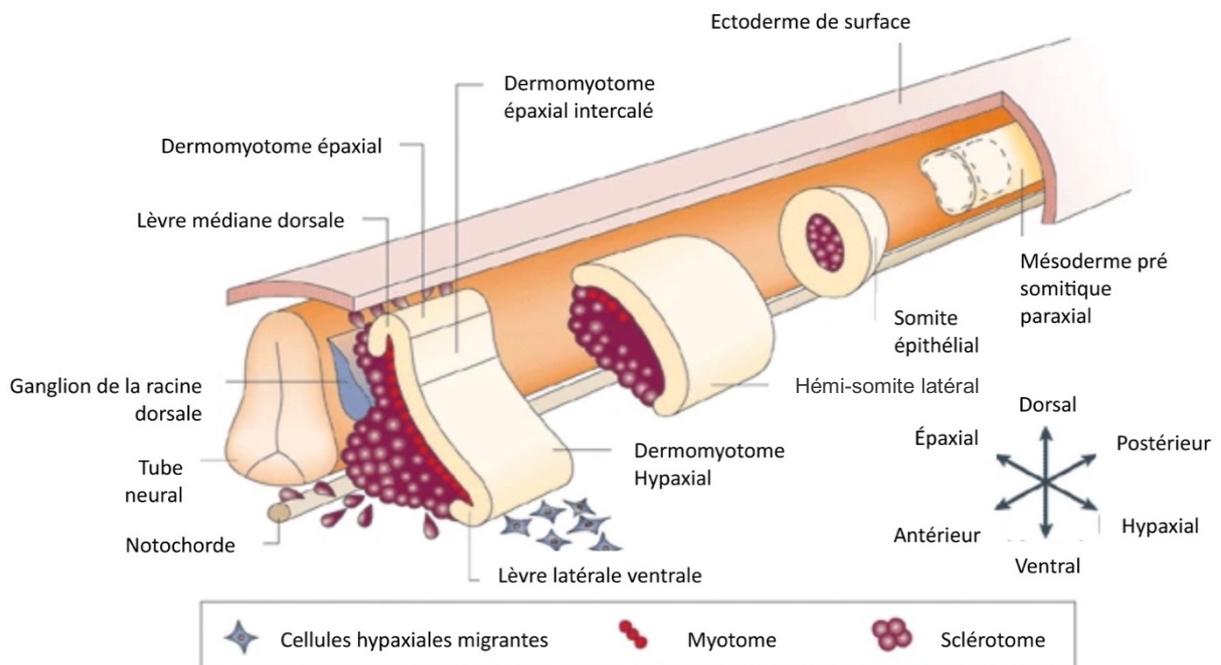


Figure 5 : Origine embryonnaire du muscle squelettique des membres et du tronc. Les somites sont des formations épithéliales qui se forment de part et d'autre du tube neural grâce à une segmentation du mésoderme paraxial, s'étendant de l'avant vers l'arrière. Peu de temps après leur apparition, la portion inférieure des somites évolue pour donner naissance au sclérotome, tandis que la partie supérieure se transforme en dermomyotome. Figure adaptée de Parker et coll., 2003 (M. H. Parker, Seale, et Rudnicki 2003).

B. Les facteurs de régulation myogéniques (MRF)

1. Caractérisation des facteurs de régulation myogéniques

Les différentes étapes de la différenciation myogénique nécessitent un remodelage de l'expression de nombreux gènes. Pour ce faire, divers facteurs de transcription vont agir de façon coordonnée tout au long du processus de différenciation. Les MRFs (Myogenic Regulatory Factors), de la superfamille des facteurs de transcription à motif bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (Davis et Weintraub 1992), jouent un rôle primordial dans la détermination et la différenciation musculaire. Initialement caractérisés *in vitro*, ces facteurs musculaires sont au nombre de 4 : MyoD (Davis, Weintraub, et Lassar 1987), Myf5 (Braun et al. 1989), Myogénine (ou Myf1) (Edmondson et Olson 1989) et MRF4 (ou Myf6 ou Herculine) (Rhodes et Konieczny 1989).

MyoD (Myogenic Differentiation) fut le premier MRF découvert en tant que facteur capable de convertir des fibroblastes murins en myoblastes, sous l'influence de l'agent déméthylant 5-Azacytidine, grâce à des expériences d'hybridation soustractive (Davis, Weintraub, et Lassar 1987). MyoD est exprimé exclusivement dans le muscle squelettique mais il présente la capacité d'induire seul la reprogrammation cellulaire vers un destin myogénique. En effet, s'il est introduit dans diverses lignées non myogéniques tels que les neurones, les adipocytes ou les chondrocytes, MyoD va entraîner leur conversion en myoblastes (Weintraub et al. 1989; Choi et al. 1990). Myogénine a ensuite été isolée de façon similaire, puis Myf5 et MRF4 ont été caractérisés par analogie de séquence. L'expression ectopique de n'importe lequel de ces quatre facteurs dans diverses lignées cellulaires entraînera la conversion en cellule de type musculaire strié squelettique, grâce à leur capacité d'activation de la transcription des gènes musculaires spécifiques et d'induction du programme myogénique dans les cellules (Edmondson et Olson 1993).

2. Fixation à l'ADN et spécificité musculaire

Le motif bHLH des MRFs contient un domaine basique de fixation à l'ADN, leur permettant de lier la séquence d'ADN consensus CANNTG appelée boîte E (E-box), et un domaine constitué de deux hélices séparées par une région adaptatrice (boucle) permettant l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des facteurs bHLH entre eux.

Les boîtes E sont présentes dans de nombreux gènes spécifiques du muscle (Lassar et al. 1989), permettant une activation spécifique des gènes musculaires par les MRFs. Pour activer la transcription au niveau des boîtes E, les facteurs myogéniques s'associent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec d'autres protéines bHLH : les protéines E. Sous forme d'homodimère, MyoD se lie moins fermement aux boîtes E et l'activation de la transcription est moins efficace que lorsque MyoD les protéines E forment des hétérodimères (Etzioni et al. 2005). Les protéines E sont ubiquitaires, contrairement aux MRFs qui sont tissu-spécifiques. Les MRFs, ainsi actifs en tant qu'hétérodimères, s'associent préférentiellement avec les protéines E12 et E47 (produits du même gène *E2A*) par le biais de leur domaine HLH, ce qui va favoriser leur liaison à l'ADN et l'activation de la transcription (Lassar et al. 1991). De nombreuses recherches *in vitro* ont souligné l'importance de la collaboration entre MyoD et E12/E47 pour activer les gènes musculaires. Toutefois, il subsiste une certaine ambiguïté quant à la nécessité d'E12/E47 dans le processus de différenciation myogénique puisque des études antérieures ont présenté des résultats divergents. Effectivement, il a été montré que l'inhibition d'E12/E47 pouvait inhiber (Lassar et al. 1991) ou n'avoir aucun effet sur la différenciation musculaire (Zhuang et al. 1992). Cette dernière observation pourrait être attribuée au fait que d'autres protéines de la famille bHLH jouent aussi un rôle crucial dans la myogenèse (Parker et al., 2006). Par exemple, HEB est une protéine de la famille bHLH exprimée dans différentes lignées musculaires, et son inhibition entraîne un blocage du processus de différenciation musculaire. Alors que les protéines E interagissent avec les MRFs pour affecter positivement leur action, d'autres protéines de la famille bHLH et HLH, telles que ID1 ou TWIST, entravent l'action des MRFs en s'associant avec eux ou avec les protéines E.

Les boîtes E étant réparties dans l'ensemble du génome, on peut se questionner sur la manière dont les MRFs parviennent à cibler spécifiquement les boîtes E présentes dans les gènes musculaires. La capacité des MRFs à activer spécifiquement les gènes musculaires peut

en partie s'expliquer par la présence de deux résidus alanine et thréonine spécifiques au sein de leur région basique, désignée sous le nom de « code myogénique ». Cette caractéristique les différencie des autres protéines bHLH (Brennan, Chakraborty, et Olson 1991; Davis et al. 1990) et leur permet notamment de collaborer efficacement avec le cofacteur positif MEF2 (Black, Molkentin, et Olson 1998).

3. Spécificités individuelles des MRFs

En dehors de la conservation du domaine bHLH, les parties N et C terminales des quatre facteurs de régulation musculaire présentent des différences notables (**Figure 6**). Ainsi, les domaines de transactivation sont les zones les moins similaires entre eux. Ces divergences pourraient expliquer les variations fonctionnelles entre ces quatre facteurs. Ces régions distinctes semblent jouer un rôle dans la modulation de la conformation du domaine HLH et/ou l'accessibilité de ce dernier aux cofacteurs. En conséquence, la spécificité de chaque facteur myogénique pourrait dépendre des différents cofacteurs avec lesquels ils interagissent. Plus précisément, MyoD et Myf5 possèdent deux domaines d'homologie : l'un situé à l'extrémité amino-terminale du domaine bHLH et riche en résidus cystéine/histidine (C/H), et l'autre en position carboxy-terminale, s'étendant des acides aminés 218 à 269. Ces deux domaines, en particulier le second, sont impliqués dans la capacité de MyoD à modifier la structure de la chromatine, ce qui permet d'initier la transcription des gènes présents dans des régions de la chromatine compactée et silencieuse (Gerber et al. 1997). Toutefois, une structure hélice tertiaire nommée hélice 3, se trouve dans la partie C-terminale de tous les MRFs. Cependant, des variations dans les résidus hydrophiles qui la composent confèrent une spécificité distincte à l'hélice 3 de chaque MRF. Par exemple l'hélice 3 de MyoD, Myf5 et MRF4 semble jouer un rôle dans la régulation musculaire en activant des gènes situés dans des régions de la chromatine fermée. A l'inverse, l'hélice 3 de Myogénine ne semble pas posséder cette capacité transactivatrice. Il est intéressant de noter que l'hélice 3 de MRF4 peut remplacer celle de MyoD, ce qui suggère une certaine redondance fonctionnelle (Bergstrom et Tapscott 2001). Néanmoins, MRF4 possède dans son hélice 3 un domaine de transactivation spécifique qui joue un rôle crucial dans la différenciation (Sirri, Leibovitch, et Leibovitch 2003).

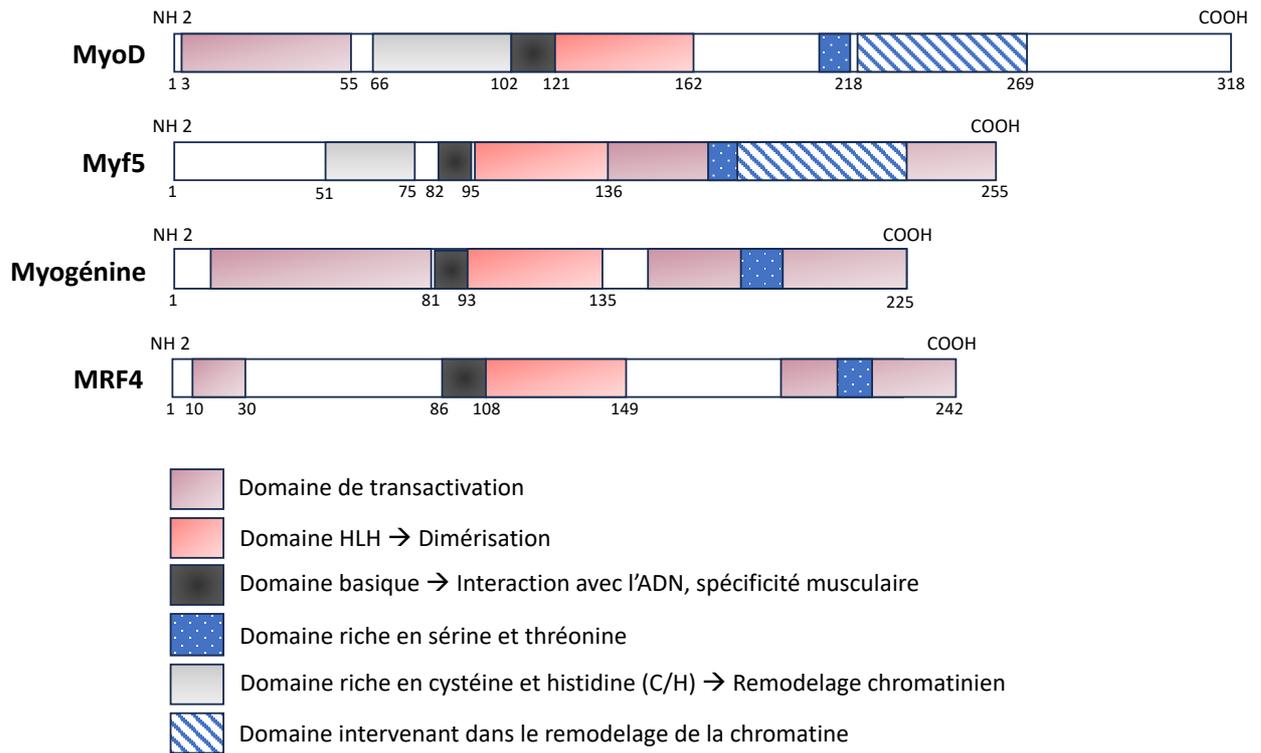


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des MRFs : MyoD, Myf5, Myogénine et MRF4.

4. Cofacteurs des MRFs : la famille MEF2

Comme mentionné plus haut, les MRFs ne sont pas des acteurs solitaires dans le déclenchement de la transcription des gènes musculaires, ils collaborent étroitement avec différents cofacteurs. Parmi ces cofacteurs, les protéines Myocyte Enhancer factor 2 (MEF2) jouent un rôle primordial en tant que régulateurs transcriptionnels clés de la différenciation myogénique (Black, Molkentin, et Olson 1998).

A l'origine, MEF2 a été identifié comme un facteur de liaison à l'élément amplificateur du gène *CKM*. Sa présence est limitée lors de la phase de prolifération des myoblastes, mais elle augmente rapidement lorsque la différenciation musculaire est initiée. Chez les vertébrés, la famille MEF2 est constituée de quatre gènes distincts : *MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C* et *MEF2D*. Les MEFs font partie de la famille des facteurs de transcription MADS-box, qui comprend notamment le Serum Response Factor (SRF), un facteur de transcription essentiel pour l'activation des gènes musculaires et le processus de différenciation (Soulez et al. 1996).

Contrairement aux MRFs, les MEF2s sont présents de manière ubiquitaire, à l'exception de MEF2C qui montre une spécificité pour certains tissus, notamment le muscle squelettique. Ces facteurs de transcription ont une affinité particulière pour une séquence riche en A/T : CTA(A/T)₄TAG. Cette séquence se retrouve fréquemment dans les éléments de régulation de nombreux gènes musculaires (Black, Molkentin, et Olson 1998).

Divers éléments suggèrent une collaboration entre les MRFs et les MEF2s dans la transactivation des gènes musculaires. Tout d'abord, il a été démontré que MEF2 peut interagir directement avec les MRFs tels que MyoD ou Myogénine (Kaushal et al. 1994). Leur collaboration synergique permet l'activation des promoteurs qui contiennent à la fois des boîtes E et des sites MEF2 (Molkentin et al. 1995). De plus, ces sites MEF2 sont fréquemment situés à proximité des boîtes E dans les promoteurs et les amplificateurs des gènes musculaires dans le génome (Wasserman et Fickett 1998). En ce qui concerne leur impact sur la myogenèse, MEF2 seul ne peut initier la différenciation mais il renforce ce processus lorsqu'il est surexprimé *in vitro* en présence des MRFs (Molkentin et al. 1995).

Cependant les MEF2 ne sont pas les seuls cofacteurs capables d'interagir avec MyoD. Pour induire la transcription de ses gènes cibles, MyoD recrute divers coactivateurs modifiant la structure de la chromatine, tels que les histones acétylases (HAT) et désacétylases (HDAC), ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine. Les HAT, tels que la protéine CREB-binding (CBP)/p300 et PCAF (p300/CBP associated-factor), travaillent en collaboration avec MyoD et leur activité est essentielle à la différenciation musculaire (Pier Lorenzo Puri et al. 1997; Polesskaya et al. 2001). Ces HAT induisent l'acétylation des histones, provoquant l'ouverture locale de la structure de la chromatine et, par conséquent, l'activation de la transcription. PCAF et CBP/p300 peuvent également acétyler directement MyoD, ce qui augmente son activité (Polesskaya et al. 2001). De plus, les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF recrutés par MyoD jouent un rôle crucial dans l'induction de la transcription des gènes musculaires et sont indispensables à la myogenèse (de la Serna, Carlson, et Imbalzano 2001). Par ailleurs, MyoD et MEF2 ont la capacité de s'associer à des corépresseurs, en l'occurrence les HDAC, conduisant à la répression de certains loci génomiques (Berkes et Tapscott 2005).

C. La détermination myogénique

La détermination myogénique constitue une étape cruciale du processus de formation des muscles. Pendant cette phase, les cellules progénitrices musculaires multipotentes deviennent des cellules unipotentes, les myoblastes.

Au stade embryonnaire, la détermination myogénique débute lors de la formation du myotome, où MyoD et Myf5 sont fortement exprimés. Les précurseurs musculaires migrent à partir du dermomyotome vers les bourgeons des membres, où ils commencent à s'engager dans la voie myogénique en exprimant Myf5 et MyoD. Les myoblastes prolifèrent ensuite pour former une population suffisante pour la création des muscles de l'embryon et du fœtus, ainsi qu'une réserve qui servira à la croissance et à la régénération musculaire après la naissance.

Cette phase de détermination est principalement orchestrée par MyoD, Myf5 et MRF4. Alors que les souris MyoD^{-/-} sont viables et fertiles (Rudnicki et al. 1992), les mutants Myf5^{-/-} meurent à la naissance, principalement à cause de sévères malformations des côtes (Braun et al. 1992). Les souris double mutantes MyoD^{-/-} Myf5^{-/-} présentent quant à elles une absence totale de myogenèse (Rudnicki et al. 1993). Une étude a montré que l'absence de Myf5 perturbe la migration des précurseurs musculaires, qui adoptent alors d'autres destins cellulaires au lieu de se transformer en myoblastes (S. Tajbakhsh et al. 1996). Une étude plus récente a démontré que si MRF4 reste actif en absence de Myf5 et MyoD, le muscle squelettique peut encore se former, ce qui souligne son rôle crucial dans ce processus (Kassar-Duchossoy et al. 2004). Enfin, les souris mutantes knockout pour Myogénine présentent de graves anomalies et meurent rapidement après la naissance. L'absence de Myogénine perturbe le processus de différenciation et non de détermination car elles présentent un nombre normal de progéniteurs musculaires mais très peu de fibres musculaires (Hasty et al. 1993; Nabeshima et al. 1993).

Une fois déterminés, les myoblastes vont subir une étape de différenciation terminale. Pour cela, ils vont sortir du cycle cellulaire, activer un programme de gènes spécifique au muscle et enfin fusionner pour former des myotubes qui subiront ensuite une étape de maturation.

D. La sortie du cycle cellulaire

Au cours du développement ainsi que chez l'adulte, la formation et la régénération des tissus nécessitent une fine régulation du cycle afin de maintenir un équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire. C'est le cas de la différenciation myogénique qui nécessite la coordination entre l'expression de gènes spécifiques au développement musculaire et la sortie irréversible du cycle cellulaire des cellules constitutives du tissu.

1. Généralités sur le cycle cellulaire

a) *Les phases du cycle cellulaire*

Les organismes vivants sont constitués de cellules se multipliant par divisions successives. C'est le cycle cellulaire qui permet à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles identiques via une succession ordonnée de processus. Ce cycle est divisé en deux parties : l'interphase et la mitose. L'interphase est sous-divisée en trois phases G1 (Gap 1), S (Synthèse) et G2 (Gap 2). La phase G1 permet à la cellule de se préparer à la division au niveau métabolique. Au cours de cette phase, les cellules vont croître et synthétiser de l'ARN et des protéines. Durant la phase S, phase de réplication de l'ADN, la cellule va dupliquer son matériel génétique afin que chaque cellule fille puisse hériter d'une copie complète du génome mère. La phase G2 permet aux cellules de continuer leur croissance. Enfin, la mitose (ou phase M) est la phase de division nucléaire, suivi de la division cellulaire (cytokinèse).

Après chaque division, une cellule peut revenir en phase G1 afin de subir d'autres divisions, ou bien entrer en phase de quiescence G0 lorsque les conditions environnementales ne sont pas propices à la prolifération. Cette phase G0 est caractérisée par une sortie du cycle cellulaire, réversible (quiescence) ou irréversible (différenciation, senescence), où les cellules sont dans un état post-mitotique non prolifératif. Les cellules souches musculaires sont une population de cellules souches quiescentes capables, à la suite d'une lésion par exemple, d'être réactivées afin de proliférer et d'amplifier leur population, puis de fusionner ou de participer à la régénération musculaire. En revanche, les cellules ayant atteint le stade terminal de

différenciation sont incapables de retourner dans le cycle cellulaire en condition physiologiques (Cheung et Rando 2013).

b) Les complexes CDK/Cycline

Le cycle cellulaire est finement régulé par les complexes CDK (cyclin-dependent kinase)/Cyclines (**Figure 7**). Les CDK sont des kinases sérine/thréonine qui acquièrent leur activité catalytique lorsqu'elles s'associent avec une cycline. Les interactions CDK/Cyclines sont spécifiques et dépendantes des phases du cycle cellulaire. Au début de la phase G₁, les complexes CDK4-6/Cycline D inhibent les effets antiprolifératifs de la protéine pRb. Ensuite, les complexes CDK2/Cycline E s'associent en fin de phase G₁, indépendamment de pRb. CDK2 va aussi participer à la phase S en s'associant cette fois-ci à la Cycline A. Enfin, la mitose est initiée par les complexes CDK1/Cycline A ou B.

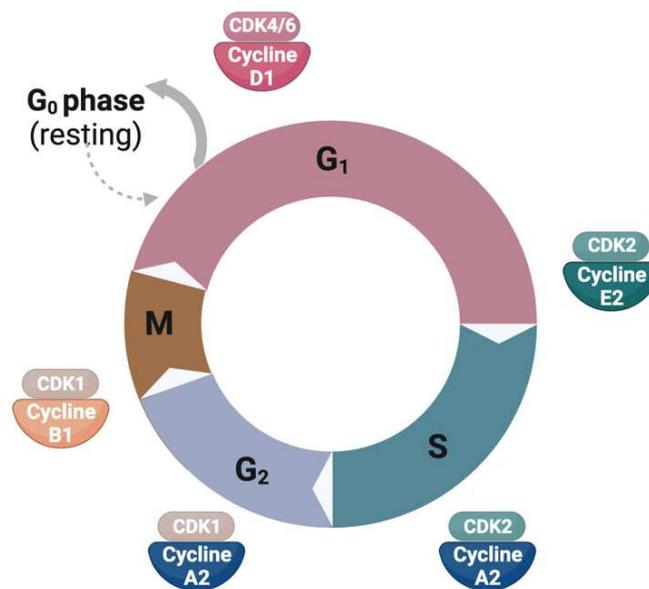


Figure 7 : Dynamique de formation des complexes CDK/Cycline au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Cette figure a été réalisée via l'application @BioRender.

c) Les CDKI : des régulateurs négatifs du cycle cellulaire

La formation et l'activité des complexes CDK-Cycline est grandement régulé par la famille des CDKI (cyclin-dependent kinase inhibitor). Il existe deux catégories de CDKI en fonction de leur profil structural et fonctionnel. La famille INK4 comprend p15, p16, p18 et p19 qui contiennent un motif participant à la reconnaissance et à l'interaction des protéines (Michaely et Bennett 1992). La famille Cip/Kip comprend les protéines p21, p27 et p57. Ces deux familles présentent des propriétés structurales et fonctionnelles distinctes.

Les membres de la famille INK4 sont des inhibiteurs sélectifs de CDK4 et CDK6, capables de se lier aux sous-unités CDK libres ou liées à la cycline, provoquant une forte inhibition de l'activité catalytique des CDK et induisant un arrêt en phase G1 (Serrano, Hannon, et Beach 1993; Hannon et Beach 1994). En revanche, les protéines Cip/Kip peuvent lier et inhiber tous les complexes CDK/Cycline au cours du cycle cellulaire, mais ne peuvent lier que les hétérodimères CDK/Cycline (Xiong et al. 1993; Matsuoka et al. 1995).

d) Régulation de l'expression des gènes du cycle cellulaire

L'expression périodique des gènes du cycle cellulaire se produit en deux larges vagues d'expression, culminant lors des transitions de phase G1/S et G2/M, et sont coordonnées par une série de complexes interconnectés contenant : les facteurs de transcription E2F, B-MYB, FOXM1 et les protéines de poche RB (protéine du rétinoblastome pRb et ses protéines associées p107 et p130). Il a récemment été démontré que l'expression des gènes du cycle cellulaire peut être séparée en deux sous-groupes : les gènes exprimés et fonctionnels au cours des phases G1/S ou bien G2/M du cycle cellulaire (Fischer et al. 2016). Les gènes des phases G1/S sont principalement réprimés par le complexe Rb/E2F en coordination avec le complexe DREAM (Rb-like/E2F4/MuvB), et sont activés par les facteurs de transcription E2F suite à la phosphorylation des protéines du rétinoblastome. En revanche, les gènes des phases G2/M sont réprimés au cours de la phase G0 par DREAM, et activés par le complexe MMB/FOXM1 (MuvB/B-MYB/FOXM1).

Il est important de noter que ces mécanismes de contrôle se régulent mutuellement et génèrent des boucles de rétroaction et des redondances pour fournir un système de progression

du cycle cellulaire presque infaillible. La corruption de ces systèmes de contrôle peut engendrer un certain nombre de pathologies telles que les cancers.

- **Le complexe pRb/E2F1-3 :**

Au début de la phase G1, pRb, déphosphorylée par la phosphatase PP1/PP2A, masque les domaines de transactivation de E2F1-3 et recrute des modificateurs répressifs de la chromatine, réprimant ainsi la transcription des gènes de phases G1/S (Kolupaeva et Janssens 2013). Au fur et à mesure de l'avancée de la phase G1, l'accumulation des complexes CDK/Cycline entraîne l'hyperphosphorylation de pRB, libérant ainsi les facteurs de transcription activateurs E2F1-3 (**Figure 8**). Ensuite, E2F1-3, en complexe avec des modificateurs activateurs de la chromatine, va stimuler l'expression des gènes des phases G1/S.

- **Le complexe répresseur DREAM :**

Le complexe DREAM est un répresseur transcriptionnel formé du noyau appelé MuvB (Lin9, Lin54, Lin52, Lin37, RBBP4) associé avec les protéines du rétinoblastome p130/p107 et les facteurs de transcription répresseurs E2F4-5 au cours des phases G1/S. Lorsqu'ils sont déphosphorylés par PP2A, p130/p107 interagissent avec LIN52 phosphorylée sur S28 par DYRK1A (Litovchick et al. 2011). Le complexe DREAM exerce son activité répressive en liant les gènes de la phase G1/S via E2F4-5/DP, ces derniers en interaction avec les sites promoteurs E2F (**Figure 8**). La phosphorylation de p130/p107 dépendante des complexes CDK/Cycline et l'interaction avec p15^{PAF} entraîne le désassemblage du complexe répresseur DREAM et libère les sites promoteurs E2F, permettant ainsi la transcription des gènes des phases G1/S et G2/M.

- **Le complexe activateur MMB-FOXM1 :**

La formation du complexe activateur MMB se produit à la suite du désassemblage du complexe DREAM, lorsque B-MYB se lie à LIN52 et LIN9, et est stimulé par l'interaction de la protéine YAP avec B-MYB (**Figure 8**). La liaison de B-MYB avec le noyau MuvB permet ensuite le recrutement du facteur de transcription FOXM1. Le complexe MMB-FOXM1 se lie

alors aux sites promoteurs CHR par l'intermédiaire de LIN54, et active la transcription des gènes des phases G2/M.

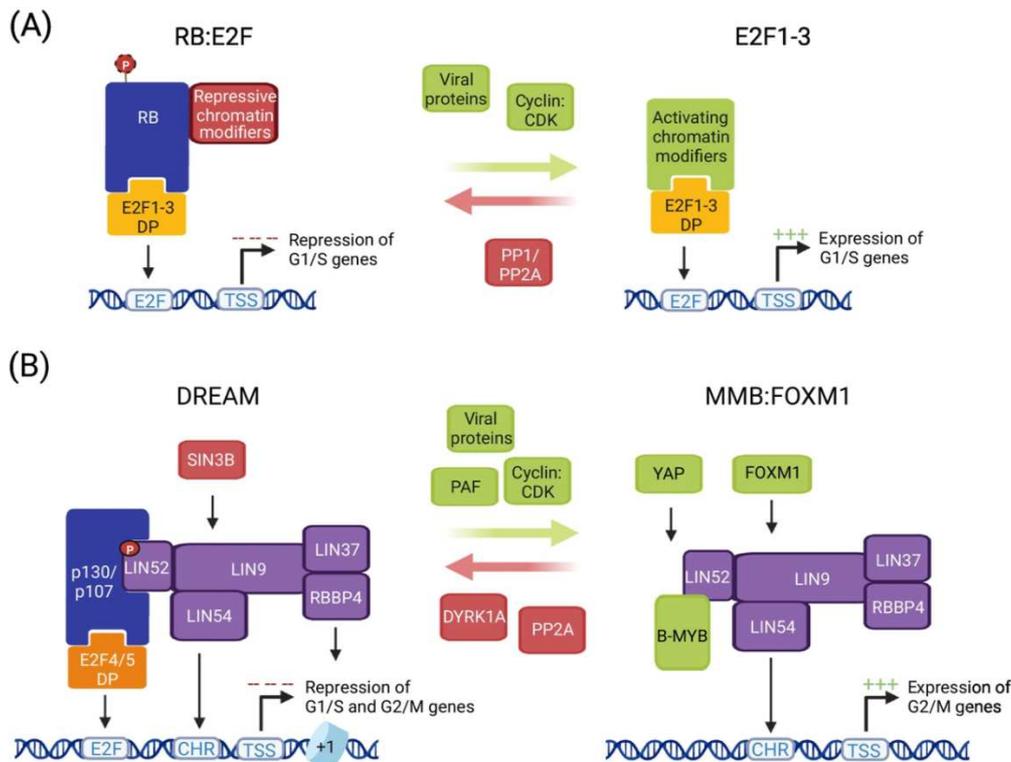


Figure 8 : Les complexes *Rb-E2F*, *DREAM* et *MMB-FOXM1*. (Fischer et al. 2022)

2. Rôle des acteurs de régulation du cycle cellulaire dans la prolifération des myoblastes et la différenciation myogénique

La sortie du cycle cellulaire des myoblastes nécessite une modification de la balance entre les régulateurs positifs (cyclines et CDK) et négatifs (CDKI et protéines du rétinoblastome) du cycle cellulaire (Walsh et Perlman 1997). MyoD joue aussi un rôle crucial dans l'arrêt du cycle permettant l'engagement des myoblastes dans le processus de différenciation qui sera souligné tout au long de cette partie.

a) *Expression et activité des complexes CDK/Cycline*

Les niveaux de CDK4 et de CDK6 sont constants au cours de la différenciation myogénique mais les niveaux de cyclines D varient. La cycline D1, très exprimée dans les myoblastes en prolifération, est très peu exprimée au cours de la différenciation. En revanche, la cycline D3 augmente fortement au cours de la différenciation. Dans les myotubes, CDK4 n'est plus associée aux cyclines mais interagit avec p21 et p27. De plus, sa localisation subcellulaire va être modifiée de façon dépendante de la cycline D1 (J. M. Zhang, Wei, et al. 1999). Effectivement, alors que CDK4 associée à la cycline D1 est nucléaire dans les myoblastes en prolifération, l'absence de la cycline D1 au cours de la différenciation va entraîner la translocation de CDK4 dans le cytoplasme des myotubes en formation. Une étude a montré que l'expression forcée de CDK4 et de la cycline D1 dans des myoblastes murins (C2C12) déclenche la synthèse d'ADN dans les myotubes et altère l'expression des gènes spécifiques du muscle (Latella et al. 2001). Par la suite, d'autres études ont montré que l'expression ectopique de CDK4 et de la cycline D1 réprime l'activité de MEF2 et que la cycline D1 ectopique inhibe l'activation transcriptionnelle des gènes musculaires par MyoD (Skapek et al. 1996; Lazaro, Bailey, et Lassar 2002).

Quelques études ont été menées sur les autres complexes CDK/Cycline dans les cellules myogéniques en prolifération et en différenciation. Le complexe mitotique CDC2/Cycline B est capable de phosphoryler MyoD, entraînant ainsi la répression de la transactivation dépendante de MyoD et une diminution de l'expression de MyoD au cours de la mitose (L. A. J. Tintignac et al. 2004; Batonnet-Pichon et al. 2006). Aussi, une récente étude menée chez *C.elegans* a montré que l'expression spécifique des différents complexes CDK/Cycline initiait la réentrée dans le cycle cellulaire et l'induction de la phase S sans interférer avec l'état différencié (Korzelius et al. 2011). Ces événements ne sont pas entraînés par le complexe CDK2/Cycline E mais plutôt par CDK4/Cycline D1. De plus, l'expression ectopique de CDK2/Cycline E dans les myotubes différenciées ne renforce pas la réentrée dans le cycle cellulaire contrairement à celle de CDK4/Cycline D.

Comme mentionné précédemment, la cycline D3 est la seule cycline de la phase G1 dont l'expression est augmentée lors de la différenciation myogénique (Rao, Chu, et Kohtz 1994). Son expression est activée par MyoD en association avec p300 (Cenciarelli et al. 1999). Une étude a montré que la cycline D3 est fortement exprimée aux stades fœtaux tardifs mais

disparaît dans le muscle squelettique différencié, suggérant un rôle dans l'induction mais pas dans la maintenance de la différenciation myogénique (Bartkova et al. 1998). Plus tardivement, une autre étude a révélé que la surexpression de cycline D3 prépare les myoblastes au processus de différenciation (Gurung et Parnaik 2012).

b) Les protéines de poche pRb, p107 et p130 et les facteurs de transcription E2Fs

La protéine du rétinoblastome pRb est un régulateur important de la prolifération et de la différenciation myogénique. Avec la participation de MyoD, ses niveaux d'expression et son état de phosphorylation sont modifiés lors du passage de l'état de prolifération à l'état de différenciation des myoblastes. En effet, MyoD entraîne l'augmentation de l'expression de pRb au cours de la différenciation myogénique (Martelli et al. 1994) et se lie à CDK4 afin d'inhiber la capacité de celle-ci à phosphoryler pRb (J. M. Zhang, Zhao, et al. 1999). Bien que pRb soit exprimé à la fois dans les myoblastes en prolifération et les myocytes en différenciation, il a été observé que la forme hypo-phosphorylée était prédominante en condition de différenciation (Kiess, Gill, et Hamel 1995). Sous sa forme non phosphorylée, pRb interagit avec MyoD par l'intermédiaire des domaines bHLH de MyoD et C-terminale de pRb (Gu et al. 1993) et sa coopération avec MyoD favorise l'activité transcriptionnelle des facteurs MEF2 (Novitch et al. 1999).

Les souris pRb^{-/-} mourant à des stades embryonnaires précoces (jour embryonnaire E14,5), avant que la myogenèse ne soit terminée, différents modèles d'ablation de pRb *in vivo* ont dû être générés :

- Des souris portant un minigène pRb hypomorphe exprimé dans le placenta et le système nerveux, mais pas dans le muscle squelettique (Zacksenhaus et al. 1996).
- Des souris à délétion conditionnelle dans lesquelles l'invalidation de pRb est induite par Mox-Cre, agissant à partir de E5.5 (de Bruin et al. 2003).
- Des souris à délétion embryonnaire dans lesquelles l'invalidation de pRb est induite par Myf5-Cre ou CKM-Cre, spécifiques du muscle (Huh et al. 2004).

La génération de ces modèles a permis la réalisation de nombreuses études fonctionnelles de pRb *in vitro* et *in vivo*. La réversibilité de l'arrêt du cycle cellulaire a été mise en évidence *in*

vivo par l'accumulation de noyaux allongés synthétisant activement de l'ADN dans les myotubes des souris pRb hypomorphes (Zacksenhaus et al. 1996). De plus, la suppression de pRb est associée à une hyper prolifération et une susceptibilité accrue à l'apoptose (Zacksenhaus et al. 1996; Ciavarra et al. 2011). Enfin, la différenciation myogénique est gravement affectée *in vivo* et *in vitro*. Effectivement, bien que la différenciation myogénique peut être initiée en absence de pRb (expression de Myogénine par exemple), un échec dans la progression et l'achèvement du programme myogénique est constaté par la baisse de l'expression de gènes tardifs du muscle tels que ceux codant la MyHC, la CKM, MRF4 ou encore la troponine T (Novitch et al. 1996; Zacksenhaus et al. 1996; de Bruin et al. 2003; Huh et al. 2004; Ciavarra et al. 2011). Les souris mutantes présentent des myotubes raccourcis, avec une diminution des myofibrilles et des noyaux agrandis (minigène pRb), ou une diminution spectaculaire de la masse musculaire accompagnée de l'absence totale de fibres matures (Myf5-Cre). Certains phénotypes sont même associés à des problèmes respiratoires et à une mort périnatale précoce chez les mutants.

Les autres protéines de poche p107 et p130 jouent aussi un rôle dans la différenciation myogénique. La protéine p107 est fortement exprimée dans les myoblastes en prolifération mais son expression diminue fortement au cours de la différenciation, alors que l'expression de p130 suit une tendance inverse à celle de p107 (Kiess, Gill, et Hamel 1995; Carnac et al. 2000). Une étude a montré que l'absence de pRb est associée à une expression accrue de p107, qui interagit avec les facteurs de transcription myogénique, mais bien que p107 puisse remplacer pRb comme cofacteur de différenciation il n'est pas suffisant pour maintenir l'état de différenciation terminale et donc rétablir le phénotype (Schneider et al. 1994). Contrairement à pRb, l'augmentation de l'expression de p130 au cours de la différenciation se produit principalement dans les cellules de réserve plutôt que dans les myotubes multinucléés (Carnac et al. 2000). La surexpression de p130 bloque l'entrée en phase S mais réprime aussi la myogenèse en inhibant MyoD ainsi que sa capacité de transactivation.

Dans les cellules indifférenciées, les facteurs E2Fs sont principalement en complexe avec p107, mais lors de la différenciation, il est remplacé par p130 (Corbeil, Whyte, et Branton 1995; Kiess, Gill, et Hamel 1995; Shin et al. 1995).

L'expression des facteurs E2Fs n'est pas uniforme au cours de la différenciation. Effectivement, l'expression d'E2F1 et E2F3a est fortement diminuée lors de la différenciation, et indétectable dans les myotubes matures, alors que l'expression d'E2F2, E2F3b et E2F4 ne varie pas (J. Wang et al. 1995; Asp et al. 2009). De plus, la distribution subcellulaire de ces facteurs est modifiée au cours de la différenciation myogénique. Effectivement, une étude a rapporté que lors de l'induction de la différenciation, E2F1 et E2F5 deviennent exclusivement cytoplasmiques, E2F3 reste cytoplasmique, E2F2 est principalement nucléaire et E2F4 apparaît dans les deux compartiments. En revanche, des signaux mitogènes, même à de faibles niveaux, peuvent entraîner l'importation d'E2F1 et E2F4 dans le noyau (Gill et Hamel 2000). E2F3b est un régulateur critique de la différenciation myogénique puisqu'il contrôle la transcription des gènes de développement et de différenciation dans les myotubes. La perte d'E2F4 entraîne des défauts de différenciation dans les myotubes plus modérés que celle d'E2F3b. Des études ont aussi montré que la surexpression d'E2F1 inhibe la sortie du cycle cellulaire et l'activation de la transcription médiée par MyoD ou Myogénine (J. Wang et al. 1995; 1996), ou provoque l'entrée en phase S dans les myocytes (G. Chen et Lee 1999). Enfin, la surexpression nucléaire d'E2F1 et E2F4 favorise la réentrée dans le cycle cellulaire et bloque le programme de différenciation (Gill et Hamel 2000).

c) *Les CDKI*

L'expression des CDKI régule l'équilibre entre la prolifération et la différenciation. Leur expression est généralement régulée à la hausse au cours de la myogenèse.

Des études sur le rôle de la famille INK4 dans la lignée myogénique ont révélé que les protéines p15 et p16 ne sont pas exprimées dans les C2C12 prolifératives, les myotubes ou encore dans des échantillons de muscle adulte (Franklin et Xiong 1996; E. G. Reynaud et al. 1999). Cependant, l'expression ectopique de p16 est associée à une augmentation de l'expression des gènes spécifiques du muscle (Skapek et al. 1995) et protège les C2C12 en différenciation du processus d'apoptose en présence de pRb (J. Wang et Walsh 1996). L'expression de p18 est quant à elle nettement augmentée au cours de la différenciation des C2C12, au niveau transcriptionnel et traductionnel. A l'inverse, la CDKI p19 est fortement

exprimée dans les myoblastes en prolifération puis diminue au moment de la différenciation (Franklin et Xiong 1996). La diminution de la p19 associée à l'augmentation de la p18 ont soulevé l'hypothèse d'un remplacement fonctionnel de p19 par p18 au cours de la myogenèse.

Les membres de la famille Cip/Kip ont été beaucoup plus étudiés dans les cellules myogéniques que ceux de la famille INK4.

Des études ont montré que les C2C12 en prolifération expriment faiblement p21, seulement détectable au moment de la phase G1 (A. Mal et al. 2000; L. A. J. Tintignac et al. 2004) et que l'induction de la différenciation dans ces cellules entraîne une forte augmentation de l'expression de p21 (Franklin et Xiong 1996; E. G. Reynaud et al. 1999; A. Mal et al. 2000). Conformément à un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire associé à la différenciation, des études ont montré que p21 montre une interaction accrue avec CDK2, CDK4 et CDK6 dans les myotubes par rapport aux myoblastes et que sa disponibilité est supérieure à celle des complexes CDK4/Cycline actifs (Franklin et Xiong 1996; J. Wang et Walsh 1996). La surexpression de p21 dans les C2C12 est suffisante pour induire la sortie du cycle cellulaire dans des conditions de culture favorables à la prolifération, alors que les myoblastes déplétés en p21 montrent une prolifération accrue (Guo et al. 1995; Hawke et al. 2003). De plus, la surexpression forcée de p21 favorise l'expression des gènes spécifiques du muscle, sauve MyoD de la répression médiée par la cycline D1 et protège contre l'apoptose (Skapek et al. 1995; J. Wang et Walsh 1996). Des études ont montré que MyoD active l'expression de p21 au niveau transcriptionnel, indépendamment de p53, et que p21 peut stabiliser MyoD en inhibant sa phosphorylation (Halevy et al. 1995; S. B. Parker et al. 1995; E. G. Reynaud et al. 1999; L. A. J. Tintignac et al. 2004). De plus, une étude a démontré que la cycline D3 favorise l'expression de p21 dans les cellules myogéniques (Gurung et Parnaik 2012).

L'expression de p57 se retrouve considérablement augmentée lorsque les C2C12 entrent en différenciation ou lorsque les progéniteurs musculaires embryonnaires passent du programme de détermination à la différenciation myogénique (E. G. Reynaud et al. 1999; Zalc et al. 2014). Cette CDKI est impliquée dans une boucle de rétroaction positive avec MyoD *in vitro* et *in vivo*, où MyoD induit p57, renforçant ainsi l'activité et la stabilisation de MyoD (Bean et al. 2005).

Alors que les souris mutantes pour p21 sont tout à fait viables, les études réalisées sur des souris doubles mutantes p21/p57 ont montré que l'absence de ces protéines entraîne de sévères défauts musculaires, confirmant une redondance fonctionnelle entre les CKI au cours de la différenciation myogénique (Deng et al. 1995; P. Zhang, Wong, et al. 1999).

E. L'activation du programme myogénique

Au cours du processus de différenciation myogénique, l'activation d'un programme génétique spécifique au muscle permet d'induire l'expression de nombreux gènes cruciaux pour la différenciation, la structure et la fonction des cellules musculaires. Ce programme ne peut être initié que par le facteur de transcription MyoD mais d'autres MRFs et cofacteurs interviennent également dans l'activation de ce programme myogénique.

Des études transcriptomiques associées à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis d'identifier plus de 300 gènes régulés par MyoD, dont une proportion significative est directement régulée par liaison directe de MyoD aux promoteurs (Bergstrom et al. 2002). Plus récemment, des expériences de ChIP-seq de MyoD ont confirmé qu'il se fixe directement aux éléments régulateurs d'un grand nombre de gènes exprimés au cours de la différenciation myogénique (Cao et al. 2010).

MyoD régule l'expression de nombreux gènes, impliqués dans diverses fonctions biologiques, tels que ceux liés à l'arrêt du cycle cellulaire (*CDKN1A*, *RB*, *CCNBI*), ceux codant des facteurs de transcription myogéniques (*MYOD* lui-même, *MYOG*, *MEF2*, *SIX*), ceux codant les protéines structurelles du muscle ou encore des gènes du métabolisme. Ces différents gènes ne sont pas induits au même moment au cours de la myogenèse (Penn et al. 2004). Alors que MyoD active précocement les gènes codant les protéines du cycle cellulaire, les protéines d'adhésion et les facteurs de transcription ainsi que les gènes impliqués dans la structure du muscle sont activés plus tard pendant la différenciation. Bien que la temporalité de la régulation génique par MyoD ne soit pas encore entièrement comprise, elle s'expliquerait en partie par la nécessité de cofacteurs et de facteurs de transcription additionnels, qui sont eux-mêmes des cibles précoces de MyoD, pour activer des gènes tardifs (Penn et al. 2004). Par exemple, MyoD va induire précocement l'expression de MEF2 et de Myogénine, puis MEF2 et Myogénine

pourront coopérer avec MyoD pour activer les gènes tardifs de la myogenèse (Penn et al. 2004; Cao et al. 2006). De plus, Myogénine ne peut se fixer sur ses promoteurs cibles qu'à condition que MyoD ait préalablement « ouvert » la structure de la chromatine (Cao et al. 2006).

F. La maturation et le maintien des fibres musculaires

La phase de maturation est l'étape finale du développement musculaire. Elle est essentielle pour que les muscles puissent acquérir leur pleine fonctionnalité et leur capacité de contraction. Cette phase est sous le contrôle de MRF4. Bien que MRF4 soit exprimé et actif lors de l'étape de détermination (Kassar-Duchossoy et al. 2004), son expression tardive lors de la différenciation et son maintien dans les muscles adultes suggère que cette protéine joue un rôle plus important dans les étapes tardives de la différenciation myogénique.

D'après plusieurs études, l'inactivation du gène MRF4 chez la souris ne semble pas avoir d'effet significatif sur le développement musculaire. Cependant, il est possible que son absence soit compensée par une surexpression de Myogénine chez ces animaux. Différents phénotypes ont été décrits selon les délétions réalisées au sein du locus MRF4. Les souris MRF4^{-/-} présentent des malformations au niveau des côtes d'intensité variables, entraînant leur décès périnatal en raison d'insuffisance respiratoire (Braun et Arnold 1995; Patapoutian et al. 1995). De plus, ces souris montrent une perte de l'expression des chaînes lourdes de myosine ainsi qu'une réduction de la masse musculaire, malgré la présence de myofibres. Une étude a montré que la surexpression de MRF4 chez les souris dépourvues de myogénine permet une formation partielle de myotube, suggérant que MRF4 peut se substituer à Myogénine et induire la formation des myotubes au stade précoce de la myogenèse (Zhu et Miller 1997).

III. Serum Response Factor (SRF) : un acteur majeur de la différenciation myogénique

A. Expression de SRF

Le Serum Response Factor (SRF) est un facteur de transcription ubiquitaire de 67kDa (Affolter et al. 1994), largement exprimé des drosophiles aux êtres humains (Posern et Treisman 2006). Il a initialement été identifié en tant que protéine nucléaire médiant l'activation transcriptionnelle transitoire du proto-oncogène *c-fos* et des gènes d'actine cytosquelettiques en réponse au sérum, en se liant à un élément court de séquence d'ADN appelé élément de réponse au sérum (Serum Response Element, SRE) (Treisman 1987). Il appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine MADS (MCM-1, Agamous, Deficiens, Srf) (Sommer et al. 1990).

Le gène *Srf* est localisé sur le chromosome 17 chez la souris et sur le chromosome 6 chez l'homme (région 6p21.1). Il s'étend sur 10 607 paires de bases et est constitué de sept exons séparés par six introns. Il est transcrit en deux ARNm distincts, l'un de 4,5 kb et l'autre de 2,5 kb, qui diffèrent par leur région non codante en 3'. Ces deux transcrits sont ensuite traduits en une unique protéine (Chai et Tarnawski 2002). Les niveaux d'ARNm de *Srf* murin sont les plus élevés dans les muscles squelettiques et cardiaques adultes, mais sont à peine détectables dans les tissus du foie, des poumons et de la rate (Belaguli, Schildmeyer, et Schwartz 1997).

SRF est une protéine de 508 acides aminés chez l'homme (Norman et al. 1988) et de 504 acides aminés chez la souris (Belaguli, Schildmeyer, et Schwartz 1997). Il contient dans sa région N-terminale un signal de localisation nucléaire (NLS) (Rech et al. 1994). Le domaine MADS, qui se trouve dans la région intermédiaire, comprend le domaine de dimérisation de ainsi que celui de fixation à l'ADN. Ce domaine MADS, hautement conservé, constitue l'interface d'interaction de SRF avec ses partenaires (Belaguli, Schildmeyer, et Schwartz 1997; Shore et Sharrocks 1995). Enfin, sa région C-terminale comporte le domaine d'activation (**Figure 9**) (Chai et Tarnawski 2002; Johansen et Prywes 1993).

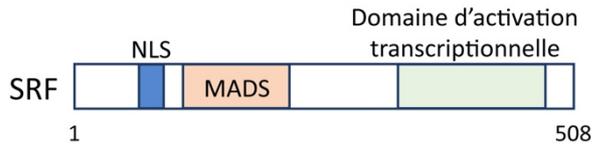


Figure 9 : Régions de SRF. D'après Posern et Treisman, 2006.

SRF fait l'objet d'un mécanisme d'épissage alternatif conduisant à la production de quatre isoformes : SRF-L, SRF-M, SRF-S et SRF-I (Kemp et Metcalfe 2000). Ces isoformes présentent une suppression partielle du domaine de transactivation en raison de la délétion de l'exon 5 dans le cas de SRF-M, des exons 4 et 5 pour SRF-S et des exons 3, 4 et 5 pour SRF-I (**Figure 10**). La traduction de la forme SRF-M en une protéine de 57 kDa conserve un domaine MADS intact. Elle est capable de se lier à l'ADN, de former des dimères avec SRF-L ou SRF-M et d'avoir un effet dominant négatif *in vitro* (Belaguli et al. 1999).

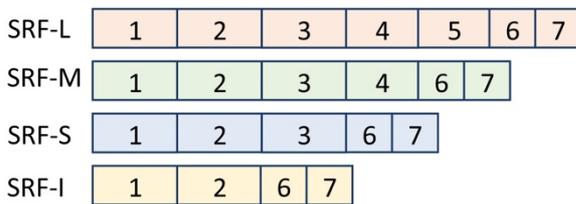


Figure 10 : Isoformes de SRF. D'après Kemp et Metcalfe, 2000.

B. Cibles de SRF

SRF, fonctionnel sous forme d'homodimères, se fixe à une séquence cible de type CC(A/T)₆GG, aussi appelée boîte CArG (Minty et Kedes 1986; Treisman 1987; Gustafson et Kedes 1989), qui fait partie du SRE. En effet, les gènes cibles de SRF sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs boîtes CArG dans leur région promotrice, permettant à SRF de se lier à son ADN cible (Sun et al. 2006). Il existe deux catégories d'éléments CArG : les éléments CArG consensus et les éléments CArG-like. En pratique, SRF présente une affinité plus élevée pour les boîtes CArG consensus (environ 64 boîtes CArG possibles), représentées par des séquences CCW₆GG où les W sont uniquement des nucléotides A ou T. Il convient de noter que SRF possède sur son propre promoteur deux boîtes CArG fonctionnelles, facilitant ainsi

son auto-régulation. SRF manifeste une affinité moindre pour les éléments CARG-like (environ 1152 boîtes possibles), constitués de la séquence consensus CCW₆GG avec une déviation d'une paire de bases. En combinant le nombre de boîtes CARG consensus et CARG-like, on retrouve 1216 permutations où SRF peut théoriquement se fixer (Miano, Long, et Fujiwara 2007). Chez l'homme, environ 300 gènes présentent un élément CARG et sont activés par SRF, représentant environ 1% du génome (Sun et al. 2006; Modak et Chai 2010).

Des études *in vivo* et *in silico* suggèrent la présence de différentes classes de gènes cibles de SRF (**Figure 11**) (Chai et Tarnawski 2002; Sun et al. 2006; Philippar et al. 2004). SRF régule d'une part l'expression des IEGs (d'*immediate early genes*) tels que *c-fos*, *fosB*, *junB* et la famille *Egr*. L'activation de ces gènes se produit immédiatement après leur stimulation, sans nécessiter la synthèse de nouvelles protéines. Ces gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou codent pour des facteurs de croissance. En conséquence, SRF pourrait influencer de manière indirecte la prolifération et la croissance cellulaire, de façon dépendante du type cellulaire puisque certains travaux ont montré que SRF n'est pas indispensable à la prolifération (Fleige et al. 2007; Kaplan-Albuquerque et al. 2005; Koegel et al. 2009), suggérant la mise en place de voies de compensation en absence de SRF qui permettent de maintenir la croissance et la prolifération cellulaire. D'autre part, SRF contrôle de nombreux gènes impliqués dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette tels que *Actb* et *Actg2* (Chai et Tarnawski 2002; Sun et al. 2006), en plus des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, comme les sous-unités 1, 5 et 9 des intégrines ou les syndécans 2 et 4 (Miano, Long, et Fujiwara 2007). Enfin, SRF régule l'expression des gènes spécifiques des muscles squelettiques, lisses et cardiaques, notamment *MyoD*, qui régule la différenciation musculaire. D'autres cibles de SRF sont des protéines du système contractile telles que les chaînes lourdes et légères de myosine, l'actine musculaire squelettique (*Acta1*) ou encore la troponine, et des protéines impliquées dans le métabolisme calcique et énergétique (Chai et Tarnawski 2002; Sun et al. 2006). Enfin, d'autres gènes cibles de SRF sont liés au guidage des axones et à la plasticité synaptique (Philippar et al. 2004; Knöll et al. 2006).

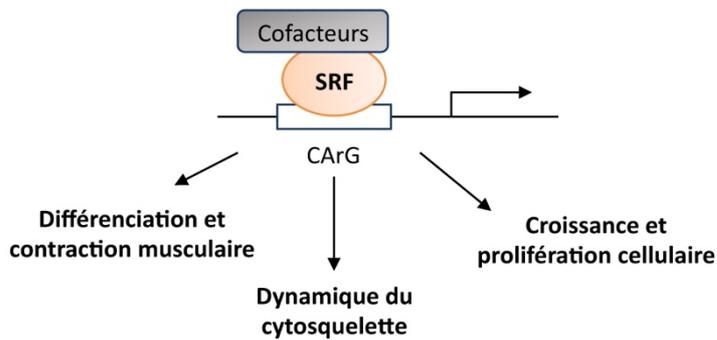


Figure 11 : Les classes de gènes cibles de SRF.

C. Régulation de l'activité de SRF

SRF exerce son action sur l'expression génique en interagissant avec d'autres facteurs de transcription. Parmi eux, on retrouve les facteurs de complexe ternaire (Ternary Complex Factors, TCF), qui jouent un rôle dans la médiation des voies de signalisation de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et du calcium (Buchwalter, Gross, et Wasylyk 2004; Shaw, Schröter, et Nordheim 1989) ainsi que les membres de la famille de cofacteurs transcriptionnels Myocardine (MRTFs ; MKL), qui participent à la médiation de la signalisation de l'actine (Cen et al. 2003).

1. Voie MAPK/TCF

Les membres de la famille des TCF Elk-1, SAP-1 et Net représentent la première classe de coactivateurs de SRF. Ces facteurs possèdent un domaine Ets hautement conservé dans leur région N-terminale, leur permettant de se lier à des régions d'ADN conservées, de type GGA(A/T), appelées sites de liaison Ets (EBS), adjacents au site de liaison SRF (C. S. Hill, Wynne, et Treisman 1994). Les TCFs possèdent également un domaine d'activation C-terminal conservé qui contient des sites potentiels consensus pour les MAPK, favorisant leur activation par ERK, JNK ou p38 (Price, Rogers, et Treisman 1995). Des études de profilage génomique ont montré que les TCFs sont présents au niveau de l'élément de réponse au sérum (SRE) même dans les cellules non stimulées, ce qui suggère que l'activation du SRE implique la régulation de l'activation transcriptionnelle plutôt que la liaison à l'ADN (Herrera, Shaw, et Nordheim 1989). En l'absence de la signalisation MAPK, SAP-1 va activer la transcription, tandis que

Net la réprime et que Elk-1 est inactif (Giovane et al. 1994). L'activation de la voie MAPK entraîne la phosphorylation des TCFs, permettant d'inhiber la liaison entre leur domaine C-terminale et leur domaine Ets et augmentant ainsi leur capacité de liaison à l'ADN (Brown et al. 1999). Les TCFs forment un complexe avec SRF au niveau d'une région SRE, définie comme une région promotrice présentant un domaine EBS adjacent à une boîte CArG, conduisant à l'activation de la transcription de gènes tels que *c-fos*, *JunB* et *Egr-1* (**Figure 12**) (Dalton et Treisman 1992; Buchwalter, Gross, et Wasyluk 2004).

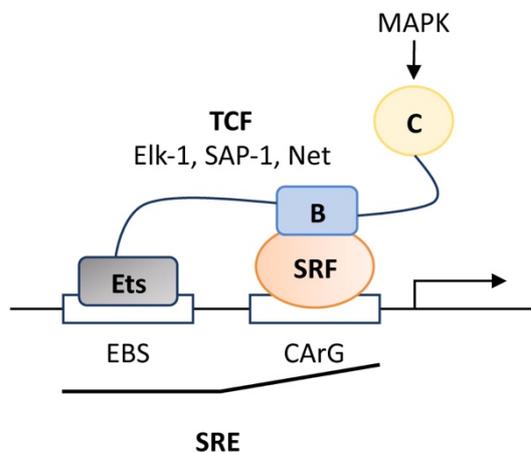


Figure 12 : La voie MAPK/TCF. D'après Posern and Treisman, 2006.

2. La voie Rho/actine/MRTFs

L'activité de SRF est aussi régulée par la famille des petites protéines GTPases Rho (C. S. Hill, Wynne, et Treisman 1995) pour le recrutement des facteurs de transcription MRTFs au niveau des gènes cibles de SRF (Olson et Nordheim 2010).

Les MRTFs sont des cofacteurs de SRF et présentent une grande homologie avec la Myocardine. Ils contiennent deux membres : MRTF-A (aussi appelé MAL, MKL1 ou BSAC) et MRTF-B (MAL16 ou MKL2). Le gène codant la Myocardine, *Myocd*, est uniquement exprimé dans les muscles cardiaques et lisses (Posern et Treisman 2006) et ses isoformes sont exclusivement nucléaires. Ils activent de manière constitutive la transcription dépendante de SRF (Guettler et al. 2008). En revanche, MRTF-A et MRTF-B sont ubiquitaires et leur localisation est régulée par la dynamique de l'actine. Une étude a révélé que MRTF-A est

majoritairement cytoplasmique et qu'une stimulation au sérum entraîne son accumulation dans le noyau (Miralles et al. 2003). Il a ensuite été démontré que la localisation de MRTF-A est régulée par un système d'import/export dynamique qui repose sur la disponibilité des monomères d'actine (Vartiainen et al. 2007). La concentration d'actine monomérique en absence de sérum favorise l'export de MRTF-A dans le cytoplasme tout en inhibant son import dans le noyau. Lors d'une stimulation au sérum, la polymérisation de l'actine augmente, réduisant la disponibilité de l'actine monomérique et provoquant ainsi une diminution du taux d'export de MRTF-A. La translocation nucléaire des MRTFs induit l'activation des gènes cibles dirigés par SRF.

3. Autres modes de régulation

D'autres cofacteurs peuvent exercer une régulation positive ou négative sur l'activité transcriptionnelle de SRF. Les membres de la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc GATA, le facteur de transcription à homéodomaine Nkx2.5 et les protéines riches en cystéines LIM-only de la famille CRP favorisent la transcription SRF-dépendante. La protéine FHL2, HDAC4, la protéine à doigts de zinc KLF4 (Krueppel-Like Factor 4), la protéine à homéodomaine MSX1 ou encore la protéine HOP (homeodomain-only protein) régulent négativement l'activité transcriptionnelle de SRF (Olson et Nordheim 2010).

SRF peut être phosphorylé sur la thréonine 159 par la kinase de la dystrophie myotonique, et la sérine 162 du domaine MADS par la protéine kinase C-alpha (PKC α). Cet événement inhibe la liaison de SRF à l'ADN et la formation de complexes avec les MRTFs (D. Iyer et al. 2003; 2006). Dans les fibroblastes, la compétition TCF-MRTF à de nombreux sites SRF favorise l'activation de la prolifération cellulaire plutôt que les programmes du cytosquelette et de la contractilité (Gualdrini et al. 2016).

SRF possède deux sites de clivage ciblés par les caspases 3 et 7. Ce clivage entraîne la formation de deux fragments incapables d'activer la transcription de *c-fos* dans les cellules humaines BJAB (Drewett et al. 2001).

4. Invalidation de SRF dans les systèmes cardiovasculaire et neuromusculaire

L'importance de SRF au cours du développement embryonnaire des souris a été démontrée par l'équipe de Nordheim en 1998, qui a constaté que l'inactivation de *Srf* est létale à E12.5, avant le début de l'organogenèse, et entraîne une gastrulation incomplète avec une absence de mésoderme (Arsenian et al. 1998). Le développement de nombreuses lignées murines exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de promoteurs spécifiques a permis de caractériser le rôle de SRF dans de nombreux tissus, mais seuls les systèmes neuromusculaires et cardiovasculaires sont présentés dans cette section.

a) *Le système cardiovasculaire*

SRF joue un rôle essentiel dans la formation du cœur. Son expression y est détectable dès E7.75, en même temps que la migration des cellules progénitrices cardiaques pour former le tube cardiaque. La délétion de SRF entraîne la mort embryonnaire à E11.5, avec un myocarde anormalement mince, des cavités cardiaques dilatées et un septum interventriculaire désorganisé, suite à la perturbation de la formation des sarcomères des cardiomyocytes et au développement de trabéculations dans les ventricules (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004). Dans le cœur adulte, l'altération de l'expression de SRF provoque une augmentation de la fibrose et une hypertrophie cardiaque (Huet et al. 2005).

Dans les cellules endothéliales, la suppression de SRF perturbe les complexes qui constituent les jonctions intercellulaires (Holtz et Misra 2008).

L'inactivation embryonnaire de SRF dans les cellules musculaires lisses provoque une diminution significative du nombre de progéniteurs aortiques à E10.5 (Miano et al. 2004). Dans des études *in vitro* utilisant des cultures primaires de cellules humaines dérivées de l'artère coronaire, le knock-down de *SRF* par siARN entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, stoppant la prolifération et entraînant la sénescence cellulaire (Werth et al. 2010). La suppression de SRF à l'âge adulte dans les cellules musculaires lisses entraîne une réduction de la contractilité artérielle et une augmentation de la rigidité des artères carotides (Galmiche et al. 2013).

b) *Le système nerveux*

La suppression de SRF dans les cellules du prosencéphale pendant la période périnatale perturbe la migration des neurones, entraînant une accumulation des neurones précurseurs dans la zone subventriculaire (Alberti et al. 2005). Lorsque la perte de SRF est déclenchée à l'âge adulte dans les cellules du prosencéphale, les souris mutantes manifestent des problèmes de comportement, bien que le nombre de neurones reste inchangé. En effet, elles ont du mal à s'adapter à un nouvel environnement et présentent des capacités de mémorisation et d'apprentissage réduites (Etkin et al. 2006).

L'absence de SRF dans les neurones sensoriels du ganglion spinal entraîne une létalité embryonnaire, le décès survenant entre E13.5 et E17.5. Même si l'absence de SRF n'affecte ni la viabilité, ni la maturation des neurones sensoriels du ganglion spinal, cette étude révèle un rôle critique de SRF dans les mécanismes d'extension et de ramification des axones de ces neurones (Wickramasinghe et al. 2008).

c) *Le système musculaire squelettique*

L'utilisation d'une approche d'inactivation de *SRF* par transfection d'ARN antisens, induite par la dexaméthasone, dans des myoblastes murins C2C12 a révélé l'importance de SRF dans la prolifération et la différenciation de ces cellules (Soulez et al. 1996). De plus, des expériences menées sur des C2C12 ont démontré que l'inhibition de l'activité de SRF conduit à une suppression de l'expression du facteur de régulation myogénique MyoD.

L'utilisation de deux modèles d'inactivation de *SRF* dans le muscle squelettique embryonnaire ont permis de démontrer le rôle essentiel de SRF dans le développement du système musculaire squelettique (S. Li et al. 2005). Les deux modèles ont permis une délétion de SRF à des stades embryonnaires mais l'un des modèles présente une délétion plus tardive. L'inactivation de *SRF* conduit à une hypoplasie musculaire sévère avec une mortalité des souris mutantes pendant la période périnatale dans les deux modèles, bien que le phénotype soit plus sévère dans le modèle où SRF est délété plus précocement (S. Li et al. 2005).

Un modèle murin dans lequel la recombinaise Cre, placée sous le contrôle du promoteur du gène codant l'actine squelettique humaine (HSA), commence à être exprimé à E9 puis atteint

un pic d'expression pendant la période périnatale, a permis d'étudier la fonction de SRF dans le développement musculaire au cours de la période périnatale (Charvet et al. 2006). A la naissance, les souris mutantes semblent normales mais manifestent dès le troisième jour un retard de croissance par rapport aux témoins. Seule la moitié des mutants survit à 6 semaines et présente un important retard de croissance, une scoliose ainsi qu'une masse musculaire particulièrement réduite. A l'âge adulte, les muscles des mutants montrent des fibres de taille réduite et une augmentation de l'espace interstitiel, signe d'une immaturité musculaire. Ils présentent également des anomalies structurales, telles que la désorganisation des sarcomères, des irrégularités dans la disposition des myofibrilles et une accumulation de glycogène.

La suppression de SRF dans les muscles squelettiques adultes n'entraîne aucun phénotype observable chez les souris mutantes avant 5 mois suggérant que SRF n'est pas nécessaire pour maintenir les fibres musculaires avant cette période. Cinq mois après invalidation, les souris présentent un vieillissement musculaire caractérisé par une diminution de la taille des fibres ainsi qu'une désorganisation des sarcomères, une réduction du nombre de fibres rapides au profit des fibres lentes, l'apparition de fibrose et l'accumulation de lipides dans le tissu musculaire (Lahoute et al. 2008). Il est intéressant de noter que l'expression endogène de SRF dans les muscles diminue naturellement avec l'âge, d'après des études réalisées chez l'homme et la souris (Lahoute et al. 2008; Sakuma et al. 2008).

IV. Le complexe ASC-1

Le complexe ASC-1 (Activating Signal Co-integrator-1 complex) est un complexe protéique tétramérique composé des sous-unités ASC-1, ASCC1, ASCC2 et ASCC3. A ce jour, les données structurales et fonctionnelles disponibles sur ces protéines sont limitées. Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis focalisée sur les sous-unités ASC-1 et ASCC1 du complexe.

A. Les sous-unités du complexe ASC-1

La sous-unité ASC-1 (Activating Signal Co-integrator-1), qui donne son nom au complexe, est un co-activateur transcriptionnel codé par le gène *TRIP4* (*Thyroid Hormone Receptor Interactor 4*). Le gène *TRIP4* est localisé sur le chromosome 15 (région 15q22.31) chez l'homme et composé de 15 exons. Chez la souris, *Trip4* est localisé sur le chromosome 9 et est composé de 17 exons.

ASC-1 est une protéine de 581 acides aminés (AA) et de poids moléculaire de 68 kDa (H.-J. Kim et al. 1999), exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères. En effet, l'ARNm de *TRIP4* est détecté à des niveaux élevés dans plusieurs tissus, notamment la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, le système gastro-intestinal, les leucocytes, le système nerveux central, le cœur et les muscles squelettiques. Chez la souris, notre équipe a établi que l'expression d'ASC-1 est plus élevée dans le cœur, le diaphragme et les muscles axiaux, par rapport aux muscles des membres (Davignon et al. 2016a).

Les premières études de localisation subcellulaire ont rapporté qu'ASC-1 est localisée dans le noyau des cellules HeLa (H.-J. Kim et al. 1999), des fibroblastes de rat (H.-J. Kim et al. 1999) et des fibroblastes humains (Knierim et al. 2016b). Cependant, une étude récente a montré qu'ASC-1 pouvait également être localisé dans le cytoplasme de cellules de mélanome humain (Hao et al. 2018), suggérant une modification de sa localisation subcellulaire dans certaines conditions pathologiques.

La protéine ASC-1 interagit *in vitro* avec des facteurs de transcription basaux (TBP, TFIIA), des facteurs de transcription (CBP, SRC-1) et des récepteurs nucléaires (TR, RXR, ER) par l'intermédiaire d'un domaine chélateur en doigts de zinc hautement conservé (**Figure 13**) (H.-J. Kim et al. 1999). ASC-1 contient aussi un domaine ASCH conservé en C-terminal prédisant une capacité de liaison aux ARNs, qui serait impliquée dans la coordination du traitement des pré-ARNm d'après des prédictions *in silico* (Auboeuf et al. 2002; L. M. Iyer, Burroughs, et Aravind 2006).

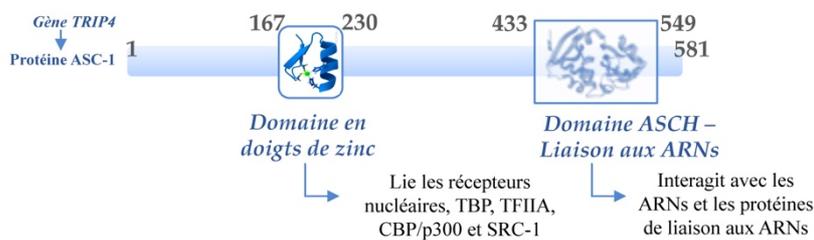


Figure 13 : Représentation schématique de la protéine ASC-1.

La protéine ASCC1 (Activating Signal Co-integrator Subunit 1) est la plus petite sous-unité du complexe (45 kDa), contenant un domaine d'homologie K (KH) de liaison à l'ARN ainsi qu'un domaine RNA-ligase en position C-terminale (Soll et al. 2018).

ASCC2 est une sous-unité de 100 kDa contenant un domaine de reconnaissance de sites ubiquitylés (CUE ; coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation) qui serait impliqué dans la signalisation de l'ubiquitine (Brickner et al. 2017).

La plus grande sous-unité, ASCC3 (200 kDa), présente une forte homologie avec les domaines d'hélicase ARN de type DExH. Cependant, ASCC3 a récemment été caractérisée comme une hélicase ADN impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN (Dango et al. 2011).

B. Les différentes conformations du complexe ASC-1 révèlent des rôles spécifiques d'ASC-1 et d'ASCC1

Les quatre sous-unités du complexe ASC-1 peuvent s'associer différemment afin de remplir diverses activités transcriptionnelles, post-transcriptionnelles ou traductionnelles (**Figure 14**). ASCC2 et ASCC3 apparaissent comme le noyau fonctionnel commun aux 3 complexes décrits à ce jour. ASC-1 et ASCC1 semblent être responsables des différences fonctionnelles entre ces complexes en contribuant à leur localisation ou assemblage, et jouent un rôle critique dans la stabilisation des interactions impliquant un large éventail de partenaires tels que les ribosomes, des éléments de la machinerie ARN polIII, des facteurs de transcription ou des régulateurs transcriptionnels.

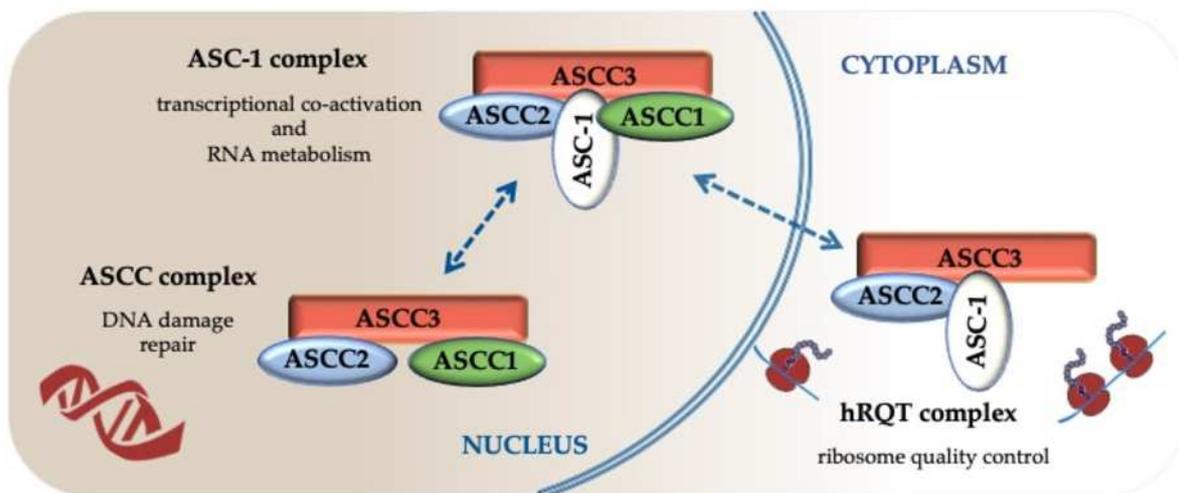


Figure 14 : Modèle proposé pour les différents complexes contenant les sous-unités ASC-1, ASCC1, ASCC2 et ASCC3 ainsi que leur localisation subcellulaire. Les doubles flèches en pointillés indiquent de potentiels changements de localisation ou de conformation n'ayant pas encore été démontrés. Figure issue de Meunier et coll., 2021.

1. Le complexe ASC-1

Le complexe ASC-1, formé par l'association stœchiométrique de ces quatre sous-unités (**Figure 15**), a initialement été caractérisé comme capable de transactiver des facteurs *in vitro* de transcription tels que AP-1, NF-kB, et SRF, impliqués dans les voies de contrôle du destin

cellulaire, y compris la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. La sous-unité ASC-1 s'est avérée essentielle pour l'interaction fonctionnelle du complexe ASC-1 avec ces facteurs de transcription via sa partie N-terminale, et ASCC1 essentielle pour la transactivation de AP-1 (Jung et al. 2002). Il a également été constaté qu'ASC-1 régule l'expression de l'inhibiteur PAI2 (anti-apoptotic plasminogen activator inhibitor-2) dans une lignée cellulaire de cancer gastrique (Almeida-Vega et al. 2009). Plus récemment, de nouvelles activités transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de ce complexe ont été découvertes, révélant sa contribution aux événements généraux de transcription et d'épissage par l'intermédiaire d'interactions avec la machinerie RNAP II. Cette fois encore, la sous-unité ASC-1 joue un rôle primordial car l'interaction du complexe avec la machinerie RNAP II est perturbée par la délétion de son domaine C-terminal (Chi et al. 2018).

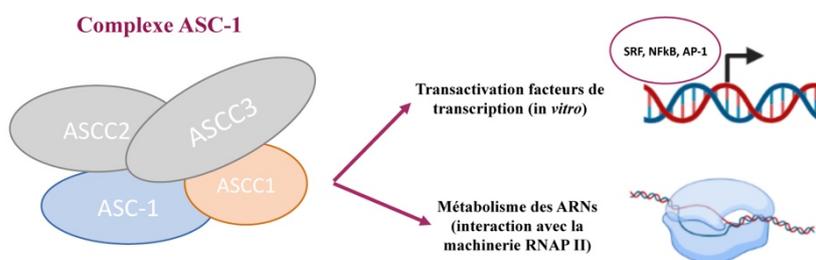


Figure 15 : Conformation du complexe ASC-1.

2. Le complexe ASCC

Le plus petit complexe, le complexe ASCC, a été identifié lors de l'étude d'un nouveau mécanisme moléculaire couplant une hélicase et une enzyme de désalkylation pour effectuer la réparation des dommages à l'ADN et maintenir l'intégrité génomique (Dango et al. 2011). L'approche protéomique de cette étude a identifié ASCC1, ASCC2 et ASCC3 comme les sous-unités associées à ce complexe de réparation de l'alkylation de l'ADN. Ce complexe capte une nouvelle signalisation dépendante de l'ubiquitine impliquée dans la réparation de l'ADN, entraînant le recrutement d'enzymes de réparation d'alkylation, ASCC3 et ALKBH3. La liaison à l'ubiquitine d'ASCC2 et l'activité hélicase d'ASCC3 sont essentielles au bon fonctionnement de cette voie de réponse à l'alkylation (Brickner et al. 2017). Le bon assemblage de ce complexe semble reposer sur ASCC1, aussi responsable de l'adressage du complexe aux foyers de nucléotides alkylés mais le mécanisme précis n'a pas encore été élucidé (Soll et al. 2018).

3. Le complexe hRQT

Un complexe humain, appelé hRQT et composé des sous-unités ASCC3, ASCC2 et ASC-1, a été associé au mécanisme de blocage des ribosomes, déclenchant la voie cytoplasmique de contrôle qualité associée aux ribosomes (RQC). Ce complexe est dédié au contrôle qualité de la traduction en assurant une expression précise des gènes et le maintien de l'homéostasie protéique. La reconnaissance et le désassemblage des ribosomes bloqués sont obtenus grâce à l'activité de liaison à l'ubiquitine d'ASCC2 et l'activité hélicase d'ASCC3. Bien que le rôle d'ASC-1 n'ait pas clairement été défini, son absence provoque une association instable du complexe hRQT avec les ribosomes ubiquitinés, entraînant une baisse d'efficacité dans l'induction du RQC. ASC-1 jouerait un rôle dans la stabilisation de cette association par le biais d'une potentielle activité de liaison à l'ARN. Une récente étude a montré qu'ASCC1 n'est pas nécessaire pour l'induction du RQC et que ce complexe peut donc se former sans cette sous-unité (Hashimoto et al. 2020). Cependant, une autre étude a étendu la composition du complexe hRQT aux quatre sous-unités du complexe ASC-1, illustrant la difficulté de déterminer le complexe minimal fonctionnel requis pour cette activité (Juszkiewicz et al. 2020).

C. ASC-1, régulateur de la prolifération, de la croissance et du cycle cellulaire

Bien que l'exploration expérimentale n'ait pas encore abordé de manière spécifique les fonctions d'ASCC1, ASCC2 et ASCC3 dans le système musculaire, on constate ces dernières années l'émergence d'ASC-1 en tant que nouveau régulateur de plusieurs mécanismes et voies cellulaires essentiels au développement et à la croissance musculaire.

Notre équipe a rapporté pour la première fois des mutations récessives sur le gène *TRIP4*, codant la sous-unité ASC-1, responsables de nouvelles formes de myopathies congénitales (Davignon et al. 2016a). En étudiant des cellules dérivées de patients affectés par cette forme spécifique de myopathie congénitale liée à ASC-1, notre laboratoire a constaté que l'absence de cette protéine perturbe la croissance des myotubes. Cette observation a été

corroborée par des expériences *in vitro* utilisant une lignée de myoblastes murins *Trip4* knockdown (*Trip4*-KD), qui ont montré une réduction du diamètre des myotubes ainsi qu'une diminution significative de l'expression de protéines sarcomériques telles que la chaîne lourde de myosine. Les résultats *ex vivo* et *in vitro* ont contribué à identifier ASC-1 comme un nouveau régulateur de la différenciation myogénique tardive et de la croissance des fibres musculaires (Davignon et al. 2016a). Ce travail a établi pour la première fois qu'ASC-1 est indispensable pour le développement et la croissance des muscles squelettiques humains, tout en mettant en lumière la co-régulation transcriptionnelle comme une nouvelle voie physiopathologique dans les maladies musculaires héréditaires.

Une partie de la croissance cellulaire étant déterminée à des stades de prédifférenciation (prolifération), notre laboratoire a aussi étudié le rôle d'ASC-1 dans la prolifération cellulaire en utilisant la lignée C2C12 *Trip4*-KD. Les myoblastes dépourvus d'ASC-1 présentent alors une prolifération accrue, attribuable à un raccourcissement de la phase G0/G1 du cycle cellulaire, entraînant une accélération de la progression du cycle cellulaire et une diminution de la taille des myoblastes (Villar-Quiles *et al.*, 2020a). Ce phénotype cellulaire est aussi associé à une expression altérée des protéines contrôlant la progression du cycle cellulaire. Effectivement, les niveaux de Cycline D1 et p21, deux acteurs majeurs de la phase G1 du cycle cellulaire, sont significativement augmentés en absence d'ASC-1, suggérant une accumulation du complexe cycline D1-Cdk4/6 responsable de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb). La forme hyperphosphorylée de pRb est effectivement prédominante dans les cellules appauvries en ASC-1. Lorsqu'à l'inverse pRb est hypophosphorylée, elle inhibe les facteurs de transcription E2F requis pour la transition G0/G1-S et l'entrée en phase S. Ainsi, la surexpression de la cycline D1 et p21, en absence d'ASC-1, induisant l'hyperphosphorylation de pRb, est responsable de la perte de l'inhibition de la transition G0/G1-S médiée par pRb, l'accélération du cycle cellulaire et un défaut de croissance cellulaire (**Figure 16**). De plus, la régulation du cycle cellulaire par ASC-1 n'est pas restreinte aux cellules myogéniques puisqu'une prolifération accrue a également été décrite dans les fibroblastes de patients exprimant deux mutations du gène *TRIP4* (Villar-Quiles et al. 2020).

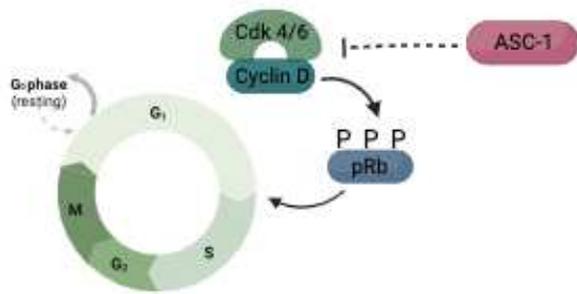


Figure 16 : *ASC-1* régule la transition G0/G1-S en régulant l'expression de la cycline D et la phosphorylation de pRb. Les traits pleins représentent des régulations indirectes et les traits discontinus représentent des régulations ou toutes les étapes intermédiaires n'ont pas encore été mises en évidence expérimentalement.

Les données actuelles suggèrent donc qu'ASC-1 régule au moins deux étapes de la myogenèse, en tant que régulateur négatif du cycle cellulaire et de la prolifération, et en tant qu'acteur clé dans la promotion de la croissance des myoblastes en prolifération et des myotubes différenciés (**Figure 17**).

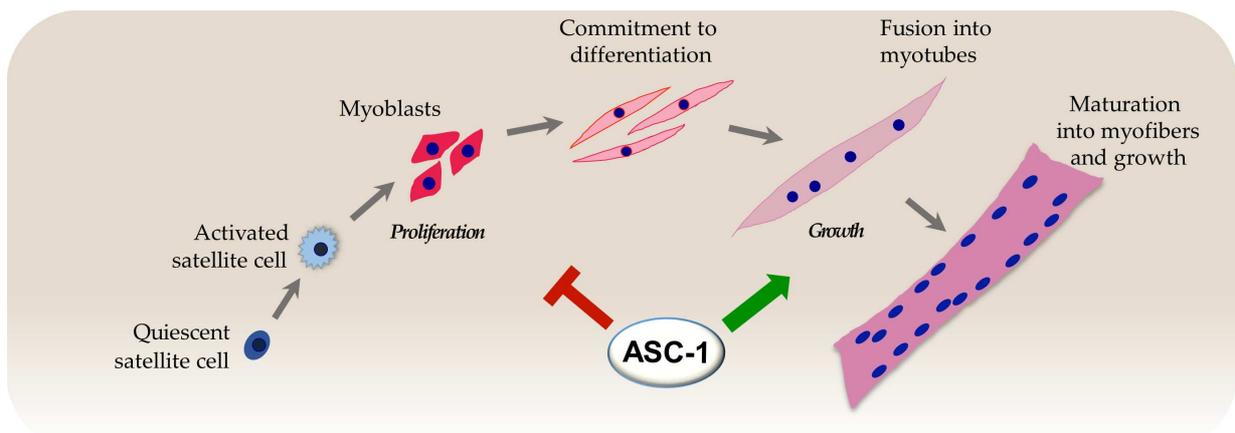


Figure 17 : *ASC-1* inhibe la progression du cycle cellulaire dans les cellules myogéniques en régulant l'expression et la phosphorylation de protéines du cycle, et favorise la croissance des cellules musculaires. (Figure issue de Meunier et coll., 2021).

ASC-1 a aussi été identifié comme régulateur de la prolifération, du cycle et de la croissance cellulaire dans certaines lignées cancéreuses. En opposition avec son effet précédemment décrit dans les cellules musculaires et les fibroblastes, il a toujours été caractérisé dans le cancer comme ayant un rôle promoteur de tumeur, c'est-à-dire favorisant la prolifération, la progression du cycle et l'immortalisation cellulaire (Yoo et al. 2014; Hao et al. 2018; Che et al. 2019; Yang et al. 2020; W. Li et al. 2021).

V. Pathologies neuromusculaires congénitales : les myopathies congénitales et l'amyotrophie spinale

Les défauts dans les sous-unités ASC-1 et ASCC1 du complexe ASC-1 semblent conduire à un spectre inhabituellement large de maladies neuromusculaires. En effet, des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCC1* ont été rapportées à la fois chez des patients atteints de myopathies congénitales (Davignon et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020), sans atteinte des motoneurones, ainsi que chez des patients présentant une amyotrophie spinale (SMA), une maladie congénitale des motoneurones, associée à des fractures osseuses prénatales (Knierim et al. 2016a; Böhm et al. 2019). Des variants *ASCC3* ont également été reportés chez onze patients présentant un syndrome neurodéveloppemental et neuromusculaire (Nair et al. 2021). Toutefois, aucun variant *ASCC2* n'a été associé à une pathologie humaine. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les pathologies associées aux sous-unités ASC-1 et ASCC1 du complexe, les myopathies congénitales et l'amyotrophie spinale.

A. Généralités sur les myopathies congénitales

1. Caractéristiques cliniques et histopathologiques

Les myopathies congénitales sont un groupe de maladies musculaires héréditaires rares, génétiquement et cliniquement hétérogènes, dont la prévalence a été estimée à environ 1,5 pour 100 000 dans la population générale et à 2,73 pour 100 000 dans la population infantile (Huang, Bi, et Yang 2021). Elles se manifestent généralement dès la naissance ou dans la petite enfance, et sont caractérisées par une hypotonie néonatale, un retard du développement moteur, une amyotrophie et une faiblesse musculaire généralisées (Cassandrini et al. 2017). Les patients peuvent aussi présenter d'autres signes tels qu'une faiblesse de la musculature faciale, une scoliose consécutive à l'hypotonie des muscles paravertébraux ou encore des atteintes des muscles extra-oculaires. Ces pathologies sont souvent associées à des insuffisances respiratoires et/ou cardiaques (Bönnemann et al. 2014; Schorling, Kirschner, et Bönnemann 2017), souvent responsables d'une mortalité précoce puisque la plupart des patients atteints de

myopathie congénitale ne disposent d'aucun traitement spécifique à ce jour (Jungbluth et al. 2017).

Les myopathies congénitales se distinguent des dystrophies musculaires congénitales, qui se caractérisent par des lésions significatives telles que la nécrose, la régénération ou la fibrose musculaire. Au contraire, les myopathies congénitales présentent des anomalies caractéristiques de l'architecture interne des fibres musculaires (C. A. Sewry et Wallgren-Pettersson 2017; Phadke 2019), sans lésions dystrophiques. Chaque myopathie congénitale individuelle est classée sur la base des caractéristiques histopathologiques et ultrastructurales des biopsies musculaires (**Figure 18**). On distingue trois classes principales de myopathies congénitales :

- Les myopathies à némaline : elles se caractérisent par la présence de corps à némaline, c'est-à-dire des inclusions en forme de bâtonnets dans le sarcoplasme et/ou le noyau des fibres musculaires. Ces inclusions sont constituées de protéines dérivées du disque Z. Il existe différents variants de ces myopathies, les myopathies à corps zébrés ou encore les myopathies avec des bâtonnets centraux (Malfatti et Romero 2016).
- Les myopathies à cores : elles se caractérisent par la présence de zones focales de désorganisation des sarcomères et de déplétion des mitochondries, définies par l'absence d'activité enzymatique oxydative, appelées « cores » (A. Ferreiro et al. 2000; Ana Ferreiro, Monnier, et al. 2002; Ana Ferreiro, Quijano-Roy, et al. 2002; Jungbluth, Sewry, et Muntoni 2011). La localisation, la forme, la taille et le nombre de ces « cores » définissent les différents sous-types des myopathies à cores. Ce type de myopathie inclue les myopathies avec cores centraux (CCD) et les myopathies avec multi-minicores (MmD).
- Les myopathies centronucléaires : elles se caractérisent par la localisation des noyaux au centre des fibres musculaires plutôt qu'à la périphérie (sous la membrane cellulaire) (Romero et Bitoun 2011).

D'autres formes très rares de myopathies congénitales ont été décrites, telles que la myopathie avec des lésions de type « cap » (accumulation sous-sarcolemmale de filaments désorganisés en forme de croissant), la myopathie avec accumulation de myosine, la myopathie avec corps réducteurs, la myopathie sarcotubulaire ou encore la myopathie avec disproportion des types de fibres.

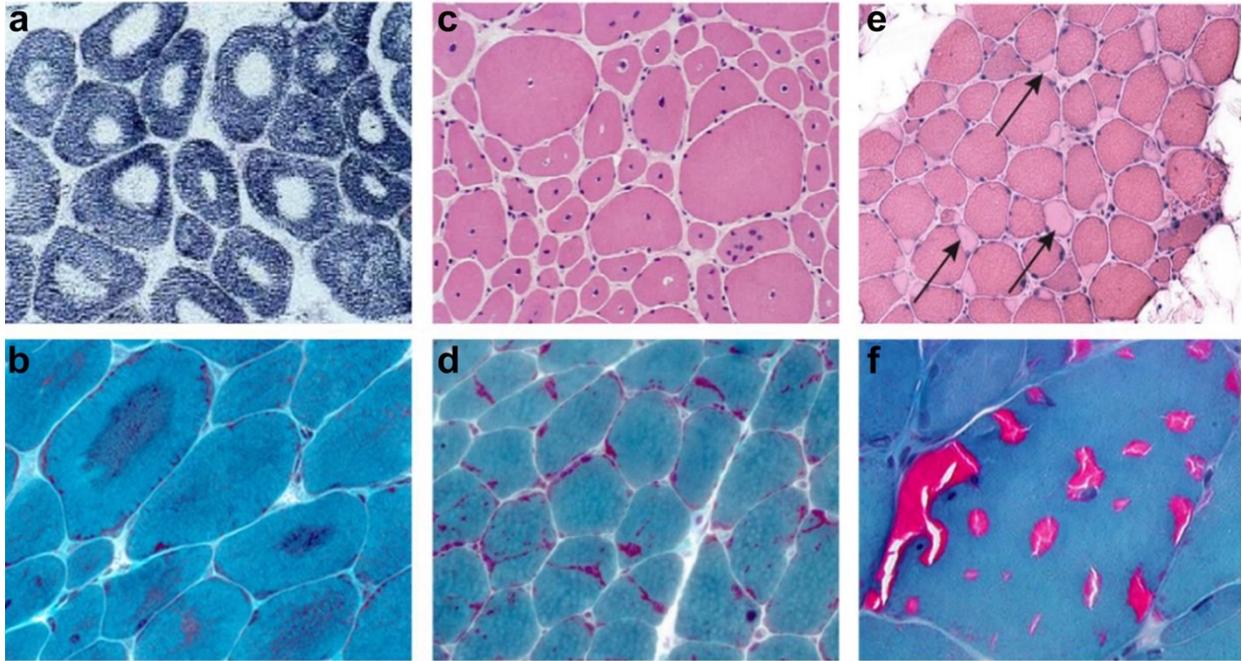


Figure 18 : Caractéristiques histopathologiques des différents groupes de myopathies congénitales. (a-b) Myopathies à cores (c) Myopathie centronucléaire (d) Myopathie à némaline (e) Myopathie avec accumulation de myosine (f) Myopathie avec des agrégats tubulaires. Figure issue de Gineste et Laporte., 2013 (Gineste et Laporte 2023).

2. Caractéristiques génétiques

Le séquençage de nouvelle génération a permis d'identifier un nombre croissant de gènes associés aux myopathies congénitales. Plus de 30 gènes ont été associés à ces pathologies mais près de 40% des patients demeurent génétiquement non caractérisés (Gonorazky, Bönnemann, et Dowling 2018). La plupart de ces gènes codent des protéines impliquées dans l'architecture ou la fonction contractile des fibres musculaires dont l'homéostasie calcique (Treves et al. 2017) et le couplage excitation-contraction (Horstick et al. 2013), le remodelage membranaire (Jungbluth et Gautel 2014; Fujise et al. 2020), la génération de force myofibrillaire (Lawlor et al. 2011; Nowak, Ravenscroft, et Laing 2013) ou l'assemblage (Gonchar et al. 2021) et l'interaction des filaments fins et épais (Jungbluth et al. 2018).

La plupart des myopathies congénitales peuvent être causées par des mutations dans différents gènes chez différents patients. Inversement, les mutations d'un même gène peuvent être à l'origine de différents types de myopathies congénitales.

A ce jour, la myopathie à némaline est associée à des mutations dans au moins 13 gènes (Malfatti et Romero 2016; Gonorazky, Bönnemann, et Dowling 2018; Caroline A. Sewry, Laitila, et Wallgren-Pettersson 2019) : *NEB*, *TPM2*, *TPM3*, *CFL2*, *ACTA1*, *TNNT1*, *TNNT3*, *KBTBD13*, *KLHL40*, *KLHL41*, *MYO18B*, *MYPN*, *RYR3* et *LMOD3*. Plus récemment, *CAP2* a été proposé comme nouveau gène potentiel pour la myopathie à némaline (Gurunathan et al. 2022). Les formes les plus fréquentes sont causées par des mutations dans les gènes *NEB* et *ACTA1*, les mutations du gène *ACTA1* étant souvent responsables de formes très sévères de la maladie.

Les myopathies à cores sont généralement causées par des mutations des gènes *RYR1*, *SEPNI*, *TTN*, *MYH7*, *UNC45B*, *ACTN2*, *CACNA1S*, *FXR1* et *MEGF10* (Topaloglu 2020), le premier étant à l'origine de la plupart des cas.

Enfin, les myopathies centronucléaires sont causées par des mutations dans au moins 7 gènes différents : *MTM1*, *BINI*, *DNM2*, *RYR1*, *TTN*, *SPEG* et *ZAK*. Les mutations dans les gènes *BINI*, *DNM2* et *RYR1* sont les plus fréquentes. Il existe une forme liée à l'X, aussi appelée myopathie myotubulaire, associée à des mutations du gène *MTM1*.

3. Mécanismes physiopathologiques et moléculaires impliqués dans les myopathies congénitales

L'identification croissante des variants génétiques et l'étude des relations entre les gènes et les maladies dans le cas des myopathies congénitales ont permis d'acquérir une meilleure compréhension de leurs mécanismes physiopathologiques (Ravenscroft et al. 2015). Cette avancée revêt une grande importance pour le développement de potentielles approches thérapeutiques, jusqu'alors inaccessibles, pour traiter ces maladies.

Les myopathies congénitales sont impliquées dans diverses voies physiopathologiques (**Figure 19**) dont : (1) le remodelage des membranes sarcolemmales et intracellulaires ainsi que le couplage excitation-contraction (Horstick et al. 2013; P. Dowling, Holland, et Ohlendieck 2014; Jungbluth et al. 2018), (2) l'homéostasie redox et la bioénergétique mitochondriale (J. J.

Dowling et al. 2012; Moulin et Ferreiro 2017; Filipe et al. 2021), (3) la génération de force myofibrillaire (Wallgren-Pettersson et al. 2011; Tajsharghi et Oldfors 2013), (4) l'atrophie (Ravenscroft et al. 2015) et potentiellement l'autophagie (Gibbs, Feldman, et Dowling 2010).

Le couplage excitation-contraction dépend de l'intégrité et du bon fonctionnement de membranes hautement spécialisées, notamment les composants de la triade : les tubules T et les récepteurs à la dihydropyridine (DHP) dans la membrane T des tubules, ainsi que le réticulum sarcoplasmique et les récepteurs à la ryanodine (RyR1) dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Des anomalies structurelles de la triade, ainsi qu'une localisation anormale de ses composants, tels que DHP et RyR1, ont été observées dans les myofibres de patients atteints de myopathies centronucléaires causées par des mutations dans les gènes *MTM1*, *BINI* et *CCDC78* (Al-Qusairi et al. 2009; J. J. Dowling et al. 2009; Majczenko et al. 2012).

Les mutations autosomiques dominantes du gène *RYR1*, qui entraînent différents phénotypes, sont supposées provoquer une activité du canal RyR1 défectueuse, une instabilité du canal ou une réduction de la conductance du calcium (Wilmshurst et al. 2010). En revanche, les mutations récessives sont susceptibles de provoquer une mauvaise localisation des canaux RyR1 ou une diminution quantitative de son expression (Zhou et al. 2013). Des anomalies dans la fonction du réticulum sarcoplasmique sont également impliquées dans les myopathies congénitales associées aux mutations du gène *NEB* (Witt et al. 2006). Les anomalies de la triade, l'altération de l'homéostasie calcique et l'altération du couplage excitation-contraction constituent l'un des principaux pathomécanismes d'un grand nombre de myopathies congénitales.

Le remodelage membranaire joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques essentiels tels que l'exocytose, le transport intracellulaire, la fonction des vésicules synaptiques, l'autophagie et la réparation des membranes. Il est intéressant de noter que des gènes tels que *BINI*, *DNM2*, *MTM1* et *MTMR14*, qui sont impliqués dans des myopathies congénitales caractérisées par des noyaux internalisés, jouent un rôle dans ce remodelage membranaire (Cowling et al. 2012).

Les perturbations de l'homéostasie redox et du métabolisme énergétique et mitochondrial sont également impliquées en tant que mécanismes pathologiques importants des myopathies à cores. Effectivement, des zones dépourvues de mitochondries, les « cores », sont

des caractéristiques histopathologiques typiques de ce type de myopathies (Ravenscroft et al. 2015).

Des altérations de la jonction neuromusculaire ont également été observées dans des modèles animaux de maladies associées à *MTM1* et *DNM2* et des enregistrements électrophysiologiques chez des patients *DNM2* ont révélé des signes d'altération de la transmission neuromusculaire (Gibbs et al. 2013).

Les myopathies congénitales ont aussi été associées à des dysfonctionnement au niveau du sarcomère et des défauts dans la génération de force myofibrillaire, résultant de mutations dans les gènes codant les filaments fins ou bien leurs protéines associées, tels que *NEB*, *ACTA1*, *TPM2* ou *MYH7* (Ravenscroft et al. 2015).

L'atrophie musculaire et l'autophagie peuvent aussi jouer un rôle important dans les pathomécanismes des myopathies congénitales. Le volume du muscle squelettique est régulé par un équilibre entre hypertrophie et atrophie, contrôlé par les voies de synthèse et de dégradation des protéines, incluant l'atrophie et l'autophagie. L'atrophie musculaire est d'ailleurs couramment observée chez les patients, et l'atrophie des fibres de type 1 est souvent observée dans les biopsies musculaires.

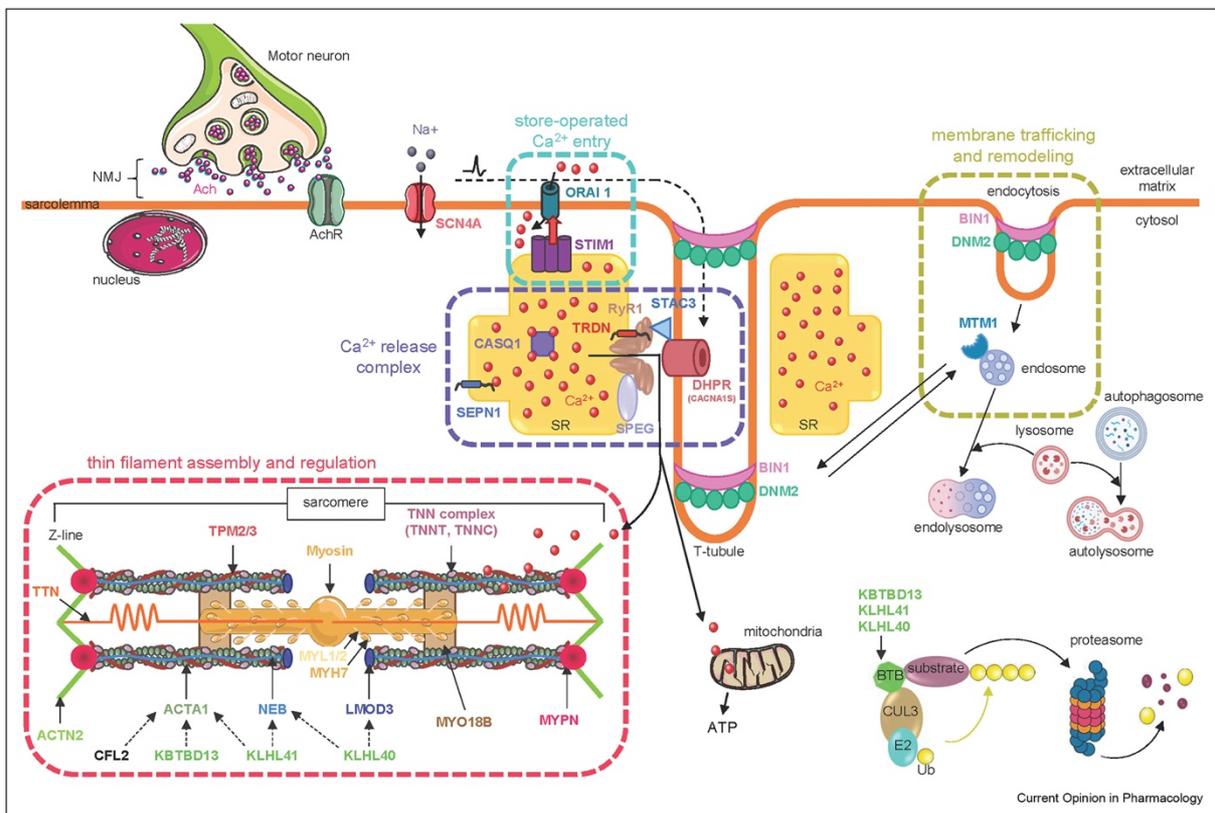


Figure 19 : Protéines impliquées et principales voies affectées dans les myopathies congénitales. Figure issue de Gineste et Laporte., 2013 (Gineste et Laporte 2023).

B. Généralités sur l'amyotrophie spinale (SMA)

1. Caractéristiques cliniques et histopathologiques

L'amyotrophie spinale (SMA) est une maladie neuromusculaire héréditaire, de l'enfant ou de l'adolescent, caractérisée par une dégénérescence des motoneurons des cornes ventrales de la moelle épinière associée à une atrophie des muscles squelettiques. Cette pathologie est considérée comme une maladie rare avec une incidence d'un cas pour 6000 à 10000 naissances. La SMA proximale, touchant préférentiellement les muscles proximaux, soit les muscles proches de l'axe du corps à la racine des membres, est la forme la plus fréquente. La SMA à prédominance distale, touchant les muscles situés aux extrémités du corps, est beaucoup plus rare et ressemble cliniquement à la maladie de Charcot-Marie-Tooth, avec une atteinte progressive des jambes et des mains.

Au niveau histopathologique, les patients atteints de SMA présentent une absence de motoneurons dans la corne ventrale de la moelle épinière ainsi qu'une atrophie dite neurogène, caractérisée par des regroupements de fibres hypertrophiques et atrophiques, d'aspect triangulaire, dans le muscle squelettique.

Les différents types de SMA sont classés en quatre groupes, dont la sévérité est décroissante, en fonction des capacités motrices des patients et de l'âge d'apparition des symptômes :

- La SMA de type I, aussi appelée maladie de Werdnig-Hoffmann, est la forme la plus grave avec une espérance de vie inférieure à deux ans. Les premiers symptômes apparaissent généralement dans les trois premiers mois de la vie et sont caractérisés par une hypotonie sévère, une faiblesse des membres et du cou, des fasciculations de la langue et une grave insuffisance respiratoire. Des atteintes cardiaques ont aussi été rapportées (Rudnik-Schöneborn et al. 2008; Shababi et al. 2010). Les biopsies musculaires de patients atteints du type I ont révélé des fibres musculaires anormalement petites ainsi que des regroupements inhabituels de fibres larges dans certaines zones (Chang et Gieron-Korthals 2011). Seules les formes prénatales (type 0)

ont été associées à une hypomyélinisation et une structure histologique anormale des nerfs périphériques (Korinthenberg et al. 1997; Hergersberg et al. 2000).

- La SMA de type II est la forme la plus fréquente dont les premiers signes cliniques se manifestent entre 6 et 18 mois par une hypotonie modérée ainsi qu'une faiblesse musculaire. Contrairement au type I, les patients sont capables de s'asseoir, mais ils demeurent incapables de se mettre debout ou de marcher sans assistance. Ils présentent aussi des complications thoraco-pulmonaires, des raideurs et des déformations articulaires du rachis et des membres.
- La SMA de type III, ou maladie de Kugelberg-Welander, se manifeste après l'acquisition de la marche par une atrophie et une faiblesse musculaire lentement progressive, prédominante aux membres inférieurs.
- La SMA de type IV apparaît à la fin de l'adolescence ou à l'âge adulte. Les signes cliniques sont peu marqués et peuvent s'apparenter à ceux de la forme III atténués. La progression de la maladie est très lente et les fonctions respiratoires ne sont pas touchées.

2. Bases génétiques de la SMA

Près de 95% des cas de SMA sont dus à des défauts dans le gène *Survival of Motor Neuron 1 (SMN1)*, et majoritairement à une délétion homozygote située sur la partie télomérique du brin long du chromosome 5 (région 5q11.2-q13.3) (Lefebvre et al. 1995; Melki et al. 1990; Rodrigues et al. 1995; Brzustowicz et al. 1990). Le reste des cas sont causés par des mutations situées dans des régions très précises du gène (Alías et al. 2009).

D'autres formes de SMA, présentant des caractéristiques cliniques similaires à la SMA liée à *SMN1*, ont été associées à des mutations sur d'autres gènes (**Tableau 2**) (Karakaya et al. 2018; Peeters, Chamova, et Jordanova 2014).

Tableau 2 : Formes de SMA non liées à SMN1.

Type	Gène	Localisation	Âge d'apparition des symptômes	Caractéristiques cliniques
SMA scapulo-péronière	<i>TRPV4</i>	12q.24.11	A la naissance	Faiblesse musculaire scapulo-péronière progressive ; paralysie laryngée
SMA infantile létale	<i>UBA1</i>	Xp11.23	A la naissance	Arthrogrypose congénitale ; insuffisance respiratoire ; déformation du thorax ; fractures osseuses ; dysmorphies faciales
SMA avec hypoplasie ponto-cérébelleuse (PCH1A et B)	<i>VRK1</i>	14q.32.2	A la naissance	Hypoplasie ponto-cérébelleuse ; microcéphalie ; déficits moteurs centraux et périphériques ; retard mental ; mortalité précoce
	<i>EXOSC3</i>	9q13.2		
SMA avec détresse respiratoire (SMARD)	<i>IGHMBP2</i>	11q13.2	Au cours des 6 premiers mois	Faiblesse musculaire distale ; neuropathie sensorielle périphérique ; paralysie diaphragmatique ; mortalité précoce
SMA prédominante des membres inférieurs	<i>DYNC1H1</i>	14q32.31	Pendant l'enfance	Faiblesse musculaire des membres inférieurs, n'affectant pas les membres supérieurs
	<i>BICD2</i>	9q22.31		
SMA avec épilepsie myoclonique progressive	<i>ASAH1</i>	8p22	Pendant l'enfance	Épilepsie myoclonique réfractaire au traitement ; faiblesse des muscles proximaux ; dysphagie
SMA de type Finkel (SMAFK)	<i>VAPB</i>	20q13.32	Adulte	Faiblesse musculaire d'apparition tardive ; crampes et fasciculations musculaires
	<i>HEXB</i>	5q13.3		
SMA de type Jokela (SMAJ)	-	22.q11.2-q13.2	Adulte	Faiblesse musculaire d'apparition tardive ; crampes et fasciculations musculaires
SMA avec défauts cardiaques (LGMD1B)	<i>LMNA</i>	1q22	Adulte	Faiblesse des muscles proximaux ; cardiomyopathies

VI. Pathologies du système neuromusculaire associées au complexe ASC-1

A. Maladies neuromusculaires pédiatriques associées à ASC-1 : un large spectre de phénotypes cliniques et histopathologiques

1. Myopathies congénitales associées à ASC-1

En 2016, mon équipe a identifié une nouvelle forme atypique de myopathie congénitale chez quatre patients provenant d'une grande famille consanguine, présentant une sévère hypotonie néonatale ainsi qu'une faiblesse musculaire (Davignon et al. 2016a). Cette faiblesse musculaire affecte les muscles des membres, entraînant une difficulté ou une incapacité à acquérir une déambulation autonome, ainsi que les muscles axiaux, entraînant une sévère scoliose et une insuffisance respiratoire responsable chez certains patients d'une mortalité précoce en absence de ventilation assistée (**Tableau 3**). Ces patients ne présentent pas ou peu de contractures articulaires mais une hyperlaxité ainsi que des anomalies cutanées telles qu'une hyperkératose folliculaire et une hyperélasticité.

Les études de clonage positionnel complétées par une étude exomique à haut débit ont révélé que les membres affectés de cette famille sont homozygotes pour une mutation non-sens récessive du gène *TRIP4* codant la protéine ASC-1.

En 2020, mon équipe a étudié cinq nouvelles familles avec sept nouvelles mutations *TRIP4*, permettant d'élargir le spectre phénotypique des myopathies congénitales liées à ASC-1 (Villar-Quiles et al. 2020). Globalement, le phénotype clinique est marqué par une faiblesse précoce des muscles axiaux et des membres, une scoliose évolutive parfois associée à une rigidité du rachis, des traits dysmorphiques et des anomalies cutanées semblables à celles observées dans les myopathies liées au collagène VI. Une atteinte respiratoire variable est corrélée à la gravité de la maladie (**Tableau 3**). Une atteinte des muscles extra oculaires a été décrite chez certains patients. Enfin, des atteintes cardiaques, notamment une cardiomyopathie dilatée à début adulte, ont été décrites chez certains patients.

Des études d'électromyographie ont été réalisées chez plusieurs patients des six familles et ont révélé des anomalies myogènes pures, sans atteintes neurogènes. L'IRM des membres inférieurs des patients a révélé une atteinte prédominante de la loge postérieure de la cuisse et des grands fessiers, et une relative préservation des muscles semi-tendineux, gracile et sartorius.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients atteints de myopathies congénitales associées à ASC-1. n.c : non caractérisé ; DCM : cardiomyopathie dilatée ; FSV : variation de la taille des fibres ; IN : noyaux internalisés.

Publication	Davignon et coll, 2016	Villar-Quiles et coll, 2020				
		Family A (Consanguine)	Family B	Family C (Consanguine)	Family D	Family E
Famille	Family F (Consanguine)	Family A (Consanguine)	Family B	Family C (Consanguine)	Family D	Family E
Individus affectés	4 (3F, 1M)	1F	1M, 1F	1M	1M	1M
Variant pathogène TRIP4	c.890G>A (p.Trp297*) Homozygote	c.141_142delAT (p.Tyr48CysfsTer3) Homozygote	c.534C>G (p.His178Gln) + c.2544_1547delACTG (p.Asp515Alafs34)	c.1065delC (p.Ile356LeufsTer6) Homozygote	c.55_56insCT (p.Gln19Profs47) + c.1197delA (p.Ser399Serfs12)	Délétion homozygote des Exons 8 et 9
Atteintes musculaires	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire sévère ; Développement moteur retardé	Hypotonie ; Faiblesse musculaire ; Développement moteur retardé	Faiblesse musculaire ; Développement moteur retardé	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire sévère ; Développement moteur retardé	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire ; Développement moteur retardé	Faiblesse musculaire
Rigid Spine	Oui (n=2)	Non	Non	Non	Oui	Oui
Scoliose	Oui (n=3)	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Atteintes articulaires	Hyperlaxité, Contractures	Contractures	Non	Hyperlaxité	Hyperlaxité, Contractures	Non
Atteintes respiratoires	Détresse respiratoire néonatale (n=3) ou à partir de 2 ans (n=1)	Oui	Insuffisance respiratoire depuis l'enfance	Insuffisance respiratoire néonatale	Oui	Non
Atteintes cardiaques	DCM (n=1)	Non	Non	Non	Non	DCM
Atteintes dermatologiques	Oui (hyperélasticité, hyperkératose)	Non	Non	Oui (hyperélasticité)	Oui (xérose)	Oui (hyperélasticité, hyperkératose)
Caractéristiques dysmorphiques	Visage plat ; Rétrognathie ; Thorax plat (n=2) ; Pectus excavatum (n=2) ; Pieds valgus (n=2)	Visage plat ; Rétrognathie	Non	Visage plat ; Marquage veineux proéminent ; Doigts effilés	Visage allongé ; Oreilles décollée ; Rétrognathie	Visage plat ; Rétrognathie
Sévérité	3 sévères ; 1 modéré	Modéré	Modéré	Sévère (décédé à l'âge de 8 mois)	Sévère	Modéré
Biopsies musculaires	n=3 : FSV, IN, anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs, légère fibrose endomysiale, lésions « cap », minicores	IN, FSV, prédominance fibres de type 1 et hypotrophie, légère fibrose de l'endomysium, fibres en troubillon, minicores	Normale (n=1)	IN, FSV, prédominance et hypotrophie des fibres de type 1, fibrose de l'endomysium	IN, FSV, prédominance fibres de type 1, minicores, anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs	IN, FSV, prédominance fibres de type 1, fibres lobulées, minicores, bâtonnets, corps cytoplasmiques et « cap »

Le spectre histopathologique des lésions architecturales des fibres musculaires associées aux myopathies congénitales liées à ASC-1 est particulièrement large. De courtes lésions appelées multi-minicores sont presque constamment observées, mais elles peuvent coexister avec des lésions dites à « cap », des corps à némaline, des corps cytoplasmiques ou encore des lésions dystrophiques légères (Davignon et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020). Des fibres avec accumulation oxydatives intenses sous le sarcolemme ont également été observées (**Figure 20**).

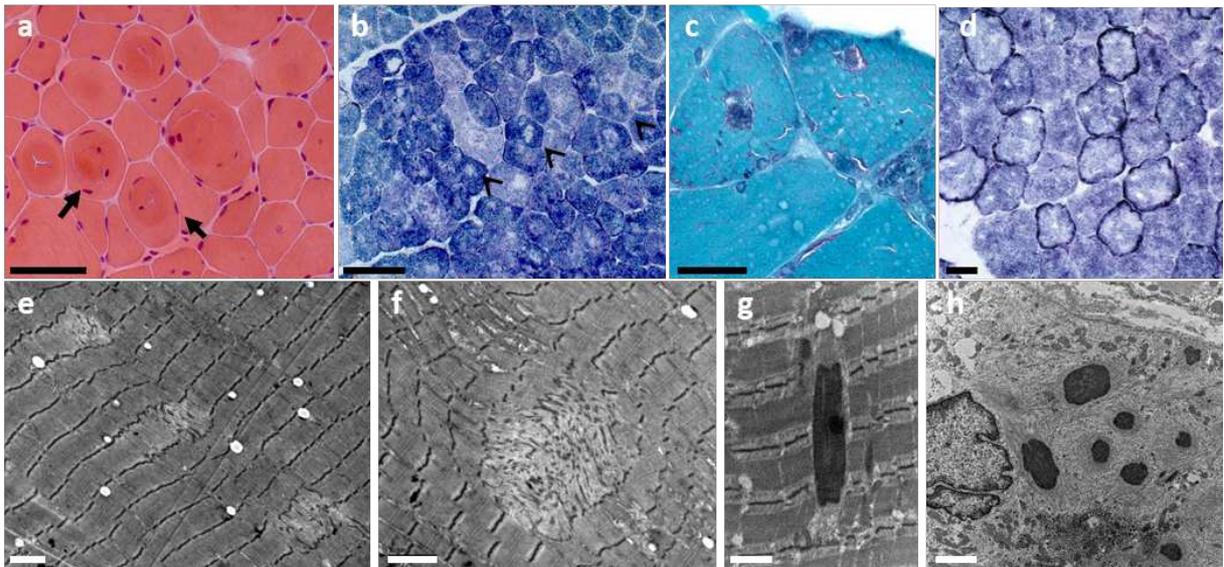


Figure 20 : Spectre histologique des myopathies congénitales associées à ASC-1. On observe des caractéristiques typiques des myopathies congénitales telles que la variation de la taille des fibres (a,b), des noyaux internalisés (a) ou encore des fibres en troubillon (a, flèches noires). Les multiminicores sont les lésions histologiques les plus fréquentes et sont identifiables par les multiples zones plus claires dépourvues d'activité oxydative en coloration oxydative (têtes de flèches noires en b) et des zones dépourvues en mitochondries et de désorganisation des sarcomères en microscopie électronique (ME ; e,f). Le trichrome de Gomori modifié a révélé chez certains patients des inclusions multiples (c) correspondant aux bâtonnets (némalines) denses aux électrons en ME (g). Des bords oxydatifs intenses sous le sarcolemme (d, coloration périphérique plus foncée), compatibles avec une prolifération ou une mauvaise localisation des mitochondries, peuvent être observés chez certains patients. Des désorganisations myofibrillaires sous-sarcolemmales (formant parfois des lésions appelées « cap »), des corps cytoplasmiques et des bâtonnets peuvent aussi être observés (h). Coupes transversales congelées : hématoxyline et éosine (a), NADH-TR (b,d), trichrome de Gomori modifié (c), ME (e-h). Barres d'échelle = 50 μ m (a,b), 25 μ m (c,d), 2 μ m (e,f,h), 1 μ m (g). Figure issue de Meunier et coll., 2021 (Meunier et al. 2021).

2. Amyotrophies spinales associées à ASC-1

Simultanément au premier rapport des myopathies congénitales liées à ASC-1 par notre équipe, Knierim *et coll.* ont décrit des mutations récessives du gène *TRIP4* chez des patients diagnostiqués de SMA (Knierim et al. 2016a). Cinq patients issus de trois familles présentaient un phénotype marqué d'arthrogrypose congénitale multiple associé à une détresse respiratoire néonatale, nécessitant une ventilation assistée, et des fractures osseuses congénitales (**Tableau 4**). La plupart des patients sont décédés d'une insuffisance respiratoire ou cardiaque au cours des 16 premiers mois de vie.

Des malformations cardiaques congénitales (communication interatriale), rarement décrites dans les cas de SMA, ont été associées dans deux familles avec cardiomyopathies. La cardiomyopathie est fréquemment associée aux maladies avec atteinte primaire des muscles striés mais ne fait typiquement pas partie du phénotype des patients SMA.

Les rares études électromyographiques effectuées dans les premières semaines de vie ont révélé l'absence de réponse musculaire après stimulation ainsi qu'une neuropathie axonale.

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients atteints de SMA associées à ASC-1. n.c : non caractérisé ; IMG : Interruption Médicale de Grossesse ; FSV : variation de la taille des fibres.

Publication	Knierim et coll, 2016		
Famille	Famille A	Famille B	Famille C
Individus affectés	1M, 1F	2M, (+1 fœtus IMG)	1M
Variant pathogène <i>TRIP4</i>	c.760C>T (p.Arg254Ter) Homozygote	c.832C>T (p.Arg278Ter) Homozygote	c.760C>T (p.Arg254Ter) + c.832C>T (p.Arg278Ter)
Manifestations prénatales	Hypokinésie fœtale ; Oligohydramnios ; Naissance prématurée (n=1)	Hypokinésie fœtale ; Oligohydramnios (n=1) ; Naissance prématurée (n=1)	n.c
Atteintes musculaires	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire ; Atrophie musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire ; Atrophie musculaire	Hypotonie néonatale ; Atrophie musculaire
Arthrogrypose multiple congénitale	Oui	Oui	Oui
Atteintes respiratoires	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale ; Hypoplasie pulmonaire	Détresse respiratoire néonatale
Atteintes cardiaques	Communication interauriculaire secondaire ; Persistance du canal artériel ; Insuffisance cardiaque (n=1) ; Cardiomyopathie (n=1)	Persistance du canal artériel ou du foramen ovale ; Cardiomyopathie (n=1)	n.c
Atteintes du système nerveux	Retard global du développement ; Dysphagie ; Aréflexie ; Neuropathie axonale	Retard global du développement ; Dysphagie ; Aréflexie ; Neuropathie axonale ; Perte des axones non myélinisés dans la biopsie du nerf sural ; α -motoneurons apoptotiques dans la moelle épinière	n.c
Fractures osseuses congénitales	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques dysmorphiques	Micro-rétrognathie ; Hypertélorisme ; Palais haut ; Bouche étroite	Micro-rétrognathie ; Hypertélorisme (n=1) ; Palais haut (n=1)	n.c
Sévérité	Sévère (décédés peu après la naissance)	Sévère (décédés peu après la naissance)	Sévère (décédé peu après la naissance)
Biopsies musculaires	FSV, immaturité des fibres musculaires	FSV, immaturité des fibres musculaires	n.c

Certaines biopsies musculaires de ces enfants diagnostiqués SMA ont montré une réduction et une variabilité majeure de la taille des fibres musculaires, suggérant qu'une atteinte musculaire primaire de cet autre phénotype lié à ASC-1 ne peut être exclue. Cependant, une tendance au regroupement des fibres musculaires de type I, considéré comme un signe de

dénervation, et la présence de motoneurons α apoptotiques dans la corne antérieure de la moelle épinière observées chez un patient sont potentiellement compatibles avec le diagnostic de SMA. Parallèlement, les biopsies du nerf sural d'un des enfants affectés ont montré une densité normale des fibres myélinisées mais la perte d'axones non myélinisés, porteurs d'informations autonomes ou sensorielles.

3. Bases génétiques des troubles neuromusculaires associés à ASC-1

Le gène *TRIP4*, localisé sur le chromosome 15, contient 13 exons et code pour la protéine ubiquitaire de 68kDa ASC-1 précédemment décrite. Au début de ma thèse, 10 mutations du gène *TRIP4* avaient été décrites chez 16 patients, issus de 9 familles, présentant des troubles neuromusculaires plus ou moins sévères (Davignon et al. 2016a; Knierim et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020). La plupart d'entre elles sont des mutations de décalage du cadre de lecture (frameshift) mais une mutation faux-sens et une délétion homozygote des exons 8-9, prédisant la perte d'un des domaines fonctionnels d'ASC-1, avaient également été décrites (Villar-Quiles et al. 2020). Pour chaque mutation, la transmission est autosomique récessive et les parents hétérozygotes ne présentent aucun trouble neuromusculaire.

B. Maladies neuromusculaires associées à ASCC1

1. Myopathie congénitale ou SMA ? : une atteinte létale du système nerveux central, du muscle squelettique et des os

Parallèlement à la description des mutations *TRIP4* chez des patients atteints d'amyotrophie spinale, Knierim et coll. ont identifié la première mutation *ASCC1* chez deux frère et sœur, diagnostiqués comme ayant une SMA prénatale grave (Knierim et al. 2016b). Cette famille présentait un tableau clinique sévère marqué par des manifestations prénatales (hypokinésie fœtale, hydramnios), une naissance prématurée, une sévère hypotonie néonatale, une aréflexie, une détresse respiratoire, une arthrogrypose multiple congénitale (contractures)

ainsi que des fractures osseuses congénitales (**Tableau 5**). Des persistances du canal artériel et du foramen ovale ont aussi été décrites, mais aucune maladie du myocarde n'a été rapportée. Les deux patients ont présenté une insuffisance respiratoire létale au cours des deux premiers mois de vie.

L'IRM cérébrale réalisée chez les deux patients a révélé un schéma gyral simplifié du cortex cérébral. La biopsie musculaire de l'un des deux patients a montré une variation de la taille des fibres, des zones d'atrophie et une immaturité des fibres musculaires. Enfin, la biopsie du nerf sural d'un patient a montré une densité normale des fibres myélinisées mais une perte d'axone non myélinisés.

En 2018, Böhm et *coll.* ont identifié trois familles supplémentaires, présentant le même phénotype clinique létal (**Tableau 5**), avec des mutations récessives non-sens ou de décalage du cadre de lecture du gène *ASCC1*. Les biopsies musculaires de ces patients ont révélé des caractéristiques myopathiques, comparables à celles associées aux mutations *TRIP4*, avec la variation de la taille des fibres, des bords oxydatifs et parfois une prédominance des fibres de type I (Böhm et al. 2019). De plus, les études d'électromyographie n'ont pas suggéré d'atteinte des motoneurones mais sont caractéristiques de formes sévères de myopathies congénitales.

D'autres mutations du gène *ASCC1* ont ensuite été décrites chez des patients dont le phénotype clinique, semblable à ceux décrit précédemment, comprenait des fractures osseuses congénitales, des hypokinésies fœtales et des détresses respiratoires néonatales, responsables d'une mortalité précoce (Oliveira et al. 2017; Giuffrida et al. 2020; Lu et al. 2020) (**Tableau 5**). L'un des patients décrit présentait des anomalies légères de dilatation du ventricule cérébral (Lu et al. 2020). Des traits dysmorphiques et un aspect myopathique ont été observés dans la plupart des cas mais les patients ont reçu le diagnostic de SMA, par analogie avec les premiers cas de mutation *ASCC1* décrits. L'absence d'études électrophysiologique ou d'examen histopathologiques approfondis de ces patients représente un frein pour définir s'il s'agit d'une atteinte primaire du muscle ou du motoneurone.

Tableau 5 : Résumé des caractéristiques génétiques et cliniques des patients présentant des troubles neuromusculaires associées à ASCC1. n.c : non caractérisé ; FSV : variation de la taille des fibres.

Publication	Böhm et coll, 2018			Knierim et coll, 2016	Oliveira et coll, 2017	Giuffrida et coll, 2019	Lu et coll, 2020
	Famille 1 (Consanguine)	Famille 2	Famille 3 (Consanguine)				
Famille	Famille 1 (Consanguine)	Famille 2	Famille 3 (Consanguine)	Famille D (Consanguine)	-	-	-
Individus affectés	2M	1F	1F, 1M, (+1 fœtus avorté)	2F	2M, 1F	1	1M
Variant pathogène ASCC1	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) + c.466C>T (p.Arg156Ter)	c.667C>T (p.Glu223Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.1027C>T (p.Arg343Ter) + Délétion hémizygote dans les exons 6 à 9a	c.932C>G (p.Ser211Ter) + Délétion hémizygote dans l'exons 5
Manifestations prénatales	Hypokinésie fœtale	n.c	Hypokinésie fœtale	Hypokinésie fœtale ; Polyhydramnios ; Naissance prématurée	Hypokinésie fœtale	Polyhydramnios ; Naissance prématurée	Hypokinésie fœtale
Atteintes musculaires	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire	Atrophie musculaire	Hypotonie néonatale ; Faiblesse musculaire
Arthrogrypose multiple congénitale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteintes respiratoires	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale ; Hypoplasie pulmonaire	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale ; Pneumonie
Atteintes cardiaques	Non	Non	Non	Persistance du canal artériel ou du foramen ovale	Non	Non	Non
Atteintes du système nerveux	n.c	n.c	Non	Retard global du développement ; Dysphagie ; Aréflexie ; Neuropathie axonale ; Perte des axones non myélinisés dans la biopsie du nerf sural ; Gyration corticale anormale	n.c	n.c	Légère dilatation ventriculaire bilatérale
Fractures osseuses congénitales	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques dysmorphiques	Non	Non	Non	Non	Microretrognathie	n.c	n.c
Sévérité	Sévère (décédé peu après la naissance)	Sévère (décédé peu après la naissance)	Sévère (décédé peu après la naissance)	Sévère (décédé peu après la naissance)	Sévère (décédé peu après la naissance)	Sévère (mort-né)	Sévère (décédé peu après la naissance)
Biopsies musculaires	FSV, Anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs	FSV, Anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs	FSV, Anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs, Prédominance des fibres de type I	FSV, Atrophie, Groupement des fibres de type I	Atrophie des fibres	n.c	n.c

2. Bases génétiques des troubles neuromusculaires associés à *ASCC1*

ASCC1 est un gène situé sur le chromosome 10 qui contient 13 exons, dont 11 codant, générant de multiples variants d'épissage qui codent pour plus de 20 isoformes. Le transcrit le plus abondant est celui codant la protéine *ASCC1* de 41 kDa. Au début de ma thèse, 7 mutations du gène *ASCC1* avaient été rapportées chez 12 patients, issus de 7 familles, présentant de graves troubles neuromusculaires à la naissance, associés à des fractures osseuses congéniales, responsables d'une mortalité au cours de la première année de vie. Tous sont des variants non-sens ou de décalage du cadre de lecture conduisant à des phénotypes autosomiques récessifs chez les patients.

La duplication d'un seul nucléotide dans l'exon 3 (c.157dupG, p.Glu53GlyfsTer19) est la mutation la plus fréquemment rapportée. Il est prédit que ce variant génère un codon de terminaison prématuré, compatible avec l'élimination du transcrit mutant. L'absence de la protéine *ASCC1* a par ailleurs été expérimentalement confirmée chez l'un des patients homozygotes pour la mutation c.157dupG (Knierim et al. 2016b). Deux mutations homozygotes non-sens ont aussi été identifiées dans quatre familles ainsi que l'hétérozygotie d'une mutation non-sens avec soit des délétions hémizygotiques (deux familles), soit une duplication d'un seul nucléotide (une famille).

VII. Objectifs de l'étude

Mon projet de recherche en tant que doctorante dans l'équipe de Myologie Fondamentale et Translationnelle, que j'ai intégrée en 2020 au sein du laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), porte sur l'étude des rôles physiopathologiques et moléculaires du co-régulateur transcriptionnel ASC-1 dans les maladies neuromusculaires congénitales.

Notre équipe a rapporté pour la première fois des mutations récessives sur le gène *TRIP4*, codant la protéine ASC-1, comme étant responsables d'une nouvelle forme de myopathie congénitale de sévérité variable et est pionnière sur l'étude du rôle d'ASC-1 dans la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques. Plus précisément, notre équipe a révélé un rôle clé d'ASC-1 dans la régulation de la croissance des cellules musculaires et dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire, en travaillant sur des cultures primaires de fibroblastes et de cellules musculaires de patients ainsi qu'en développant un modèle *in vitro* de knockdown de *Trip4* dans des cellules murines myogéniques C2C12, mimant la perte d'expression de la protéine observée chez les patients.

A la lumière de l'implication d'ASC-1 dans les maladies neuromusculaires et de son rôle dans la croissance des cellules musculaires, l'objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier les voies et mécanismes moléculaires régulés par ASC-1, en particulier ceux impliqués dans la myogenèse, afin de comprendre comment les défauts de cette protéine ubiquitaire provoquent de graves phénotypes neuromusculaires.

Le premier axe de mon travail de thèse a consisté à mieux définir le spectre phénotypique des pathologies liées à ASC-1 et à clarifier les corrélations phénotype-génotype par la description génétique, clinique et histopathologique de nouveaux patients avec des mutations du gène *TRIP4*, et par une révision de la littérature. Le second axe de mon travail de recherche a été de caractériser les effets de l'absence d'ASC-1 sur la différenciation myogénique, au niveau transcriptomique et protéomique, dans un nouveau modèle de C2C12 *Trip4*-KO (généralisé via la technologie CRISPR/Cas9), permettant de travailler sur un modèle plus stable et proche de la situation pathologique humaine. Ensuite, l'essentiel de mon travail de thèse a été d'identifier les mécanismes responsables du phénotype, en identifiant des partenaires d'ASC-1 dans les cellules musculaires et en étudiant son effet sur l'activité et la

localisation subcellulaire des facteurs de transcription essentiels à la myogenèse, tels que MyoD, Myogénine et SRF. Enfin, le troisième axe de mon travail de thèse a porté sur l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes du cycle cellulaire par ASC-1 dans différents types cellulaires, ainsi que son implication sur les mécanismes de sortie du cycle cellulaire.

MATÉRIEL ET METHODES

I. Cultures cellulaires et traitements

A. Lignée cellulaire de myoblastes murins C2C12

1. Prolifération

La lignée cellulaire C2C12, développée à l'Institut Weizmann en 1977 (Yaffe et Saxel 1977), a été utilisée dans cette étude. Cette lignée de myoblastes murins sous-clonaux immortalisés offre une prolifération et une différenciation rapide en culture et représente un modèle de choix pour l'étude de la myogenèse, de l'expression protéique et des voies métaboliques.

Les C2C12 sont des cellules adhérentes cultivés dans du Dulbecco Modified Eagle Media contenant du Glutamax 1X (DMEM, *Gibco*, 61965-026) supplémenté en Fetal Calf Serum (FCS) 10% et Pénicilline/Streptomycine (P/S) 1%.

Le maintien de la prolifération se fait en réensemencement les cellules deux fois par semaines dans des flasques de 75 cm². Pour cela, après un rinçage au tampon phosphate salin (PBS), les cellules sont décrochées avec 3ml de Trypsine-EDTA 0,05% (*Gibco*, 25300-054), pendant 5 minutes à 37°C, puis l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 6ml de milieu de culture. Le comptage des cellules est réalisé sur cellule de Malassez. Une fraction de ces cellules sont diluées du 1/30ème au 1/50ème dans un milieu neuf et maintenu en culture à 37°C avec 5% de CO₂.

2. Différenciation

Afin d'induire la différenciation, les cellules sontensemencées (Jour-4) dans des plaques 6 puits (75000 cellules/puits) préalablement recouvertes de Matrigel (Corning, 354234) et incubées pendant 96h à 37°C et 5% de CO₂. Une fois les cellules à confluence (Jour 0), le milieu de culture est remplacé par un milieu favorable à la différenciation, de faible concentration en sérum : DMEM 1X, Horse Serum 2% (HS) et Pénicilline/Streptomycine 1%. Ce milieu est renouvelé tous les deux jours. L'extinction transitoire (knock-down, KD) d'ASC-1 dans les cellules en cours de différenciation est obtenu par transfection du siARN 24h après l'ensemencement (J-3) (Figure 21).

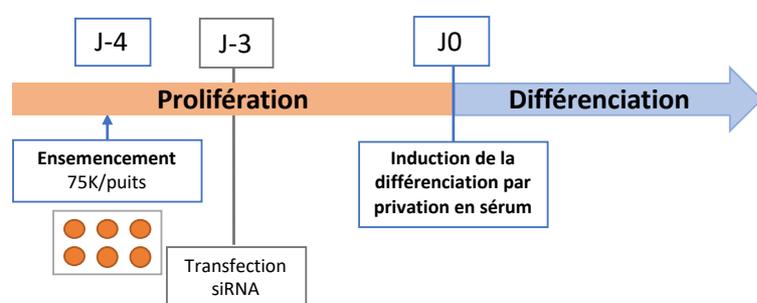


Figure 21 : Schéma chronologique du protocole de différenciation des C2C12. Dans certains cas, une transfection de siARN a été réalisée 24h après l'ensemencement, à J-3.

B. Lignée cellulaire de glioblastome humain T98G

1. Prolifération

La lignée cellulaire cancéreuse T98G provient d'une cellule de type fibroblaste qui a été isolée du cerveau d'un homme de 61 ans atteint d'un glioblastome multiforme (Stein 1979). Cette lignée, souvent utilisée dans les études de neuroscience, est un modèle de choix pour les études du cycle cellulaire par rapport aux cellules C2C12. Comme un grand nombre d'anticorps dirigés contre les protéines du cycle cellulaire utilisés dans cette étude n'étaient pas compatibles avec les C2C12 j'ai décidé d'utiliser la lignée T98G pour faciliter les études sur le cycle cellulaire et la quiescence.

Les T98G sont cultivées dans du Minimum Essential Medium contenant du Glutamax 1X (MEM, Gibco, 41090-028) supplémenté en Fetal Calf Serum (FCS) 10% et Pénicilline/Streptomycine (P/S) 1%.

Tout comme les C2C12, les T98G sont réensemencées deux fois par semaine et maintenues en culture à 37°C avec 5% de CO₂.

2. Quiescence

Les cellules T98G sont ensemencées dans des flasques T75 (400K/flasque) et maintenues en culture dans le milieu de prolifération (MEM + FCS 10% + P/S 1%) à 37°C avec 5% de CO₂. Trois jours plus tard, le processus de quiescence est initié en changeant le milieu de prolifération par un milieu de quiescence sans sérum (MEM + P/S 1%). Au bout de 72h en culture à 37°C avec 5% de CO₂, les cellules privées de sérum sont alors en phase de quiescence cellulaire.

C. Transfections

1. Transfections d'ARN interférents

- Le knock-down du gène *Trip4* dans les cellules C2C12 a été réalisé via la transfection d'un siARN dirigé contre la séquence murine du gène *Trip4* (Origene ; Voir Villar-Quiles et coll., 2020) de séquence sens :

si*Trip4* : 5'-AGCACAAACUCAUCAUAACUGUCT-3'

- Pour les transfections contrôles, j'ai utilisé le siARN *Scramble* (Scbl) de chez Origene (#SR30004) de séquence sens :

Scbl : 5'- CGUUAUAUCGCGUAUAAUACGCGUAT-3'

Les cellules sontensemencées (75000 cellules/puits) dans des plaques 6 puits et incubées pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂. Le lendemain, elles sont transfectées avec un mélange de 2 volumes de Lipofectamine RNAiMax (*Invitrogen*) pour 1 volume d'ARN interférent soit *siTrip4*, soit *Scbl* ou sans ARN (contrôle NT ; non traité) dans un milieu synthétique (Opti-MEM ; *Gibco*, 51985-026). Ce mélange est ajouté au milieu de culture sans antibiotiques (DMEM + FCS 10%) pendant 24 heures sauf pour les expériences de différenciation où il est laissé 72 heures. La concentration finale en siARN est de 4nM pour les expériences sur les cellules en prolifération et de 10 nm pour celles sur les cellules en différenciation.

La transfection des C2C12 en prolifération avec le *siTrip4* entraîne une extinction de l'expression protéique d'ASC-1 de 90% en moyenne par rapport au *Scbl* (**Figure 22**).

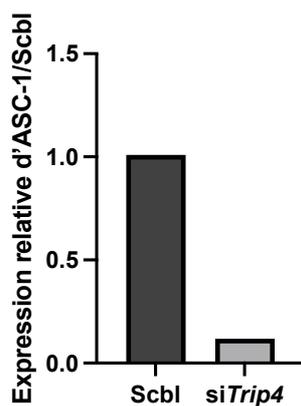


Figure 22 : Efficacité du siARN dirigé contre Trip4. Quantification par western-blot de l'extinction d'ASC-1 48h après la transfection de l'ARN interférent dans les C2C12 en prolifération. L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au *Scbl*.

2. Transfection du vecteur d'expression TRIP4 humain

Pour les expériences de surexpression d'ASC-1 dans la lignée C2C12, j'ai transfecté un vecteur d'expression *Promega* contenant la séquence du gène *TRIP4* humain (*hTRIP4*) lié à une étiquette Halotag (**Figure 23A**). Les cellules sontensemencées (75000 cellules/puits) dans des plaques 6 puits et incubées pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂. Le lendemain, elles sont transfectées avec 5µl de lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) dilué dans de l'Opti-MEM (*Gibco*, 51985-026) auquel on rajoute 0,25 ou 0,5µg/ml de vecteur *hTRIP4*. Toutes les expériences ont

été réalisées 48h après la transfection et l'expression de la forme humaine étiquetée, observable à 100kDa, a été systématiquement vérifiée par western-blot (**Figure 23B**).

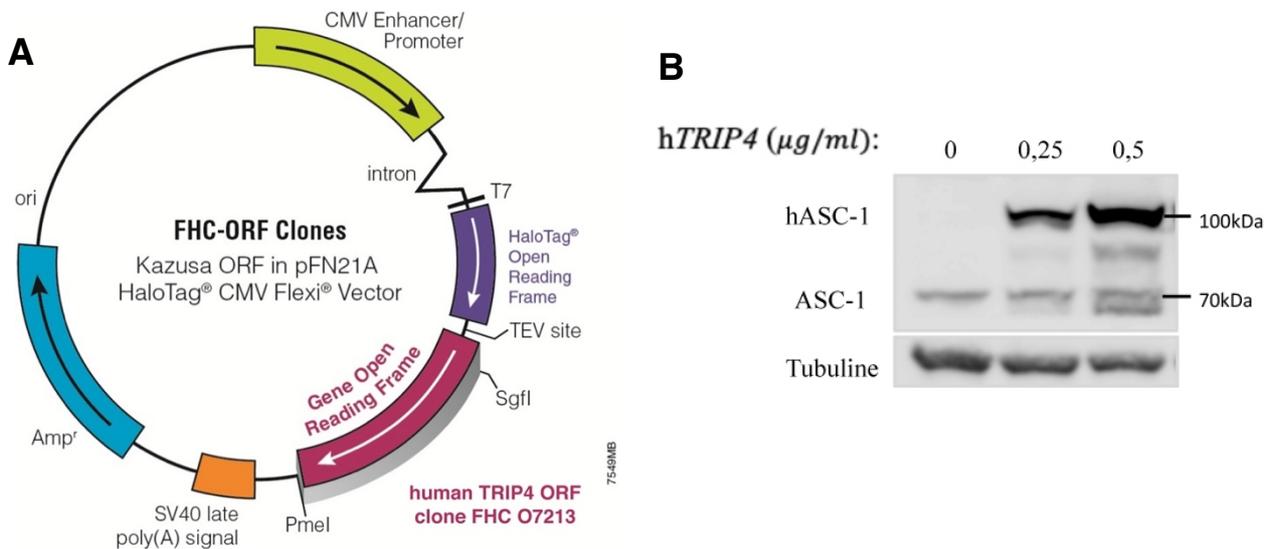


Figure 23 : Transfection du vecteur d'expression hTRIP4 dans les C2C12 en prolifération. (A) Carte du vecteur d'expression contenant l'ORF (open reading frame) TRIP4 (Promega, pFN21AB7885). (B) Détection (Western-Blot) par l'anticorps anti-ASC-1 (Abcam) de la protéine ASC-1 ectopique humaine (hASC-1) à 100 kDa et de la protéine endogène ASC-1 à 70 kDa après transfection dans les C2C12.

II. Génération de lignées knockout via l'édition génomique CRISPR/Cas9

L'édition du génome via la technologie CRISPR (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 (CRISPR associated protein 9), qui tire ses origines de recherches sur les bactéries durant les années 1980 (Ishino et al. 1987), permet aujourd'hui la modification ciblée du génome de façon simple, rapide et efficace.

Cette technologie utilise un complexe ribonucléoprotéique formé de deux éléments : un guide ARN (sgRNA, single guide RNA) de séquence homologue à la séquence ADN cible, ainsi qu'une endonucléase Cas9.

Tout d'abord, la Cas9 en complexe avec le guide ARN va se lier à l'ADN en amont d'une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif) riche en guanine. Une fois fixé à l'ADN, l'enzyme va ouvrir la double hélice ADN en amont du motif NGG afin de permettre l'appariement de l'ARN guide à la séquence cible de 3' en 5'. Si l'ARN s'apparie de manière stable, la Cas9 va subir des changements de conformation, nécessaires à l'activation de ses domaines nucléases, et pourra réaliser la cassure double brin.

Une fois la séquence d'ADN cible clivée, le système de réparation de l'ADN NHEJ (Non-Homologous End-Joining) va se mettre en place. Ce système joint les extrémités libres non-homologues et introduit des modifications spontanées correspondant généralement à des mutations indel (insertion/délétion) et induisant, le plus souvent, l'inactivation du produit du gène cible (Knock-Out, KO). Il est également possible de guider la réparation en délivrant à la cellule un donneur ADN flanqué d'extrémités homologues à celles du site de coupure. Dans ce cas, la réparation se fera par recombinaison homologue, beaucoup plus fidèle, et la séquence désirée sera insérée définitivement dans le génome permettant alors d'introduire une mutation ciblée ou bien d'insérer un nouveau gène (Knock-In, KI).

Cette technologie étant aujourd'hui devenue un outil de choix pour la génération de modèles en biologie, j'ai décidé de faire générer une lignée de myoblastes murins immortalisés (C2C12) CRISPR/Cas9 *Trip4* knock-out (KO) ainsi qu'une lignée de glioblastome humain (T98G) *TRIP4* knock-out par l'entreprise *Synthego*, afin d'en faire nos principaux modèles d'études, mimant de façon stable l'absence de protéine ASC-1 observée chez les patients.

A. C2C12 *Trip4*-knockout (KO)

Afin de générer une lignée C2C12 *Trip4*-KO, l'entreprise *Synthego* a utilisé un guide ARN de séquence ACCGGGAGCCGCUAGUACAC ciblant le site de coupure 65,884,990 sur le chromosome 9 murin (**Figure 24**), permettant de générer un décalage du cadre de lecture dans l'exon 4 du gène *Trip4*.

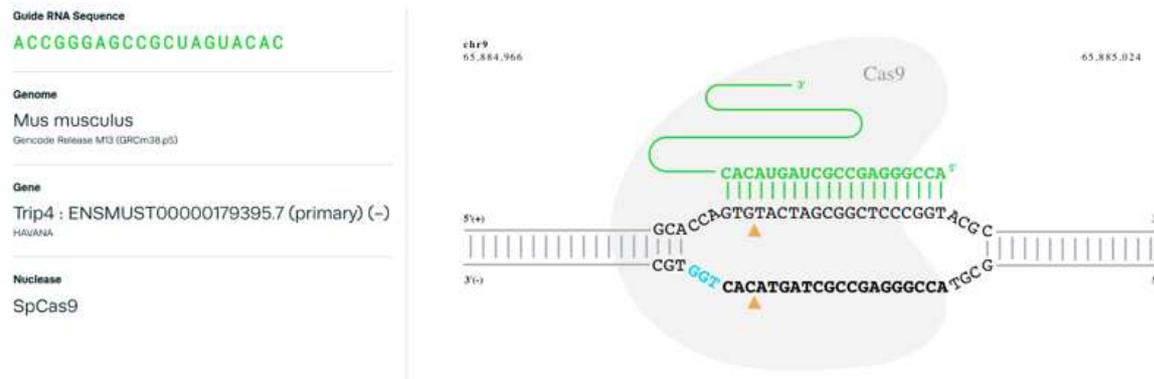


Figure 24 : Guide ARN utilisé pour générer la lignée C2C12 *Trip4*-KO.

Deux clones ont été isolés par dilution limite puis séquencés sur une centaine de base au niveau de la région ciblée (**Figure 25**).

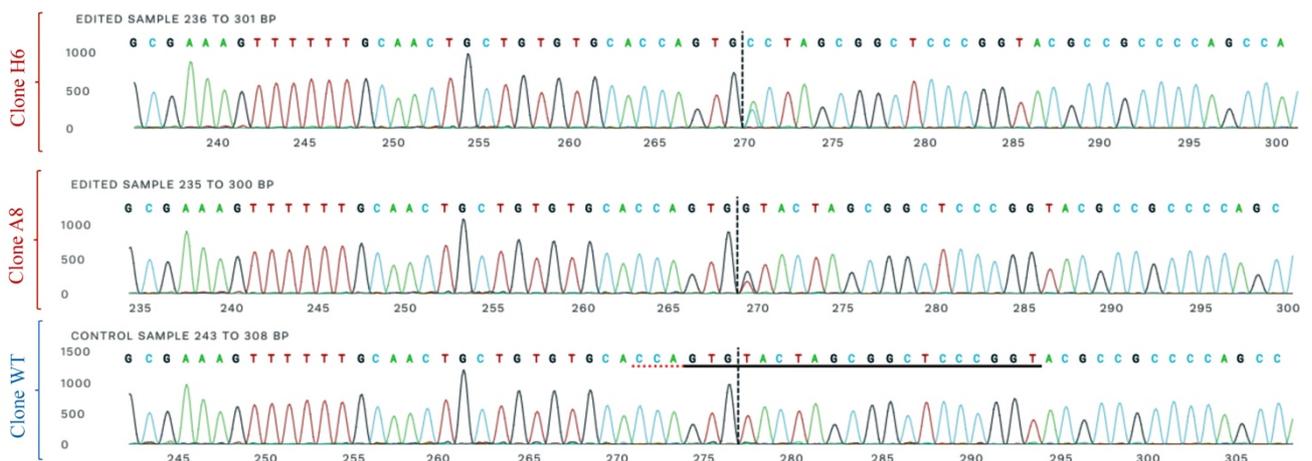


Figure 25 : Résultats du séquençage Sanger des clones H6 et A8 C2C12 *Trip4*-KO. L'échantillon contrôle WT est représenté en bas, le clone A8 au milieu et le clone H6 en haut.

Les clones H6 et A8 sont hétérozygotes composés, avec respectivement des délétions -1/-1 et des insertions +1/+1. Les analyses par Western-Blot ont confirmé l'absence totale de protéine dans les deux clones (**Figure 26A**). L'expression des ARNm de *Trip4* a été mesurée par transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel (qRT-PCR) (**Figure 26B**) révélant une expression résiduelle plus élevée dans le clone A8 que le clone H6. Pour cette raison, j'ai sélectionné le clone H6 comme modèle pour cette étude.

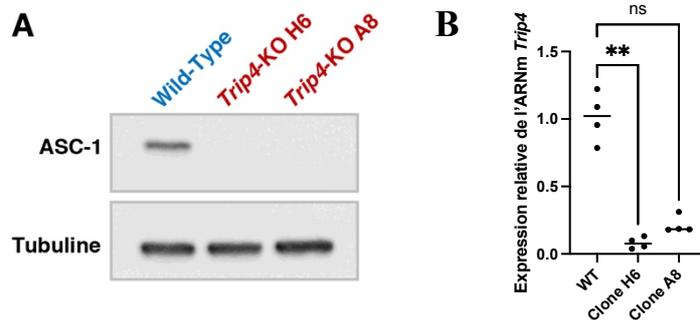


Figure 26 : Vérification du knockout du gène *Trip4* dans la lignée C2C12. (A) Quantification par western-blot de l'expression protéique d'ASC-1 (B) Quantification par qRT-PCR de l'ARNm *Trip4* dans les clones H6 et A8. L'expression a été normalisée par rapport à *Rpl19* puis rapportée au WT. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$.

B. T98G *TRIP4*-knockout (KO)

Afin de générer une lignée T98G *TRIP4*-KO, l'entreprise *Synthego* a utilisé un guide ARN de séquence ACUGGUGCACCCAGCAGUUG ciblant le site de coupure 64,387,921 sur le chromosome 15, permettant de générer un décalage du cadre de lecture dans l'exon 1 du gène *TRIP4*.

Tout comme pour la lignée C2C12, deux clones ont été isolés par dilution limite puis séquencés sur une centaine de bases au niveau de la région ciblée (**Figure 27**).

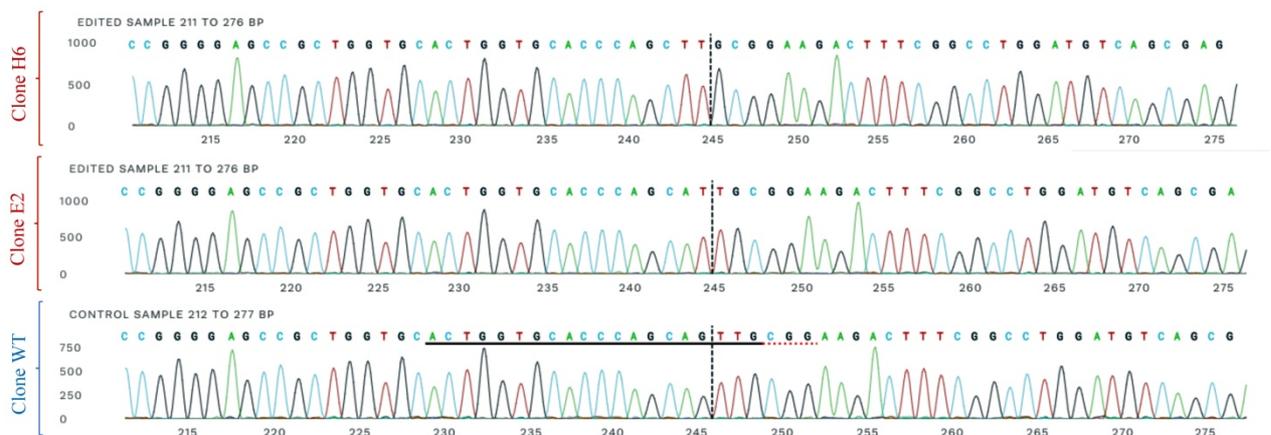


Figure 27 : Résultats du séquençage Sanger des clones H6 et E2 T98G *TRIP4*-KO. L'échantillon contrôle WT est représenté en bas, le clone E2 au milieu et le clone H6 en haut.

Les clones H6 et E2 sont homozygotes, avec respectivement des délétions -2 et -1. Les analyses par Western-Blot ont confirmé l'absence totale de protéine dans les deux clones (**Figure 28A**). L'expression des ARNm de *TRIP4* a été mesurée par transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel (qRT-PCR) (**Figure 28B**) révélant une expression résiduelle plus élevée dans le clone E2 que le clone H6. Pour cette raison, j'ai sélectionné le clone H6 comme modèle pour cette étude.

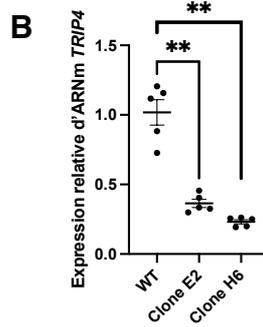
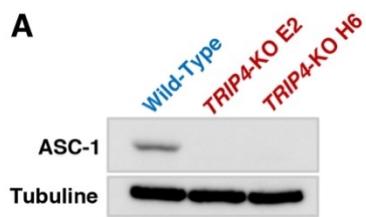


Figure 28 : Vérification du knockout du gène TRIP4 dans la lignée T98G. (A) Quantification par western-blot de l'expression protéique d'ASC-1 (B) Quantification par qRT-PCR de l'ARNm TRIP4 dans les clones E2 et H6. L'expression a été normalisée par rapport à GAPDH puis rapportée au WT. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$.

III. Analyses transcriptomiques

A. Extraction d'ARN

Les ARNs des cellules prolifératives en culture sont extraits à l'aide du kit *RNeasy Plus Mini* (Qiagen, 74136) selon les instructions du fabricant. Pour les extractions d'ARN des cellules différenciées, les cellules sont collectées après traitement à la trypsine et non par grattage, et deux lavages au PBS ont été ajoutés afin d'éliminer le Matrigel avant l'extraction. Chaque échantillon d'ARN a été conservé à -80°C.

Les échantillons de tissus musculaires contrôles et de patients sont préalablement broyés dans un mortier à l'aide d'un piston, le tout refroidi dans l'azote. Les ARNs sont ensuite extraits du muscle broyé à l'aide du kit *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen, 74704) selon les instructions du fabricant.

B. RNAseq

La qualité des ARNs est analysée sur un *Bioanalyzer Agilent 2100* afin de contrôler objectivement la qualité de l'ensemble des ARNs en définissant une valeur « RIN » (RNA Integrity Number) comprise entre 0 et 10. Seuls les échantillons d'ARN avec une valeur RIN supérieure à 7 sont envoyés à séquencer. Ces ARNs sont ensuite transformés en une librairie d'ADN codant puis séquencés suivant le protocole proposé par *Illumina*. La profondeur du séquençage est au minimum de 25 millions de reads pour garantir une bonne fiabilité des données (résultats de la plateforme *Brain Genomic* de l'Institut du Cerveau à la Pitié-Salpêtrière).

Les séquences ARN obtenues sous forme de fichiers FASTQ sont alignées sur le génome de référence de la souris *Mus musculus* GRCm39 (GCA 000001635.9) en utilisant le programme STAR modifié par *Bioconductor packages*. Cela permet de quantifier le nombre de transcrits correspondant à chaque gène pour chaque échantillon.

L'expression différentielle des gènes entre les échantillons contrôles et les échantillons mutés est obtenue en utilisant *DESeq2 pipeline*. *DESeq2* utilise un test de Wald pour tester l'hypothèse de savoir si deux groupes de gènes sont égaux ou non, en se basant sur leur moyenne et leur variation. En termes simples, dans le test de Wald, nous obtenons une mesure du changement pour chaque gène, appelé coefficient, et l'erreur standard. La statistique de Wald est représentée sous forme d'un score qui représente le rapport entre le changement (coefficient) et l'incertitude (erreur standard). Un score élevé suggère que le changement observé n'est pas dû au hasard. Les statistiques de Wald sont utilisées pour calculer la *p-value*.

Les analyses permettant de contrôler la qualité des données sont réalisées avec *Python* et *Script*. Les logiciels *ToppGene*, *Enrichr* et *KEGG release 107.1* sont utilisés pour effectuer les analyses d'ontologie des gènes (Gene Ontology, GO) et les recherches d'enrichissement dans certaines voies, processus biologiques ou fonctions moléculaires.

C. Transcription inverse et réaction de la polymérase en chaîne en temps réel (qRT-PCR)

Pour chaque échantillon, 1µg d'ARN est synthétisé en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche)* selon les instructions du fabricant avec une étape de dénaturation à 65°C pendant 10 min, suivie de 10 min à 25°C et enfin une étape d'élongation à 50°C pendant 1h (*GeneAmp PCR System 9700*).

Chaque PCR semi-quantitative est réalisée en triplicats sur des dilutions 1/20 d'ADNc à l'aide du kit *Syber Green I Mastermix (Roche)*, selon les instructions du fabricant, dans le *LightCycler 480 II (Roche)* réglé sur le programme suivant :

- Dénaturation à 95°C, 8min
- 40 cycles : 94°C, 15sec → 55°C, 20sec → 72°C, 30sec
- Un cycle : 95°C, 5sec → 60°C, 1min → 95°C, 30sec

Les amorces utilisées sont générées à l'aide d'outils tels que *BLAST*, *Primer3* plus ou *Origene* et sont décrites en **Annexe 2**. Les données sont analysées via la méthode comparative

$\Delta\Delta Cq$ par rapport à un gène rapporteur (*Rpl19* dans les C2C12 ou *GAPDH* dans les T98G) et les analyses statistiques sont réalisées sur *Prism* en utilisant le test non paramétrique pour les petits échantillons de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

D. Expériences de luciférase

Les cellules C2C12 sontensemencées (4000 cellules/puits pour les WT, 6000 cellules/puits pour les KO) dans des plaques 96 puits blanches à fond plat (*Greiner, 655098*) puis incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec :

- Un vecteur exprimant la TK-Renilla (20ng)
- Un vecteur rapporteur SRE-Luciférase (6ng), ARE-Luciférase (48ng) ou Myog-Luciférase (60ng)
- Un vecteur exprimant *hTRIP4* (100 ou 50ng), un vecteur MyoD-HA (100 ou 50ng) et/ou un vecteur vide pCITO (complétant à 200ng le mix ADN)

Les cellules sont transfectées avec de la Lipofectamine 2000, comme précédemment décrit, et maintenues en culture dans du milieu de transfection (DMEM + FCS 10%) sans antibiotiques. Au bout de 16h, le milieu de transfection est changé par du milieu de culture (DMEM + FCS 10% + P/S 1%).

48h après la transfection, les cellules sont lysées afin de mesurer les activités Luciférase et Renilla à l'aide du kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (*Promega, E2920*), selon les instructions du fabricant, dans un luminomètre *Centro XS3 LB960* (*Berthold*).

IV. Analyses protéiques

A. Génération d'un nouvel anticorps ASC-1

Afin d'optimiser notre protocole d'immunoprécipitation, nous avons fait développer par l'entreprise *Covalab* un nouvel anticorps dirigé contre la séquence humaine d'ASC-1 chez le lapin. Les 88% d'homologie existant entre les séquences humaines et murines d'ASC-1 sont en faveur d'une reconnaissance de la protéine dans les 2 types cellulaires par ce nouvel anticorps. C'est ce que nous avons observé en western-blot sur des lysats protéiques de C2C12 ou d'une lignée de myoblastes humains. Bien que l'anticorps *Covalab* entraîne un plus grand nombre de bandes artéfactuelles par rapport à l'utilisation de l'anticorps commercial *Abcam* (**Figure 29A**), son utilisation pour des expériences d'immunoprécipitation a permis d'améliorer le rendement d'immunoprécipitation (**Figure 29B**).

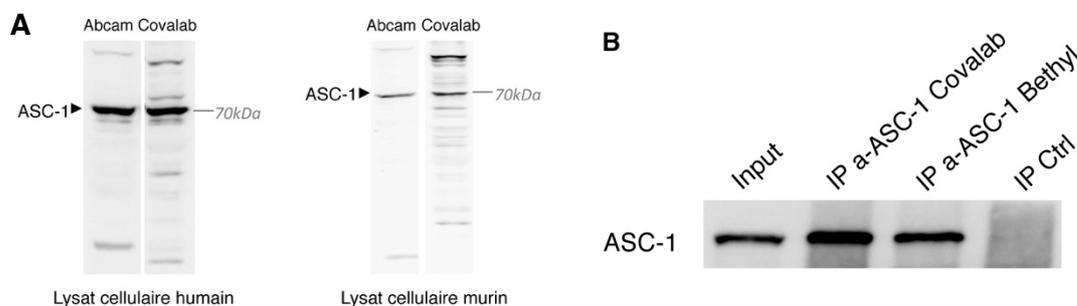


Figure 29 : Validations expérimentales du nouvel anticorps dirigé contre ASC-1. (A) Détection par Western-Blot de la protéine ASC-1, avec l'anticorps commercial Abcam ou le nouvel anticorps généré par Covalab, dans des extraits protéiques de cellules humaines (gauche) et murines (droite). (B) Immunoprécipitation d'ASC-1, avec l'anticorps commercial Abcam et le nouvel anticorps généré par Covalab, dans des C2C12. Détection par Western-Blot d'ASC-1 dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP). Un lysat contrôle a été immunoprécipité en absence d'anticorps (IP Ctrl).

B. Extraction des protéines

Les échantillons cellulaires obtenus dans des plaques 6 puits sont lavés deux fois avec du PBS froid puis lysés dans du tampon RIPA (*ThermoScientific, 89901*) complété avec 1mM de DTT, 1X de cocktail d'inhibiteurs de protéases et 1X d'inhibiteurs de phosphatases. Après 15 min d'incubation sur glace, les cellules sont grattées puis le lysat est centrifugé 15 min 12000 rpm à 4°C. Les concentrations protéiques sont déterminées via la méthode de Bradford dans le surnageant de centrifugation puis les échantillons sont conservés à -20°C en tampon *Laemmli* après un chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

C. Traitement lambda phosphatase

Des lysats cellulaires de C2C12 ont été traités avec la lambda phosphatase (*New England Biolabs*) dans le but d'étudier le profil de phosphorylation de MyoD. Pour cela, les cellules sont trypsinisées puis lavées une fois en tampon PBS et une fois en tampon Tris/NaCl. Les cellules sont ensuite lysées avec du tampon RIPA froid, complété avec 1mM de DTT et 1X de cocktail d'inhibiteurs de protéases, mais pas d'inhibiteurs de phosphatases. Après 15 min d'incubation sur glace, les cellules sont grattées puis le lysat est centrifugé 15 min 12000 rpm à 4°C. Les lysats protéiques (30µg) sont traités ou non avec la lambda phosphatase (200 ou 400U), en présence ou en absence d'inhibiteurs de phosphatases (1X), selon les instructions du fabricant et incubés pendant 30 minutes à 30°C. Enfin, les échantillons sont conservés à -20°C en tampon *Laemmli* après un chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

D. Western-Blot (WB)

Les extraits protéiques (20µg) sont analysés sur des gels Mini-PROTEAN TGX 10% ou 4-15% (*BioRad*) puis transférés sur membrane de nitrocellulose à l'aide du kit de transfert Trans-Blot Turbo (*Biorad*).

Les membranes sont bloquées pendant 2h dans du lait écrémé 5% dilué dans du TBST (0,01% Tween-20) puis incubées avec l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Après 4 lavages au TBST, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire, couplé à une peroxydase HRP (horseradish peroxidase), pendant 1h à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du TBST-Lait 1% (**Annexe 1**). Après 4 nouveaux lavages, les membranes sont incubées dans une solution 1 :1 de Péroxyde et de Luminol (ECL, *Biorad*) pendant 5 min puis exposées en chimioluminescence dans le *LAS 4000 Imager*. Les analyses quantitatives ont été réalisées à l'aide du logiciel *ImageJ*.

E. Immunoprécipitations

La co-immunoprécipitation (co-IP), est une technique permettant d'identifier la formation de complexes entre une protéine cible connue et d'autres protéines partenaires. Elle peut dépendre de la quantité de protéine cible obtenue lors de l'immunoprécipitation et des conditions de son isolation. Cette technique utilise les propriétés de reconnaissance des anticorps en association avec des méthodes de dosages et de caractérisation des protéines. Toutes les immunoprécipitations de cette étude ont été réalisées dans des cellules C2C12 ou T98G natives avec des anticorps reconnaissant les protéines endogènes. Nous avons choisi d'exclure l'utilisation de protéines cibles étiquetées, qui implique nécessairement une transfection et donc une modification du niveau d'expression de la protéine cible. Dans le cas d'ASC-1, une surexpression peut avoir des conséquences sur la prolifération cellulaire et l'expression de certaines protéines de régulation de la myogenèse.

Pour cette raison, nous avons choisi, malgré la difficulté, de travailler sur les protéines endogènes et plusieurs protocoles ont été utilisés afin d'optimiser la technique pour chaque anticorps.

1. Immunoprécipitation avec billes d'agarose

L'utilisation de billes d'agarose est adaptée à l'immunoprécipitation de protéines de faible abondance ou n'ayant pas une forte affinité pour l'anticorps utilisé.

Pour ce faire, les cellules sontensemencées dans des flasques de 75cm². Une fois à confluence (48h environ), les cellules sont lysées avec 1,2ml de tampon de lyse par flasque (**Tableau 6**) pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Le lysat protéique est ensuite récupéré par grattage des cellules et centrifugé 15 minutes à 13000 rpm à 4°C.

Une étape de présélection est ensuite réalisée afin d'écartier les interactions non spécifiques pouvant avoir lieu avec les billes d'agarose couplées aux protéines A et G (*Santa Cruz, sc-2003*). Pour cela, les billes sont d'abord lavées 3 fois dans 10 volumes de tampon de lyse. Le lysat protéique est ensuite incubé avec les billes pendant 1h sur roue à 4°C puis centrifugé 1 minute à 11500 rpm à 4°C (surnageant = lysat présélectionné). Un aliquot de 1/20 du volume du surnageant est conservé dans du tampon *Laemmli* pour servir de témoin (Input). Le lysat présélectionné est ensuite incubé une nuit avec les anticorps d'intérêt sur roue à 4°C :

- Anticorps anti-**ASC-1** (*Bethyl ; A300-843A*) : 3µg/mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**SRF** (*SantaCruz; sc-335*): 2µg/mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**MyoD** (*SantaCruz; sc-304*): 2µg/mg de lysat protéique

Le lendemain, de nouvelles billes A/G (50µl de billes pour 500µg de protéines), lavées 4 fois dans 10 volumes de tampon de lavage (**Tableau 6**), sont incubées avec le mélange lysat-anticorps pendant 2h30 sur roue à 4°C (étape d'immunoprécipitation). Parallèlement, une incubation du lysat sans anticorps avec les billes A/G sert de contrôle négatif. Une fois l'incubation sur roue terminée, une centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes à 4°C est réalisée afin d'éliminer les protéines non précipitées.

Enfin, les billes sont lavées 3 fois dans un grand volume de tampon de lavage puis resuspendues dans du tampon *Laemml*i et chauffées à 95°C pendant 5 minutes. Une dernière centrifugation (3500rpm, 5 minutes, 4°C) permet de récupérer les complexes immuns.

Tableau 6 : Composition des tampons pour l'immunoprécipitation avec billes d'agarose.

	Tampon de lyse	Tampon de lavage
Tris pH 7,5	25mM	25mM
NaCl	150mM	150mM
Glycérol	5%	5%
MgCl ₂	1,5mM	1,5mM
EDTA	0,5mM	0,5mM
NP-40 (détergent)	1%	0,15% ou 0,25%
DTT	1mM	1mM
Inhibiteur de protéases	1X	1X
Inhibiteur de phosphatases	1X	1X

2. Immunoprécipitation avec billes magnétiques

Les immunoprécipitations avec billes magnétiques permettent d'éviter les pertes de billes dues à la centrifugation, celles-ci étant récupérées à l'aide d'un aimant. Elles ont été réalisées à l'aide de kit *Pierce Crosslink Magnetic IP/Co-IP (Thermo scientific, 8805)* avec quelques modifications des instructions du fabricant. Chaque tampon fourni a été complété avec 1mM de DTT, 1X de cocktail d'inhibiteur de protéases et 1X d'inhibiteur de phosphatase.

Nous avons dans un premier temps couplé de façon non covalente les anticorps d'intérêt aux billes magnétiques pendant 15 minutes sur roue à la température de la pièce (RT). Comme dans le paragraphe précédent, les cellules sont lysées avec 700µl de tampon de lyse (kit Pierce) par flasque pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Le lysat protéique est ensuite récupéré par grattage et soniqué avec une sonde de 3mm dans un *Ultrasonic Processor (Bioblock)* pendant 4x10sec avec 1 minute 30 de pause entre chaque sonication (Programme : Timer 10sec ; Pulse ON 1sec ; Pulse OFF 1sec ; Amplitude 20%). Cette étape a été rajoutée pour améliorer la récupération des protéines dans les deux compartiments cellulaires, noyau et cytoplasme. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 15 minutes, 13000 rpm à 4°C et un aliquot de 1/20 du

volume du surnageant a été conservé dans du tampon *Laemmli* pour servir de témoin (*Input*). Dans ce protocole, il n'y a pas d'étape de présélection.

L'immunoprécipitation est réalisée en incubant directement le lysat soniqué avec les anticorps préalablement couplés aux billes sur roue une nuit à 4°C :

- Anticorps anti-**ASC-1** (*Covalab*) : 5µg/mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**ASCC1** (*Covalab*) : 5µg/mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**LIN54** (*Bethyl ; A303-799A*) : 5µg/mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**FOXM1** (*Cell Signalling ; #20459*) : Dilution 1/50 pour 1 mg de lysat protéique
- Anticorps anti-**p130** (*Cell Signalling ; #13610*) : Dilution 1/100 pour 1 mg de lysat protéique

Parallèlement, un aliquot du lysat est incubé avec les billes magnétiques sans anticorps comme contrôle négatif. Après 2 lavages en tampon de lyse et 1 lavage à l'eau ultra pure, les billes sont resuspendues dans du tampon *Laemmli* et chauffées à 95°C pendant 5 minutes puis placées sur l'aimant afin de récupérer les complexes immuns.

3. Immunoprécipitation avec Dynabeads

Les billes Dynabeads sont des billes magnétiques de haute qualité permettant un temps d'incubation très court favorisant une diminution du bruit de fond en absence d'étape de présélection.

Les anticorps ont préalablement été couplés aux billes magnétiques à l'aide du kit *Dynabeads Antibody Coupling (Invitrogen, 14311D)* selon les instructions du fabricant. L'incubation des anticorps aux *Dynabeads M-270* se fait 24h sur roue à 37°C.

La lyse des cellules est réalisée comme précédemment avec 700µl de tampon de lyse (kit Pierce) par flasques pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Le lysat protéique est ensuite soniqué selon le protocole décrit précédemment et centrifugé pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4°C. Un aliquot de 1/20 du volume du surnageant a été conservé dans du tampon *Laemmli* pour servir de témoin (*Input*).

Pour l'étape d'immunoprécipitation, le lysat a été incubé avec les billes, préalablement couplées aux anticorps, sur roue 1h à 4°C :

- Anticorps anti-ASC-1 (*Covalab* ou *Bethyl*) : 10µg/mg de lysat protéique/mg billes
- Anticorps anti-HA (*Santa Cruz ; sc-805x*) : 10µg/mg de lysat protéique/mg billes

Parallèlement, un aliquot du lysat est incubé avec les billes magnétiques sans anticorps comme contrôle négatif. Après 2 lavages en tampon de lyse et 1 lavage à l'eau ultra pure, les complexes immuns sont élués dans 45µl de tampon d'éluion à pH 2. Après neutralisation, l'éluat est conservés dans tampon *Laemmli*.

F. Immunofluorescence

Quatre jours avant l'induction de la différenciation (J-4), les C2C12 WT et *Trip4*-KO sont ensemencées (15000 cellules/puits) dans des plaques *Lab-Teks* (*Lab-Teks, Chamber Slide, 177437*), préalablement recouvertes de Matrigel, puis maintenues en culture à 37°C avec 5% de CO₂. Au Jour 0, le milieu de culture (DMEM + FCS 10% + P/S 1%) est remplacé par le milieu de différenciation (DMEM + HS 2% + P/S 1%).

Les expériences d'immunofluorescence sont réalisées aux jours 0, 2 et 3. Pour cela, les *Lab-Teks* sont lavées deux fois au PBS puis les cellules sont fixées au PFA (Paraformaldéhyde 4% en PBS, *Affymetrix, 19943*) à température ambiante pendant 15 à 20 minutes. Après trois lavages au PBS, les cellules fixées sont perméabilisées pendant 15 minutes en PBS-0,3% Triton, puis incubées pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué en PBS-2% BSA (**Annexe 1**). Les cellules sont lavées trois fois en PBS/Tween20 0,1% puis incubées avec un anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, dilué en PBS-2% BSA (**Annexe 1**). Enfin, deux lavages en PBS/Tween20 0,1% et un séchage à température ambiante sont réalisés. Des lamelles sont montées sur les lames des *Lab-Teks* avec du fluoromount DAPI (*Interchim FP-GO3520*) pour être analysées au microscope confocal *ZEISS LSM700* (x40). La mise au point est faite sur le noyau (marquage DAPI) pour chaque marquage et l'intensité du laser est réglée à la même valeur pour les cellules WT et *Trip4*-KO.

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur *Prism* en utilisant le test non paramétrique pour les petits échantillons de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Les analyses avec des p-value inférieures à 0,05 ont été considérées significatives.

RÉSULTATS

I. Caractérisation d'un nouveau variant *TRIP4* et analyse des corrélations phénotype-génotype

A. Caractérisation d'un nouveau variant homozygote dans deux familles de la population Rom atteintes d'une myopathie congénitale

Grâce à une collaboration internationale, nous avons identifié et collecté les données génétiques, cliniques et histologiques de quatre nouveaux patients issus de deux familles différentes et présentant une même mutation homozygote sur le gène *TRIP4*, le variant c.1611dupT (p.Val538CysfsTer17). Ils présentent un phénotype clinique englobant des formes légères à intermédiaires diagnostiquées de myopathie congénitale à multiminicores. Cette mutation, responsable d'un décalage du cadre de lecture, prédit l'apparition d'un codon stop prématuré à la fin du domaine de liaison à l'ARN ASCH (**Figure 30A**). Les études génétiques ont été réalisées par les Dr. Cossee et Dr. Del Mar Fenollar Cortés. Nous avons montré expérimentalement, en réalisant un Western-Blot sur un échantillon de biopsie musculaire de l'un des patients, que l'expression protéique résiduelle d'ASC-1 est de 13,6% par rapport à un échantillon témoin (**Figure 30B**).

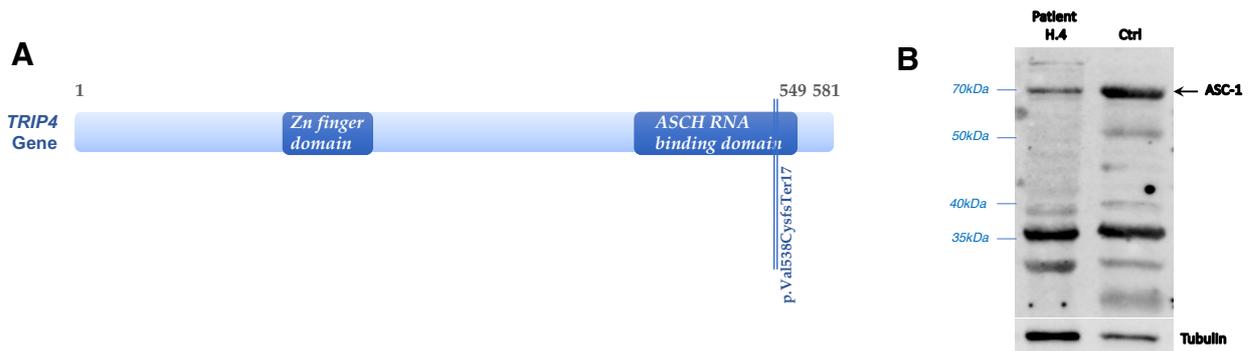


Figure 30 : Identification d'un nouveau variant *TRIP4* localisé à la fin du domaine de liaison à l'ARN ASCH. (A) Localisation du variant p.Val538CysfsTer17 sur le gène *TRIP4*. (B) Quantification par Western-blot d'ASC-1 dans un échantillon de muscle du patient H.4 et de muscle contrôle sain (Ctrl). L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline et rapportée au muscle Ctrl, montrant ainsi une expression protéique résiduelle de 13,6% de la protéine ASC-1 dans le muscle du patient H.4 par rapport au contrôle sain.

Ces deux familles, bien qu'originaires de deux pays différents (France et Espagne), appartiennent à la population Rom. Chaque couple parental présente une consanguinité au second degré. La généalogie est compatible avec une transmission autosomique récessive dans chaque fratrie. Une étude de co-ségrégation du variant a été réalisée au moyen d'un séquençage Sanger dans la famille (avec plusieurs membres atteints (famille G), révélant une co-ségrégation de la mutation à l'état homozygote avec le phénotype chez trois des quatre membres de la fratrie. La sœur cadette, asymptomatique du point de vue musculaire, est porteuse hétérozygote de cette mutation.

1. Phénotypes cliniques

Les principales caractéristiques cliniques identifiées chez les patients de ces deux nouvelles familles sont synthétisées dans le **tableau 7** ci-dessous.

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques des quatre nouveaux patients caractérisés.

Famille	Famille G (Consanguine)			Famille H (Consanguine)
Individus affectés (sexe)	1 (féminin)	2 (masculin)	3 (féminin)	4 (masculin)
Variant pathogène <i>TRIP4</i>	c.1611DupT (p.Val538CysfsTer17) Homozygote			
Atteinte musculaire	Faiblesse musculaire progressive Développement moteur retardé	Hypotonie Amyotrophie généralisée Faiblesse musculaire progressive Retard moteur	Faiblesse musculaire Développement moteur retardé	Hypotonie Faiblesse musculaire
Rigidité du rachis	Non	Oui	Non	Non
Scoliose	Oui	Oui	Oui	Non
Atteinte respiratoire	Discrète	Insuffisance respiratoire	Discrète	Syndrome ventilatoire restrictif (stable)
Atteinte cardiaque	Non	Non	Non	Non
Atteinte du système nerveux	Non	Épisodes de déficit neurologique focal	Non	Dysfonction anté-hypophysaire
Atteinte dermatologique	Non	Non	Non	Non
Caractéristiques dysmorphiques	Non	Camptodactylie	Non	Pieds plats; genu valgum
Sévérité	Légère	Intermédiaire	Légère	Intermédiaire
Biopsies musculaires	Prédominance des fibres de type I Quelques noyaux internalisés	Prédominance des fibres de type I Multiminicores	Non	Multiminicores, caps, batônnets, noyaux internalisés, désorganisation sarcomérique

Dans la famille G, phénotypée par le Dr. Martinez Vicente et le Dr. Galan Davila, trois des frères et sœurs présentaient un retard dans l'acquisition des étapes du développement moteur, avec une acquisition de la marche tardive (24 mois) ainsi que des chutes fréquentes. Cependant, l'un des individus (G.2), à ce jour âgé de 29 ans, présente un phénotype plus sévère avec une insuffisance respiratoire ainsi qu'une scoliose sévère. Les premiers symptômes sont survenus durant la petite enfance, comprenant une hypotonie, un développement moteur retardé, une faiblesse prédominant au niveau des ceintures mais touchant également les fléchisseurs du cou et les abdominaux, ainsi que des tremblements distaux sporadiques au niveau des membres supérieurs. Il a développé une scoliose s'accompagnant d'une légère rigidité rachidienne. La faiblesse musculaire a progressé graduellement et est actuellement notée aux alentours de 3+ (échelle MRC) au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne et des fléchisseurs du cou. Il y a également un discret déficit distal des fléchisseurs des doigts et de la dorsiflexion du pied. Il éprouve des difficultés pour marcher, et a besoin d'aide d'une tierce personne pour se relever d'un siège, effectuer sa toilette, se retourner dans son lit ou couper ses aliments. Il a également une toux inefficace ainsi qu'une grande fatigabilité à l'effort. Aucune atteinte cardiaque structurelle n'a été décelée mais il est actuellement suivi en raison de symptômes tels que la dyspnée, l'asthénie et des épisodes de palpitations. Malgré des valeurs de capacité respiratoire modérément réduites (CVF 59%), il nécessite d'une ventilation non invasive (BiPAP) pendant 22 heures par jour. Son insuffisance respiratoire s'est aggravée progressivement, nécessitant la mise en place d'une ventilation non-invasive à l'âge de 26 ans. Son état respiratoire s'est encore détérioré à la suite d'une infection par le SARS-CoV-2. Le patient a aussi présenté des épisodes de déficits neurologiques focaux mais l'EEG effectué était normal, alors que l'IRM cérébrale montrait de petites hétérotopies frontales.

Le patient G.2 a trois sœurs dont deux qui présentent un tableau similaire mais d'une moindre gravité. Elles ont néanmoins une faiblesse des muscles axiaux qui a entraîné une nette scoliose, mais elles marchent de façon autonome et n'ont pas besoin de ventilation mécanique à l'âge de 31 et 20 ans.

Le patient de la famille H (H.4), phénotypé par le Dr. Cintas, présente depuis l'adolescence des difficultés motrices périphériques évoquant une atteinte musculaire. Ce patient, âgé de 24 ans lors de la dernière consultation, présente à ce jour un syndrome myopathique avec un déficit des ceintures scapulaire et pelvienne (autour de 4/5 sur l'échelle

MRC) associé à un léger déficit de la flexion des doigts. Aucune scoliose, rigidité de la colonne ou atteinte articulaire n'ont été reportés chez ce patient. De même, il ne présente aucune atteinte cardiaque. Effectivement, il a un rythme sinusal sans aucun trouble de la conduction à l'ECG et l'IRM cardiaque était normale. En revanche, il est suivi en endocrinologie pour un retard statural et obésité (IMC>40), associé à un déficit complet en hormone de croissance et un taux bas de cortisol. Une prise pondérale importante a été reportée ces dernières années, accentuant le handicap du patient. Sur le plan respiratoire, il présente un syndrome ventilatoire restrictif stable avec une CVF à 43% de la valeur attendue.

Aucune étude de ségrégation n'a été réalisée dans la famille mais son frère, asymptomatique du point de vue musculaire, est aussi atteint d'un déficit complet en hormone de croissance et l'une de ses sœurs a présenté une encéphalopathie avec microcéphalie ainsi qu'une cardiopathie traitée chirurgicalement.

2. Examens complémentaires

Le dosage de CPK (Créatine PhosphoKinase) était normal ou légèrement augmenté (<2 fois la normale) chez tous les patients. Une IRM musculaire réalisée chez l'un des patients (G.2) a montré des zones d'infiltration graisseuse « peignée » plus marquées dans le muscle semi-tendineux des deux cuisses et dans le muscle soléaire des deux jambes (**Figure 31**). Aucune lésion osseuse ou articulaire n'a été observé. Des IRM cérébrales ont été réalisées chez deux des patients (G.2 et H.4). L'une a révélé de petites hétérotopies frontales (G.2) alors que l'autre a révélé des hypersignaux de substance blanche d'aspect nodulaire (H.4). Enfin, des études électromyographiques ont aussi été réalisées chez deux patients. Alors qu'une discrète atteinte myogène a été identifiée chez le patient de la famille H, l'EMG du patient G2 a montré des signes compatibles avec une atteinte myopathique diffuse, avec atteinte sévère des membres supérieurs et modérée-sévère des membres inférieurs. Aucune altération de la jonction neuromusculaire et aucune atteinte neurogène suggérant des défauts du motoneurone n'ont été identifiées.

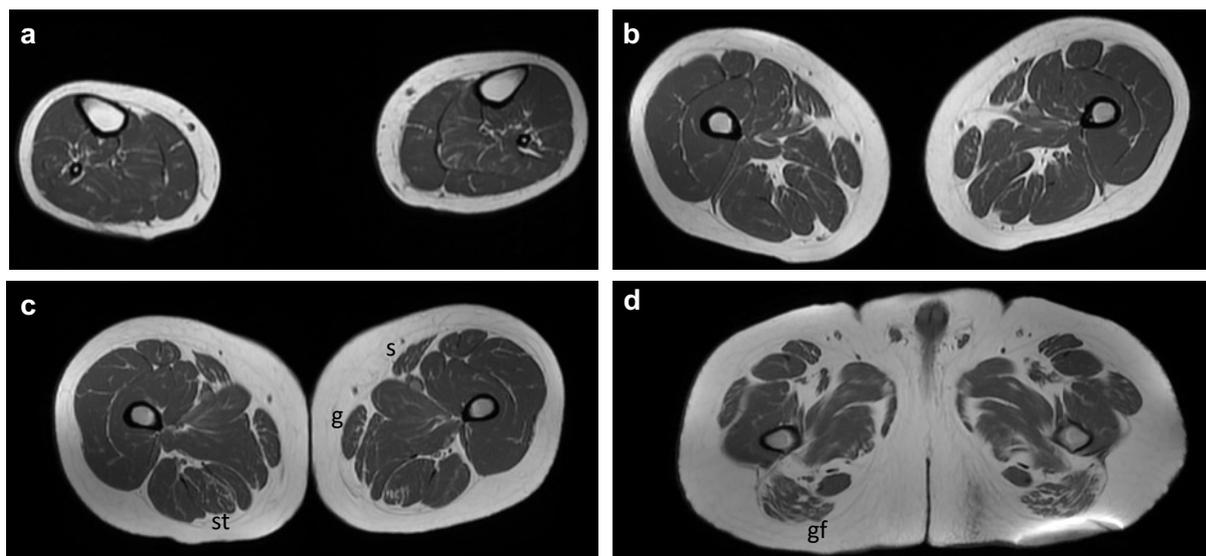


Figure 31 : IRM des muscles des membres inférieurs du patient G.2. Séquence T1, coupes transversales au niveau des jambes (a), des cuisses (b,c) et de la ceinture pelvienne (d). Cet IRM montre une abondante adiposité sous-cutanée (blanche sur l'image) ainsi qu'une atrophie et une infiltration graisseuse plus marquée sur les muscles sartorius (s), gracilis (g), semi-tendineux (st) et grands fessiers (gf).

3. Phénotypes histopathologiques

Des biopsies musculaires ont été réalisées dans l'enfance chez trois des quatre patients identifiés. Les biopsies de la famille G ont été interprétées par le Dr Sierra Gonzalo et celle du patient H.4 par le Pr. Uro-Coste.

Dans la famille G, les deux patients présentent une variabilité de la taille des fibres (les plus petites ayant des contours arrondis), une prédominance des fibres de type I et quelques noyaux internalisés. La biopsie de la patiente G.1 montre en plus, avec la coloration histochimique NADH-TR, un réseau intermyofibrillaire conservé mais quelques zones sous-sarcolemmales plus foncées. Le muscle du patient G.2 a des zones dépourvues d'activité oxydative avec les colorations oxydatives (NADH, SHD, COX), ainsi que des zones fuscino-philés en trichrome de Gomori.

La biopsie du patient H.4 montre une irrégularité de la taille des fibres musculaires ainsi qu'une désorganisation de leur architecture (**Figure 32**). De nombreuses fibres ont un déficit de coloration, présentent une forme arrondie, et occupent environ 10% de la surface du

cytoplasme, évoquant des cores. Ces cores ne sont pas toujours centraux et pas toujours uniques au sein de la fibre musculaire. Les études par coupes semi-fines et en microscopie électronique ont révélé des zones de désorganisation du sarcomère aboutissant dans certaines fibres à la constitution de petites structures quadrillées, évoquant des batônnets. Dans d'autres fibres, il existe des zones globalement circulaires, constituées par des aspects granulo-filamentaires. Il existe aussi des structures denses aux électrons, en vague, disposées régulièrement dans ces petits nodules, évoquant des mini-cores. Enfin, un autre type d'anomalie constituée par une accumulation de filaments au pôle de deux fibres a été reporté. Cette accumulation filamentaire, qui comporte encore quelques stries Z, repousse la striation sarcomérique normale, évoquant des caps. La présence simultanée de minicores, de caps et de batônnets est caractéristique des anomalies précédemment décrites chez les patients atteints de myopathies congénitales liées à ASC-1.

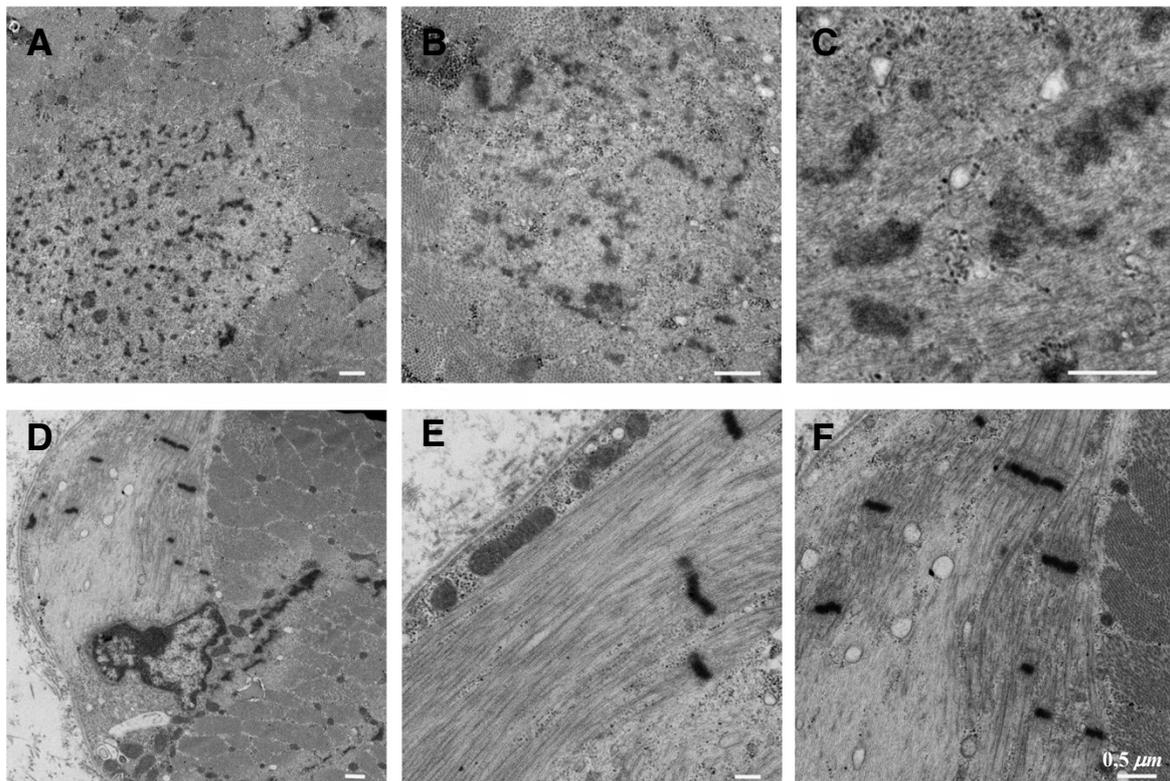


Figure 32 : Lésions ultrastructurales du patient H.4. (A-C) Les coupes ultrafines transversales montrent des zones localisées de désorganisation sarcomérique, dépourvues en mitochondries et contenant du matériel granulo-filamentaire de densité comparable à celle de la strie Z (minicores), entourées de sarcomères d'aspect normal. **(D-F)** Certaines fibres présentent des zones sous-sarcolemmales d'accumulation de matériel filamentaire, avec perte de la structure sarcomérique, en forme de croissant ou de casquette (lésion de type « cap »). Chaque barre d'échelle blanche correspond à 0,5 μm.

B. Étude des corrélations phénotype-génotype des maladies neuromusculaires associées au complexe ASC-1

Au début de ma thèse, l'incertitude quant à l'implication primaire des motoneurones ou des muscles dans les pathologies liées ASC-1 et *ASCC1* nécessitait d'être clarifiée. Afin de déterminer les tissus affectés chez les individus porteurs de mutations *TRIP4* ou *ASCC1* et d'établir des corrélations phénotype-génotype, j'ai étudié tous les cas décrits dans la littérature entre 2016 et aujourd'hui ainsi que les quatre nouveaux patients caractérisés au cours de ma thèse.

A ce jour, 50 patients avec des mutations sur les gènes *TRIP4* ou *ASCC1*, présentant des atteintes neuromusculaires plus ou moins sévères, ont été décrits. Toutes les mutations *ASCC1*, à l'exception d'une, ont été associées à un syndrome néonatal léthal (décès au cours de la première année de vie). En revanche, le spectre phénotypique associé aux mutations *TRIP4* est lui bien plus large puisqu'il comprend des formes légères, intermédiaires, sévères et, en période néonatale, léthales d'atteinte neuromusculaire.

L'étude des phénotypes cliniques de ces patients a permis de classer les pathologies neuromusculaires associées au complexe ASC-1 en deux catégories distinctes (**Tableau 8**) :

- Les formes légères, intermédiaires et sévères associées à des mutations *TRIP4* et à l'une des mutations du gène *ASCC1*, avec un phénotype clinique plutôt caractéristique des myopathies congénitales.
- La forme néonatale léthale associée aux mutations des gènes *ASCC1* ou *TRIP4*, avec un phénotype clinique proche de l'amyotrophie spinale avec fractures osseuses congénitales (SMABF2).

Formes légères, intermédiaires et sévères		
	Total des patients TRIP4 (%)	Total des patients ASCC1 (%)
Hypotonie	18/20 (90%)	1/1
Faiblesse musculaire	20/20 (100%)	1/1
Retard du développement moteur	20/20 (100%)	1/1
Rigidité du rachis	4/10 (40%)	0/1
Scoliose	11/20 (55%)	0/1
Hyperlaxité articulaire	11/20 (55%)	1/1
Contractures articulaires	7/20 (35%)	0/1
Atteinte respiratoire	17/20 (85%)	0/1
Atteinte cutanée	8/13 (61%)	0/1
Atteinte cardiaque	3/20 (15%)	0/1
Décès (<2ans)	2/20 (10%)	0/1
Biopsies musculaires	Multiples lésions caractéristiques des myopathies congénitales	n.c

Forme néonatale létale		
	Total des patients TRIP4 (%)	Total des patients ASCC1 (%)
Hypokinésie foetale	5/5 (100%)	15/17 (88%)
Hypotonie néonatale	6/6 (100%)	16/17 (94%)
Faiblesse musculaire et atrophie	6/6 (100%)	17/17 (100%)
Fractures osseuses congénitales	6/6 (100%)	18/18 (100%)
Arthrogrypose multiple congénitale	5/5 (100%)	16/17 (94%)
Insuffisance respiratoire	6/6 (100%)	17/17 (100%)
Atteinte du système nerveux	6/6 (100%)	8/10 (80%)
Atteinte cardiaque	3/4 (75%)	3/16 (19%)
Décès (<1ans)	6/6 (100%)	18/18 (100%)
Biopsies musculaires	Variation de la taille des fibres ; Immaturité des fibres musculaires	Variation de la taille des fibres ; Atrophie des fibres musculaires

Tableau 8 : Résumé des caractéristiques cliniques des pathologies neuromusculaires associées à des mutations des gènes TRIP4 et ASCC1. Les formes légères, intermédiaires et sévères (Vert) ne concernent quasi exclusivement que des patients avec des mutations du gène TRIP4 (Bleu), à l'exception d'un patient hétérozygote composite pour deux mutations du gène ASCC1 (Orange). La forme létale néonatale (Violet) est majoritairement associée à des mutations du gène ASCC1, et parfois du gène TRIP4. n.c : non caractérisé.

La première catégorie ne concerne quasi exclusivement que des patients avec des mutations du gène *TRIP4* et est caractérisée cliniquement, électrophysiologiquement et histopathologiquement par une atteinte primaire du muscle squelettique, que nous avons appelée myopathie liée à ASC-1. Ce phénotype, de sévérité très variable (**Tableau 9**), s'étend de la forme légère, où les patients présentent une hypotonie, une faiblesse musculaire et un retard dans l'acquisition de la marche, aux formes sévères, où les patients présentent en plus des atteintes respiratoires responsables d'un décès prématuré. Deux décès avant l'âge de 2 ans ont été reportés à ce jour (Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022).

Parmi les 21 patients présentant des mutations du gène *TRIP4* et diagnostiqués comme atteints de myopathie congénitale liée à ASC-1, 85% ont développé des atteintes respiratoires de sévérité variable, pouvant aller jusqu'à l'insuffisance respiratoire entraînant le décès. L'atteinte musculaire est parfois associée à une scoliose (55%), une rigidité du rachis (40%),

une hyperlaxité (55%) et des contractures des articulations (35%). Des atteintes cutanées (61%), telles que l'hyperélasticité et l'hyperkératose, et des caractéristiques dysmorphiques, telles que la microrétrognathie et l'hypertélorisme, ont aussi été fréquemment décrites chez ces patients. Deux cas de cardiomyopathie dilatée à début adulte et un cas de malformation cardiaque ont été également répertoriés (Davignon et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022). Aucune atteinte du système nerveux spécifique n'a été recensée mais certains patients présentent un retard global du développement caractérisé par des troubles du langage et de l'apprentissage (Davignon et al. 2016b; Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022; Dembour et al. 2022). Enfin, dans certains cas, des manifestations prénatales, telles la diminution de liquide amniotique (oligohydramnios), une bradykinésie fœtale ainsi qu'une naissance prématurée, ont été décrites (Dembour et al. 2022; Marais et al. 2022).

Des études électromyographiques ont été réalisées chez 7 patients, y compris le patient G.2 décrit plus haut, et ont révélé une atteinte myogène sans signes de dénervation ou d'atteintes du motoneurone, ni anomalies dans les études de conduction nerveuses.

De façon surprenante, un seul patient récemment décrit, porteur de deux variants hétérozygotes sur le gène *ASCCI*, présente une forme intermédiaire de myopathie congénitale, semblable à la myopathie congénitale liée à ASC-1 précédemment décrite (Sharova et al. 2022). Ce patient présente une hypotonie néonatale et un retard du développement moteur. L'examen neurologique réalisé à l'âge de 3 ans et demi a révélé une hypotonie musculaire sévère, une faiblesse des muscles fléchisseurs du cou, une faiblesse musculaire des membres supérieurs et inférieurs, une réduction des réflexes ostéotendineux des membres supérieurs et des réflexes achilléens mais des réflexes rotuliens normaux. L'étude de conduction nerveuse s'est révélée normale mais l'EMG a montré une atteinte myogène. Aucune fracture osseuse congénitale ni arthrogrypose multiple congénitale n'ont été signalées mais le patient présente une épiphysiolyse de l'ulna. Il présente des caractéristiques dysmorphiques telles qu'une cryptorchidie, un pectus excavatum et un front large. Le patient a montré un retard dans l'acquisition des capacités de langage et de communication. Enfin, une IRM cérébrale a montré une légère ventriculomégalie et une légère hypertrophie de l'espace sous-arachnoïdien.

Tableau 9 : Résumé des caractéristiques cliniques observées chez 21 patients, issus de 14 familles, atteints de formes légères, intermédiaires et sévères associées à des mutations du gène TRIP4. TVR : Trouble Restrictif Ventilatoire ; DCM : Cardiomyopathie dilatée ; FSV : Variation de la taille des fibres ; IN : Noyaux internalisés ; n.r : non reporté ; n.a : non applicable.

Formes légères, intermédiaires et sévères						
Publication	Davignon et coll, 2016	Villar-Quiles et coll, 2020				
Famille	Famille F (Consanguine)	Famille A (Consanguine)	Famille B	Famille C (Consanguine)	Famille D	Famille E
Individus affectés	4 (3F, 1M)	1F	1M, 1F	1M	1M	1M
Variant pathogène TRIP4	c.890G>A (p.Trp297*) Homozygote	c.141_142delAT (p.Tyr48CysfsTer3) Homozygote	c.534C>G (p.His178Gln) + c.2544_1547delACTG (p.Asp515Alafs34)	c.1065delC (p.Ile356LeufsTer6) Homozygote	c.55_56insCT (p.Gln19Profs47) + c.1197delA (p.Ser399Serfs12)	Délétion homozygote des exons 8 et 9
Expression protéique	Absence totale de protéine	n.r	Diminution d'ASC-1	n.r	Absence totale de protéine	Absence totale de protéine
Atteinte musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Hypotonie, Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Faiblesse musculaire Remarquée à l'adolescence
Rigidité du rachis	Oui (n=2)	Non	Non	Non	Oui	Oui
Scoliose	Oui (n=3)	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Atteinte articulaire	Hyperlaxité, Contractures	Contractures	Non	Hyperlaxité	Hyperlaxité, Contractures	Non
Atteinte respiratoire	Détresse respiratoire néonatale (n=3) ou à partir de 2 ans (n=1)	Oui	Insuffisance respiratoire depuis l'enfance	Insuffisance respiratoire néonatale	Oui	Non
Atteinte cardiaque	DCM (n=1)	Non	Non	Non	Non	DCM
Atteinte du système nerveux	Difficultés d'apprentissage, Retard du langage	Difficultés d'apprentissage et d'écriture	Non	Non	Non	Non
Atteintes dermatologiques	Hyperélasticité, Hyperkératose	Non	Non	Hyperélasticité	Xérose	Hyperélasticité, Hyperkératose
Caractéristiques dysmorphiques	Visage plat ; Rétrognathie ; Thorax plat (n=2) ; Pectus excavatum (n=2) ; Pieds valgus (n=2)	Visage plat ; Rétrognathie	Non	Visage plat ; Marquage veineux proéminent ; Doigts effilés	Visage allongé ; Oreilles décollée ; Rétrognathie	Visage plat ; Rétrognathie
Sévérité	Sévère (n=3), Intermédiaire (n=1)	Intermédiaire	Intermédiaire	Sévère (décès à 8 mois)	Sévère	Intermédiaire
Biopsies musculaires	n=3 : FSV, IN, anneaux sous-sarcolemmaux hyperodysmatifs, légère fibrose endomysiale, lésions « cap », minicores	IN, FSV, prédominance fibres de type 1 et hypotrophie, légère fibrose de l'endomysium, fibres en tourbillon, minicores	Normale (n=1)	IN, FSV, prédominance et hypotrophie des fibres de type 1, fibrose endomysiale	IN, FSV, prédominance fibres de type 1, minicores, anneaux sous-sarcolemmaux hyperoxydatifs	IN, FSV, prédominance fibres de type 1, fibres lobulées, minicores, bâtonnets, corps cytoplasmiques et lésions « cap »

Formes légères, intermédiaires et sévères

Publication	Dembour et coll, 2022		Marais et coll, 2022			Thèse		
Famille	Famille 1	Famille 2	Famille 1 (Consanguine)	Famille 2	Famille 3 (Consanguine)	Family 6 (Consanguine)	Famille G (Consanguine)	Famille H (Consanguine)
Individus affectés	1M	1M	1M	1F	2F	-	2F, 1M	1M
Variant pathogène <i>TRIP4</i>	c.925C>T (p.Arg309Ter) + c.1255C>T (p.Gln419Ter)	c.925C>T (p.Arg309Ter) + délétion exons 10 et 11	c.512G>A (p.Cys171Tyr) Homozygote	c.1678+1_1678+2insC (p.Phe526Glyfs6)	c.1065delC (p.Ile356LeufsTer6) Homozygote	c.1065delC (p.Ile356LeufsTer6) Homozygote	c.1611dupT (p.Val538CysfsTer17) Homozygote	
Expression protéique	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	n.a (pas de consentement pour la diffusion des données cliniques)	<i>En cours</i>	Diminution d'ASC-1
Atteinte musculaire	Hypotonie centrale et périphérique, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale centrale et périphérique, Faiblesse musculaire	Hypotonie, Faiblesse musculaire	Hypotonie, Faiblesse musculaire	Hypotonie, Faiblesse musculaire		Hypotonie, Faiblesse musculaire, Retard développement moteur	Hypotonie, Faiblesse musculaire
Rigidité du rachis	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r		n.r	n.r
Scoliose	Non	Non	Non	Oui	Non		Oui (n=3)	Non
Atteinte articulaire	Hyperlaxité	Hyperlaxité	Contractures	Hyperlaxité	Hyperlaxité		Non	Non
Atteinte respiratoire	Détresse respiratoire néonatale	Non	Détresse respiratoire néonatale	Non	Détresse respiratoire néonatale		Insuffisance respiratoire (n=1)	TVR
Atteinte cardiaque	Non	Non	Communication interauriculaire et interventriculaire	Non	Non		Non	Non
Atteinte du système nerveux	Retard global du développement	Retard global du développement, Dysphagie	Hyporéflexie	Non	Hyporéflexie		Épisodes de déficits neurologiques focales (n=1)	Retard global du développement, Insuffisance hypophysaire
Atteintes dermatologiques	Non	Peau sèche avec lésions de grattage	n.r	n.r	n.r		n.r	Non
Caractéristiques dysmorphiques	Non	Pectus excavatum, cryptorchidie	Microrétrognathie, Hypertélorisme, Palais haut	Microrétrognathie, Hypertélorisme	Microrétrognathie, Palais haut		Camptodactylie (n=1)	Pieds plats; genu valgum; Obésité
Sévérité	Sévère	Intermédiaire	Sévère	Intermédiaire	Sévère (1 décès à 7 mois)	Intermédiaire (n=1) Légère (n=2)	Intermédiaire	
Biopsies musculaires	FSV, prédominance fibres de type 1, minicores, zones de désorganisation myofibrillaire centrales	FSV, cores	n.r	n.r	FSV, IN, fibres arrondies, augmentation du tissu conjonctif endomysial, lésions « cap », minicores	FSV, prédominance des fibres de type I, anneaux sous- sarcolemmaux hyperoxydatifs, IN, Multiminicores (n=2)	Multiminicores, caps, batônnetts, noyaux internalisés, désorganisation sarcomérique	

A ce jour, 14 mutations du gène *TRIP4* sont associées aux myopathies congénitales liées à ASC-1. La transmission est autosomique récessive dans tous les cas. Seul deux variants faux-sens dans le gène *TRIP4* ont été rapportées (Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022). Les 12 autres mutations sont de type non-sens ou décalage du cadre de lecture (**Tableau 10**). La délétion d'un seul nucléotide dans l'exon 8 (c.1065delC, p.Ile356LeufsTer6) est la mutation la plus fréquemment rapportée (3 familles).

Un seul patient muté *ASCCI*, hétérozygote composite avec une délétion des exons 2 et 3a et un variant d'épissage c.395-2A>G, présente des caractéristiques cliniques semblables au phénotype intermédiaire décrit pour les myopathies congénitales liées à ASC-1, associées à des mutations du gène *TRIP4*.

Tableau 10 : Résumé des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCC1* associées aux formes légères, intermédiaires et sévères des myopathies congénitales associées à *ASC-1*. Tableau adapté de Meunier et coll., 2021, mis à jour à partir de la ligne rouge.

Publications	Gène	Exon	Changement cDNA	Changement protéique	Type de variant	Effet prédit	Atteintes primaires rapportées
Davignon <i>et coll.</i> , 2016	<i>TRIP4</i>	7	c.950>A (homozygote)	p.Trp297Ter	Substitution	Non-sens	Muscle
Villar-Quiles <i>et coll.</i> , 2020	<i>TRIP4</i>	2	c.141_142delAT (homozygote)	p.Tyr48CysfsTer3	Délétion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	4	c.534C>G (comp het)	p.His178Gln	Substitution	Faux-sens	Muscle
	<i>TRIP4</i>	11	c.1544_1547delACTG (comp het)	p.Asp515AlafsTer34	Délétion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	8	c.1065delC (homozygote)	p.Ile356LeufsTer6	Délétion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	1	c.55_56insCT (comp het)	p.Gln19ProfsTer 47	Insertion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	9	c.1197delA (comp het)	p.Ser399SerfsTer 12	Délétion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	8+9	Délétion homozygote des exons 8 et 9		Délétion	Délétion dans le cadre	Muscle
Dembour <i>et coll.</i> , 2022	<i>TRIP4</i>	7	c.925C>T (comp het)	p.Arg309Ter	Substitution	Non-Sens	Muscle
	<i>TRIP4</i>		c.1255C>T (comp het)	p.Gln419Ter	Substitution	Non-Sens	Muscle
	<i>TRIP4</i>	10+11	Délétion hémizygote des exons 10 et 11		Délétion		Muscle
Marais <i>et coll.</i> , 2022	<i>TRIP4</i>	4	c.512G>A (homozygote)	p.Cys171Tyr	Substitution	Faux-sens	Muscle
	<i>TRIP4</i>		c.1678+1_1678+2insC	p.Phe526Glyfs6	Insertion	Décalage du cadre	Muscle
	<i>TRIP4</i>	8	c.1065delC (homozygote)	p.Ile356LeufsTer6	Délétion	Décalage du cadre	Muscle
Thèse (<i>non publié</i>)	<i>TRIP4</i>		c.1611dupT (homozygote)	p.Val538CysfsTer17	Duplication d'une paire de base	Décalage du cadre	Muscle
Sharova <i>et coll.</i> , 2022	<i>ASCC1</i>	2-3a	Délétion hémizygote des exons 2 et 3a		Délétion	Délétion dans le cadre	Muscle (+ os ?)
	<i>ASCC1</i>	5	c.395-2A (comp het)	p.Val104GlyfsTer4	Délétion	Variant d'épissage / Décalage du cadre	

Les mutations gène *TRIP4* sont réparties sur toute la longueur du gène et certaines d'entre elles se situent au niveau des domaines fonctionnels prédits de la protéine ASC-1. En effet, certaines délétions perturbent le domaine ASCH situé dans la partie carboxy-terminale (p.Asp515AlafsTer34 ; p.Ser399SerfsTer12 ; p.Ile356LeufsTer6 ; délétion homozygote des exons 8 et 9 ou 10 et 11 ; p.Val538CysfsTer19), alors que les substitutions faux-sens p.His178Gln et p.Cys171Tyr se situent dans le domaine central à doigt de zinc (Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022) (**Figure 33**). D'après des prédictions *in silico*, certaines mutations avec décalage du cadre de lecture conduiraient à de courtes protéines tronquées dépourvues de tout domaine fonctionnel (p.Gln19ProfsTer47 ; p.Tyr48CysfsTer3), alors que trois mutations non-sens sont compatibles avec la synthèse de protéines tronquées préservant au moins un des deux domaines fonctionnels (p.Trp297Ter ; p.Arg309Ter ; p.Gln419Ter) (Davignon et al. 2016a; Dembour et al. 2022).

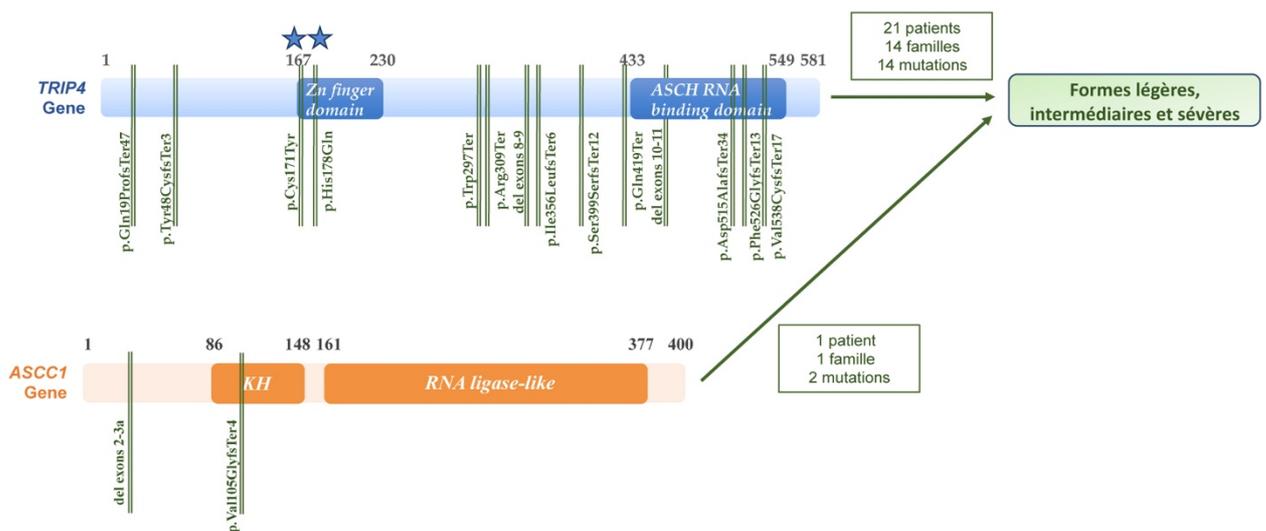


Figure 33 : Localisation des mutations des gènes *TRIP4* et *ASCC1* associées au phénotype de la myopathie congénitale associée au complexe ASC-1. Les étoiles bleues désignent les mutations faux-sens

Notre équipe a réalisé des études expérimentales sur les échantillons de 4 patients qui ont révélé une déplétion totale ou une très forte diminution de l'expression d'ASC-1 associée à 3 de ces mutations, dont la mutation faux-sens p.His178Gln (Davignon et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020), suggérant une élimination par des mécanismes de contrôle qualité transcriptionnels ou post-transcriptionnels. De plus, la protéine ASC-1 est indétectable à la fois

dans les cas les plus légers ainsi que dans les premiers cas graves rapportés, suggérant des modulateurs de la sévérité du phénotype autres que la quantité de protéine ASC-1 présente.

Le seul patient avec une mutation du gène *ASCC1* présentant ce type de phénotype est hétérozygote composite. Il présente un variant d'épissage c.395-2A>G (p.Val104GlyfsTer4) affectant un site d'épissage accepteur conservé. L'étude de Sharova *et coll.*, a montré expérimentalement, par des RT-PCR réalisées sur les échantillons d'ADNc du père et du patient, que ce variant entraîne la présence de deux isoformes : le premier avec un exon 5 tronqué entraînant la perte de 12 AA sans décalage du cadre de lecture et le second avec une perte complète de l'exon 5 entraînant un décalage du cadre de lecture (Sharova et al. 2022). Le second variant a été associé à une délétion des exons 2 et 3a, responsable de la surexpression d'une forme tronquée d'ASCC1 chez ce patient.

Il semble donc que l'absence totale de la protéine ASC-1 (haploinsuffisance) ou la surexpression d'une protéine ASCC1 tronquée conduisent à un phénotype musculaire strié primaire de sévérité variable qui rentre dans le cadre de la myopathie congénitale associée au complexe ASC-1.

La seconde catégorie concerne 21 patients avec des mutations du gène *ASCCI* et 7 patients avec des mutations du gène *TRIP4*. Tous présentaient une forme néonatale léthale au cours de la première année de vie, caractérisée par une hypokinésie fœtale, une hypotonie néonatale, une faiblesse et une atrophie musculaire, des fractures osseuses congénitales, une arthrogrypose multiple congénitale et une détresse respiratoire néonatale (**Tableau 11**). La majorité des individus présentant cette condition à début anténatal sont nés prématurément. Des manifestations anténatales, telles que l'excès ou le manque de liquide amniotique (polyhydramnios ou oligohydramnios respectivement), ont aussi été fréquemment recensées. Les patients présentaient des caractéristiques dysmorphiques telles que la microrétrognathie, l'hypertélorisme, la cryptorchidie ou l'arachnodactylie. Les atteintes du système nerveux étaient fréquentes et variables. Quatre des patients mutés sur le gène *TRIP4* décrits par Knierim *et coll.*, présentaient, en plus d'une aréflexie et/ou une dysphagie dont l'origine peut être myopathique ou neuropathique, une neuropathie axonale, (Knierim *et al.* 2016b). Un autre patient *TRIP4*-mutant présentait une hypoplasie cérébelleuse ainsi qu'une nécrose et une hémorragie du cortex occipital (Töpf *et al.* 2021). Chez les patients *ASCCI*-mutants, une atrophie cérébrale progressive, une dilatation bilatérale des ventricules et une perte des axones myélinisés sur une biopsie de nerf sural ont été reportées (Knierim *et al.* 2016b; Lu *et al.* 2020; Bradinova *et al.* 2022; Voraberger *et al.* 2023). Des atteintes cardiaques ont été décrites à la fois chez les patients mutés sur le gène *TRIP4* ou *ASCCI*, bien qu'elles semblent plus fréquentes chez les patients avec des mutations *TRIP4*. En effet, trois des patients mutés *TRIP4* décrits par Knierim *et coll.*, présentaient des malformations cardiaques telles que la persistance du canal artériel et/ou la persistance du foramen ovale, deux d'entre eux ont développé une cardiomyopathie et enfin l'un des patients a développé une insuffisance cardiaque (Knierim *et al.* 2016b). En revanche, parmi les patients mutés sur le gène *ASCCI*, seuls 3 patients sur 16 présentaient des malformations cardiaques (Knierim *et al.* 2016b; Rosano *et al.* 2021).

Six patients avec des mutations *ASCCI* et un phénotype néonatal léthal ont été diagnostiqués comme atteints de myopathie congénitale par Böhm *et coll.*, 2018, devant les lésions histologiques typiques sur les biopsies musculaires et l'absence de signes d'atteinte neurogène à l'EMG. Tous les autres patients ont été décrits comme atteints d'amyotrophie spinale avec fractures osseuses congénitales (SMABF2), bien que certains d'entre eux n'ont pas bénéficié d'une étude phénotypique détaillée, notamment n'ont pas eu de biopsie ou d'EMG. En l'absence de ces examens, l'origine neurogène ou myogène peut être très difficile

établir chez des nouveaux nés. Il persiste donc un doute sur le diagnostic précis pour certains de ces cas, mais d'après les descriptions phénotypiques des 28 patients atteints de cette forme létale néonatale de maladie neuromusculaire, il semble établi que, au moins pour une partie d'entre eux, les défauts du complexe ASC-1 étaient associés à une atteinte du système nerveux central, avec ou sans atteinte musculaire primaire associée, compatible avec une pathologie du motoneurone de type SMABF2. **Ces données montrent le caractère multi-système des pathologies associées au complexe ASC-1, pouvant toucher de façon primaire les muscles striés (squelettique et cardiaque), les neurones et/ou les os.**

Tableau 11 : Résumé des caractéristiques cliniques observées chez 28 patients, issus de 17 familles, atteints de la forme néonatale létale de pathologies neuromusculaires associées à des mutations du gène TRIP4 ou ASCC1. IMG : Interruption médicale de grossesse ; FSV : Variation de la taille des fibres ; IN : Noyaux internalisés ; n.r : non reporté ; n.a : non applicable.

Forme néonatale létale (mutations du gène TRIP4)				
Publication	Knierim et coll, 2016			Töpf et coll, 2021
Famille	Famille A	Famille B	Famille C	Famille Consanguine
Individus affectés	1M, 1F	2M (+1 fœtus IMG)	1M	1M
Variant pathogène	c.760C>T (p.Arg254Ter) Homozygote	c.832C>T (p.Arg278Ter) Homozygote	c.760C>T (p.Arg254Ter) + c.832C>T (p.Arg278Ter)	c.760C>T (p.Arg254Ter) Homozygote
Expression protéique	ASC-1 tronquée	ASC-1 tronquée	n.r	n.r
Manifestations prénatales	Hypokinésie fœtale, Oligohydramnios, Naissance prématurée (n=1)	Hypokinésie fœtale, Oligohydramnios (n=1), Naissance prématurée (n=1)	n.r	Hypokinésie fœtale, Oligohydramnios, insuffisance placentaire, retard de croissance
Atteinte musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire ; Atrophie musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire ; Atrophie musculaire	Hypotonie néonatale, Atrophie musculaire	Atrophie musculaire
Arthrogrypose Multiple Congénitale	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteinte respiratoire	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale, Hypoplasie pulmonaire	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale
Atteinte cardiaque	Communication interauriculaire secondaire ; Persistance du canal artériel ; Insuffisance cardiaque (n=1) ; Cardiomyopathie (n=1)	Persistance du canal artériel (n=1), Persistance du Foramen ovale (n=1), Cardiomyopathie (n=1)	n.r	n.r
Atteinte du système nerveux	Dysphagie ; Aréflexie ; Neuropathie axonale	Dysphagie ; Aréflexie ; Neuropathie axonale ; Perte des axones non myélinisés dans la biopsie du nerf sural ; α -motoneurones apoptotiques dans la moelle épinière	n.r	Hypoplasie du cervelet, nécrose et hémorragie du cortex occipital
Fractures osseuses congénitales	Oui	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques dysmorphiques	Microretrognathie, Hypertélorisme, Palais ogival, Bouche étroite	Microretrognathie, Hypertélorisme (n=1), Palais ogival (n=1)	n.r	n.r
Sévérité	Décès peu après la naissance	Décès peu après la naissance	Décès peu après la naissance	Décès à 8 semaines
Biopsies musculaires	FSV, immaturité des fibres musculaires	FSV, immaturité des fibres musculaires	n.r	n.r

Forme néonatale létale (mutations du gène <i>ASCC1</i>)						
Publication	Knierim <i>et coll</i> , 2016	Oliveira <i>et coll</i> , 2017	Böhm <i>et coll</i> , 2019			Giuffrida <i>et coll</i> , 2019
Famille	Famille D (Consanguine)	-	Famille 1 (Consanguine)	Famille 2	Famille 3 (Consanguine)	-
Individus affectés	2F	2M, 1F	2M	1F	1F, 1M (+1 fœtus IMG)	1F
Variant pathogène	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) Homozygote	c.157dupG (p.Glu53Glyfs19Ter) + c.466C>T (p.Arg156Ter)	c.667C>T (p.Glu223Ter) Homozygote	c.1027C>T (p.Arg343Ter) + Délétion hémizygote des exons 6 à 9a
Expression protéique	Absence totale d'ASCC1	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
Manifestations prénatales	Hypokinésie fœtale, Polyhydramnios, Naissance prématurée	Hypokinésie fœtale	Hypokinésie fœtale	n.r	Hypokinésie fœtale	Naissance prématurée, Polyhydramnios
Atteinte musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Atrophie musculaire
Arthrogrypose Multiple Congénitale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteinte respiratoire	Détresse respiratoire néonatale, Hypoplasie pulmonaire	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale
Atteinte cardiaque	Persistance du canal artériel ou du foramen ovale	Non	Non	Non	Non	Non
Atteinte du système nerveux	Gyration corticale, perte d'axones non myélinisés, aréflexie, dysphagie, retard global de développement	n.r	n.r	n.r	Non	n.r
Fractures osseuses congénitales	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques dysmorphiques	Non	Microrétrognathie	Non	Non	Non	n.r
Sévérité	Décès peu après la naissance	Décès in utero ou peu après la naissance	Décédé peu après la naissance	Décès à 13 jours	Décès peu après la naissance	Mort-né
Biopsies musculaires	FSV, Atrophie, Groupement des fibres de type I	Atrophie	FSV, anneaux sous- sarcolemmaux hyperoxydatifs	FSV, anneaux sous- sarcolemmaux hyperoxydatifs	FSV, anneaux sous- sarcolemmaux hyperoxydatifs Prédominance des fibres de type I	n.r

Forme néonatale léthale (mutations du gène <i>ASCC1</i>)							
Publication	Lu et coll, 2020	Rosano et coll, 2020	Bradinova et coll, 2022		Marais et coll, 2022		Voraberger et coll, 2023
Famille	Famille non consanguine	Famille non consanguine	Famille 1 (Consanguine)	Famille 2 (Consanguine)	Famille 4	Famille 5	Famille consanguine
Individus affectés	1M	1F	1M	1F	1F(+1 fœtus avorté)	1F(+1 fœtus avorté)	1F
Variant pathogène	c.932C>G (p.Ser311Ter) + Délétion hémizygote dans l'exon 5	c.297-8T>G + c.466C>T (p.Arg156Ter)	c.626+1G>A Homozygote	c.626+1G>A Homozygote	c.710+1G>A (p.Asp192Ter) Homozygote	c.897G>A (p.Trp299Ter) Homozygote	Délétion homozygote des exons 7 et 8
Expression protéique	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
Manifestations prénatales	Hypokinésie fœtale	Hypokinésie fœtale, Polyhydramnios	Hypokinésie fœtale	Hypokinésie fœtale	Hypokinésie fœtale, Oligo hydramnios	Hypokinésie fœtale	Naissance prématurée
Atteinte musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire	Hypotonie néonatale	Hypotonie néonatale	n.r	Hypotonie néonatale	Hypotonie néonatale, Faiblesse musculaire
Arthrogrypose Multiple Congénitale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	n.r
Atteinte respiratoire	Détresse respiratoire néonatale, Pneumonie	Hypoplasie pulmonaire	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale	n.r	Détresse respiratoire néonatale	Détresse respiratoire néonatale
Atteinte cardiaque	Non	Dilatation et hypertrophie du ventricule droit, septum interventriculaire aplati, diminution de la fonction ventriculaire gauche	Non	Non	Non	n.r	n.r
Atteinte du système nerveux	Légère dilatation bilatérale des ventricules cérébraux	Nerfs intramusculaires avec un nombre réduit d'axones myélinisés	Aréflexie	Aréflexie	n.r	Aréflexie	Atrophie cérébrale progressive
Fractures osseuses congénitales	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Caractéristiques dysmorphiques	Cryptorchidie	Fente palatine, Arachnodactylie	Cryptorchidie	Non	Microrétrognathie	n.r	Arachnodactylie
Sévérité	Décès à 2 jours	Décès à 3 jours	Décès à 12 jours	Décès à 48 jours	Décès peu après la naissance	Décès à 27 jours	Décès à 3 mois
Biopsies musculaires	n.r	Prédominance des fibres de type II, Myofibrilles désorganisées, bandes Z hypertrophiées	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r

Du point de vue moléculaire, à ce jour, 2 mutations du gène *TRIP4* et 11 mutations du gène *ASCC1* sont associées à la forme néonatale létale (**Tableau 12**). La transmission est autosomique récessive dans tous les cas.

Tableau 12 : Résumé des mutations *TRIP4* et *ASCC1* associées à la forme néonatale. Tableau adapté de Meunier et coll., 2021, mis à jour à partir de la ligne rouge.

Publications	Gène	Exon	Changement cDNA	Changement protéique	Type de variant	Effet prédit	Atteintes primaires reportées
Knierim et coll., 2016	<i>TRIP4</i>	6	c.760C>T (homo u comp het)	p.Arg254Ter	Délétion	Non-sens	Motoneurone + os
	<i>TRIP4</i>	7	c.832C>T (homo ou comp het)	p.Arg278Ter	Délétion	Non-sens	Motoneurone + os
	<i>ASCC1</i>	3a	c.157dupG (homozygote)	p.Glu53GlyfsTer19	Duplication d'une paire de base	Décalage du cadre	Motoneurone/SNC + os
Oliveira et coll., 2017	<i>ASCC1</i>	3a	c.157dupG (homozygote)	p.Glu53GlyfsTer19	Duplication d'une paire de base	Décalage du cadre	n.c. Muscle? + os
Böhm et coll., 2019	<i>ASCC1</i>	3a	c.157dupG (hom ou comp het)	p.Glu53GlyfsTer19	Duplication d'une paire de base	Décalage du cadre	Muscle + os
	<i>ASCC1</i>	5	c.466C>T (comp het)	p.Arg156Ter	Substitution	Non-sens	Muscle + os
	<i>ASCC1</i>	6	c.667C>T (homozygote)	p.Glu223Ter	Substitution	Non-sens	Muscle + os
Giuffrida et coll., 2019	<i>ASCC1</i>	9a	c.1027C>T (comp het)	p.Arg343Ter	Substitution	Non-sens	Os + ?
	<i>ASCC1</i>	6-9a	Délétion hémizygote des exons 6 à 9a		Microdélétion	Délétion dans le cadre	Os + ?
Lu et coll., 2020	<i>ASCC1</i>	5	Délétion hémizygote dans l'exon 5		Microdélétion	Décalage du cadre	SNC + Os
	<i>ASCC1</i>	9	c.932C>G (comp het)	p.Ser311Ter	Substitution	Non-sens	SNC + Os
Rosano et coll., 2020	<i>ASCC1</i>	5	c.297-8T>G (comp het)		Substitution	Variant d'épissage / Décalage du cadre	Motoneurone + os
	<i>ASCC1</i>	5	c.466C>T (comp het)	p.Arg156Ter	Substitution	Non-sens	Motoneurone + os
Bradinova et coll., 2022	<i>ASCC1</i>	7	c.710+1G>A (homozygote)	p.Asp192Ter	Substitution	Non-sens	Motoneurone + os
Marais et coll., 2022	<i>ASCC1</i>	7	c.710+1G>A (homozygote)	p.Asp192Ter	Substitution	Non-sens	Muscle + os
	<i>ASCC1</i>		c.897G>A (homozygote)	p.Trp299Ter	Substitution	Non-sens	Muscle + os
Voraberger et coll., 2023	<i>ASCC1</i>	7-8	Délétion homozygote des exons 7 et 8		Microdélétion	Non-sens	Motoneurone + os

Deux mutations non-sens du gène *TRIP4* (p.Arg254Ter, p.Arg278Ter), identifiées chez quatre familles, sont associées à la forme néonatale léthale. Ces mutations, localisées au niveau des exons 6 et 7 du gène, sont compatibles avec la synthèse de protéines tronquées préservant au moins un des deux domaines fonctionnels (**Figure 34**) (Knierim et al. 2016b). Knierim *et coll* ont réalisé des études expérimentales sur les échantillons de deux patients qui ont révélé la perte de la forme de pleine longueur de la protéine mais également, par le biais d'événements d'épissage alternatifs (saut d'exons), la régulation à la hausse d'un isoforme plus court contenant la plupart des domaines fonctionnels d'ASC-1. Malgré cela, les patients homozygotes ou hétérozygotes composés porteurs de ces mutations avaient un phénotype neuromusculaire néonatal très sévère (forme néonatale léthale), avec des fractures osseuses congénitales, entraînant la mort dans les premières semaines de vie. Bien qu'il ne puisse pas être exclu qu'une composante de l'atteinte musculaire primaire ait contribué au phénotype sévère chez ces patients mutants *TRIP4*, ces données génétiques suggèrent que l'absence d'ASC-1 (haploinsuffisance) pourrait être associée à un phénotype musculaire strié primaire (myopathie congénitale liée à ASC-1), tandis que l'expression d'une protéine ASC-1 plus courte pourrait conduire à une cascade physiopathologique partiellement différente, y compris l'implication préférentielle des motoneurons, et conduisant à une pathologie de type SMABF2. Une analyse détaillée et un phénotypage approfondi des patients avec différentes mutations du gène *TRIP4* sont nécessaires afin de clarifier ce point.

Parmi les 11 mutations du gène *ASCCI* associées à ce phénotype néonatal léthal, on retrouve des variants non-sens, de décalage du cadre de lecture et d'épissage. La duplication d'un seul nucléotide dans l'exon 3 (c.157dupG, p.Glu53GlyfsTer19) est la mutation la plus fréquemment rapportée (Knierim et al. 2016b; Oliveira et al. 2017; Böhm et al. 2019). Il est prédit que ce variant génère un codon de terminaison prématuré, compatible avec l'élimination du transcrit mutant. L'absence de la protéine ASCC1 a par ailleurs été expérimentalement confirmée chez l'un des patients homozygotes pour la mutation c.157dupG (Knierim et al. 2016b). La plupart des autres mutations reportées sont localisés au niveau des domaines fonctionnels prédits de la protéine ASCC1 (**Figure 34**). En effet, on retrouve la délétion hémizygotique de l'exon 5 qui perturbe le domaine KH (Lu et al. 2020) ainsi que 8 mutations (délétion homozygote des exons 7 et 8, délétion hémizygotique des exons 6 à 9a, p.Asp192Ter, p.Glu223Ter, p.Trp299Ter, p.Ser311Ter, p.Arg343Ter), homozygotes ou hémizygotiques, qui perturbent le domaine RNA ligase-like (Giuffrida et al. 2020; Lu et al. 2020; Bradinova et al.

2022; Marais et al. 2022; Voraberger et al. 2023). D'après les analyses *in silico*, ces mutations conduiraient à une absence totale de la protéine ASCC1.

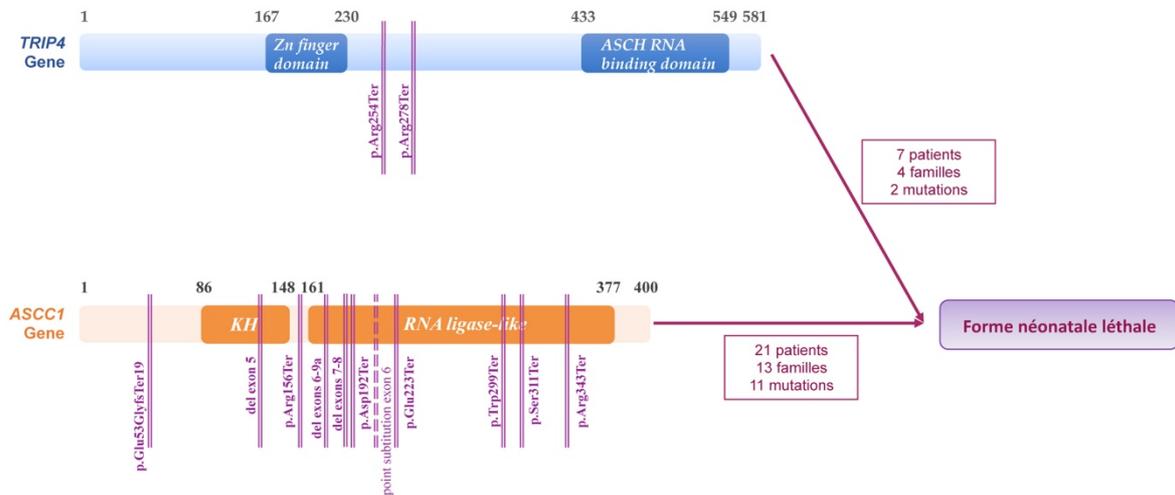


Figure 34 : Localisation des mutations du gène *TRIP4* et du gène *ASCC1* associées à la forme néonatale létale.

A l'inverse des myopathies congénitales liées au complexe ASC-1, il semblerait que l'absence totale de la protéine ASCC1 ou l'expression d'une protéine ASC-1 tronquée soit responsable du phénotype létal néonatale avec fractures osseuses congénitales, diagnostiqué d'amyotrophie spinale SMABF2.

II. ASC-1 contrôle le démarrage de la différenciation myogénique en régulant l'expression, la localisation et l'activité de facteurs clés de la myogenèse précoce

A. La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte la myogenèse précoce et entraîne un retard d'expression au niveau transcriptionnel de régulateurs clés de la myogenèse

Une précédente étude menée par notre laboratoire avait révélé que l'absence d'ASC-1 induite par knockdown dans les C2C12 affecte la myogenèse tardivement, avec une diminution du diamètre des myotubes et une expression de la MyHC significativement diminuée aux jours 3 et 4 de différenciation (Davignon et al. 2016a). Pour ces expériences, l'expression protéique résiduelle d'ASC-1 était de 80% lors de l'induction de la différenciation (Jour 0), atteignant une extinction maximum au Jour 2 (35% d'expression résiduelle d'ASC-1) (Thèse de Lauriane Davignon, 2015).

Afin d'approfondir l'étude du rôle d'ASC-1 dans la myogenèse précoce, j'ai dans un premier temps repris le modèle C2C12 *Trip4*-knockdown (*Trip4*-KD) en changeant le protocole de transfection. Pour diminuer le taux d'expression d'ASC-1 plus précocement, j'ai optimisé le protocole d'extinction transitoire dans les C2C12 en transfectant le siARN dans des cultures moins confluentes et en maintenant la présence de celui-ci pendant la prolifération des cellules jusqu'au déclenchement de la différenciation par privation en sérum. Ce protocole a permis d'obtenir une réduction de l'expression d'ASC-1 de 90% au Jour 0 et de maintenir l'extinction en dessous de 80% jusqu'au Jour 3 (**Figure 35**).

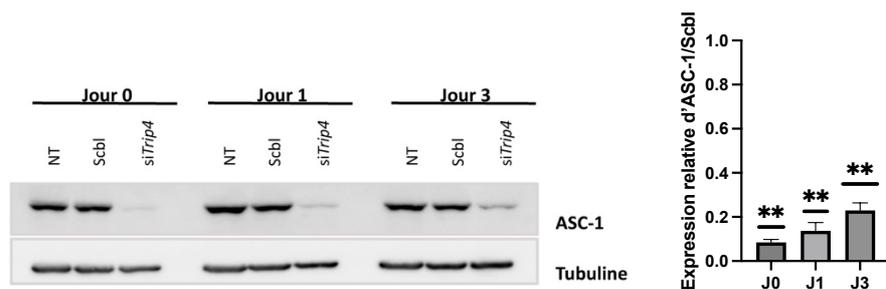


Figure 35 : Efficacité du knock-down de Trip4 dans les C2C12 au cours de la différenciation myogénique. Quantification par Western-Blot de l'expression protéique d'ASC-1 à J0, J1 et J3 dans les C2C12 non transfectées (NT), ou transfectées avec un siARN contrôle (Scramble, Scbl) ou un siTrip4 72h avant l'induction de la différenciation (Jour 0 : privation en sérum) (n=4). L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au Scbl. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$.

L'observation microscopique de la différenciation myogénique dans les différentes conditions expérimentales nous a permis de constater que, comme précédemment décrit par mon équipe d'accueil (Davignon et al. 2016a), l'extinction transitoire d'ASC-1 dans les myoblastes murins affecte la morphologie des myotubes au Jour 3 (**Figure 36**). Mais nous avons observé par une analyse qualitative que la déplétion transitoire d'ASC-1 dès le début de la différenciation affecte aussi plus précocement la myogenèse, avec un défaut d'alignement et d'allongement des myoblastes observable au Jour 0 et un retard de fusion observable au Jour 1 des C2C12 *Trip4*-KD par rapport aux contrôles (*Scramble*, *Scbl*) (**Figure 36**).

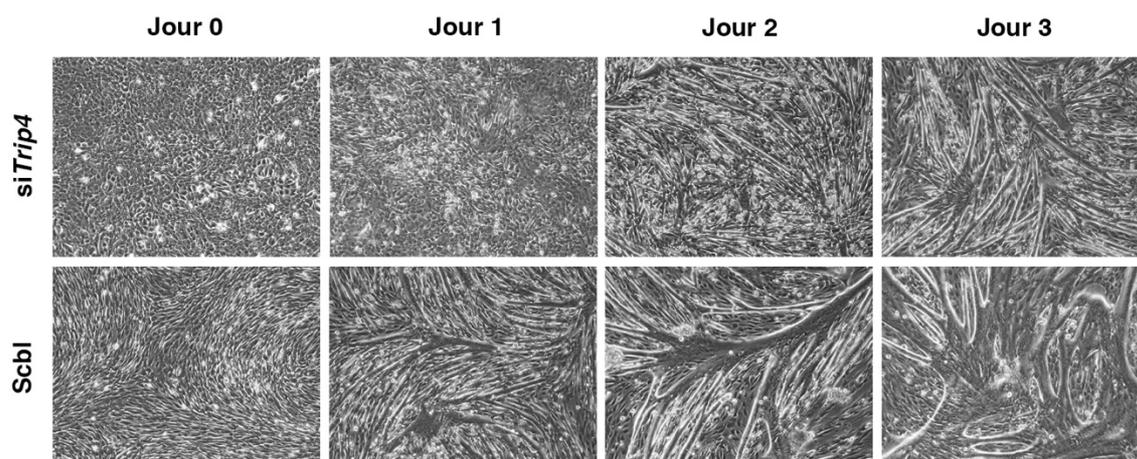


Figure 36 : Les C2C12 *Trip4*-KD présentent un retard de différenciation et un défaut de croissance des myotubes. Les photos ont été réalisées avec un microscope à lumière transmise (x10) 0, 1, 2 et 3 jours après induction de la différenciation dans les C2C12 transfectées avec un siARN contrôle (*Scramble*, *Scbl*) ou un siTrip4. Images représentatives d'au moins 4 expériences indépendantes.

Afin d'étudier quantitativement le démarrage de la différenciation myogénique dans ce modèle, j'ai mesuré par Western-Blot l'expression protéique de marqueurs précoces de la myogenèse, les MRFs MyoD et Myogénine. Cela a permis de mettre en évidence un retard significatif d'expression protéique de MyoD et de Myogénine au début de la différenciation dans les C2C12 *Trip4*-KD (**Figure 37**). Ce défaut d'expression, présent à J0 ou J1 puis comblé à J1 ou J3 pour MyoD et Myogénine respectivement, suggère un rôle clé d'ASC-1 dans le démarrage de la myogenèse. Les MRFs étant impliqués, entre autres, dans la régulation de l'expression des protéines contractiles, leur retard d'expression pourrait expliquer la baisse d'expression significative observée de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) au cours de la différenciation myogénique (**Figure 37**).

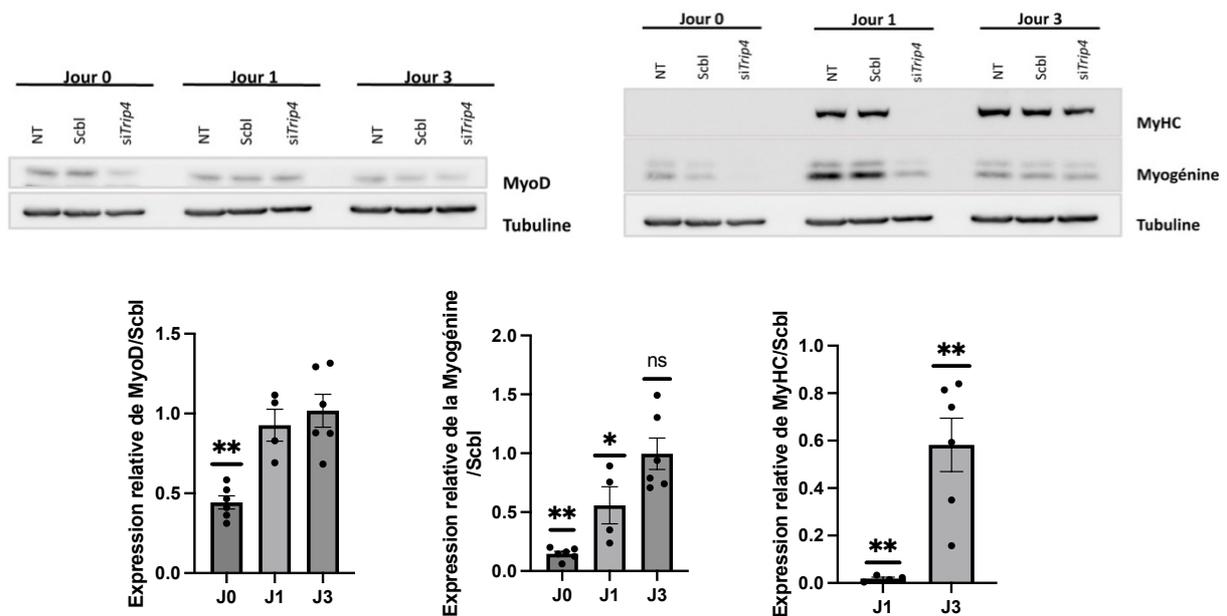


Figure 37 : La déplétion transitoire d'ASC-1 entraîne un retard d'expression protéique des MRFs et de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) dans les C2C12 au cours de la différenciation myogénique. Quantification par Western-Blot de l'expression protéique de MyoD, Myogénine et MyHC dans les C2C12 non transfectées (NT), ou transfectées avec un siARN Scbl ou siTrip4 au cours de la différenciation (n=6). L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au Scbl. J0 correspond à l'induction de la différenciation par privation en sérum et J1 et J3 correspondent aux jours post-privation en sérum. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; ns = non significatif.

Afin de déterminer à quel niveau de régulation l'absence d'ASC-1 affecte l'expression des MRFs, les ARNs des C2C12 dans les différentes conditions expérimentales ont été extraits au deuxième jour de différenciation. L'analyse des transcrits par qRT-PCR a montré une diminution significative des niveaux d'ARNm de *Myog* et des chaînes lourdes de myosine *Myh4* et *Myh7*, ainsi qu'une tendance non significative à la diminution du transcrit de *MyoD*, dans les C2C12 *Trip4*-KD (**Figure 38**), suggérant qu'ASC-1 affecte transcriptionnellement, de façon directe ou indirecte, l'expression de Myogénine et de la MyHC au début de la myogenèse. L'expression de *MyoD* est régulée plus précocement que celle de Myogénine et des chaînes lourdes de myosine lors du démarrage de la différenciation myogénique. Il est donc possible que les niveaux d'ARNs de *MyoD* aient été plus significativement affectés par l'absence d'ASC-1 à J0 ou J1, même si la diminution du transcrit de *MyoD* en absence d'ASC-1 n'était pas significative à J2.

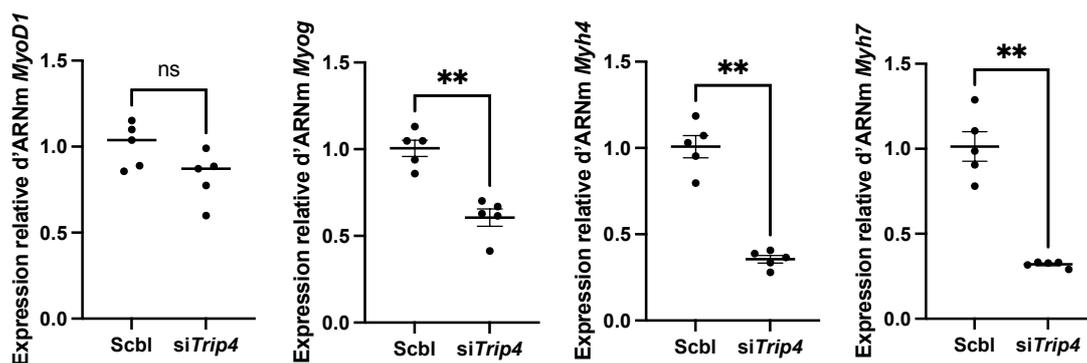


Figure 38 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte significativement l'expression de *Myog*, *Myh4* et *Myh7* au niveau transcriptionnel à J2. Quantification par qRT-PCR de l'expression relative des transcrits de *MyoD1*, *Myog*, *Myh7* ($n=5$) et *Myh4* ($n=6$) deux jours après induction de la différenciation dans les C2C12 *Scbl* et *siTrip4*. L'expression a été normalisée par rapport à *Rpl19* puis rapportée au *Scbl*. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; ns = non significatif.

L'activation des caspases dans les cellules myogéniques a lieu après la sortie du cycle cellulaire au début de la myogenèse (H. Dehkordi et al. 2020). Bien que leur rôle dans le processus de différenciation myogénique n'ait pas encore été totalement élucidé, des études ont montré que la formation d'apoptosomes est nécessaire à la formation des myotubes et que les caspases 3 et 9 présentent un pic d'activation dans les C2C12 au jours 1 et 2 après privation en sérum (Murray et al. 2008; H. Dehkordi et al. 2020). Afin de confirmer le rôle précoce d'ASC-

1 dans la différenciation myogénique, en étudiant une autre voie que celle de la régulation transcriptionnelle des MRFs, j'ai quantifié l'activation des caspases 3 et 9 aux jours 0, 1 et 3 dans les différentes conditions. Bien que légèrement diminuée au Jour 0 dans les C2C12 déplétées en ASC-1, l'activation de la caspase 9 n'est pas significativement affectée. En revanche, les C2C12 *Trip4*-KD présentent un retard significatif d'activation de la caspase 3 au Jour 0, compensé au Jour 1, ainsi qu'une suractivation de la caspase 3 au Jour 3 (**Figure 39**). Le retard d'activation des caspases lors de la différenciation des myoblastes déplétés transitoirement en ASC-1 permet de conclure qu'ASC-1 exerce un rôle précoce au cours de la myogenèse qui n'est pas restreint à la régulation transcriptionnelle des facteurs de régulation myogéniques.

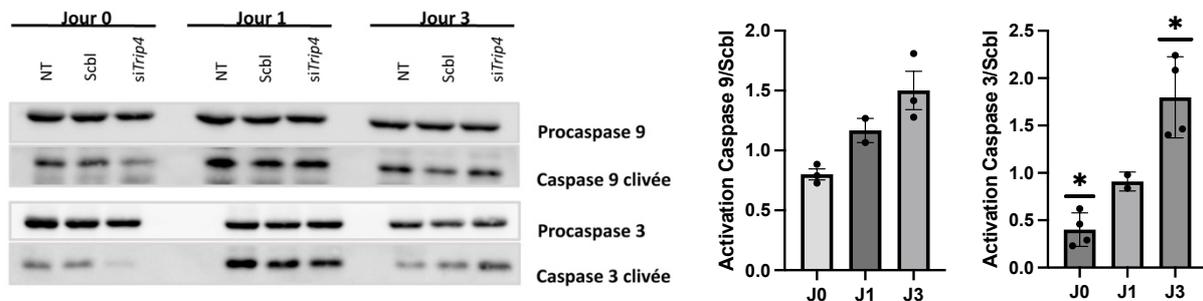


Figure 39 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 retarde le clivage de la caspase 3 au cours de la différenciation myogénique. Quantification par Western-Blot de l'activation des caspases 9 (n=3) et 3 (n=4) dans les C2C12 non transfectées (NT), ou transfectées avec un siARN *Scbl* ou *siTrip4* au cours de la différenciation. L'expression des procaspases et des caspases clivées ont été normalisées par rapport à la tubuline. L'activation des caspases a été quantifiée en calculant le rapport de la caspase clivée sur la procaspase, puis rapportée au *Scbl*. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : * = $p < 0,05$.

Ces expériences de différenciation sur le modèle C2C12 *Trip4*-KD ont permis de montrer pour la première fois que **la déplétion transitoire d'ASC-1 affecte la myogenèse précoce et entraîne un retard d'expression au niveau transcriptionnel de régulateurs clés de la différenciation myogénique.**

B. L'absence d'ASC-1 affecte le transcriptome pendant la différenciation myogénique, modulant particulièrement les gènes cibles de SRF et MyoD

Afin d'examiner les conséquences du knockdown de *Trip4* sur la myogenèse précoce des C2C12 au niveau transcriptomique, j'ai réalisé des analyses RNAseq de myoblastes au cours de la différenciation (2 jours après induction de la différenciation), préalablement transfectés avec un siARN ciblant *Trip4* ou un ARN contrôle *Scbl* (**Figure 40A**). La différenciation a été induite sur 3 transfections indépendantes et l'extinction de *Trip4* au niveau ARN a été vérifié par qRT-PCR (**Figure 40B**).

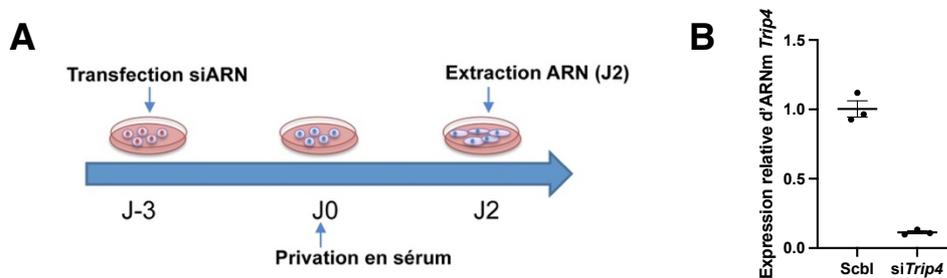


Figure 40 : Extraction d'ARN des C2C12 Trip4-KD à J2 pour analyse par RNAseq. (A) Les C2C12 ont été transfectées ($n=3$) avec un siARN *Scbl* ou un si*Trip4* 72h avant l'induction de la différenciation (J0) et les ARN ont été extraits au deuxième jour de différenciation (J2) **(B)** Validation par qRT-PCR du knockdown de *Trip4* au niveau ARN à J2. L'expression a été normalisée par rapport à *Rpl19* puis rapportée au *Scbl*. L'expression résiduelle du transcrite de *Trip4* était de 11% à J2. Moyenne +/- SEM.

Les données de RNAseq sont qualitativement interprétables comme l'atteste l'analyse en composantes principales (PCA) (**Figure 41A**). Deux jours après induction de la différenciation, un total de 781 gènes est différentiellement exprimé dans les C2C12 *Trip4*-KD par rapport au *Scbl*, sur la base de $p < 0,05$ et $|\log_2FC| > 1$ (**Figure 41B**). En accord avec le défaut de différenciation myogénique identifié en absence d'ASC-1, l'analyse de l'ontologie des gènes (GO), réalisée à l'aide des logiciels *ToppGene* et *EnrichR*, a révélé que les 194 gènes significativement sous-exprimés dans les C2C12 *Trip4*-KD présentent un enrichissement significatif pour les processus du système musculaire et plus particulièrement de la contraction (**Figure 41C**). Effectivement, un grand nombre de gènes codant des protéines sarcomériques telles que la nébuline, la titine et les chaînes lourdes de myosine (*Myh4*, *Myh6* et *Myh7*) sont sous-exprimés en accord avec le retard de différenciation observé. En parallèle, l'analyse de

l'ontologie des 524 gènes significativement sur-régulés en absence d'ASC-1 a révélé un enrichissement significatif pour les processus d'adhérence cellulaire, de signalisation intercellulaire et de régulation de la prolifération (**Figure 41C**).

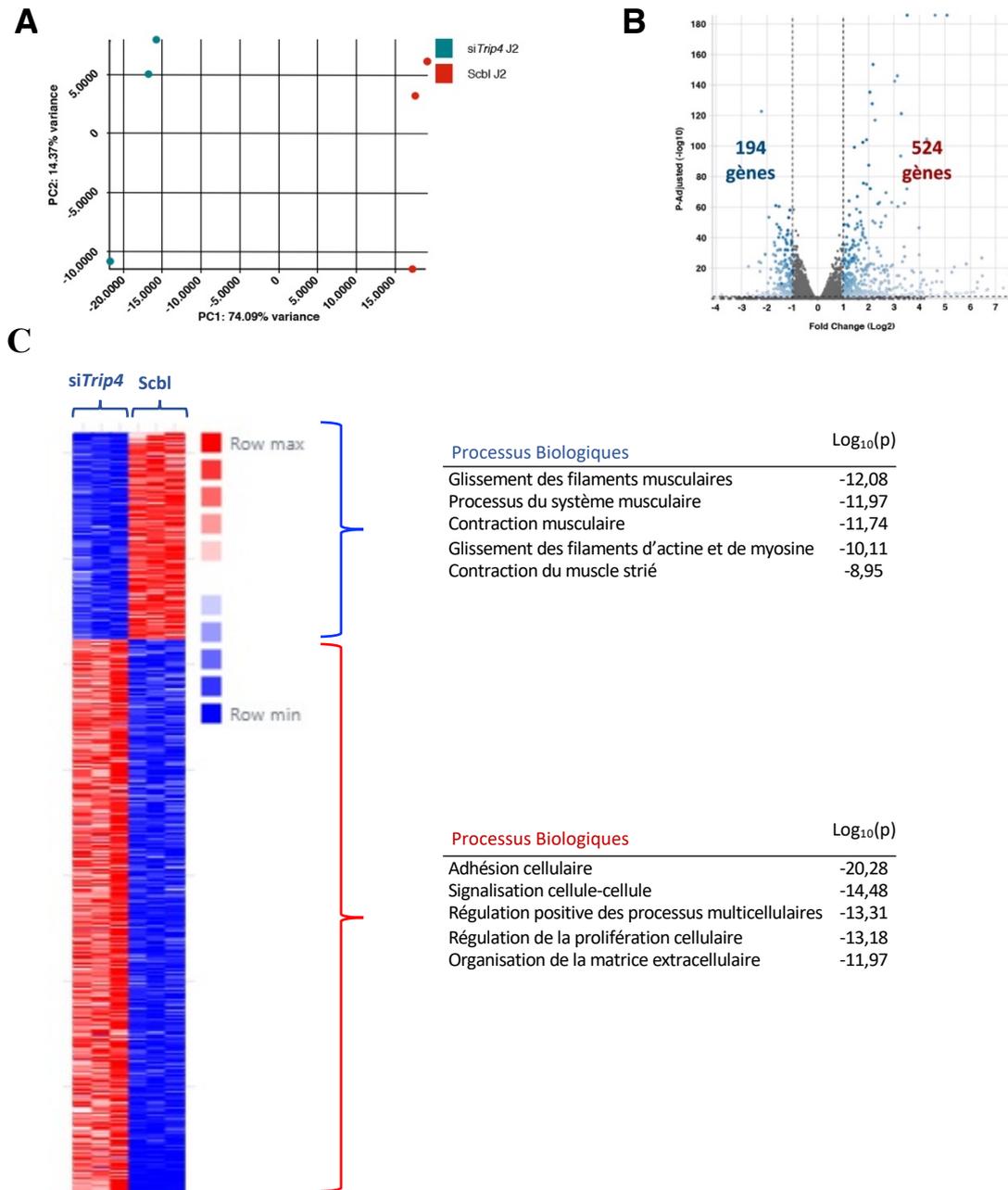


Figure 41 : Analyse transcriptomique par RNAseq du modèle C2C12 Trip4-KD au deuxième jour de différenciation (J2). (A-B) Analyse en composantes principales (PCA) (A) et Volcano-Plot (B) des données RNAseq dans les C2C12 Scbl et siTrip4 au deuxième jour de différenciation (C) Heatmap des gènes significativement différenciellement exprimés avec l'ontologie des gènes sous-exprimés (haut) et surexprimés (bas) dans les C2C12 siTrip4 par rapport au Scbl à J2.

L'analyse *ToppGene* des gènes significativement sous-régulés en absence d'ASC-1 a aussi révélé un enrichissement significatif de gènes comportant des boîtes SRE, donc potentiellement régulés transcriptionnellement par le facteur de transcription SRF. Pour rappel, SRF joue un rôle majeur dans l'expression de certaines protéines musculaires au cours de la myogenèse. Une étude avait déjà montré que le complexe ASC-1 est capable de transactiver SRF *in vitro* dans des cellules HeLa (Jung et al. 2002) et notre laboratoire avait également démontré que la surexpression exogène d'ASC-1 dans les cellules myogéniques en prolifération induit une transactivation modeste mais robuste de SRF (Davignon et al. 2016a). J'ai donc décidé d'analyser plus spécifiquement l'effet de l'absence d'ASC-1 sur l'expression des gènes cibles de ce facteur de transcription dans les C2C12 en différenciation.

En comparant une liste des gènes cibles de SRF plus spécifiques du muscle, identifiés chez l'homme et la souris (Chai et Tarnawski 2002; Miano, Long, et Fujiwara 2007; Sun et al. 2006), avec la liste des gènes significativement sous-exprimés dans les C2C12 *Trip4*-KD à J2, il est apparu que ces deux listes présentent 21 gènes en commun (**Figure 42A**), codant principalement des protéines du cytosquelette et de la contraction (**Figure 42B**) tels que les myosines à chaîne lourde (*Myh4* et *Myh7*, dont la diminution du taux d'ARNm a déjà été observée par qRT-PCR ; **Figure 38**), la myoglobine (*Mb*) et la créatine kinase musculaire (*Ckm*). La réduction du taux d'ARNm de certains de ces 21 gènes a été confirmée par qRT-PCR afin de consolider ce résultat (**Figure 42C**). Ces résultats suggèrent que l'absence d'ASC-1 perturbe l'expression des protéines sarcomériques au cours de la différenciation myogénique, possiblement via une modulation de l'activité de SRF.

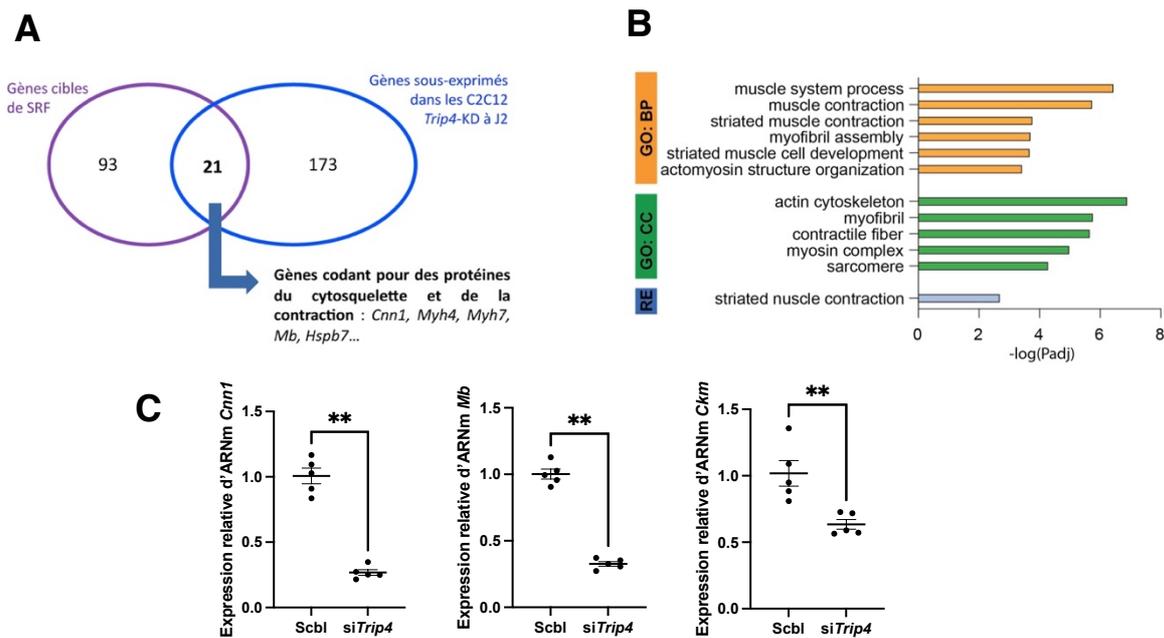


Figure 42 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression des gènes cibles de SRF au niveau transcriptomique à J2. (A) Diagramme de Venn des gènes cibles de SRF (Chai et Tarnawski 2002; Miano, Long, et Fujiwara 2007; Sun et al. 2006) et des gènes significativement sous-régulés dans les C2C12 Trip4-KD par rapport au Scbl au deuxième jour de différenciation (J2) (B) Ontologie des 21 gènes cibles de SRF sous-exprimés dans les C2C12 Trip4-KD via EnrichR; BP : Processus biologiques ; CC : Composants cellulaires ; RE : Reactome (C) Validation par qRT-PCR (n=5) de la baisse d'expression significative des gènes cibles de SRF *Cnn1*, *Mb* et *Ckm* deux jours après induction de la différenciation dans les C2C12 siTrip4. L'expression a été normalisée par rapport à *Rpl19* puis rapportée au Scbl. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = p < 0,005.

J'ai précédemment montré que l'expression de MyoD au cours de la différenciation est retardée dans les C2C12 Trip4-KD (**Figure 37**). J'ai donc étudié plus spécifiquement l'effet de l'absence d'ASC-1 sur l'expression des gènes cibles de MyoD dans les C2C12 en différenciation. Pour cela, j'ai superposé la liste des gènes significativement différentiellement exprimés sur les analyses RNAseq, dans les C2C12 siTrip4 par rapport aux cellules Scbl à J2, à la liste des potentielles cibles de MyoD issus de la banque ChIP Atlas (+1k ; myoblastes et myotubes ; souris). J'ai mis en évidence que l'expression de 354 potentiels gènes cibles de ce facteur de transcription est affectée positivement ou négativement (260 surexprimés, 97 sous-exprimés) par la déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 à J2 (**Figure 43**). Le retard d'expression de MyoD pourrait être à l'origine de cette différence, ou bien ASC-1 pourrait être un co-régulateur de MyoD dans les cellules musculaires. J'ai donc décidé d'approfondir l'étude du rôle d'ASC-1 sur les facteurs de transcription SRF et MyoD dans la suite de cette étude.

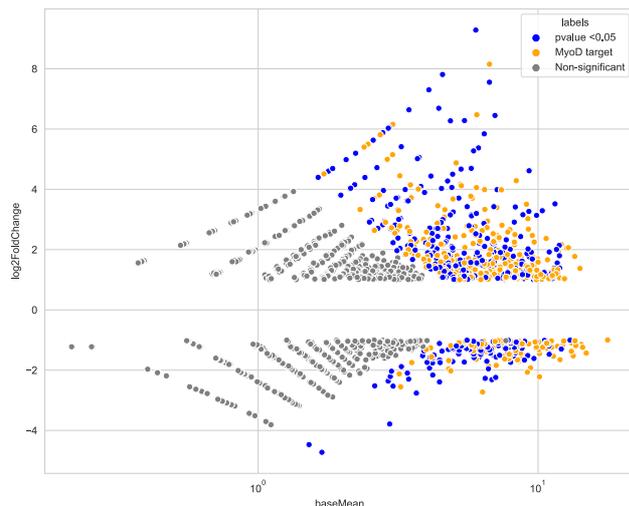


Figure 43 : La déplétion transitoire d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression de nombreux gènes cibles de MyoD au niveau transcriptomique à J2. MA plot représentant la superposition des potentiels gènes cibles de MyoD, issus de la banque ChIP atlas, et des gènes significativement dérégulés dans les analyses RNAseq des C2C12 Trip4-KD par rapport au Scbl à J2. Les points jaunes représentent les potentiels gènes cibles de MyoD significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq ; Les points bleus représentent les gènes significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq qui ne sont pas des cibles de MyoD.

Nous disposons d'un échantillon de muscle de patient muté *TRIP4* et n'exprimant pas la protéine ASC-1 (patient FIII.1, (Davignon et al. 2016a)) que nous avons analysé par RNAseq afin de comparer l'effet de l'absence d'ASC-1 au niveau transcriptomique dans les C2C12 *Trip4*-KD en différenciation et dans un muscle humain *TRIP4*-KO. Nous avons observé, en analysant ponctuellement l'expression de certains gènes, que ceux codant pour les protéines impliquées dans la régulation des processus du système musculaire, et plus particulièrement les protéines sarcomériques, sont sous-régulés dans le muscle de patient par rapport au muscle contrôle (**Annexe 3**). Ce résultat s'accorde avec les anomalies sarcomériques observées dans les biopsies de patients et peut contribuer à les expliquer. Nous avons aussi observé la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les processus d'activation cellulaire, et plus particulièrement des leucocytes, dans le muscle de patient par rapport au muscle contrôle (**Annexe 3**), suggérant que l'absence d'ASC-1 pourrait entraîner une activation des processus inflammatoires dans le muscle.

Certains gènes montrent une tendance similaire à la surexpression ou à la sous-expression dans le muscle de patient et dans les C2C12 *Trip4*-KD à J2, par rapport à leurs contrôles respectifs, dont certaines cibles des facteurs de transcription SRF et MyoD (**Annexe 3**). Cependant, nous avons aussi remarqué que l'expression de certains gènes cruciaux dans la régulation de la myogenèse, dont l'expression des facteurs de régulation myogénique, présente des tendances d'expressions différentes ou opposées dans les deux types de matériel biologique (**Figure 44**).

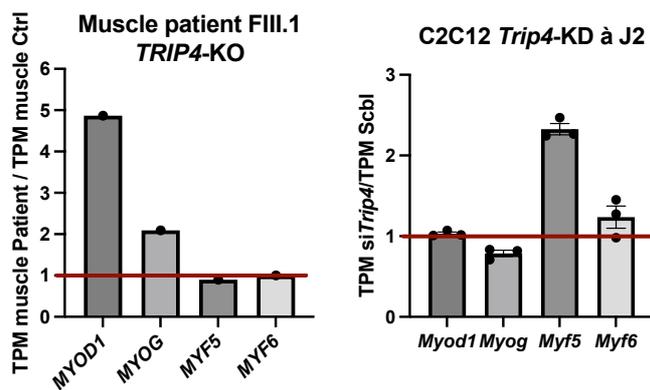


Figure 44 : L'expression des MRFs est affectée différemment dans le muscle de patient TRIP4-KO et dans les C2C12 Trip4-KD à J2. Ces histogrammes montrent les transcrits ARN (Transcripts per million, TPM) des MRFs dans le muscle de patient par rapport au muscle contrôle (gauche) (n=1) ; ou dans les C2C12 Trip4-KD par rapport aux cellules Scbl à J2 (droite) (n=3). Moyenne +/- SEM.

Il y a cependant deux limites à cette comparaison entre le modèle C2C12 *Trip4*-KD en différenciation et dans un muscle humain *TRIP4*-KO, la première étant que nous n'avons pu analyser qu'un seul échantillon de muscle de patient, et la seconde concerne le stade adulte de l'échantillon musculaire par rapport au modèle cellulaire de différenciation à J2 qui permet d'analyser un stade plus précoce de différenciation. Afin de se rapprocher au plus près de la pathologie humaine, nous avons décidé de faire produire une lignée cellulaire C2C12 *Trip4*-KO, via la technologie CRISPR/Cas9, permettant d'étudier les différentes phases de la myogenèse dans des cellules constitutivement et chroniquement déplétées en ASC-1, et donc plus comparables aux muscles de patients.

Ces expériences RNAseq sur les C2C12 *Trip4*-KD à J2 et un échantillon de muscle de patient *TRIP4*-KO ont permis de mettre pour la première fois en évidence que **l'absence d'ASC-1 affecte le transcriptome pendant la myogenèse, et plus particulièrement les gènes cibles des facteurs de transcription SRF et MyoD. Cette modification du transcriptome affecte négativement les processus du système musculaire et de la contraction, et positivement les processus d'adhésion cellulaire, de signalisation intercellulaire et de régulation de la prolifération.**

C. ASC-1 régule l'expression, la localisation et l'activité des acteurs clés de la myogenèse précoce

Pour poursuivre l'étude du rôle d'ASC-1 dans la myogenèse et comprendre les mécanismes physiopathologiques inhérents à son absence, j'ai fait produire une lignée de C2C12 *Trip4*-knockout (KO), comme précisé dans le matériel et méthodes, afin de l'utiliser comme nouveau modèle d'étude. Cette lignée offre une absence complète d'ASC-1 de façon stable (**Figure 45**) et permet donc de se rapprocher du modèle pathologique des maladies musculaires associées à ASC-1.

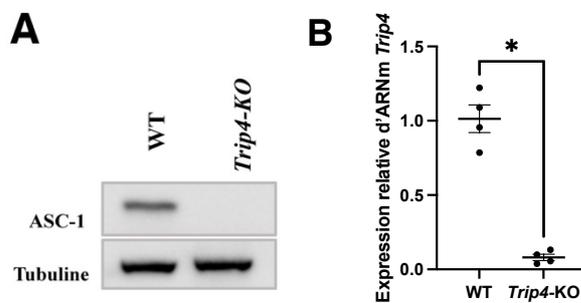


Figure 45 : Validation du knock-out d'ASC-1 dans les C2C12 *Trip4*-KO en prolifération. (A) Western-Blot d'ASC-1 représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes (B) Quantification par qRT-PCR de l'expression du transcrite *Trip4* (n=4). L'expression a été normalisée par rapport à *Rpl19* puis rapportée au WT. Moyenne +/- SEM. Mann Whitney : * = $p < 0,05$.

1. Caractérisation de la différenciation myogénique dans le nouveau modèle C2C12 *Trip4*-KO

J'ai induit la différenciation par privation en sérum dans cette nouvelle lignée de C2C12 *Trip4*-KO en respectant la même chronologie que pour les cellules transfectées avec le siARN, soit un ensemencement 96h avant le Jour 0 (privation en sérum). Alors que les cellules de type sauvage (wild-type, WT) commencent à s'allonger et s'aligner au Jour 0, comme observé précédemment pour le *Scbl*, les C2C12 *Trip4*-KO présentent une morphologie particulièrement ronde avec une absence totale d'allongement ou d'alignement (**Figure 46**). Au final, au Jour 3, les C2C12 WT forment de nombreux myotubes mais seuls quelques myotubes sont observables dans la lignée knockout. L'observation microscopique de la différenciation myogénique indique un retard/défaut de différenciation plus marqué dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux *Trip4*-KD.

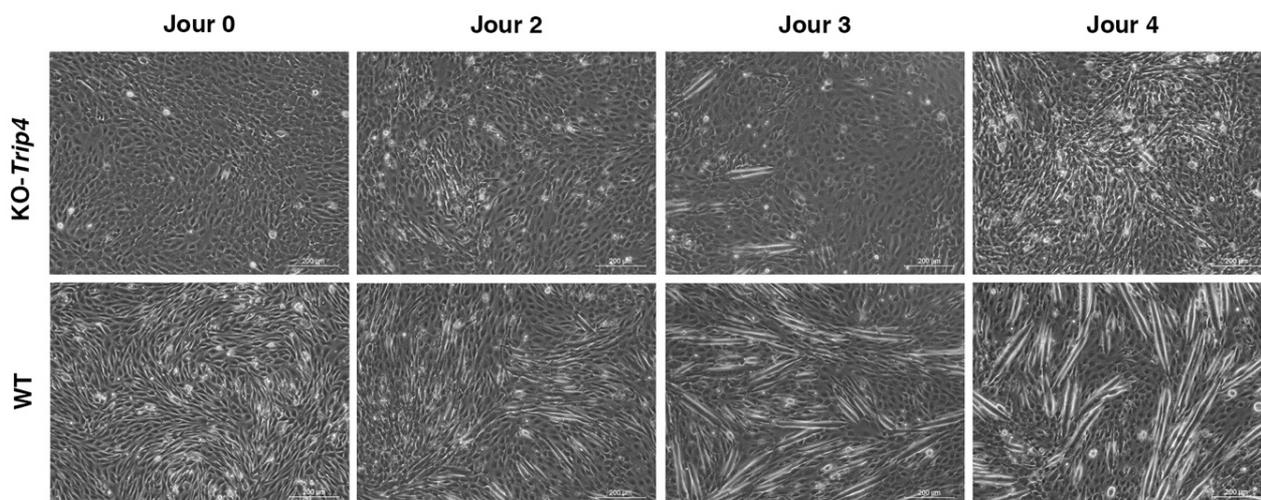


Figure 46 : Le knock-out de *Trip4* dans les *C2C12* entraîne un retard et un défaut de différenciation. Les photos ont été réalisées avec un microscope à lumière transmise (x10) 0, 2, 3 et 4 jours après induction de la différenciation dans les *C2C12* WT et *Trip4*-KO. Images représentatives d'au moins 5 expériences indépendantes.

Des expériences de Western-blot (**Figure 47A**), à J0, J2 et J4, et de qRT-PCR (**Figure 47B**) à J3, ont été réalisées afin de quantifier le démarrage de la différenciation par l'expression des marqueurs Myogénine et MyHC. Une absence totale d'expression de la MyHC est observée au niveau protéique tout au long de la différenciation, et au niveau ARN à J3, en contraste avec une forte surexpression de Myogénine à partir du Jour 2 dans les *C2C12 Trip4*-KO. Myogénine activant l'expression de la MyHC au cours de la myogenèse, il est surprenant d'observer que la surexpression de Myogénine est associée à une absence complète d'expression de la MyHC. Fait intéressant, la surexpression de Myogénine au niveau ARN est aussi observable dans les résultats RNAseq du muscle du patient *TRIP4*-KO (TPM muscle patient = 66,77 / TPM muscle contrôle = 31,94) mais pas dans les résultats RNAseq, ni dans les résultats de qRT-PCR, du modèle *C2C12 Trip4*-KD à J2, suggérant que l'absence totale d'ASC-1 de façon stable affecte directement ou indirectement la transcription de ce gène.

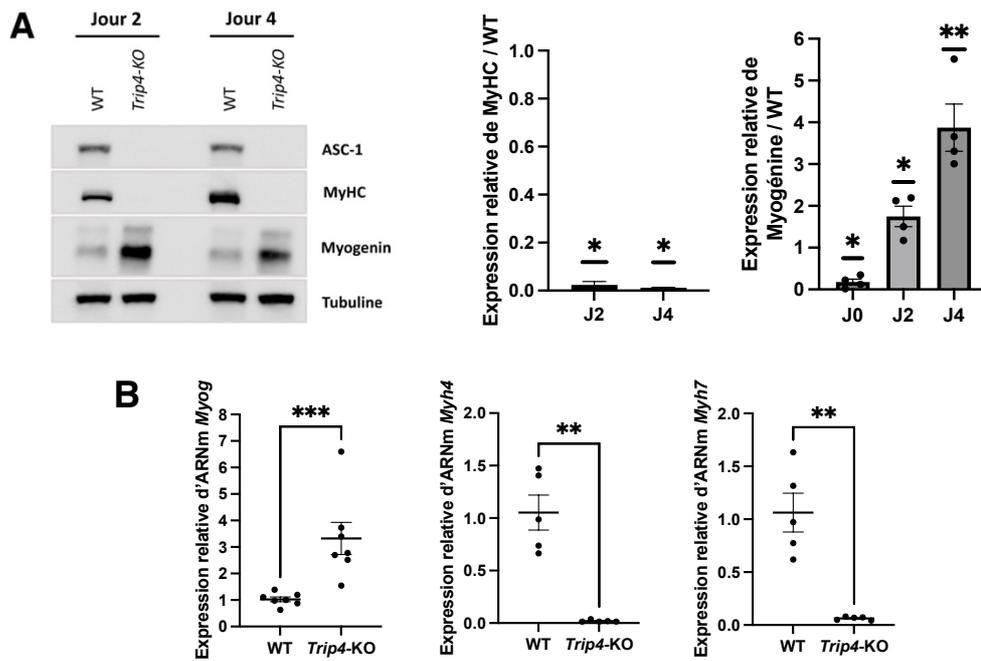


Figure 47 : Le knock-out de Trip4 dans les C2C12 entraîne une absence d'expression de la MyHC et une forte surexpression de Myogénine au cours de la myogenèse. (A) Quantification par Western-blot (n=4) de l'expression protéique de la MyHC et de Myogénine aux jours 2 et 4 de différenciation dans les C2C12 WT et Trip4-KO. L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au WT. (B) Quantification par qRT-PCR (n=5) de l'expression relative des ARNm Myog, Myh4 et Myh7 trois jours après induction de la différenciation dans les C2C12 WT et Trip4-KO. L'expression a été normalisée par rapport à Rpl19 puis rapportée au WT. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : * = $p < 0,001$, ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$.**

Comme décrit précédemment, le retard de différenciation semble plus prononcé dans le modèle C2C12 Trip4-KO par rapport au modèle C2C12 Trip4-KD, malgré une forte surexpression de Myogénine. J'ai donc réalisé ensuite des analyses RNAseq de myoblastes au cours de la différenciation dans le but de caractériser au niveau transcriptomique ce nouveau modèle. Dans ce cas, les ARNs ont été extraits à J3 pour assurer un nombre de myotubes comparable à celui obtenu à J2 dans les C2C12 knocked-down pour Trip4 (premières analyses RNAseq).

Les données de RNAseq sont qualitativement interprétables comme l'atteste l'analyse en composante principale (PCA) (Figure 48A). Trois jours après induction de la différenciation, un total de 2213 gènes sont différentiellement exprimés dans les C2C12 Trip4-KO par rapport au WT, sur la base de $p < 0,05$ et $|\log_2FC| > 1$ (Figure 48B). L'analyse de l'ontologie des gènes a révélé que les 1376 gènes significativement sous-exprimés dans les cellules KO présentent un enrichissement pour les processus du développement et de la

contraction musculaire (**Figure 48C**), comme nous l'avons déjà observé dans les analyses transcriptomiques du modèle knockdown. Aussi, bien que nous avons déjà mis en évidence un enrichissement des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire parmi les gènes surexprimés dans le modèle knockdown à J2 (**Figure 41C**), le knockout de *Trip4* semble affecter d'autant plus la prolifération, d'après l'enrichissement des gènes du cycle cellulaire, et particulièrement de la phase M, parmi les gènes surexprimés dans les C2C12 *Trip4*-KO à J3 (**Figure 48C**).

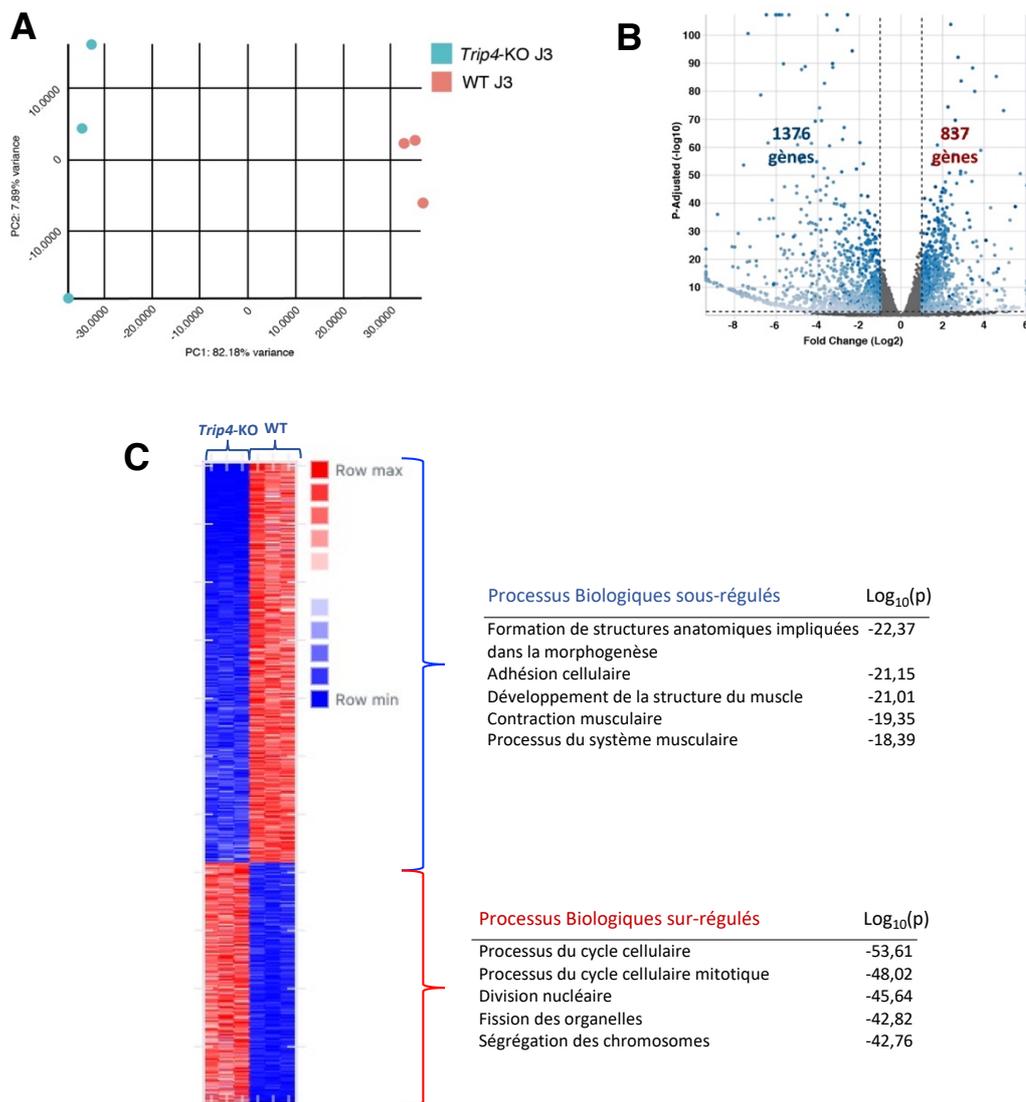


Figure 48 : Analyse transcriptomique par RNAseq du modèle C2C12 *Trip4*-KO en différenciation à J2. (A-B) Analyse en composante principale (PCA) (A) et Volcano-Plot (B) des données RNA seq des C2C12 WT et si*Trip4* au troisième jour de différenciation. (C) Heatmap des gènes différentiellement exprimés avec l'ontologie des gènes sous-exprimés (haut) et surexprimés (bas) dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT.

De même que pour la précédente analyse transcriptomique dans le modèle knock-down, nous avons comparé la liste des gènes cibles de SRF et MyoD à celle des gènes significativement dérégulés dans les C2C12 *Trip4*-KO à J3 par rapport aux WT. Un total de 26 gènes sont significativement sous-régulés parmi les gènes cibles de SRF spécifiques du muscle (**Figure 49A**) et 1376 potentiels gènes cibles de MyoD sont affectés positivement ou négativement (529 surexprimés, 847 sous-exprimés) par l'absence d'ASC-1 (**Figure 49B**). Ces résultats confirment que l'absence d'ASC-1 perturbe l'activité de SRF et MyoD au cours de la myogenèse.

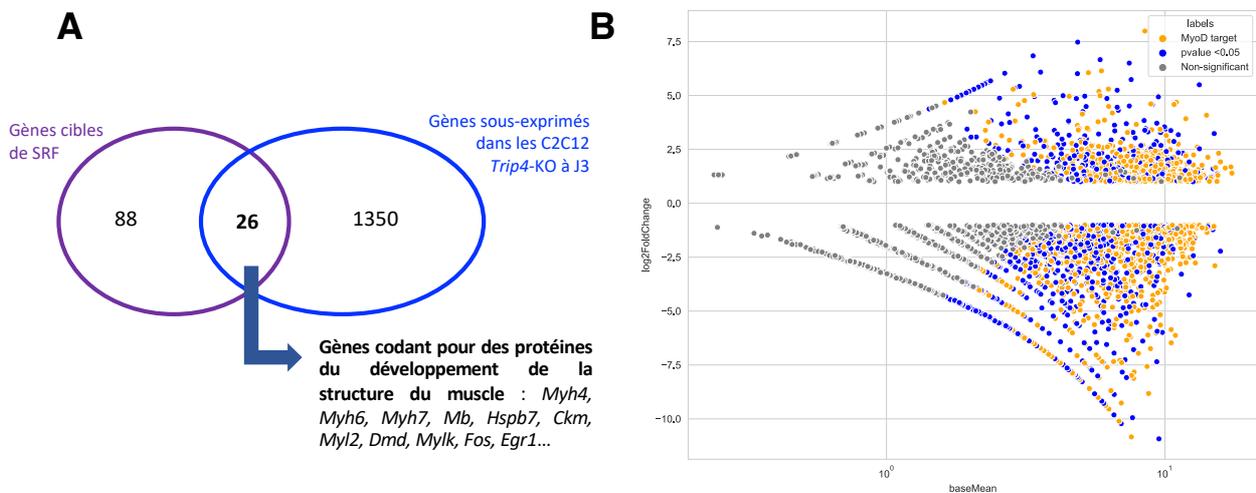


Figure 49 : L'absence d'ASC-1 affecte l'expression des gènes cibles de SRF et MyoD au niveau transcriptomique dans le modèle C2C12 *Trip4*-KO à J3. (A) Diagramme de Venn des gènes cibles de SRF (Chai et Tarnawski 2002; Sun et al. 2006; Miano, Long, et Fujiwara 2007) et des gènes sous-régulés dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT au troisième jour de différenciation (B) MA plot représentant la superposition des potentiels gènes cibles de MyoD, issus de la banque ChIP atlas, et des gènes significativement dérégulés dans les analyses RNAseq des C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT à J3. Les points jaunes représentent les potentiels gènes cibles de MyoD significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq ; Les points bleus représentent les gènes significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq qui ne sont pas des cibles de MyoD.

Ces expériences menées sur le nouveau modèle C2C12 *Trip4*-KO ont confirmé que, comme dans le modèle C2C12 *Trip4*-KD, l'absence d'ASC-1 affecte le transcriptome pendant la myogenèse, et plus particulièrement les gènes cibles des facteurs de transcription SRF et MyoD. De plus, nous avons montré que **l'absence totale d'ASC-1 (KO) entraîne un défaut/retard de différenciation plus marqué qu'en knock-down, associé à une surexpression de Myogénine et une absence totale de MyHC à partir de J2.**

2. ASC-1 régule l'expression de MyoD mais pas celle de SRF

Précédemment, j'ai montré que l'expression des gènes cibles de MyoD et SRF est significativement diminuée au niveau ARN dans les C2C12 *Trip4*-KD et C2C12 *Trip4*-KO respectivement aux jours 2 et 3 de la différenciation. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, j'ai mesuré l'expression de SRF et MyoD au cours de la myogenèse dans ce nouveau modèle. De façon surprenante, l'expression protéique de MyoD et SRF est significativement augmentée à partir du Jour 2 dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux cellules WT (**Figure 50A**). L'analyse des transcrits par qRT-PCR a montré une augmentation significative du niveau d'ARNm de *MyoD*, mais aucun effet significatif sur celui de *Srf*, au Jour 3 de différenciation dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT (**Figure 50B**). Fait intéressant, la surexpression de MyoD et SRF au niveau ARN est observable dans les résultats RNAseq du muscle du patient *TRIP4*-KO (*MYOD1* : TPM muscle patient = 69,77 / TPM muscle contrôle = 14,33 ; *SRF* : TPM muscle patient = 22,51 / TPM muscle contrôle = 14,82) mais pas dans les résultats RNAseq ni les résultats de qRT-PCR du modèle C2C12 *Trip4*-KD à J2.

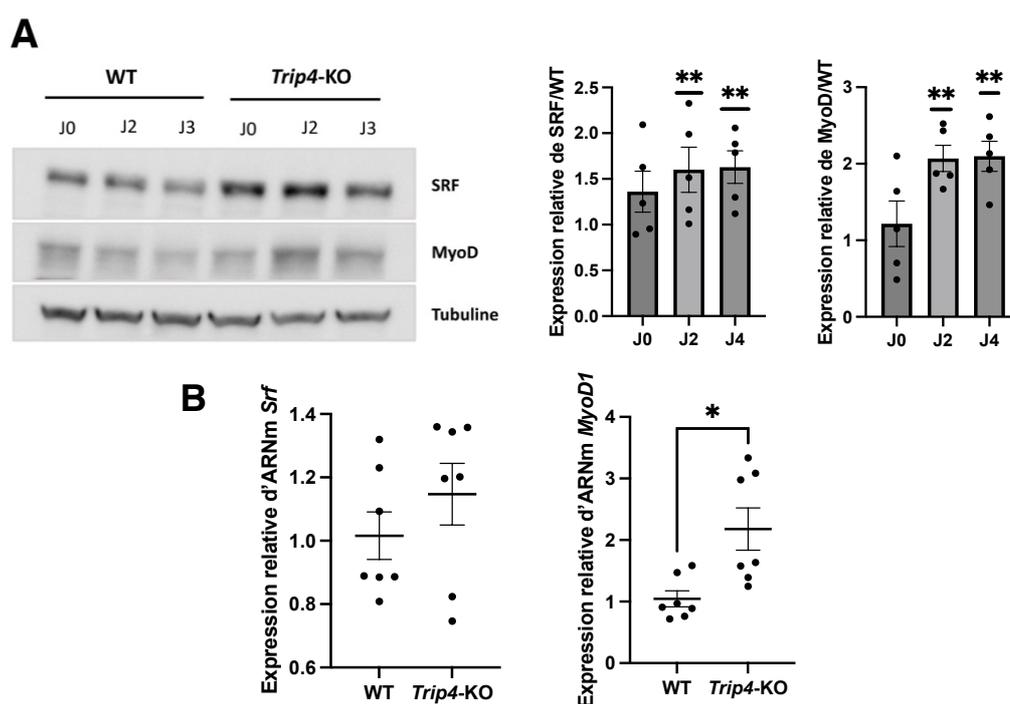


Figure 50 : Le knock-out de *Trip4* dans les C2C12 entraîne la surexpression protéique de SRF et MyoD à partir du deuxième jour de la myogenèse. (A) Quantification par Western-blot (n=5) de l'expression protéique de MyoD et SRF aux jours 0, 2 et 4 de différenciation dans les C2C12 WT et *Trip4*-KO. L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au WT. (B) Quantification par qRT-PCR (n=6) de l'expression relative des ARNm *MyoD1* et *Srf* trois jours après induction de la différenciation

dans les C2C12 WT et Trip4-KO. L'expression a été normalisée par rapport à Rpl19 puis rapportée au WT. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$.

Nous avons par la suite transfecté des C2C12 en prolifération avec un plasmide d'expression du gène *TRIP4* humain afin de vérifier si ASC-1 régule directement l'expression de SRF et MyoD (**Figure 51**). Alors que la surexpression d'ASC-1 n'affecte pas significativement l'expression protéique de SRF, elle entraîne une forte diminution (plus de 50%) dose-dépendante de l'expression protéique de MyoD. **Ces résultats confirment qu'ASC-1 régule l'expression de MyoD mais pas de SRF dans les cellules myogéniques.**

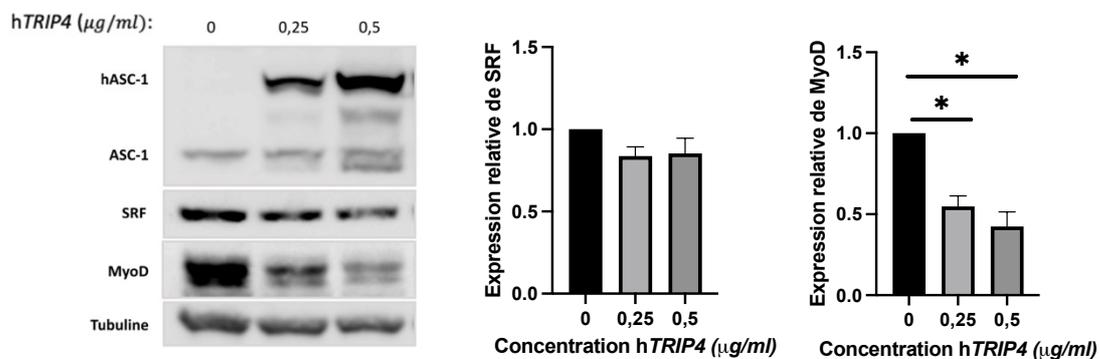


Figure 51 : La surexpression d'ASC-1 dans les C2C12 affecte l'expression protéique de MyoD mais pas celle de SRF. Les C2C12 en prolifération ont été transfectées (n=4) avec différentes concentrations d'un plasmide d'expression *TRIP4* humain (0, 0,25 et 0,5 µg/ml). Les quantifications par Western-Blot des expressions relatives de SRF et MyoD ont été normalisées avec la tubuline puis rapportées à la condition sans traitement. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : * = $p < 0,05$.

3. L'absence d'ASC-1 affecte la localisation subcellulaire de Myogénine au cours de la myogenèse

Afin de comprendre pourquoi, malgré la surexpression des facteurs de régulation myogéniques, MyoD et Myogénine, les C2C12 *Trip4*-KO présentent un tel défaut de différenciation associé à une forte diminution de l'expression des gènes cruciaux pour la myogenèse, la structure et la fonction des cellules musculaires, nous avons étudié la localisation subcellulaire de ces facteurs de transcription myogéniques dans les différentes conditions expérimentales. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence à J0, J2 et J3 dans les C2C12 *Trip4*-KO et WT. Ces expériences ont montré que MyoD est bien exprimé dans le noyau des cellules en présence et en absence d'ASC-1 aux jour 0, 2 et 3 de différenciation (**Figure 52A**). De plus, le nombre de noyaux marqués par MyoD par rapport au nombre de noyaux totaux (% Noyaux MyoD +) est diminué dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT à J0 mais non significativement affecté à J2 et J3 (**Figure 52B**).

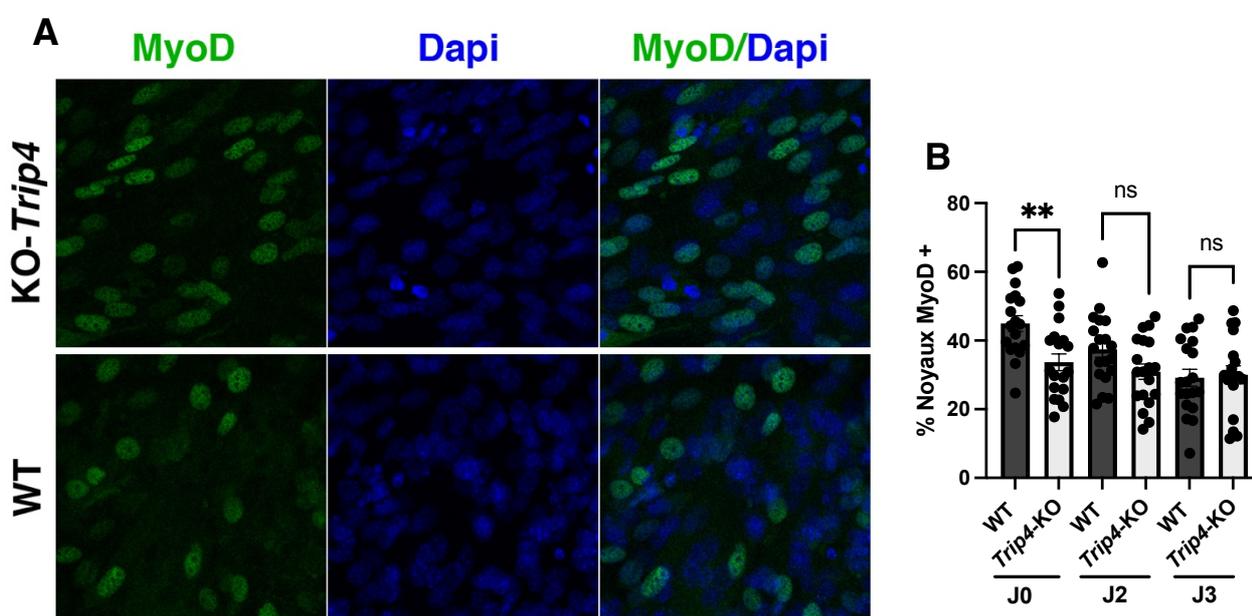


Figure 52 : La localisation subcellulaire de MyoD n'est pas affectée par l'absence d'ASC-1 dans les C2C12 en différenciation. (A) Les C2C12 WT et *Trip4*-KO au troisième jour de différenciation ont été marquées avec un anticorps dirigé contre MyoD (vert) et les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). MyoD est localisé dans le noyau des cellules WT et KO (B) Quantification du nombre de noyaux marqués pour MyoD par rapport au nombre de noyaux totaux marqués au DAPI. Pour chaque expérience indépendante, au minimum 10 images par conditions expérimentales ont été utilisées afin de réaliser les comptages. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; ns = non significatif.

Nous avons ensuite réalisé des marquages Myogénine (MyoG) qui ont révélé que le pourcentage de cellules exprimant Myogénine à J0, J2 et J3 est comparable dans les C2C12 WT et *Trip4*-KO (**Figure 53B**). En revanche, nous avons constaté que la localisation subcellulaire est significativement perturbée à J2 et J3, avec les cellules WT exprimant majoritairement Myogénine dans le noyau et les cellules *Trip4*-KO exprimant majoritairement Myogénine dans le cytoplasme (**Figure 53A-C**).

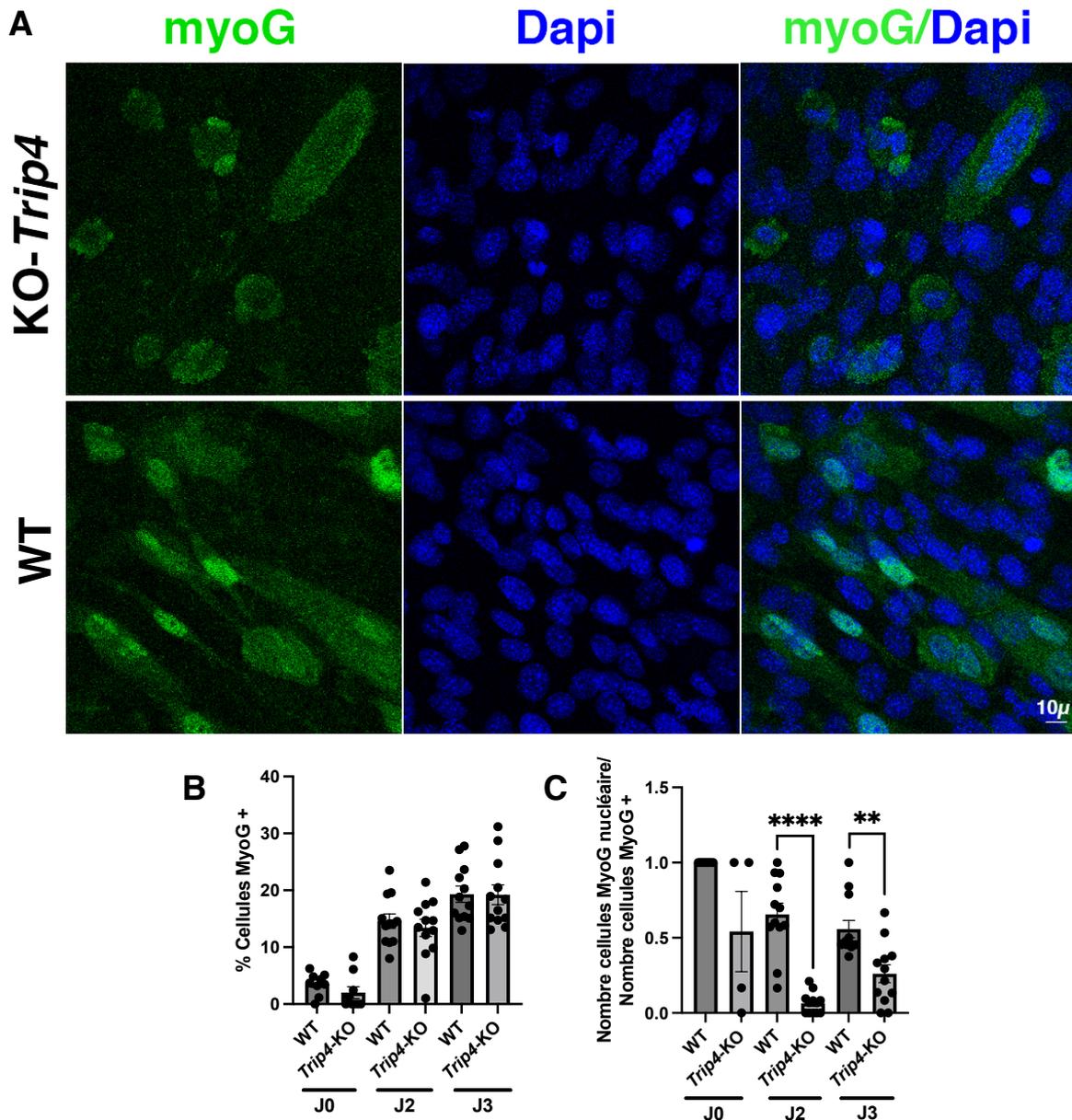


Figure 53 : L'absence d'ASC-1 perturbe la localisation subcellulaire de Myogénine dans les C2C12 à J2 et J3. (A) Les C2C12 WT et *Trip4*-KO au deuxième jour de différenciation ont été marquées avec un anticorps dirigé contre Myogénine (vert) et les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Les cellules WT sont plus intensément marquées dans le noyau alors que les cellules KO sont marquées de manière diffuse dans

le cytoplasme (B) Quantification du nombre de cellules marquées pour Myogénine par rapport au nombre de cellules totales (C) Quantification du nombre de cellules marquées pour Myogénine plus intensément dans le noyau par rapport au nombre de cellules totales marquées pour Myogénine. Pour chaque expérience indépendante, au minimum 10 images par condition expérimentale ont été utilisées afin de réaliser les comptages. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : **** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$.

Ces résultats montrent que l'absence d'ASC-1 affecte la localisation subcellulaire de Myogénine, mais pas celle de MyoD dans les C2C12 en différenciation. La rétention cytoplasmique de Myogénine et la relative absence de myogénine nucléaire peut expliquer pourquoi malgré la surexpression de MyoG, des marqueurs de différenciation terminale tels que la MyHC ne sont pas exprimés dans les cellules *Trip4*-KO en différenciation.

4. ASC-1 interagit avec SRF, MyoD et le récepteur aux androgènes

J'ai ensuite réalisé des expériences d'immunoprécipitation dans des C2C12 en prolifération (forte confluence, **Figure 54A**) afin de déterminer si ASC-1 peut interagir de façon directe ou indirecte avec les facteurs de transcription SRF et MyoD. Dans un premier temps, j'ai immunoprécipité ASC-1, SRF et MyoD en utilisant des anticorps disponibles dans le commerce et des billes d'agarose. Bien qu'aucune interaction directe n'ait été mise en évidence entre SRF, MyoD et ASC-1 dans ces conditions, **j'ai identifié le récepteur aux androgènes (AR) et ASC2 comme partenaires communs de SRF, MyoD et ASC-1 (Figure 54B)**. Ce résultat laisse entrevoir une interaction probable entre ASC-1 et SRF et/ou MyoD.

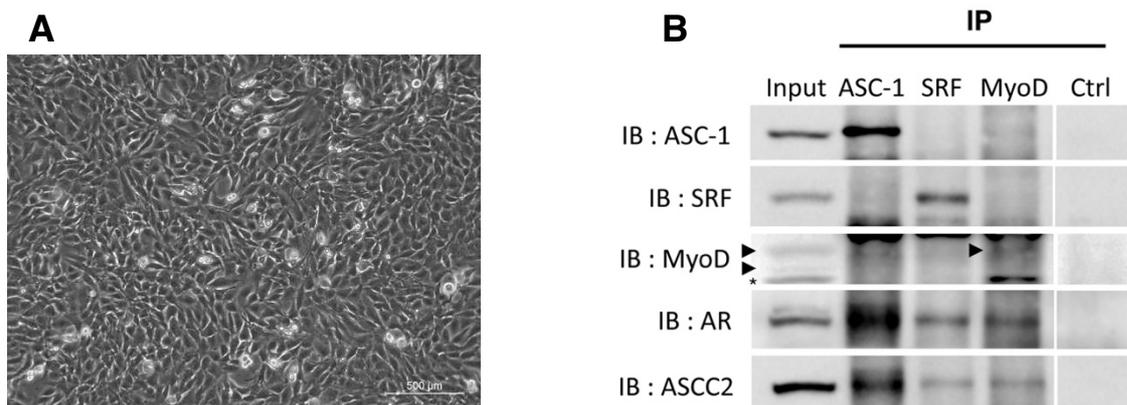


Figure 54 : ASC-1, SRF et MyoD ont des partenaires communs. (A) Photo représentative de la confluence des C2C12 pour les expériences d'immunoprécipitation. Les photos ont été réalisées avec un microscope à lumière transmise ($\times 10$). (B) Immunoprécipitations d'ASC-1, SRF et MyoD dans des C2C12 en prolifération. Détection par Western-Blot (Immunoblot : IB) de ces protéines ainsi que du récepteur aux androgènes (AR) partenaire connu de SRF et de la sous-unité du complexe ASC-1, ASCC2, dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP). Un lysat contrôle a été immunoprécipité en absence d'anticorps (Ctrl). Les bandes spécifiques de MyoD sont indiquées par les têtes de flèches.

Pour améliorer le rendement d'immunoprécipitation par ASC-1, j'ai utilisé un nouvel anticorps dirigé contre cette protéine, que nous avons fait développer par la société Covalab, et des billes magnétiques afin de minimiser les pertes par centrifugation, et un protocole de lyse cellulaire renforcé par une étape de sonication, toujours dans des C2C12 en prolifération. L'optimisation de cette technique a cette fois-ci permis de co-immunoprécipiter SRF avec ASC-1 dans ces conditions (**Figure 55**). La co-immunoprécipitation d'ASCC2 avec ASC-1 a

été utilisée comme contrôle pour valider ce nouveau protocole. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle **ASC-1 est capable d'interagir avec le facteur de transcription SRF, de façon directe ou indirecte.**

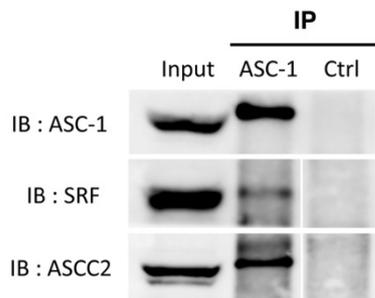


Figure 55 : Interaction d'ASC-1 avec le facteur de transcription SRF. Immunoprécipitation d'ASC-1 par un nouvel anticorps développé par Covalab dans les C2C12 en prolifération. Détection par Western-Blot (IB) d'ASC-1, SRF et ASC2 dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP). Un lysat contrôle a été immunoprécipité en absence d'anticorps (Ctrl).

Enfin, j'ai réalisé une deuxième optimisation du protocole d'immunoprécipitation par ASC-1 afin de lever l'interrogation sur l'interaction entre ASC-1 et MyoD, en utilisant des billes paramagnétiques très homogènes (*Dynabeads*) préalablement couplées à l'anticorps afin de réduire davantage le bruit de fond dans la zone de migration des chaînes d'immunoglobulines. En effectuant une élution douce, nous avons pu voir que les billes couplées avec un anticorps anti-HA permettent d'obtenir un signal réduit des immunoglobulines vers 50 kDa. Cette amélioration nous a permis de détecter un signal en dessous de 50 kDa avec les billes couplées à l'anticorps anti-ASC-1 correspondant à une bande migrant au niveau du signal MyoD de l'input. L'utilisation d'anticorps secondaires spéciaux, spécifiques des chaînes légères ou de la forme native des chaînes d'immunoglobulines, n'a pas permis d'éliminer totalement le bruit de fond des immunoglobulines. Néanmoins, ce protocole a permis de révéler une des bandes de MyoD et de mettre en évidence la co-immunoprécipitation de MyoD avec l'anticorps anti-ASC-1 (**Figure 56A**, têtes de flèches). Afin de m'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une bande non spécifique, j'ai testé l'anticorps MyoD sur des lysats protéiques issus de fibroblastes et de myoblastes murins (**Figure 56B**). MyoD étant une protéine uniquement exprimée dans le muscle, les bandes observables dans le lysat de fibroblastes sont des bandes non spécifiques. Ce test nous a permis de confirmer que notre bande d'intérêt est bien spécifique de MyoD. Enfin, j'ai traité des lysats protéiques de C2C12 en prolifération avec de la lambda phosphatase, en présence ou non d'inhibiteurs de phosphatase, afin de déterminer si la bande MyoD immunoprécipitée correspond à une forme

phosphorylée (**Figure 56C**). J'ai observé que le traitement à la lambda phosphatase induit la perte des bandes de plus faible migration ainsi qu'une augmentation de l'intensité de la bande du dessous, suggérant que notre bande immunoprécipitée correspond à une forme phosphorylée de MyoD. J'ai pu déduire de ces expériences qu'une **forme phosphorylée de MyoD co-immunoprécipite avec ASC-1 dans les cellules myogéniques.**

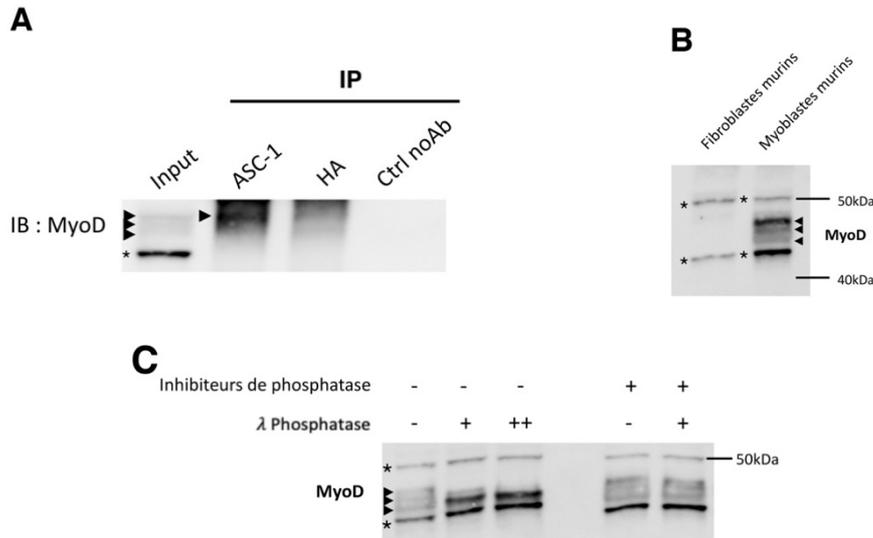


Figure 56 : Interaction d'ASC-1 avec une forme phosphorylée de MyoD. (A) Immunoprécipitation rapide d'ASC-1 à l'aide des billes paramagnétiques Dynabeads dans les C2C12 en prolifération. Détection par Western-Blot (IB) de MyoD dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP) Deux contrôles d'immunoprécipitation ont été réalisés en utilisant soit un anticorps dirigé contre un peptide (HA) non représenté dans les cellules soit en absence d'anticorps (Ctrl). (B) Détection par western-Blot de MyoD dans des lysats protéiques de fibroblastes et de myoblastes murins. L'anticorps utilisé révèle des bandes non spécifiques dans les fibroblastes (astérisques) visible également dans les myoblastes. Les bandes spécifiques de MyoD (têtes de flèches) sont visibles uniquement dans les myoblastes. (C) Identification des formes phosphorylées de MyoD. Les C2C12 en prolifération ont été lysées en absence d'inhibiteurs de phosphatase. Le lysat a été traité ou non par la lambda phosphatase en présence ou absence d'inhibiteurs de phosphatase. Les bandes de MyoD (têtes de flèches) ont été révélées par Western-Blot. Les bandes non spécifiques sont indiquées par un astérisque.

5. ASC-1 corégule l'activité de SRF, MyoD et du récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques

Les résultats précédents suggèrent qu'ASC-1 agit avec SRF et MyoD pour réguler l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la différenciation myogénique. Afin d'évaluer l'importance fonctionnelle d'ASC-1 dans la régulation de l'expression des gènes cibles spécifiques du muscle par SRF et MyoD, j'ai effectué des tests d'activité luciférase.

Le facteur de transcription SRF régule la transcription de ses gènes cibles en se fixant spécifiquement aux promoteurs sur les *Serum Responsive Elements* (SRE) (Huet et al. 2005). J'ai donc dans un premier temps mesuré l'activité luciférase dans des C2C12 WT en prolifération (forte confluence), préalablement co-transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle du promoteur SRE (SRE-Luc), un plasmide de contrôle CMV-renilla luciférase et un plasmide d'expression du gène *TRIP4* humain (ou un vecteur vide pCITO) afin d'étudier l'effet de la surexpression d'ASC-1 sur l'activité de SRF (**Figure 57A**). L'expression de la forme humaine d'ASC-1 dans les cellules a été vérifiée par Western-Blot (**Figure 57B**). Notre laboratoire avait précédemment rapporté que la surexpression d'ASC-1 dans les C2C12 améliore la transactivation de SRF, dans les C2C12 en prolifération de façon modeste mais significative (augmentée x 1,3) (Davignon et al. 2016a). Mon expérience a validé cette action d'ASC-1, et j'ai pu quantifier une augmentation plus importante (x 4) de la transactivation de SRF induite par ASC-1, possiblement due à une différence de vecteur d'expression du gène *Trip4*. Ce résultat confirme qu'**ASC-1 est capable de transactiver SRF dans les cellules myogéniques.**

Afin d'étudier l'effet de l'absence d'ASC-1 sur l'activité de SRF dans des conditions pathologiques, j'ai comparé l'activité luciférase SRE-Luc dans des C2C12 WT, *Trip4*-KO et *Trip4*-KO transfectées avec le plasmide d'expression du gène *TRIP4* humain (**Figure 57C**). La transactivation de SRF est réduite de moitié dans les cellules *Trip4*-KO par rapport au WT et la réexpression d'ASC-1 dans les cellules KO permet de corriger cette diminution de l'activité de SRF dans les C2C12 en prolifération. **ASC-1 est donc nécessaire pour l'activité de SRF dans les cellules myogéniques en prolifération.**

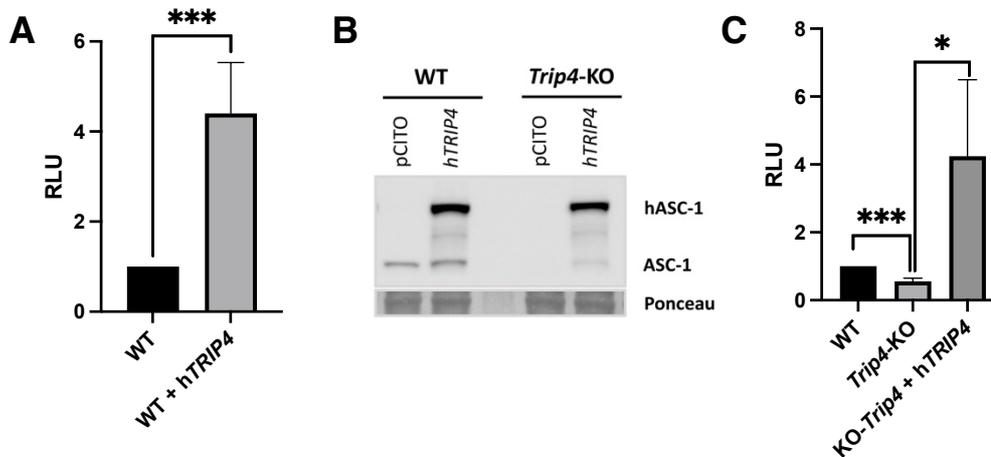


Figure 57 : ASC-1 transactive et est nécessaire à l'activité de SRF dans les cellules myogéniques. (A) Les C2C12 WT ont été co-transfectées (n=6) avec un plasmide rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur SRE (SRE-Luc), un plasmide de contrôle CMV-Renilla luciférase ainsi qu'un plasmide d'expression du gène TRIP4 humain (hTRIP4) ou bien un vecteur vide (pCITO). (B) L'expression de la forme humaine d'ASC-1, à 100 kDa, a été vérifiée par Western-Blot. (C) Les C2C12 WT et Trip4-KO ont été co-transfectées (n=6) avec le plasmide SRE-Luc, un plasmide de contrôle CMV-Renilla luciférase ainsi qu'un plasmide hTRIP4 ou bien un vecteur vide pCITO. L'activité luciférase a été normalisée par l'activité Renilla et rapportée au WT transfecté avec le vecteur vide. RLU = Relative Luciferase activity. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : *** = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$.

MyoD active notamment la transcription de Myogénine en se fixant à son promoteur dans les cellules myogéniques. Afin de déterminer l'effet d'ASC-1 sur l'activité de MyoD, nous avons mesuré l'activité luciférase dans des C2C12 WT et Trip4-KO en prolifération, préalablement co-transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle du promoteur Myogénine (MyoG-Luc), un plasmide de contrôle CMV-renilla luciférase, un plasmide d'expression du gène TRIP4 humain et/ou un plasmide d'expression MyoD-HA (ou un vecteur vide pCITO) (Figure 58). L'expression de la forme humaine d'ASC-1 et de MyoD-HA dans les cellules a été vérifiée par Western-Blot (Figure 58A). Nous avons observé que, en cohérence avec l'état prolifératif, la transfection de hTRIP4 seul n'est pas suffisante pour activer le promoteur de Myogénine dans les C2C12 WT et Trip4-KO en prolifération (Figure 58B). En revanche, la co-transfection de MyoD-HA et hTRIP4 dans les C2C12 WT augmente significativement l'activité luciférase par rapport aux C2C12 transfectées avec le plasmide MyoD-HA seul, indiquant **qu'ASC-1 est capable de transactiver MyoD dans les cellules myogéniques**. De plus, l'activité luciférase induite par la transfection de MyoD est diminuée

de plus de moitié dans les cellules WT par rapport aux cellules *Trip4*-KO, mais peut être en partie restaurée par la réexpression d'ASC-1 dans les cellules KO, signifiant **qu'ASC-1 est nécessaire pour l'activité de MyoD dans les cellules myogéniques (Figure 58B).**

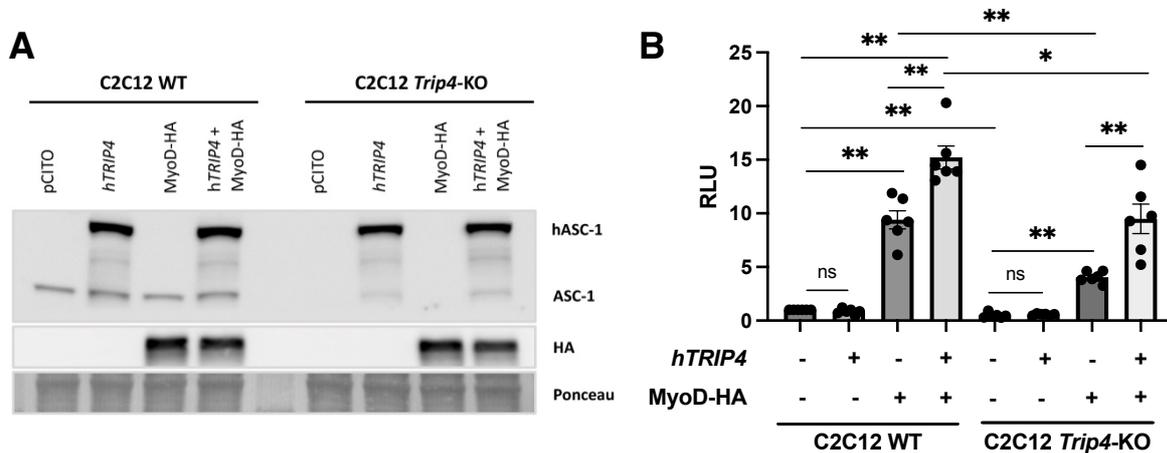


Figure 58 : ASC-1 transactive et est nécessaire à l'activité de MyoD dans les cellules myogéniques. (A) L'expression de la forme humaine d'ASC-1, à 100 kDa, et de MyoD-HA ont été vérifiées par Western-Blot. **(B)** Les C2C12 WT et *Trip4*-KO ont été co-transfectées ($n=6$) avec un plasmide rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur Myogénine (*MyoG*-Luc), un plasmide de contrôle CMV-Renilla luciférase ainsi qu'un plasmide d'expression du gène *TRIP4* humain (*hTRIP4*), un plasmide d'expression MyoD-HA ou bien un vecteur vide (*pCITO*). L'activité luciférase a été normalisée par l'activité Renilla et rapportée au WT co-transfecté avec le vecteur vide et *MyoG*-Luc. Six expériences indépendantes ont été réalisées. RLU = Relative Luciferase activity. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; ns = non significatif.

Précédemment, j'ai identifié que le récepteur aux androgènes co-immunoprécipite avec ASC-1. Dans le muscle, des études précédentes avaient déjà établi que le récepteur aux androgènes joue un rôle direct dans la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans la différenciation et la fonction musculaire (Wyce et al. 2010) et qu'il est recruté sur les promoteurs de certains gènes, tels que *Acta1*, par SRF (Vlahopoulos et al. 2005). Afin de déterminer si cette interaction peut avoir un rôle sur l'activité du récepteur aux androgènes, j'ai mesuré l'activité luciférase ARE-Luc (*Androgen responsive element*) dans des C2C12 WT, des C2C12 *Trip4*-KO et des C2C12 WT surexprimant ASC-1 (WT + *hTRIP4*). L'activité du récepteur aux androgènes est comparable dans les cellules WT et les cellules *Trip4*-KO mais la surexpression d'ASC-1 entraîne une augmentation significative (x2) de l'activité luciférase

(Figure 59). Ce résultat montre qu'en absence de traitement spécifique, ASC-1 n'est pas indispensable à l'activité du récepteur aux androgènes mais qu'il est capable de le transactiver dans les cellules myogéniques.

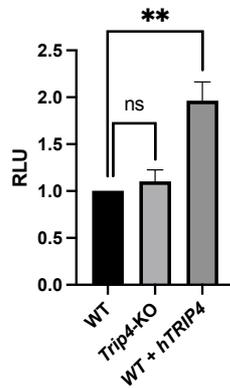


Figure 59 : ASC-1 transactive le récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques. Les C2C12 WT et Trip4-KO ont été co-transfectées (n=6) avec le plasmide ARE-Luc, un plasmide de contrôle CMV-Renilla luciférase ainsi qu'un plasmide hTRIP4 ou bien un vecteur vide pCITO. L'activité luciférase a été normalisée par l'activité Renilla et rapportée au WT transfecté avec le vecteur vide. RLU = Relative luciférase activity. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : ** = $p < 0,005$; ns = non significatif.

III. ASC-1 régule transcriptionnellement l'expression des gènes du cycle cellulaire, cibles du complexe MMB-FOXM1, dans différents types cellulaires

A. L'absence d'ASC-1 entraîne une réactivation du cycle cellulaire au cours de la myogenèse

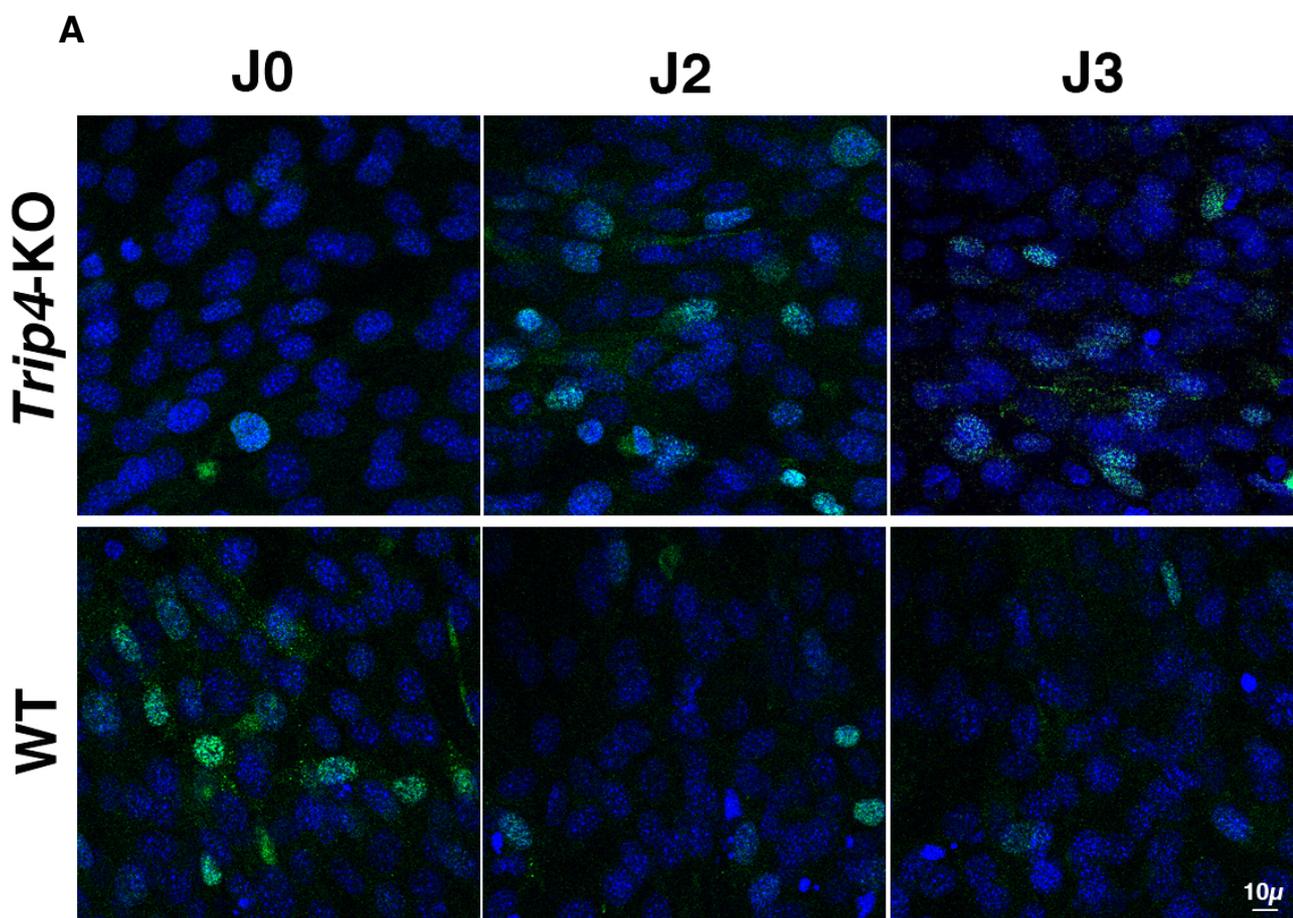
Une précédente étude menée par notre laboratoire avait permis d'identifier ASC-1 comme un nouveau régulateur du cycle cellulaire, à la fois dans les myoblastes et dans les fibroblastes en prolifération (Villar-Quiles et al. 2020). Dans la continuité de ces résultats, l'étude transcriptomique, que j'ai réalisé au troisième jour de différenciation par RNAseq dans les C2C12 *Trip4*-KO et WT, a révélé un enrichissement des gènes du cycle cellulaire, et plus particulièrement de la phase M, parmi les gènes surexprimés dans les cellules KO (**Figure 48C**).

Afin d'approfondir l'étude du rôle d'ASC-1 dans la régulation du cycle cellulaire, nous avons analysé de façon plus ciblée l'expression de certains gènes du cycle cellulaire dans nos résultats RNAseq des C2C12 WT et *Trip4*-KO à J3. Nous avons observé que l'expression d'un certain nombre de gènes codant les cyclines ou encore les facteurs de transcription E2F1, FOXM1 et MYBL2, est significativement augmentée en absence d'ASC-1 (**Tableau 13**).

Gènes	Log2(FoldChange)	p-value
<i>CcnA2</i>	2,03	5,34 ^e -46
<i>CcnB1</i>	2,26	8,07 ^e -31
<i>CcnB2</i>	1,46	1,77 ^e -7
<i>CcnE2</i>	1,58	3,22 ^e -11
<i>Rbl1</i> (p107)	1,49	2,37 ^e -24
<i>E2f1</i>	1,16	4,99 ^e -11
<i>Foxm1</i>	1,75	5,35 ^e -39
<i>Mybl2</i>	2,17	4,94 ^e -15
<i>Cdk1</i>	1,49	3,98 ^e -19
<i>Cdkn1C</i> (p57)	2,44	1,57 ^e -14

Tableau 13 : Surexpression des transcrits des gènes du cycle cellulaire dans les C2C12 *Trip4*-KO à J3. Expression différentielle des transcrits de certains gènes du cycle cellulaire dans les C2C12 *Trip4*-KO à J3 par rapport aux cellules WT, représentée par la valeur Log2(FoldChange), avec les p-value correspondantes.

Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunofluorescence aux jours 0, 2 et 3 afin de mesurer l'expression d'un marqueur de prolifération, KI-67, dans les C2C12 WT et *Trip4*-KO au cours de la différenciation myogénique. Alors que le nombre de cellules marquées KI-67 est significativement diminué dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux cellules WT à J0, on observe une inversion de la tendance à partir du jour 2 avec une nette augmentation du nombre de cellules marquées KI-67 aux jours 2 et 3 en absence d'ASC-1 (**Figure 60A-B**). Parallèlement, nous avons aussi compté le nombre de noyaux marqués au DAPI par champ optique dans chaque condition. Alors que le nombre de noyaux n'évolue pas significativement au cours de la myogenèse dans les cellules WT, une augmentation significative du nombre de noyaux est observée entre le jour 0 et le troisième jour de différenciation dans les C2C12 *Trip4*-KO, possiblement représentative d'un phénomène de reprise de la prolifération (**Figure 60C**).



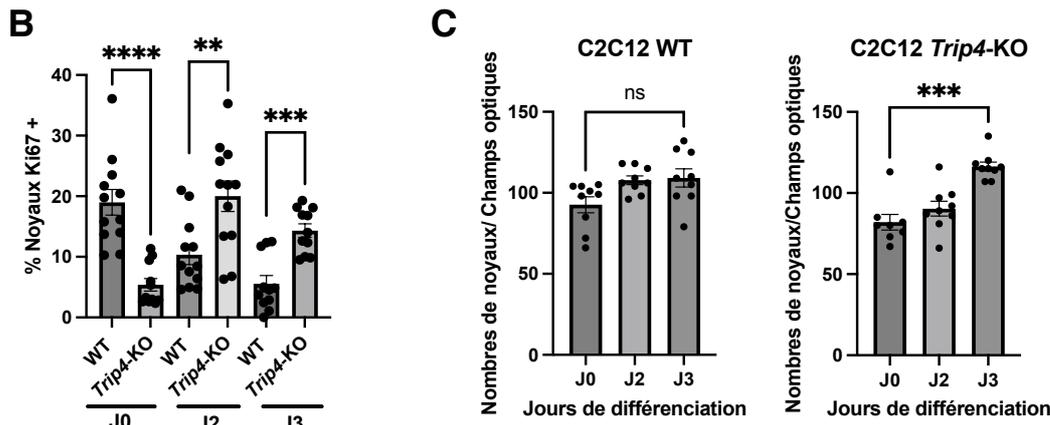


Figure 60 : Les C2C12 Trip4-KO se remettent à proliférer au jour 2 de différenciation. (A) Les C2C12 WT et Trip4-KO aux jours 0, 2 et 3 de différenciation ont été marquées avec un anticorps dirigé contre KI-67 (vert) et les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). (B) Quantification du nombre de noyaux marqués pour KI-67 par rapport au nombre de noyaux totaux marqués au DAPI (% Noyaux KI-67 +), dans les C2C12 WT et Trip4-KO à J0, J2 et J3. (C) Quantification du nombre de noyaux totaux marqués au DAPI par champ optique dans les C2C12 WT et Trip4-KO à J0, J2 et J3. Pour chaque expérience indépendante, au minimum 10 images par condition expérimentale ont été utilisées afin de réaliser les comptages. Moyenne +/- SEM. Mann-Whitney : **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,005$.

Enfin, nous avons quantifié l'expression protéique de la cycline D1 et de p27 (marqueur de quiescence) dans les différentes conditions expérimentales au cours de la différenciation. On observe une tendance à la surexpression de la cycline D1 dans les C2C12 Trip4-KO par rapport aux WT à partir de J2 ainsi qu'une tendance (car $n=2$) à la sous-expression de p27 aux jours 0, 2 et 4 de différenciation (**Figure 61**).

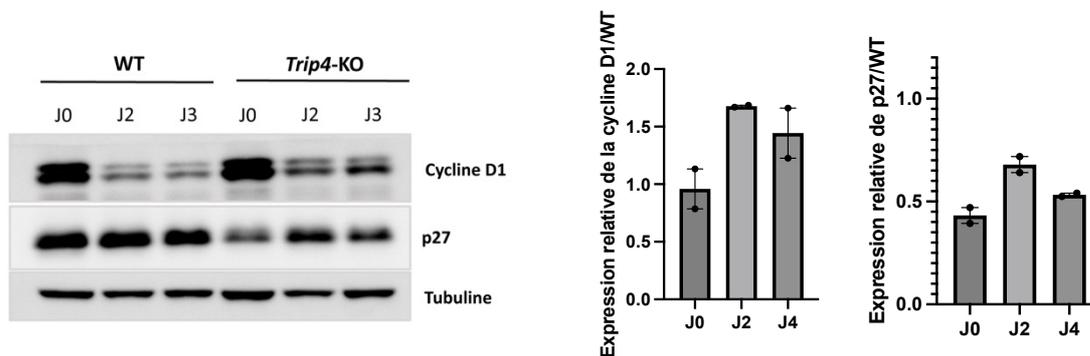


Figure 61 : Les C2C12 Trip4-KO surexpriment la cycline D1 et sous-expriment p27 au cours de la myogenèse. Quantification par Western-Blot de l'expression protéique de la cycline D1 et de p27 aux jours 0, 2 et 4 de différenciation dans les C2C12 WT et Trip4-KO. L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au WT. L'expérience n'a été réalisée à ce jour que deux fois et les valeurs ne sont donc pas significatives.

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'**en absence d'ASC-1, les cellules ne sortent pas définitivement du cycle cellulaire comme elles devraient le faire au cours de la myogenèse, et qu'une partie des cellules retourne dans le cycle pour proliférer à partir du deuxième jour de différenciation.** Ainsi, le rôle d'ASC-1 dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération n'affecterait donc pas seulement les cellules prolifératives mais perturberait aussi probablement tout le processus de différenciation myogénique, soulignant l'importance de la compréhension des processus de régulation par lesquels ASC-1 intervient.

B. La transcription des gènes du cycle cellulaire est différentiellement affectée dans les fibroblastes de patients

Afin d'étendre l'étude du rôle d'ASC-1 dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq sur des fibroblastes contrôles et de patients portant des mutations du gène *TRIP4*, dont deux patients issus de la famille F et la mère hétérozygote du patient FII.2 (Davignon et al. 2016a), et deux patients de la famille B (Villar-Quiles et al. 2020). Aucun processus biologique n'a été enrichi lors de l'analyse de l'ontologie des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons de fibroblastes de patients et les fibroblastes contrôles. En revanche, en analysant ponctuellement l'expression de certains gènes du cycle cellulaire tels que ceux codant les cyclines, les protéines du rétinoblastome, les facteurs de transcription, E2F, FOXM1, B-MYB, les CDK ou encore d'autres gènes cibles des complexes DREAM et FOXM1-MMB, nous avons constaté que l'expression de ces gènes est augmentée uniquement chez deux patients, BIII.1 et FIII.1, ainsi que chez la mère hétérozygote du patient FII.2 (**Figure 62**). De façon surprenante, les deux patients surexprimant ces gènes du cycle cellulaire ne sont pas issus de la même famille, soulignant une variabilité intrafamiliale dans la réponse des gènes du cycle cellulaire liée à ASC-1 dans les fibroblastes. De plus, les patients de la famille F présentent une absence totale d'expression d'ASC-1 alors que ceux de la famille B présentent une diminution de l'expression d'ASC-1, suggérant que ce n'est pas l'expression résiduelle d'ASC-1 qui modulerait l'expression des gènes du cycle cellulaire dans ce type cellulaire. Ces résultats semblent donc indiquer qu'ASC-1 n'a pas seulement un effet sur l'expression de cycline D1 et de p21 mais

pourrait affecter bien plus largement le cycle cellulaire et l'expression de ces gènes avec une variabilité certaine, possiblement en fonction des différents types cellulaires.

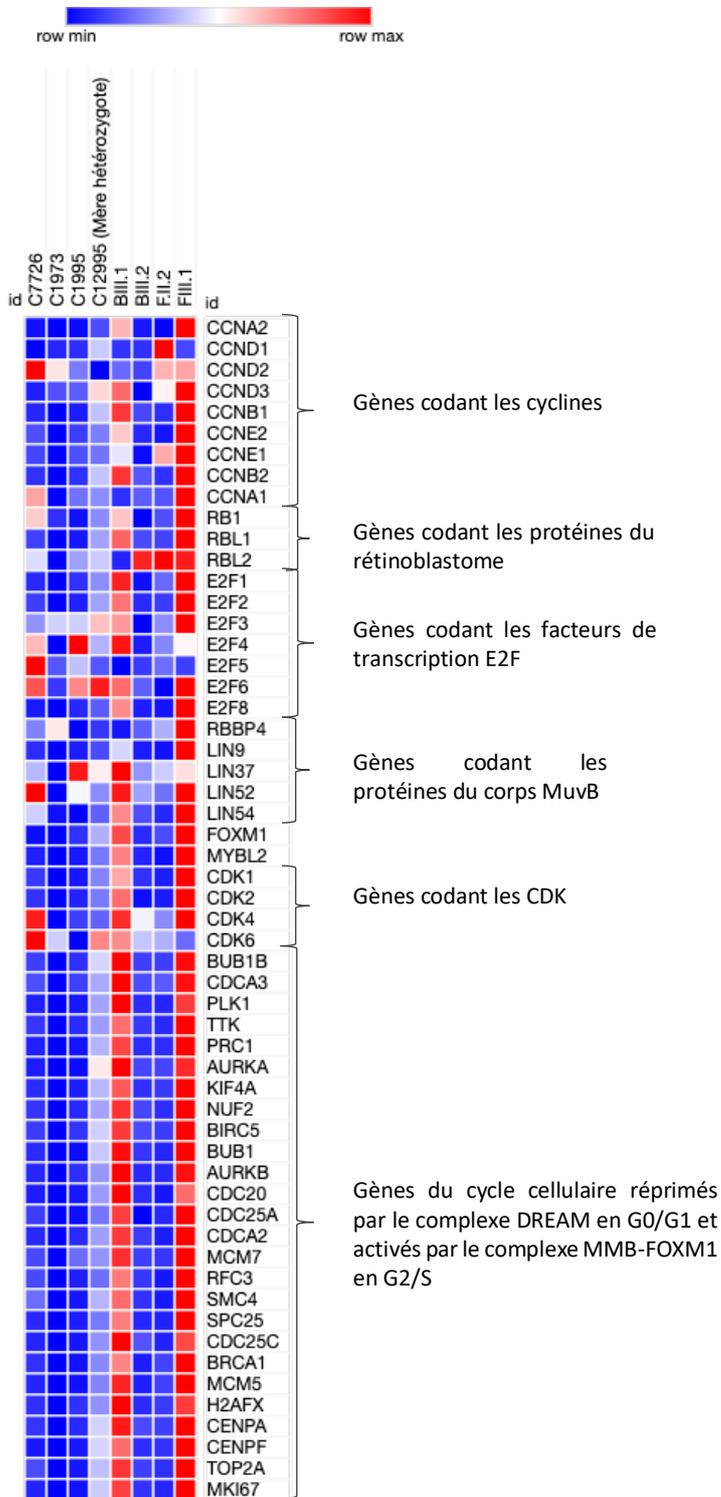


Figure 62 : L'absence ou la diminution de l'expression d'ASC-1 affecte l'expression des gènes du cycle cellulaires de façon hétérogène dans les fibroblastes de patients. Heatmap représentant les niveaux d'expression de chaque gène dans nos résultats RNAseq réalisés sur des fibroblastes contrôles (C7726, C1973, C1995), deux patients de la famille B (BIII.1, BIII.2), deux patients de la famille F (FII.2, FIII.1) ainsi que la mère hétérozygote du patient FII.2.

C. ASC-1 interagit avec FOXM1 et affecte l'expression des gènes cibles du complexe FOXM1-MMB en prolifération et en quiescence

La surexpression d'un grand nombre de gènes du cycle cellulaire en absence d'ASC-1, à la fois dans des C2C12 en différenciation et dans des fibroblastes en prolifération, suggère que l'absence d'ASC-1 pourrait affecter la formation ou l'activité des complexes régulant l'expression des gènes du cycle cellulaire, à savoir pRb-E2F1, DREAM et/ou FOXM1-MMB. Dans une précédente étude, notre laboratoire avait déjà établi que l'absence d'ASC-1 entraîne une hyperphosphorylation de pRb, ce qui pourrait être en partie responsable d'une augmentation de l'expression des gènes régulés par E2F1. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet potentiel de l'absence d'ASC-1 sur les complexes DREAM et FOXM1-MMB dans une lignée de glioblastome humain T98G, largement utilisée pour l'étude de ces complexes.

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer si ASC-1 interagit avec le complexe répresseur des gènes du cycle DREAM ou le complexe activateur des gènes du cycle FOXM1-MMB. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans la lignée T98G. Aucune interaction directe entre ASC-1 et LIN54 (**Figure 63A**), sous-unité du corps MuvB des deux complexes DREAM et FOXM1-MMB, ni entre ASC-1 et p130 (**Figure 63B**), sous-unité du complexe DREAM, n'a été mise en évidence lors de ces expériences. En revanche, **nous avons co-immunoprécipité FOXM1 avec ASC-1, ainsi qu'avec son partenaire ASCC1**, dans les cellules T98G (**Figure 63**). Cette interaction entre le complexe ASC-1 et le facteur de transcription FOXM1 pourrait moduler la capacité de liaison au corps MuvB au cours du cycle cellulaire, et expliquer pourquoi l'absence d'ASC-1 entraîne la surexpression d'un certain nombre de gènes cibles du complexe FOXM1-MMB comme décrit plus haut.

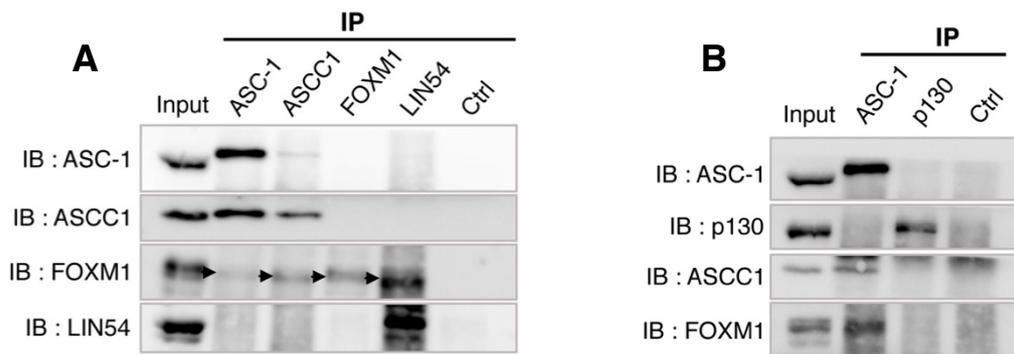


Figure 63 : ASC-1 interagit avec FOXM1 dans la lignée de glioblastome humain T98G. (A) Immunoprécipitation d'ASC-1, ASCC1, FOXM1 et LIN54 dans des T98G en prolifération. Détection par Western-Blot (IB) de ces protéines dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP). **(B)** Immunoprécipitation d'ASC-1 et p130 dans des T98G en prolifération. Détection par Western-Blot (IB) de ces protéines ainsi qu'ASCC1 et FOXM1 dans les fractions témoin (Input) et immunoprécipitées (IP). Un lysat contrôle a été immunoprécipité en absence d'anticorps (Ctrl) pour chaque expérience.

Par la suite, nous avons mesuré l'expression protéique de gènes cibles du facteur de transcription FOXM1 dans des T98G WT et *TRIP4*-KO en prolifération et en quiescence (après 72h de privation en sérum). Alors que l'expression protéique de FOXM1 et de la cycline D1 n'est pas affectée dans les T98G *TRIP4*-KO en prolifération par rapport aux cellules WT, nous avons constaté que l'expression protéique de la cycline A2 et de PLK1, des gènes cibles connus de FOXM1, est augmentée en absence d'ASC-1 (**Figure 64**). De plus, nous avons observé que l'expression de p27 est significativement réduite dans les T98G *TRIP4*-KO en prolifération par rapport aux WT (**Figure 64**).

Comme nous avons précédemment constaté un défaut d'arrêt du cycle cellulaire dans les C2C12 au cours de la différenciation myogénique, nous avons voulu étudier l'arrêt du cycle temporaire en quiescence dans les T98G *TRIP4*-KO afin de déterminer si l'absence d'ASC-1 pouvait perturber la sortie du cycle cellulaire dans plusieurs types cellulaires. Pour cela, nous avons induit la quiescence dans les T98G en privant les cellules de sérum pendant 72h. Alors que l'expression de p27, marqueur de quiescence, augmente fortement dans les T98G WT entre l'état de prolifération et de quiescence, nous avons pu observer un défaut marqué de l'expression de cet inhibiteur de CDK dans les T98G *TRIP4*-KO (**Figure 64**). De plus, les cellules n'exprimant pas ASC-1 surexpriment de manière significative FOXM1, la cycline A2 et PLK1 (**Figure 64**), des protéines caractéristiques de la phase G2/M. Ces résultats suggèrent que l'absence d'ASC-1 affecte la capacité des T98G à sortir du cycle cellulaire, même de manière réversible.

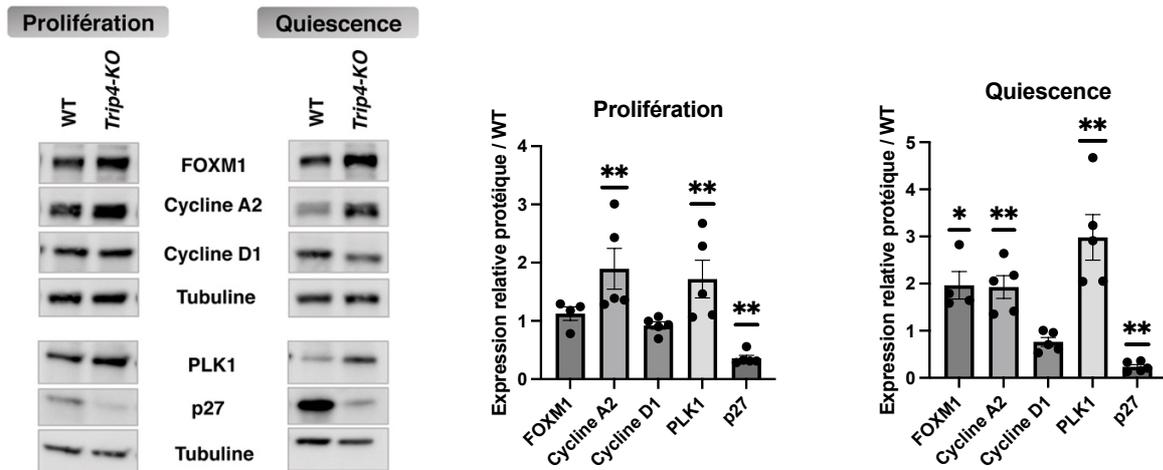


Figure 64 : L'absence d'ASC-1 perturbe l'expression des gènes cibles de FOXM1 et affecte la quiescence dans les T98G. Quantification par Western-Blot de l'expression protéique de FOXM1, cycline A2, cycline D1, PLK1 et p27 dans les T98G WT et TRIP4-KO en prolifération et en quiescence (après 72h de privation en sérum). L'expression a été normalisée par rapport à la tubuline puis rapportée au WT.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, l'identification de défauts héréditaires dans le complexe ASC-1 et leur association avec des maladies neuromusculaires congénitales monogéniques ont représenté un progrès significatif dans la caractérisation moléculaire de ces maladies rares, révélant ainsi des défauts dans la co-régulation transcriptionnelle, la régulation de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire en tant que nouveaux mécanismes pathologiques. Effectivement, les travaux précédents de mon équipe ont permis de mettre en avant le rôle central du co-régulateur transcriptionnel ASC-1 dans la physiopathologie des muscles squelettiques, par l'identification de son implication dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la croissance des cellules myogéniques (Davignon et al. 2016a; Villar-Quiles et al. 2020).

Les co-intégrateurs transcriptionnels agissent en tant que coactivateurs ou corépresseurs en intégrant les facteurs de transcription ou les récepteurs nucléaires dans des complexes multiprotéiques, et peuvent ainsi adapter la réponse cellulaire aux changements environnementaux ou moduler l'expression génique de manière spécifique à un tissu (Spiegelman et Heinrich 2004). De ce fait, élucider leur rôle physiologique peut contribuer à comprendre une variété de voies physiopathologiques et à clarifier pourquoi les défauts héréditaires d'une protéine ubiquitaire sont souvent associées à un phénotype spécifique d'un tissu.

Mes travaux de recherche réalisés au cours de ces 3 années de doctorat avaient pour objectif d'aborder, à travers un axe plus mécanistique, les rôles d'ASC-1 dans la régulation de la myogenèse et du cycle cellulaire, afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le muscle squelettique et les pathomécanismes inhérents à son absence. J'ai d'abord contribué à définir le spectre phénotype des pathologies neuromusculaires associées au complexe ASC-1 par la description de nouveaux patients, une révision de la littérature et une analyse des corrélations phénotype-génotype. J'ai ensuite mis en évidence le rôle d'ASC-1 dans la myogenèse précoce par l'identification de liens fonctionnels entre ASC-1 et les régulateurs clés de la différenciation myogénique. Enfin, j'ai approfondi l'étude fonctionnelle d'ASC-1 dans la régulation du cycle cellulaire dans divers types cellulaires. Cependant, il a également été soulevé des questions intéressantes auxquelles il n'a pas été possible de répondre dans le temps de cette thèse et qui représentent des pistes intéressantes d'investigations futures. L'interprétation et la conclusion de mes travaux de recherche ainsi qu'une ouverture sur les perspectives qu'ils apportent sont présentés à la suite de ce paragraphe.

I. Les atteintes tissulaires des pathologies neuromusculaires associées au complexe ASC-1

A. La question troublante de l'implication des motoneurones par rapport à l'atteinte musculaire primaire : Myopathie congénitale ou SMA ?

Il est important de déterminer clairement quels tissus et systèmes sont affectés chez les individus porteurs de mutations sur le gène *TRIP4* ou *ASCCI*, à savoir clarifier la question de l'implication des motoneurones par rapport à celle des muscles primaires. La réponse à cette question pourrait ne pas être simple, car le développement anténatal des motoneurones et des muscles dépend mutuellement l'un de l'autre. Effectivement, la maturation complète des muscles nécessite un contact adéquat avec les plaques motrices des motoneurones, et inversement, les signaux rétrogrades des muscles vers les motoneurones contribuent à la survie des motoneurones et à la maturation des synapses aux stades pré- et postnatal (Baudet et al. 2008). Ainsi, des défauts primaires dans les motoneurones ou les fibres musculaires peuvent entraîner une jonction neuromusculaire (NMJ) anormale sur le plan structural et/ou fonctionnel et des phénotypes qui se chevauchent, qui peuvent être particulièrement difficiles à différencier chez les nouveau-nés.

La majorité des patients avec des mutations du gène *TRIP4* présentent cliniquement, électrophysiologiquement et histopathologiquement un phénotype primaire du muscle squelettique de sévérité variable (avec ou sans atteinte du myocarde), appelé myopathie congénitale liées à ASC-1, associé à une déplétion complète ou partielle de la protéine ASC-1. Étonnamment, quatre familles partageant deux mutations du gène *TRIP4* (Knierim et al. 2016b; Töpf et al. 2021), conduisant à la surexpression d'un isoforme plus court d'ASC-1, présentaient un phénotype néonatal léthal se rapprochant cliniquement d'une maladie du motoneurone, l'amyotrophie spinale associée à des fractures osseuses congénitales. Néanmoins, les biopsies musculaires de ces patients ont révélé des fibres musculaires immatures de taille réduite et variable, compatibles avec une atteinte primaire du muscle squelettique ainsi qu'avec le rôle d'ASC-1 dans la différenciation myogénique décrit dans cette étude et dans la précédente étude menée par notre laboratoire (Davignon et al. 2016a). De plus, les cardiomyopathies rapportées

dans deux de ces quatre familles étayant également la possibilité d'une atteinte primaire des muscles striés (squelettique et cardiaque) associée. Cependant, certains patients atteints de la forme néonatale léthale présentaient des regroupements des fibres de type I, classiquement retrouvés dans les atteintes neuropathiques, et des études de neurographie évoquaient une neuropathie axonale et, pour l'un des patients, des α -motoneurones apoptotiques ont été observées dans la moelle épinière (Knierim et al. 2016b). De plus, l'un des patients plus récemment caractérisé présentait une hypoplasie cérébelleuse ainsi qu'une nécrose et une hémorragie du cortex occipital (Töpf et al. 2021). De façon intéressante, le knock-down de *trip4* chez le poisson zèbre entraîne à la fois une perturbation de la croissance des axones des α -motoneurones, des structures musculaires anormales (myotomes avec une formation de myofibrilles sévèrement réduite) et un dysfonctionnement des jonctions neuromusculaires (Knierim et al. 2016b). Ces anomalies pourraient être secondaires à une neuronopathie avec des effets en aval sur les jonctions neuromusculaires et les muscles, ou bien être compatibles avec une implication rétrograde des jonctions neuromusculaires et des motoneurones en raison d'un défaut musculaire primaire. Il n'est pas impossible que les deux mécanismes puissent coexister, bien qu'il ne puisse pas être exclu à ce stade que certains types de mutations du gène *TRIP4* soient associés à une implication préférentielle de différents tissus. Il est nécessaire d'approfondir le phénotypage des patients par des études d'électromyographie, des biopsies musculaires et de la neuroimagerie, mais aussi d'étudier la protéine ASC-1 dans un modèle neuronal afin de clarifier ce point.

Tous les patients avec des mutations du gène *ASCC1*, à l'exception d'un, partageaient un phénotype commun caractérisé par une atteinte néonatale léthale avec fractures osseuses congénitales et arthrogrypose congénitale multiple, associé à une absence complète de protéine *ASCC1* (prouvée expérimentalement ou prédite *in silico*). Lors des premières descriptions de ces patients, les diagnostics cliniques étaient de myopathie congénitale chez certains patients et de SMA chez d'autres. Effectivement, Böhm *et coll.*, avaient rapporté, dans trois familles présentant des mutations du gène *ASCC1*, des caractéristiques histopathologiques et électromyographiques myopathiques sans signes d'atteintes des motoneurones qu'ils ont associé à un diagnostic de myopathie congénitale sévère (Böhm et al. 2019). En revanche, la famille décrite par Knierim *et coll.*, présentait une réduction majeure de la taille des fibres et des regroupement des types de fibres ainsi qu'un EMG évoquant une atteinte neurogène (Knierim et al. 2016b). Dans de plus récentes études, le diagnostic de SMABF2 semble être

devenu systématique chez les patients avec des mutations du gène *ASCC1*, malgré l'absence d'études phénotypiques complémentaires dans plusieurs cas. Les descriptions récentes d'atrophie cérébrale progressive, de dilatation bilatérale des ventricules cérébraux et de perte des axones myélinisés sur une biopsie de nerf sural, rapportées chez certains patients (Lu et al. 2020; Bradinova et al. 2022; Voraberger et al. 2023), ainsi que l'absence de description d'atteintes myocardiques, soutiennent l'association des défauts d'*ASCC1* avec une atteinte neuronale. De plus, des études transcriptomiques réalisées sur des fibroblastes cutanés d'un patient porteur d'une mutation *ASCC1* ont révélé une régulation à la baisse des gènes associés à la neurogenèse, à la migration neuronale et au développement osseux (Knierim et al. 2016b). De façon surprenante, un seul patient, décrit plus récemment, avec des mutations *ASCC1* ne présentait pas le spectre phénotypique habituellement décrit mais une forme intermédiaire de myopathie congénitale sans fracture osseuse congénitale (Sharova et al. 2022). L'étude de conduction nerveuse s'était révélée normale et l'EMG avait montré un schéma myogénique, permettant ainsi d'écarter une atteinte primaire du motoneurone dans ce cas précis. Il semble donc très probable qu'*ASCC1* joue un rôle clé aussi bien dans le développement et la physiologie des muscles squelettiques que dans ceux des motoneurones et des tissus osseux.

En conséquence, nos études suggèrent qu'il est indiqué de séquencer systématiquement les gènes *TRIP4* et *ASCC1* dans les cas de myopathie congénitale ou de SMA génétiquement non caractérisées. En ce sens, ce travail aura potentiellement des retombées directes sur la santé humaine, contribuant à l'amélioration du diagnostic des patients et à l'accès au conseil génétique pour les familles.

B. Implication du complexe ASC-1 dans les pathologies neurodégénératives

Un nombre croissant d'études suggèrent que le complexe ASC-1 pourrait être impliqué dans les mécanismes sous-jacents aux maladies neurodégénératives, en particulier la sclérose latérale amyotrophique (SLA, ou maladie de Charcot). La SLA est une maladie neurodégénérative mortelle caractérisée par une paralysie progressive des muscles impliqués dans le mouvement volontaire, due à la dégénérescence des motoneurones. Plus de 25 gènes

ont été identifiés comme causes de la SLA (Peters, Ghasemi, et Brown 2015). Ils sont impliqués dans des processus tels que l'expression génique, la fonction mitochondriale, la dégradation des protéines, l'autophagie, l'apoptose et le transport nucléo-cytoplasmique (Y. R. Li et al. 2013; Paez-Colasante et al. 2015; Jovičić, Paul, et Gitler 2016; Taylor, Brown, et Cleveland 2016; Gao, Almeida, et Lopez-Gonzalez 2017).

Dans une étude réalisée en 2018, Chi et *coll.* ont étudié les fonctions de quatre protéines de liaison à l'ADN/ARN dont les défauts sont responsables de la SLA (FUS, EWSR1, TAF15 et MATR3) au sein de la machinerie RNAP II/U1 snRNP (Chi et al. 2018). Cette étude a révélé que ces quatre protéines sont nécessaires pour l'association du complexe ASC-1 avec la machinerie RNAP II/U1 snRNP.

Des cibles connues du complexe ASC-1 ont également été liés à la SLA, notamment les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Frakes et al. 2014; Zhao et al. 2015; Bhinge et al. 2017). De plus, certaines sous-unités du complexe ASC-1 sont impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, l'un des mécanismes sous-jacents aux troubles neurodégénératifs (Madabhushi, Pan, et Tsai 2014; S. J. Hill et al. 2016). Les neurones sont des cellules très actives sur le plan métabolique qui produisent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et présentent souvent une déficience de la voie de recombinaison homologue en réponse aux dommages à l'ADN, ce qui peut entraîner une accumulation de dommages à l'ADN et une dégénérescence (McMurray 2005; Lombard et al. 2005). Certains de ces dommages à l'ADN, tels que l'alkylation de l'ADN (Sedgwick 2004), nécessitent un complexe de réparation régulé par ASCC1 (Soll et al. 2018).

Enfin, il est intéressant de noter que *TRIP4* a été identifié comme un nouveau locus significatif dans le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Ruiz et al. 2014).

Nous proposons que l'étude des pathologies neuromusculaires congénitales associées au complexe ASC-1 peuvent représenter des modèles utiles pour clarifier des voies physiopathologiques impliquées dans les maladies des motoneurones au sens large, potentiellement contribuant ainsi à l'identification de cibles thérapeutiques pour ces maladies aujourd'hui sans traitement.

C. Implication du complexe ASC-1 dans le développement osseux

Les fractures osseuses congénitales, reportées chez seulement quatre familles avec des mutations du gène *TRIP4* (Knierim et al. 2016b; Töpf et al. 2021), font partie du phénotype clinique de tous les patients porteurs de mutations du gène *ASCC1* décrits à ce jour (Knierim et al. 2016b; Oliveira et al. 2017; Böhm et al. 2019; Giuffrida et al. 2020; Lu et al. 2020; Rosano et al. 2021; Bradinova et al. 2022; Marais et al. 2022; Voraberger et al. 2023), à l'exception d'un seul cas (Sharova et al. 2022). Bien que des fractures prénatales aient été signalées de manière non spécifique dans d'autres formes de maladies musculaires congénitales (Ryan et al. 2001; Garcia-Angarita et al. 2009; Ravenscroft et al. 2013), leur fréquence chez les patients présentant des mutations du gène *ASCC1* suggère que, dans ce contexte, elles ne sont pas une conséquence aspécifique de l'immobilité fœtale mais directement liées à un rôle de la sous-unité ASCC1 dans le développement osseux. Des études transcriptomiques réalisées sur des fibroblastes cutanés d'un patient porteur d'une mutation *ASCC1* ont révélé une régulation à la baisse des gènes associés au développement osseux tels que *TNFRSF11B*, *SASSF2* et *STCI* (Knierim et al. 2016b). De plus, il a été démontré que l'absence d'ASCC1 inhibe la transactivation d'AP-1 par le complexe ASC-1 (Jung et al. 2002), et plusieurs facteurs de transcription de la famille AP-1 se sont avérés jouer un rôle dans le développement osseux (Wagner 2002; Kawamata et al. 2008; Bozec et al. 2010; Lerbs et al. 2020). Une récente étude a rapporté pour la première fois le phénotype osseux microstructural chez un patient porteur d'une mutation *ASCC1*, avec un volume et un renouvellement de l'os trabéculaire extrêmement faible et des fibrilles de collagène qui semblaient désorganisées (Voraberger et al. 2023). Des analyses transcriptomiques réalisées sur les fibroblastes cutanés de ce patient ont révélé que l'absence d'ASCC1 est associée à une régulation négative de *RUNX2*, le régulateur principal de l'ostéoblastogenèse, et *SERPINF1*, qui est impliqué dans la différenciation des ostéoblastes et des adipocytes. Enfin, l'inactivation d'*ASCC1* dans des cellules stromales mésenchymateuses humaines supprime leur capacité de différenciation en ostéoblastes tout en augmentant leur différenciation en adipocytes (Voraberger et al. 2023).

Il semble donc établi à présent qu'ASCC1 est indispensable au développement et la maintenance du tissu osseux, alors que ceci ne semble pas être le cas pour ASC-1.

II. ASC-1 dans la régulation de l'expression, de l'activité et de la localisation des MRFs

Les facteurs de régulation myogéniques sont des acteurs clés du processus de myogenèse. Malgré une quantité considérable d'études concernant ces facteurs, leurs mécanismes d'action exacts ne sont toujours pas complètement compris. De nombreux mécanismes de régulation positifs et négatifs existent, soit entre les facteurs de régulation myogénique eux-mêmes, soit entre ces facteurs et d'autres protéines. De plus, des facteurs en amont et des signaux sont également impliqués dans le contrôle de l'expression des MRFs dans les différentes cellules myogéniques prénatales et post natales. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier pour la première fois la protéine ASC-1 comme un régulateur de l'expression, de l'activité et de la localisation de certains MRFs.

A. ASC-1 est un partenaire de MyoD et régule son expression et son activité

Au cours de mes travaux, j'ai montré qu'ASC-1 régule négativement l'expression protéique de MyoD en prolifération et en différenciation, et son absence est associée à une augmentation de MyoD dans les cellules myogéniques. Ce résultat est particulièrement surprenant puisque j'ai parallèlement montré qu'ASC-1 est nécessaire pour l'activité de MyoD dans les myoblastes. Bien qu'il ne puisse pas être exclu que la surexpression de MyoD en absence d'ASC-1 soit compensatrice du défaut d'activité de MyoD dans les C2C12 *Trip4-KO* ou secondaire à d'autres niveaux de régulation induits par l'absence de cette protéine, ASC-1 pourrait avoir un rôle plus direct sur l'expression de MyoD. Effectivement, il est possible qu'ASC-1 régule directement l'expression protéique de MyoD par son interaction avec une forme phosphorylée, que nous avons identifiée dans cette étude par des expériences d'immunoprécipitation, et que par conséquent l'absence d'ASC-1 affecte la stabilité et la demi-vie de MyoD. En effet, MyoD peut être la cible directe de phosphorylations qui vont réguler son activité ou sa stabilité. Par exemple, la phosphorylation de MyoD au niveau de la Sérine 200 joue un rôle crucial dans la modulation de sa demi-vie et de son activité au cours de la

prolifération des myoblastes (Song et al. 1998; Kitzmann et al. 1999). Cette phosphorylation de la Sérine 200 de MyoD par le complexe Cdk2/Cycline E stimule sa dégradation par le système ubiquitine protéasome lors de la phase G1 du cycle cellulaire (L. A. Tintignac et al. 2000). L'inhibiteur de CDK p57 peut inhiber les complexes CDK/Cyclines qui contrôlent la phase G1 et ainsi inhiber la dégradation de MyoD dépendante de la phosphorylation, mais aussi stabiliser MyoD indépendamment de son état de phosphorylation par une interaction physique lors de la différenciation myogénique (Emmanuel G. Reynaud et al. 2000). La surexpression de p57 observée dans nos résultats RNAseq des C2C12 *Trip4*-KO à J3 pourrait donc augmenter la stabilité de MyoD et ainsi être responsable de sa surexpression au cours de la différenciation myogénique. Néanmoins, MyoD est la cible d'autres phosphorylations (L. N. Liu, Dias, et Houghton 1998; Song et al. 1998; Batonnet-Pichon et al. 2006; Jo, Cho, et Jo 2011; Simonatto et al. 2013), activatrices ou inhibitrices, et il serait important par la suite de déterminer avec qu'elle forme phosphorylée de MyoD interagit ASC-1 afin d'approfondir le lien fonctionnel entre ces deux protéines.

Nos expériences de luciférase ont aussi montré qu'ASC-1 transactive MyoD dans les myoblastes murins. Néanmoins, nos analyses transcriptomiques ont révélé que son absence n'a pas un effet unidirectionnel sur l'expression des gènes cibles de MyoD, mais perturbe positivement ou négativement l'expression de ces gènes. En réalisant une analyse bio-informatique d'ontologie des gènes significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq, dans les C2C12 WT et *Trip4*-KO en différenciation (trois jours après changement de milieu), nous avons constaté que les gènes cibles de MyoD surexprimés en absence d'ASC-1 sont principalement des gènes du cycle cellulaire, et que ceux sous-exprimés sont impliqués dans le développement musculaire. MyoD, qui est exprimé à la fois dans les cellules indifférenciées et différenciées (P. L. Puri et Sartorelli 2000), agit pour réguler négativement la transcription de certains gènes dans les myoblastes avant l'induction de la différenciation, puis se dissocie des facteurs répressifs, tel que HDAC1 (Asoke Mal et Harter 2003), afin de réguler positivement l'expression d'autres gènes lors de l'initiation de la différenciation musculaire (Berkes et Tapscott 2005). Nous proposons l'hypothèse qu'ASC-1 peut exercer une activité co-activatrice ou co-répressive sur MyoD en fonction des gènes ciblés ou du timing de différenciation. Une étape cruciale pour bien définir le rôle d'ASC-1 sur l'activité de MyoD sera d'approfondir ces études fonctionnelles en intégrant une approche plus précise de la temporalité et en réalisant

des expériences de ChIP en prolifération, lors de la myogenèse précoce et de la myogenèse tardive.

B. L'absence d'ASC-1 perturbe l'expression et la localisation subcellulaire de Myogénine

Mes travaux ont montré qu'ASC-1 est nécessaire à la transactivation de MyoD dans les myoblastes. MyoD étant responsable de l'induction de l'expression de Myogénine, ce résultat, combiné au défaut de différenciation myogénique observé en absence d'ASC-1, suggérait un effet négatif du knock-out de *Trip4* sur l'expression de Myogénine au cours de la myogenèse. Il était donc inattendu d'observer une surexpression de Myogénine dans les C2C12 *Trip4*-KO en différenciation par rapport aux cellules WT à partir de J2. L'expression de Myogénine au cours de la différenciation myogénique est régulée positivement par MyoD (Thayer et al. 1989) et négativement par MRF4 (W. Zhang, Behringer, et Olson 1995), qui est très largement sous-exprimé dans les résultats RNAseq des C2C12 *Trip4*-KO à J3. Ainsi, la surexpression de MyoD associée à la sous-expression de MRF4 au cours de la différenciation myogénique en absence d'ASC-1 pourraient être responsables de la surexpression de Myogénine.

De plus, il était surprenant que la surexpression de Myogénine dans les C2C12 *Trip4*-KO soit associée à une absence totale d'expression de la MyHC. Mais les expériences d'immunofluorescence ont révélé que l'absence d'ASC-1 affecte la distribution subcellulaire de Myogénine, et pas celle de MyoD, dans les C2C12 en différenciation. Ainsi, la rétention cytoplasmique de Myogénine observée dans les C2C12 *Trip4*-KO peut empêcher son activité transcriptionnelle dans le noyau et expliquer pourquoi, malgré sa surexpression, Myogénine n'est pas capable d'activer la transcription de la MyHC au cours de la différenciation myogénique. Même si très peu d'études mécanistiques sur la localisation subcellulaire de Myogénine ont été réalisées à ce jour, une étude a établi que les cellules indifférenciées expriment Myogénine dans le cytoplasme avec une distribution périnucléaire et que, après l'induction de la différenciation, elle se concentre progressivement dans le noyau (Ferri et al. 2009). Une autre étude a montré que le répresseur myogénique I-mfa est capable de s'associer aux MRFs, avec une préférence pour Myogénine et Myf5, et de les retenir dans le cytoplasme (C.-M. A. Chen et al. 1996). Il est intéressant de noter que ce répresseur myogénique était surexprimé dans nos résultats RNAseq des C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT à J3 (log (FC)

= 2,57, p-value = 1,415e-07), ce qui pourrait expliquer l'expression majoritairement cytoplasmique de Myogénine en absence l'ASC-1 au cours de la différenciation. Il serait donc intéressant par la suite d'étayer cette hypothèse par des études fonctionnelles, en approfondissant l'effet de l'absence d'ASC-1 sur l'expression de I-mfa et sur la co-localisation de Myogénine avec ce répresseur myogénique dans les différentes conditions expérimentales.

III. ASC-1 transactive des facteurs de transcription ubiquitaires : SRF et le récepteur aux androgènes

Le complexe ASC-1 a initialement été caractérisé comme capable de transactiver, *in vitro*, le facteur de transcription SRF dans des cellules HeLa (Jung et al. 2002) et mes travaux de recherche ont montré pour la première fois qu'ASC-1 transactive le facteur de transcription SRF par une interaction directe, *in vivo*, dans les cellules myogéniques.

SRF agit principalement en partenariat avec deux familles de cofacteurs, les TCF et les MRTFs, qui interagissent de manière compétitive avec le domaine de liaison à l'ADN de SRF (Miralles et al. 2003; Zaromytidou, Miralles, et Treisman 2006). Une récente étude a montré que les MRTFs favorisent l'activation transcriptionnelle des gènes du cytosquelette et de la contractilité, alors que les TCFs favorisent l'activation transcriptionnelle des gènes de la prolifération (Gualdrini et al. 2016). Alors que nous avons montré dans cette étude que l'absence d'ASC-1 entraînait un fort défaut d'expression des gènes cibles de SRF impliqués dans la contraction et la structure du muscle, nous avons aussi observé une surexpression de certaines cibles de SRF impliqués dans les processus d'adhésion. Afin d'approfondir les études fonctionnelles de l'interaction entre ASC-1 et SRF, il serait intéressant d'étudier l'interaction entre ASC-1, les TCFs et les MRTFs en prolifération et en différenciation, et de vérifier si l'absence d'ASC-1 favorise l'association de SRF aux TCFs ou aux MRTFs.

SRF est un facteur de transcription ubiquitaire qui joue un rôle essentiel dans la formation du cœur. La délétion de SRF entraîne des anomalies cardiaques telles qu'un myocarde anormalement mince, des cavités cardiaques dilatées et un septum interventriculaire désorganisé (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004). Une étude a montré que l'inactivation

de SRF dans le cœur adulte chez la souris conduit à une insuffisance cardiaque avec cardiopathie dilatée (Parlakian et al. 2005). Ainsi, les cas de cardiomyopathies dilatées et de malformations cardiaques reportés chez certains patients avec des mutations du gène *TRIP4* (Davignon et al. 2016a; Knierim et al. 2016b; Villar-Quiles et al. 2020; Marais et al. 2022) et le rôle d'ASC-1 en tant que coactivateur de SRF suggèrent que l'absence d'ASC-1 pourrait initier ou contribuer à des processus majeurs dans le processus de remodelage cardiaque pathologique.

D'autre part, alors qu'une seule étude avait suggéré qu'ASC-1 pouvait fonctionner comme co-régulateur du récepteur aux androgènes et jouer un rôle dans les fonctions testiculaires (Lee et al. 2002), mes travaux ont pour la première fois permis d'identifier ASC-1 comme partenaire et transactivateur du récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques.

Le récepteur aux androgènes est un facteur de transcription, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui médie les effets des androgènes (Lubahn et al. 1988). Dans le muscle, AR joue un rôle direct dans la transcription de certains gènes impliqués dans la différenciation et la fonction musculaire (Wyce et al. 2010) mais malgré les nombreuses études réalisées chez l'homme (J.-G. Yu et al. 2014) et le rongeur (Chambon et al. 2010; Fernando et al. 2010; J. Kim et al. 2019), les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels AR affectent l'homéostasie des myofibrilles des membres restent mal compris. Une très récente étude a permis d'identifier un certain nombre de gènes dont l'expression est directement régulée par AR, ces derniers codant des protéines clés de la contraction musculaire et des enzymes métaboliques (Ghaibour et al. 2023). Nous avons identifié un certain nombre de ces gènes cibles d'AR parmi les gènes significativement sous-régulés (RNAseq) dans les C2C12 *Trip4*-KO par rapport aux WT à J3, et particulièrement ceux impliqués dans le cytosquelette contractile (*Tnni2*, *Lmod3*, *Tcap*) et la génération de force musculaire (*Mylk4* et *Myom1*), étayant ainsi un rôle d'ASC-1 sur l'activité du récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques.

Cette fonction d'ASC-1 pourrait aussi contribuer à expliquer les phénotypes neuronaux décrits chez certains patients avec des mutations *TRIP4*. En effet, la surexpression du récepteur aux androgènes de type sauvage dans le muscle squelettique de souris transgéniques aboutit à un phénotype neuromusculaire caractéristique de la Maladie de Kennedy (ou amyotrophie spinale bulbaire), une maladie des motoneurons (Monks et al. 2008).

Ainsi, nous proposons que l'étude du rôle d'ASC-1 sur l'activité du récepteur aux androgènes nécessite d'être approfondie et pourrait permettre d'étendre la compréhension de mécanismes pathologiques impliqués dans d'autres maladies que les myopathies congénitales.

IV. Interaction entre ASC-1, ASCC2, SRF, MyoD et AR : un ou plusieurs complexes ?

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier pour la première fois ASC-1 et ASCC2 comme partenaires communs de MyoD, SRF et du récepteur aux androgènes dans les cellules myogéniques. En revanche, nous ne savons pas si ces interactions permettent la formation d'un complexe unique sur les promoteurs de certains gènes cibles communs, ou bien si différents complexes indépendants se forment avec ASC-1 et/ou ASCC2.

Des études ont montré que les sites de liaison de SRF (SRE) sont fréquemment situés à proximité des sites de liaison de MyoD (boîtes E) dans les régions régulatrices des gènes du muscle squelettique et que MyoD et SRF peuvent coopérer pour activer l'expression de certains gènes musculaires (Sartorelli, Webster, et Kedes 1990; Catala et al. 1995). De plus, SRF et les MRFs sont capables d'interagir par des interactions protéine-protéine dans les cellules musculaires (Groisman et al. 1996). D'autres études ont démontré que d'autres cofacteurs de SRF tels que SAP-1 et MASTR peuvent coopérer avec les MRFs afin de stimuler l'expression des gènes du muscle squelettique (Biesiada et al. 1999; Meadows et al. 2008). L'identification d'ASC-1 comme partenaire commun de SRF et MyoD suggère que ASC-1 puisse former un complexe avec ces deux facteurs de transcription sur les promoteurs de leurs gènes cibles communs. Il serait intéressant par la suite de réaliser des expériences d'immunoprécipitation et de ChIP dans les C2C12 *Trip4*-KO afin de déterminer si l'absence d'ASC-1 perturbe la coopération entre MyoD et SRF dans l'activation de la transcription de ces gènes.

Une étude a montré que AR et SRF s'associent *in vitro* et qu'ils stimulent ensemble la transcription du gène de l'alpha-actine squelettique. Ainsi, le récepteur aux androgènes est capable d'activer les gènes myogéniques dépourvus de sites ARE via son recrutement par le facteur de transcription SRF (Vlahopoulos et al. 2005). Dans l'étude citée, l'effet synergique

sur l'activité du promoteur de l'alpha actine squelettique est perturbé par un certain nombre de mutations de AR ou SRF, sans affecter l'activation des promoteurs répondant spécifiquement à SRF ou AR (SRE et ARE), suggérant que cette interaction est médiée par une troisième protéine. L'identification d'ASC-1 comme partenaire commun de SRF et AR dans les cellules myogéniques pourrait confirmer cette hypothèse.

Enfin, des études avaient suggéré un lien possible entre la signalisation du récepteur aux androgènes et MyoD (Piovesan et al. 2013; MacKrell et al. 2015), et il a récemment été démontré que la nalodrone, un stéroïde anabolisant, favorise la formation de complexes protéiques formés par AR, MyoD et Numb (X.-H. Liu et al. 2018). Dans notre étude, nous avons rapporté pour la première fois la co-immunoprécipitation d'AR avec MyoD sans traitement préalable des cellules myogéniques. ASC-1, en tant que partenaire commun, pourrait jouer un rôle crucial dans le recrutement du récepteur aux androgènes, afin de permettre sa collaboration avec SRF et MyoD.

V. ASC-1 dans la régulation de la transcription des gènes du cycle cellulaire

La précédente étude menée par notre laboratoire (Villar-Quiles et al. 2020) ainsi que les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont montré qu'ASC-1 régule négativement la prolifération et l'expression d'un certain nombre de gènes du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses (T98G) et non cancéreuses (fibroblastes, C2C12).

A. Implication d'ASC-1 dans la sortie du cycle cellulaire

Les résultats obtenus lors de mon travail de thèse suggèrent que l'absence d'ASC-1 perturbe la sortie du cycle cellulaire réversible, comme observé dans les expériences de quiescence dans les T98G, et irréversible, comme montré lors du processus de différenciation dans les C2C12.

Bien que les mécanismes de régulation du cycle cellulaire par ASC-1 demeurent incompris, nos résultats ont montré qu'ASC-1 joue un rôle crucial dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques. Effectivement, la surexpression des gènes du cycle cellulaire observée au niveau transcriptomique à J3 -1 ainsi que la réactivation de l'expression protéique de KI-67 et Cycline D1 à J2 en absence d'ASC-1, ont permis de montrer que bien que les C2C12 *Trip4*-KO soient capables de sortir du cycle cellulaire en début de différenciation (absence de marquage KI-67), certaines cellules n'empruntent pas le destin myogénique et retournent dans le cycle cellulaire.

Mes études transcriptomiques réalisées sur des cellules myogéniques en différenciation et des fibroblastes en prolifération ont montré que l'absence d'ASC-1 entraîne la surexpression d'un très grand nombre de gènes du cycle cellulaire, surtout ceux des phases G2/M, qui sont des cibles du complexe répresseur DREAM lors des phases G0/G1 et du complexe activateur MMB-FOXM1 lors des phases G2/M. De plus, nous avons identifié FOXM1 comme partenaire d'ASC-1 dans la lignée T98G. Bien que nous n'ayons pas pu identifier cette interaction dans les cellules myogéniques, car l'anticorps commercial utilisé ne fonctionnait pas en Western-Blot dans les C2C12, il est possible qu'ASC-1 réprime l'activité transcriptionnelle par une interaction directe avec le facteur de transcription FOXM1 dans les fibroblastes, les myoblastes et les cellules T98G. Il est aussi possible qu'ASC-1 régule la dynamique de formation des complexes DREAM et MMB-FOXM1 à des moments précis du cycle cellulaire, et ainsi que son absence favorise l'association du complexe MMB-FOXM1, entraînant ainsi une surexpression des gènes des phases G2/M du cycle cellulaire. Enfin, il est probable que la surexpression de ces gènes du cycle cellulaire soit responsable de l'incapacité des cellules C2C12 et T98G à maintenir la sortie du cycle cellulaire, tant pour le processus de quiescence cellulaire que pour le processus de différenciation.

A ce jour, le rôle de FOXM1 dans le muscle n'a quasiment jamais été étudié, à l'exception d'une très récente étude qui a montré que la perte de FOXM1 entraîne une atrophie musculaire et affecte la régénération musculaire, et que le défaut ainsi que la surexpression de FOXM1 perturbe la maintenance des cellules souches musculaires (Z. Chen et al. 2020). Ainsi, ce facteur de transcription, grandement étudié pour son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'auto-renouvellement et de la tumorigenèse, pourrait donc avoir un rôle crucial dans le développement musculaire que nos études contribuent à caractériser.

B. ASC-1 : oncogène ou suppresseur de tumeur ?

La dérégulation de la prolifération est une caractéristique principale du cancer et il a été démontré qu'ASC-1 est fortement exprimé dans les lignées cellulaires et les tissus tumoraux de mélanome humain (Hao et al. 2018), de cancer du col de l'utérus (Che et al. 2019), de cancer colorectal (Yang et al. 2020) et de gliome (W. Li et al. 2021). Il a aussi été démontré que le knock-down de *TRIP4* dans les cellules tumorales permet de réduire la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Hao et al. 2018; Che et al. 2019; W. Li et al. 2021).

Cela semble contradictoire avec nos données montrant une régulation négative de la prolifération cellulaire par ASC-1. Cependant, il est concevable que le complexe ASC-1, en tant que co-intégrateur transcriptionnel, n'ait pas seulement un rôle direct unidirectionnel, mais, en fonction de l'environnement cellulaire, de ses modifications post-traductionnelles et de son association avec différentes protéines, puisse moduler de manière différentielle diverses voies dans différents types cellulaires. Par exemple, l'ubiquitylation d'ASC-1 favorise la transactivation du récepteur α des œstrogènes, essentielle à la prolifération des cellules de cancer du sein (Yoo et al. 2014). Dans les cellules malignes cervicales, ASC-1 favorise la prolifération des cellules cancéreuses en activant les voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT et en régulant l'expression de hTERT, réduisant ainsi la radiosensibilité (Che et al. 2019). Dans le mélanome, ASC-1 favorise la croissance tumorale en coréglant l'expression de cytokines pro-inflammatoires COX-2/iNOS avec p300 (Hao et al. 2018).

Aussi, nous avons nous-même observé une variabilité intrafamiliale quant à l'effet de l'absence d'ASC-1 sur l'expression des gènes du cycle cellulaire dans les études transcriptomiques réalisées sur les fibroblastes de patients, suggérant que d'autres régulateurs sont impliqués dans cette voie de signalisation ou que des mécanismes de compensation peuvent être mis en place par la cellule en fonction du contexte génétique. Ainsi, il est possible qu'ASC-1 puisse avoir un effet oncogène dans certaines cellules et un rôle suppresseur de tumeur dans d'autres cellules, de manière dépendante du paysage génétique.

Enfin, nous avons constaté au cours de cette étude que l'absence d'ASC-1 entraîne la surexpression de gènes cibles du complexe FOXM1-MMB en prolifération et en quiescence

ainsi qu'une surexpression de FOXM1 lui-même en condition de quiescence, et nous avons identifié ASC-1 comme partenaire de FOXM1 dans la lignée cellulaire T98G. Nos résultats suggèrent donc qu'ASC-1 régule négativement l'expression et l'activité de FOXM1 par une interaction directe dans les cellules prolifératives. Le facteur de transcription FOXM1 contribue de manière significative à la tumorigenèse et à la progression du cancer. Il est fortement surexprimé dans de nombreux cancers humains tels que le cancer de l'ovaire, le cancer du sein, le cancer de la prostate, le carcinome hépatocellulaire, l'angiosarcome, le cancer colorectal, le mélanome, le cancer du poumon et le cancer gastrique (Okada et al. 2013; Kong et al. 2014; Ito, Kohashi, Yamada, Iwasaki, et al. 2016; Ito, Kohashi, Yamada, Maekawa, et al. 2016; H. Zhang et al. 2016; Abdeljaoued et al. 2017; Egawa et al. 2017; Y. Liu et al. 2017; Tassi et al. 2017). Des études ont montré que l'inhibition de FOXM1 dans les cellules cancéreuses entraînait une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire, des métastases, de l'angiogenèse et de la résistance aux médicaments (Jiang et al. 2014; C. Yu et al. 2015; K. Wang et al. 2016; Zhong et al. 2017). Ainsi, approfondir les études fonctionnelles de la régulation de l'activité de FOXM1 par ASC-1 pourrait permettre le développement de nouvelles thérapies dans les cancers où FOXM1 est fortement exprimé.

CONCLUSION

Mes travaux de recherche portant sur l'étude de la régulation de la myogenèse et du cycle cellulaire dans des cellules musculaires et non musculaires m'ont permis de mettre en évidence plusieurs rôles du co-régulateur transcriptionnel ASC-1 dans ces processus.

Dans un premier temps, j'ai contribué à clarifier les bases moléculaires et les corrélations phénotype-génotype d'une nouvelle famille de maladies neuromusculaires congénitales, avec des retombées directes en santé humaine (amélioration du diagnostic).

Dans un second temps, j'ai mis en évidence pour la première fois le rôle d'ASC-1 dans les étapes précoces de la myogenèse en caractérisant des liens fonctionnels entre ASC-1 et les régulateurs clés de la différenciation myogénique : SRF, MyoD, Myogénine et AR. J'ai aussi montré que l'absence d'ASC-1 perturbe des mécanismes non spécifiques du muscle, tel que la sortie du cycle cellulaire. Ainsi, mes travaux ont permis de caractériser ASC-1 en tant que régulateur de mécanismes cellulaires clés, tels que la myogenèse et le cycle cellulaire, identifiant ainsi de nouvelles voies physiopathologiques.

Ceci contribue à faire avancer notre compréhension de ces processus et ouvre des perspectives sur l'identification de cibles thérapeutiques pour un ensemble de pathologies humaines (musculaires et de motoneurones notamment), actuellement sans traitement. Nous espérons que d'autres études fonctionnelles contribueront à clarifier les rôles moléculaires du complexe ASC-1 et fourniront une illustration supplémentaire de l'intérêt des études mécanistiques sur les troubles monogéniques rares ou ultra-rares en tant que modèle pour les voies physiopathologiques complexes sous-jacentes de nombreuses pathologies humaines plus répandues, notamment les maladies neurodégénératives et le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

Abdeljaoued, Syrine, Ilhem Bettaieb, Meher Nasri, Olfa Adouni, Aida Goucha, Olfa El Amine, Hammouda Boussen, Khaled Rahal, et Amor Gamoudi. 2017. « Overexpression of FOXM1 Is a Potential Prognostic Marker in Male Breast Cancer ». *Oncology Research and Treatment* 40 (4): 167-72. <https://doi.org/10.1159/000458156>.

Affolter, M., J. Montagne, U. Walldorf, J. Groppe, U. Kloter, M. LaRosa, et W. J. Gehring. 1994. « The Drosophila SRF Homolog Is Expressed in a Subset of Tracheal Cells and Maps within a Genomic Region Required for Tracheal Development ». *Development (Cambridge, England)* 120 (4): 743-53. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.743>.

Ahmetov, Ildus I., Olga L. Vinogradova, et Alun G. Williams. 2012. « Gene Polymorphisms and Fiber-Type Composition of Human Skeletal Muscle ». *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 22 (4): 292-303. <https://doi.org/10.1123/ijsem.22.4.292>.

Alberti, Siegfried, Sven M. Krause, Oliver Kretz, Ulrike Philippar, Thomas Lemberger, Emilio Casanova, Franziska F. Wiebel, et al. 2005. « Neuronal Migration in the Murine Rostral Migratory Stream Requires Serum Response Factor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 6148-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501191102>.

Alías, Laura, Sara Bernal, Pablo Fuentes-Prior, María Jesus Barceló, Eva Also, Rebeca Martínez-Hernández, Francisco J. Rodríguez-Alvarez, et al. 2009. « Mutation Update of Spinal Muscular Atrophy in Spain: Molecular Characterization of 745 Unrelated Patients and Identification of Four Novel Mutations in the SMN1 Gene ». *Human Genetics* 125 (1): 29-39. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0598-1>.

Almeida-Vega, Simon, Krista Catlow, Susan Kenny, Rod Dimaline, et Andrea Varro. 2009. « Gastrin Activates Paracrine Networks Leading to Induction of PAI-2 via MAZ and ASC-1 ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296 (2): G414-423. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90340.2008>.

Al-Qusairi, Lama, Norbert Weiss, Anne Toussaint, Céline Berbey, Nadia Messaddeq, Christine Kretz, Despina Sanoudou, et al. 2009. « T-Tubule Disorganization and Defective Excitation-Contraction Coupling in Muscle Fibers Lacking Myotubularin Lipid Phosphatase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18763-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900705106>.

Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschläger, U. Rüther, et A. Nordheim. 1998. « Serum Response Factor Is Essential for Mesoderm Formation during Mouse Embryogenesis ». *The EMBO Journal* 17 (21): 6289-99. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6289>.

Asp, Patrik, Diego Acosta-Alvear, Mary Tsikitis, Chris van Oevelen, et Brian David Dynlacht. 2009. « E2f3b Plays an Essential Role in Myogenic Differentiation through Isoform-Specific Gene Regulation ». *Genes & Development* 23 (1): 37-53. <https://doi.org/10.1101/gad.1727309>.

Auboef, Didier, Arnd Höning, Susan M. Berget, et Bert W. O'Malley. 2002. « Coordinate Regulation of Transcription and Splicing by Steroid Receptor Coregulators ». *Science (New*

York, N.Y.) 298 (5592): 416-19. <https://doi.org/10.1126/science.1073734>.

Bang, M. L., T. Centner, F. Fornoff, A. J. Geach, M. Gotthardt, M. McNabb, C. C. Witt, et al. 2001. « The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual Approximately 700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction with Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System ». *Circulation Research* 89 (11): 1065-72. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>.

Bartkova, J., J. Lukas, M. Strauss, et J. Bartek. 1998. « Cyclin D3: Requirement for G1/S Transition and High Abundance in Quiescent Tissues Suggest a Dual Role in Proliferation and Differentiation ». *Oncogene* 17 (8): 1027-37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202016>.

Batonnet-Pichon, Sabrina, Lionel J. Tintignac, Anna Castro, Valentina Sirri, Marie Pierre Leibovitch, Thierry Lorca, et Serge A. Leibovitch. 2006. « MyoD Undergoes a Distinct G2/M-Specific Regulation in Muscle Cells ». *Experimental Cell Research* 312 (20): 3999-4010.

Baudet, Christel, Ester Pozas, Igor Adameyko, Elisabet Andersson, Johan Ericson, et Patrik Ernfors. 2008. « Retrograde Signaling onto Ret during Motor Nerve Terminal Maturation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (4): 963-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4489-07.2008>.

Bean, Camilla, Michela Salamon, Anna Raffaello, Stefano Campanaro, Alberto Pallavicini, et Gerolamo Lanfranchi. 2005. « The Ankrd2, Cdkn1c and Calcyclin Genes Are under the Control of MyoD during Myogenic Differentiation ». *Journal of Molecular Biology* 349 (2): 349-66. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.063>.

Belaguli, N. S., L. A. Schildmeyer, et R. J. Schwartz. 1997. « Organization and Myogenic Restricted Expression of the Murine Serum Response Factor Gene. A Role for Autoregulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (29): 18222-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18222>.

Belaguli, N. S., W. Zhou, T. H. Trinh, M. W. Majesky, et R. J. Schwartz. 1999. « Dominant Negative Murine Serum Response Factor: Alternative Splicing within the Activation Domain Inhibits Transactivation of Serum Response Factor Binding Targets ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (7): 4582-91. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.4582>.

Bergstrom, Donald A., Bennett H. Penn, Andrew Strand, Robert L. S. Perry, Michael A. Rudnicki, et Stephen J. Tapscott. 2002. « Promoter-Specific Regulation of MyoD Binding and Signal Transduction Cooperate to Pattern Gene Expression ». *Molecular Cell* 9 (3): 587-600. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00481-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00481-1).

Bergstrom, Donald A., et Stephen J. Tapscott. 2001. « Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (7): 2404-12. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.7.2404-2412.2001>.

Berkes, Charlotte A., et Stephen J. Tapscott. 2005. « MyoD and the Transcriptional Control of Myogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16 (4-5): 585-95.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.006>.

Bhinghe, Akshay, Seema C. Namboori, Xiaoyu Zhang, Antonius M. J. VanDongen, et Lawrence W. Stanton. 2017. « Genetic Correction of SOD1 Mutant iPSCs Reveals ERK and JNK Activated AP1 as a Driver of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Stem Cell Reports* 8 (4): 856-69. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.019>.

Biesiada, E., Y. Hamamori, L. Kedes, et V. Sartorelli. 1999. « Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Proteins and Sp1 Interact as Components of a Multiprotein Transcriptional Complex Required for Activity of the Human Cardiac Alpha-Actin Promoter ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (4): 2577-84. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2577>.

Black, B. L., J. D. Molkenin, et E. N. Olson. 1998. « Multiple Roles for the MyoD Basic Region in Transmission of Transcriptional Activation Signals and Interaction with MEF2 ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (1): 69-77. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.1.69>.

Böhm, Johann, Edoardo Malfatti, Emily Oates, Kristi Jones, Guy Brochier, Anne Boland, Jean-François Deleuze, Norma Beatriz Romero, et Jocelyn Laporte. 2019. « Novel ASCC1 Mutations Causing Prenatal-Onset Muscle Weakness with Arthrogryposis and Congenital Bone Fractures ». *Journal of Medical Genetics* 56 (9): 617-21. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105390>.

Bönnemann, Carsten G., Ching H. Wang, Susana Quijano-Roy, Nicolas Deconinck, Enrico Bertini, Ana Ferreiro, Francesco Muntoni, et al. 2014. « Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies ». *Neuromuscular disorders: NMD* 24 (4): 289-311. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.12.011>.

Bozec, Aline, Latifa Bakiri, Maria Jimenez, Thorsten Schinke, Michael Amling, et Erwin F. Wagner. 2010. « Fra-2/AP-1 Controls Bone Formation by Regulating Osteoblast Differentiation and Collagen Production ». *The Journal of Cell Biology* 190 (6): 1093-1106. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002111>.

Bradinova, Irena, Silvia Andonova, Radoslava Vazharova, Stiliyana Tomova, Lubomir Balabanski, et Alexey Savov. 2022. « Spinal Muscular Atrophy with Congenital Bone Fractures 2 Caused by a Rare Loss-of-Function ASCC1 Gene Mutation in Two Bulgarian Roma Patients ». *Clinical Genetics* 102 (1): 78-79. <https://doi.org/10.1111/cge.14130>.

Braun, T., et H. H. Arnold. 1995. « Inactivation of Myf-6 and Myf-5 Genes in Mice Leads to Alterations in Skeletal Muscle Development ». *The EMBO Journal* 14 (6): 1176-86. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07101.x>.

Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, et H. H. Arnold. 1989. « A Novel Human Muscle Factor Related to but Distinct from MyoD1 Induces Myogenic Conversion in 10T1/2 Fibroblasts ». *The EMBO Journal* 8 (3): 701-9. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03429.x>.

Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold, et R. Jaenisch. 1992. « Targeted Inactivation of the

Muscle Regulatory Gene Myf-5 Results in Abnormal Rib Development and Perinatal Death ». *Cell* 71 (3): 369-82. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90507-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90507-9).

Brennan, T. J., T. Chakraborty, et E. N. Olson. 1991. « Mutagenesis of the Myogenin Basic Region Identifies an Ancient Protein Motif Critical for Activation of Myogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (13): 5675-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5675>.

Brickner, Joshua R., Jennifer M. Soll, Patrick M. Lombardi, Cathrine B. Vågbø, Miranda C. Mudge, Clement Oyeniran, Renana Rabe, et al. 2017. « A Ubiquitin-Dependent Signalling Axis Specific for ALKBH-Mediated DNA Dealkylation Repair ». *Nature* 551 (7680): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nature24484>.

Brill, G., N. Kahane, C. Carmeli, D. von Schack, Y. A. Barde, et C. Kalcheim. 1995. « Epithelial-Mesenchymal Conversion of Dermatome Progenitors Requires Neural Tube-Derived Signals: Characterization of the Role of Neurotrophin-3 ». *Development (Cambridge, England)* 121 (8): 2583-94. <https://doi.org/10.1242/dev.121.8.2583>.

Brown, L. A., S. H. Yang, A. Hair, A. Galanis, et A. D. Sharrocks. 1999. « Molecular Characterization of a Zebrafish TCF ETS-Domain Transcription Factor ». *Oncogene* 18 (56): 7985-93. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203197>.

Bruin, Alain de, Lizhao Wu, Harold I. Saavedra, Pamela Wilson, Ying Yang, Thomas J. Rosol, Michael Weinstein, Michael L. Robinson, et Gustavo Leone. 2003. « Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11): 6546-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031853100>.

Brzustowicz, L. M., T. Lehner, L. H. Castilla, G. K. Penchaszadeh, K. C. Wilhelmsen, R. Daniels, K. E. Davies, M. Leppert, F. Ziter, et D. Wood. 1990. « Genetic Mapping of Chronic Childhood-Onset Spinal Muscular Atrophy to Chromosome 5q11.2-13.3 ». *Nature* 344 (6266): 540-41. <https://doi.org/10.1038/344540a0>.

Buchwalter, Gilles, Christian Gross, et Bohdan Wasylyk. 2004. « Ets Ternary Complex Transcription Factors ». *Gene* 324 (janvier): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.028>.

Cao, Yi, Roshan M. Kumar, Bennett H. Penn, Charlotte A. Berkes, Charles Kooperberg, Laurie A. Boyer, Richard A. Young, et Stephen J. Tapscott. 2006. « Global and Gene-Specific Analyses Show Distinct Roles for Myod and Myog at a Common Set of Promoters ». *The EMBO Journal* 25 (3): 502-11. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600958>.

Cao, Yi, Zizhen Yao, Deepayan Sarkar, Michael Lawrence, Gilson J. Sanchez, Maura H. Parker, Kyle L. MacQuarrie, et al. 2010. « Genome-Wide MyoD Binding in Skeletal Muscle Cells: A Potential for Broad Cellular Reprogramming ». *Developmental Cell* 18 (4): 662-74. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.014>.

Carnac, G., L. Fajas, A. L'honoré, C. Sardet, N. J. Lamb, et A. Fernandez. 2000. « The

Retinoblastoma-like Protein P130 Is Involved in the Determination of Reserve Cells in Differentiating Myoblasts ». *Current Biology: CB* 10 (9): 543-46. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00471-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00471-1).

Cassandrini, Denise, Rosanna Trovato, Anna Rubegni, Sara Lenzi, Chiara Fiorillo, Jacopo Baldacci, Carlo Minetti, et al. 2017. « Congenital Myopathies: Clinical Phenotypes and New Diagnostic Tools ». *Italian Journal of Pediatrics* 43 (1): 101. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0419-z>.

Catala, F., R. Wanner, P. Barton, A. Cohen, W. Wright, et M. Buckingham. 1995. « A Skeletal Muscle-Specific Enhancer Regulated by Factors Binding to E and CArG Boxes Is Present in the Promoter of the Mouse Myosin Light-Chain 1A Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (8): 4585-96. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4585>.

Cen, Bo, Ahalya Selvaraj, Rebecca C. Burgess, Johann K. Hitzler, Zhigui Ma, Stephan W. Morris, et Ron Prywes. 2003. « Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (18): 6597-6608. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003>.

Cenciarelli, C., F. De Santa, P. L. Puri, E. Mattei, L. Ricci, F. Bucci, A. Felsani, et M. Caruso. 1999. « Critical Role Played by Cyclin D3 in the MyoD-Mediated Arrest of Cell Cycle during Myoblast Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (7): 5203-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.5203>.

Chai, J., et A. S. Tarnawski. 2002. « Serum Response Factor: Discovery, Biochemistry, Biological Roles and Implications for Tissue Injury Healing ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 53 (2): 147-57.

Chambon, Céline, Delphine Duteil, Alban Vignaud, Arnaud Ferry, Nadia Messaddeq, Rocco Malivindi, Shigeaki Kato, Pierre Chambon, et Daniel Metzger. 2010. « Myocytic Androgen Receptor Controls the Strength but Not the Mass of Limb Muscles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32): 14327-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009536107>.

Chang, Tracy, et Maria Gieron-Korthals. 2011. « Spinal Muscular Atrophy: An Update ». *Fetal and Pediatric Pathology* 30 (2): 130-36. <https://doi.org/10.3109/15513815.2010.524692>.

Charvet, Claude, Christophe Houbbron, Ara Parlakian, Julien Giordani, Charlotte Lahoute, Anne Bertrand, Athanassia Sotiropoulos, et al. 2006. « New Role for Serum Response Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-like Growth Factor 1 Pathways ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6664-74.

Che, Yilin, Yizhuo Li, Fufu Zheng, Kun Zou, Zongjuan Li, Manyu Chen, Sheng Hu, et al. 2019. « TRIP4 Promotes Tumor Growth and Metastasis and Regulates Radiosensitivity of Cervical Cancer by Activating MAPK, PI3K/AKT, and hTERT Signaling ». *Cancer Letters* 452 (juin): 1-13.

Chen, C.-M. Amy, Norbert Kraut, Mark Groudine, et Harold Weintraub. 1996. « I-Mf, a Novel Myogenic Repressor, Interacts with Members of the MyoD Family ». *Cell* 86 (5): 731-41. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80148-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80148-8).

Chen, G., et E. Y. Lee. 1999. « Phenotypic Differentiation without Permanent Cell-Cycle Arrest by Skeletal Myocytes with Deregulated E2F-1 ». *DNA and Cell Biology* 18 (4): 305-14. <https://doi.org/10.1089/104454999315367>.

Chen, Zhe, Lei Li, Shuangnian Xu, Zhilong Liu, Chengfang Zhou, Zhigang Li, Yuanyuan Liu, et al. 2020. « A Cdh1–FoxM1–Apc axis controls muscle development and regeneration ». *Cell Death & Disease* 11 (3): 180. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2375-6>.

Cheung, Tom H., et Thomas A. Rando. 2013. « Molecular Regulation of Stem Cell Quiescence ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (6): 329-40. <https://doi.org/10.1038/nrm3591>.

Chi, Binkai, Jeremy D. O’Connell, Alexander D. Iocolano, Jordan A. Coady, Yong Yu, Jaya Gangopadhyay, Steven P. Gygi, et Robin Reed. 2018. « The Neurodegenerative Diseases ALS and SMA Are Linked at the Molecular Level via the ASC-1 Complex ». *Nucleic Acids Research* 46 (22): 11939-51. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1093>.

Choi, J., M. L. Costa, C. S. Mermelstein, C. Chagas, S. Holtzer, et H. Holtzer. 1990. « MyoD Converts Primary Dermal Fibroblasts, Chondroblasts, Smooth Muscle, and Retinal Pigmented Epithelial Cells into Striated Mononucleated Myoblasts and Multinucleated Myotubes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (20): 7988-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.7988>.

Chu, Miensheng, Carol C. Gregorio, et Christopher T. Pappas. 2016. « Nebulin, a multi-functional giant ». Édité par Stan L. Lindstedt et Hans H. Hoppeler. *Journal of Experimental Biology* 219 (2): 146-52. <https://doi.org/10.1242/jeb.126383>.

Ciavarra, Giovanni, Andrew T. Ho, David Cobrinik, et Eldad Zacksenhaus. 2011. « Critical Role of the Rb Family in Myoblast Survival and Fusion ». *PloS One* 6 (3): e17682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017682>.

Collins, Charlotte A., Irwin Olsen, Peter S. Zammit, Louise Heslop, Aviva Petrie, Terence A. Partridge, et Jennifer E. Morgan. 2005. « Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche ». *Cell* 122 (2): 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.010>.

Corbeil, H. B., P. Whyte, et P. E. Branton. 1995. « Characterization of Transcription Factor E2F Complexes during Muscle and Neuronal Differentiation ». *Oncogene* 11 (5): 909-20.

Cowling, Belinda S., Anne Toussaint, Jean Muller, et Jocelyn Laporte. 2012. « Defective Membrane Remodeling in Neuromuscular Diseases: Insights from Animal Models ». *PLoS Genetics* 8 (4): e1002595. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002595>.

Dalton, S., et R. Treisman. 1992. « Characterization of SAP-1, a Protein Recruited by Serum

Response Factor to the c-Fos Serum Response Element ». *Cell* 68 (3): 597-612. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90194-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90194-h).

Dango, Sebastian, Nima Mosammaparast, Mathew E. Sowa, Li-Jun Xiong, Feizhen Wu, Keyjung Park, Mark Rubin, Steve Gygi, J. Wade Harper, et Yang Shi. 2011. « DNA Unwinding by ASCC3 Helicase Is Coupled to ALKBH3-Dependent DNA Alkylation Repair and Cancer Cell Proliferation ». *Molecular Cell* 44 (3): 373-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.039>.

Davignon, Laurianne, Claire Chauveau, Cédric Julien, Corinne Dill, Isabelle Duband-Goulet, Eva Cabet, Brigitte Buendia, et al. 2016a. « The Transcription Coactivator ASC-1 Is a Regulator of Skeletal Myogenesis, and Its Deficiency Causes a Novel Form of Congenital Muscle Disease ». *Human Molecular Genetics* 25 (8): 1559-73.

———. 2016b. « The Transcription Coactivator ASC-1 Is a Regulator of Skeletal Myogenesis, and Its Deficiency Causes a Novel Form of Congenital Muscle Disease ». *Human Molecular Genetics* 25 (8): 1559-73. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw033>.

Davis, R. L., P. F. Cheng, A. B. Lassar, et H. Weintraub. 1990. « The MyoD DNA Binding Domain Contains a Recognition Code for Muscle-Specific Gene Activation ». *Cell* 60 (5): 733-46. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90088-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90088-v).

Davis, R. L., et H. Weintraub. 1992. « Acquisition of Myogenic Specificity by Replacement of Three Amino Acid Residues from MyoD into E12 ». *Science (New York, N.Y.)* 256 (5059): 1027-30. <https://doi.org/10.1126/science.1317057>.

Davis, R. L., H. Weintraub, et A. B. Lassar. 1987. « Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts ». *Cell* 51 (6): 987-1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-x).

Dembour, Alexis, Anne Destrée, Marie Deprez, Hazim Kadhim, Deniz Karadurmus, Olivier Froment, Nicolas Deconinck, et Damien Lederer. 2022. « ASC1 Complex Related Conditions: Two Novel Paediatric Patients with TRIP4 Pathogenic Variants and Review of Literature ». *European Journal of Medical Genetics* 65 (4): 104469. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104469>.

Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge, et P. Leder. 1995. « Mice Lacking p21CIP1/WAF1 Undergo Normal Development, but Are Defective in G1 Checkpoint Control ». *Cell* 82 (4): 675-84. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90039-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90039-x).

Dowling, James J., Sandrine Arbogast, Junguk Hur, Darcee D. Nelson, Anna McEvoy, Trent Waugh, Isabelle Marty, et al. 2012. « Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of RYR1-related myopathy ». *Brain* 135 (4): 1115-27. <https://doi.org/10.1093/brain/aws036>.

Dowling, James J., Andrew P. Vreede, Sean E. Low, Elizabeth M. Gibbs, John Y. Kuwada, Carsten G. Bonnemann, et Eva L. Feldman. 2009. « Loss of Myotubularin Function Results in

T-Tubule Disorganization in Zebrafish and Human Myotubular Myopathy ». *PLoS Genetics* 5 (2): e1000372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000372>.

Dowling, Paul, Ashling Holland, et Kay Ohlendieck. 2014. « Mass Spectrometry-Based Identification of Muscle-Associated and Muscle-Derived Proteomic Biomarkers of Dystrophinopathies ». *Journal of Neuromuscular Diseases* 1 (1): 15-40.

Drewett, V., A. Devitt, J. Saxton, N. Portman, P. Greaney, N. E. Cheong, T. F. Alnemri, E. Alnemri, et P. E. Shaw. 2001. « Serum Response Factor Cleavage by Caspases 3 and 7 Linked to Apoptosis in Human BJAB Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 33444-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103877200>.

Edmondson, D. G., et E. N. Olson. 1989. « A Gene with Homology to the Myc Similarity Region of MyoD1 Is Expressed during Myogenesis and Is Sufficient to Activate the Muscle Differentiation Program ». *Genes & Development* 3 (5): 628-40. <https://doi.org/10.1101/gad.3.5.628>.

———. 1993. « Helix-Loop-Helix Proteins as Regulators of Muscle-Specific Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (2): 755-58.

Egawa, Mayumi, Yuichi Yoshida, Satoshi Ogura, Tomohide Kurahashi, Takashi Kizu, Kunimaro Furuta, Yoshihiro Kamada, et al. 2017. « Increased Expression of Forkhead Box M1 Transcription Factor Is Associated with Clinicopathological Features and Confers a Poor Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology* 47 (11): 1196-1205. <https://doi.org/10.1111/hepr.12854>.

Etkin, Amit, Juan Marcos Alarcón, Stuart P. Weisberg, Khalid Touzani, Yan You Huang, Alfred Nordheim, et Eric R. Kandel. 2006. « A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context ». *Neuron* 50 (1): 127-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.013>.

Etzioni, Shulamit, Anat Yafe, Samer Khateb, Pnina Weisman-Shomer, Eyal Bengal, et Michael Fry. 2005. « Homodimeric MyoD Preferentially Binds Tetraplex Structures of Regulatory Sequences of Muscle-specific Genes* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 26805-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500820200>.

Fernando, Shannon M., Pengcheng Rao, Lee Niel, Diptendu Chatterjee, Marijana Stagljar, et D. Ashley Monks. 2010. « Myocyte Androgen Receptors Increase Metabolic Rate and Improve Body Composition by Reducing Fat Mass ». *Endocrinology* 151 (7): 3125-32. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0018>.

Ferreiro, A., B. Estournet, D. Chateau, N. B. Romero, C. Laroche, S. Odent, A. Toutain, et al. 2000. « Multi-Minicore Disease--Searching for Boundaries: Phenotype Analysis of 38 Cases ». *Annals of Neurology* 48 (5): 745-57.

Ferreiro, Ana, Nicole Monnier, Norma B. Romero, Jean-Paul Leroy, Carsten Bönnemann, Charles-Antoine Haengeli, Volker Straub, et al. 2002. « A Recessive Form of Central Core

Disease, Transiently Presenting as Multi-Minicores Disease, Is Associated with a Homozygous Mutation in the Ryanodine Receptor Type 1 Gene ». *Annals of Neurology* 51 (6): 750-59. <https://doi.org/10.1002/ana.10231>.

Ferreiro, Ana, Susana Quijano-Roy, Claire Pichereau, Behzad Moghadaszadeh, Nathalie Goemans, Carsten Bönnemann, Heinz Jungbluth, et al. 2002. « Mutations of the Selenoprotein N Gene, Which Is Implicated in Rigid Spine Muscular Dystrophy, Cause the Classical Phenotype of Multimincore Disease: Reassessing the Nosology of Early-Onset Myopathies ». *American Journal of Human Genetics* 71 (4): 739-49. <https://doi.org/10.1086/342719>.

Ferri, Paola, Elena Barbieri, Sabrina Burattini, Michele Guescini, Alessandra D'Emilio, Laura Biagiotti, Paolo Del Grande, Antonio De Luca, Vilberto Stocchi, et Elisabetta Falcieri. 2009. « Expression and Subcellular Localization of Myogenic Regulatory Factors during the Differentiation of Skeletal Muscle C2C12 Myoblasts ». *Journal of Cellular Biochemistry* 108 (6): 1302-17. <https://doi.org/10.1002/jcb.22360>.

Filipe, Anne, Alexander Chernorudskiy, Sandrine Arbogast, Ersilia Varone, Rocío-Nur Villar-Quiles, Diego Pozzer, Maryline Moulin, et al. 2021. « Defective Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts and Bioenergetics in SEPNI-Related Myopathy ». *Cell Death and Differentiation* 28 (1): 123-38. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0587-z>.

Fischer, Martin, Patrick Grossmann, Megha Padi, et James A. DeCaprio. 2016. « Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F Target Gene Analyses Identifies Cell Cycle Gene Regulatory Networks ». *Nucleic Acids Research* 44 (13): 6070-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw523>.

Fischer, Martin, Amy E. Schade, Timothy B. Branigan, Gerd A. Müller, et James A. DeCaprio. 2022. « Coordinating gene expression during the cell cycle ». *Trends in Biochemical Sciences* 47 (12): 1009-22. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.007>.

Fleige, Anne, Siegfried Alberti, Lothar Gröbe, Ursula Frischmann, Robert Geffers, Werner Müller, Alfred Nordheim, et Angela Schippers. 2007. « Serum Response Factor Contributes Selectively to Lymphocyte Development ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24320-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703119200>.

Frakes, Ashley E., Laura Ferraiuolo, Amanda M. Haidet-Phillips, Leah Schmelzer, Lyndsey Braun, Carlos J. Miranda, Katherine J. Ladner, et al. 2014. « Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF- κ B Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Neuron* 81 (5): 1009-23. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.013>.

Franklin, D. S., et Y. Xiong. 1996. « Induction of p18INK4c and Its Predominant Association with CDK4 and CDK6 during Myogenic Differentiation ». *Molecular Biology of the Cell* 7 (10): 1587-99. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.10.1587>.

Fujise, Kenshiro, Mariko Okubo, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada, Ichizo Nishino, Satoru Noguchi, Kohji Takei, et Tetsuya Takeda. 2020. « Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy ». *The*

- Journal of Biological Chemistry* 296 (novembre). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015184>.
- Galmiche, Guillaume, Carlos Labat, Mathias Mericskay, Karima Ait Aissa, Jocelyne Blanc, Kevin Retailleau, Mustapha Bourhim, et al. 2013. « Inactivation of Serum Response Factor Contributes to Decrease Vascular Muscular Tone and Arterial Stiffness in Mice ». *Circulation Research* 112 (7): 1035-45. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301076>.
- Gao, Fen-Biao, Sandra Almeida, et Rodrigo Lopez-Gonzalez. 2017. « Dysregulated Molecular Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia Spectrum Disorder ». *The EMBO Journal* 36 (20): 2931-50. <https://doi.org/10.15252/embj.201797568>.
- Garcia-Angarita, Natalia, Janbernd Kirschner, Mandy Heiliger, Christian Thirion, Maggie C. Walter, Susanne Schnitfeld-Acarlioglu, Matthias Albrecht, et al. 2009. « Severe Nemaline Myopathy Associated with Consecutive Mutations E74D and H75Y on a Single ACTA1 Allele ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 19 (7): 481-84. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.05.001>.
- Gerber, A. N., T. R. Klesert, D. A. Bergstrom, et S. J. Tapscott. 1997. « Two Domains of MyoD Mediate Transcriptional Activation of Genes in Repressive Chromatin: A Mechanism for Lineage Determination in Myogenesis ». *Genes & Development* 11 (4): 436-50. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.436>.
- Ghaibour, Kamar, Mélanie Schuh, Sirine Souali-Crespo, Céline Chambon, Anouk Charlot, Joe Rizk, Daniela Rovito, et al. 2023. « Androgen Receptor Coordinates Muscle Metabolic and Contractile Functions ». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 14 (4): 1707-20. <https://doi.org/10.1002/jcsm.13251>.
- Gibbs, Elizabeth M., Nigel F. Clarke, Kristy Rose, Emily C. Oates, Richard Webster, Eva L. Feldman, et James J. Dowling. 2013. « Neuromuscular Junction Abnormalities in DNM2-Related Centronuclear Myopathy ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91 (6): 727-37. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-0994-4>.
- Gibbs, Elizabeth M., Eva L. Feldman, et James J. Dowling. 2010. « The Role of MTMR14 in Autophagy and in Muscle Disease ». *Autophagy* 6 (6): 819-20. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12624>.
- Gill, R. M., et P. A. Hamel. 2000. « Subcellular Compartmentalization of E2F Family Members Is Required for Maintenance of the Postmitotic State in Terminally Differentiated Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 148 (6): 1187-1201. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1187>.
- Gineste, Charlotte, et Jocelyn Laporte. 2023. « Therapeutic approaches in different congenital myopathies ». *Current Opinion in Pharmacology* 68 (février): 102328. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102328>.
- Giovane, A., A. Pintzas, S. M. Maira, P. Sobieszczuk, et B. Wasylyk. 1994. « Net, a New Ets Transcription Factor That Is Activated by Ras ». *Genes & Development* 8 (13): 1502-13. <https://doi.org/10.1101/gad.8.13.1502>.

Giuffrida, Maria G., Gioia Mastromoro, Valentina Guida, Mauro Truglio, Maria Fabbretti, Barbara Torres, Tommaso Mazza, et al. 2020. « A New Case of SMABF2 Diagnosed in Stillbirth Expands the Prenatal Presentation and Mutational Spectrum of ASCC1 ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 182 (3): 508-12. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61431>.

Gonchar, Anastasiia D., Galina V. Kopylova, Anastasia M. Kochurova, Valentina Y. Berg, Daniil V. Shchepkin, Natalia A. Koubasova, Andrey K. Tsaturyan, Sergey Y. Kleymenov, Alexander M. Matyushenko, et Dmitrii I. Levitsky. 2021. « Effects of Myopathy-Causing Mutations R91P and R245G in the TPM3 Gene on Structural and Functional Properties of Slow Skeletal Muscle Tropomyosin ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 534 (janvier): 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.103>.

Gonorazky, Hernan D., Carsten G. Bönnemann, et James J. Dowling. 2018. « The Genetics of Congenital Myopathies ». *Handbook of Clinical Neurology* 148: 549-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00036-3>.

Greaser, M. L., et J. Gergely. 1971. « Reconstitution of Troponin Activity from Three Protein Components ». *The Journal of Biological Chemistry* 246 (13): 4226-33.

Groisman, R., H. Masutani, M. P. Leibovitch, P. Robin, I. Soudant, D. Trouche, et A. Harel-Bellan. 1996. « Physical Interaction between the Mitogen-Responsive Serum Response Factor and Myogenic Basic-Helix-Loop-Helix Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (9): 5258-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.5258>.

Gros, Jérôme, Marie Manceau, Virginie Thomé, et Christophe Marcelle. 2005. « A Common Somitic Origin for Embryonic Muscle Progenitors and Satellite Cells ». *Nature* 435 (7044): 954-58. <https://doi.org/10.1038/nature03572>.

Gruen, M., et M. Gautel. 1999. « Mutations in Beta-Myosin S2 That Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy (FHC) Abolish the Interaction with the Regulatory Domain of Myosin-Binding Protein-C ». *Journal of Molecular Biology* 286 (3): 933-49. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2522>.

Gu, W., J. W. Schneider, G. Condorelli, S. Kaushal, V. Mahdavi, et B. Nadal-Ginard. 1993. « Interaction of Myogenic Factors and the Retinoblastoma Protein Mediates Muscle Cell Commitment and Differentiation ». *Cell* 72 (3): 309-24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90110-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90110-c).

Gualdrini, Francesco, Cyril Esnault, Stuart Horswell, Aengus Stewart, Nik Matthews, et Richard Treisman. 2016. « SRF Co-Factors Control the Balance between Cell Proliferation and Contractility ». *Molecular Cell* 64 (6): 1048-61. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.016>.

Guettler, Sebastian, Maria K. Vartiainen, Francesc Miralles, Banafshe Larijani, et Richard Treisman. 2008. « RPEL Motifs Link the Serum Response Factor Cofactor MAL but Not Myocardin to Rho Signaling via Actin Binding ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (2): 732-42. <https://doi.org/10.1128/MCB.01623-07>.

- Guo, K., J. Wang, V. Andrés, R. C. Smith, et K. Walsh. 1995. « MyoD-Induced Expression of P21 Inhibits Cyclin-Dependent Kinase Activity upon Myocyte Terminal Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (7): 3823-29. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.7.3823>.
- Gurunathan, Sharavana, Jessica Sebastian, Jennifer Baker, Hoda Z. Abdel-Hamid, Shawn C. West, Brian Feingold, Vivek Peche, Miguel Reyes-Múgica, Suneeta Madan-Khetarpal, et Jeffrey Field. 2022. « A Homozygous CAP2 Pathogenic Variant in a Neonate Presenting with Rapidly Progressive Cardiomyopathy and Nemaline Rods ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 188 (3): 970-77. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62590>.
- Gurung, Ritika, et Veena K. Parnaik. 2012. « Cyclin D3 Promotes Myogenic Differentiation and Pax7 Transcription ». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (1): 209-19.
- Gustafson, T. A., et L. Kedes. 1989. « Identification of Multiple Proteins That Interact with Functional Regions of the Human Cardiac Alpha-Actin Promoter ». *Molecular and Cellular Biology* 9 (8): 3269-83. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.8.3269-3283.1989>.
- H. Dehkordi, Mahshid, Amin Tashakor, Enda O'Connell, et Howard O. Fearnhead. 2020. « Apoptosome-dependent myotube formation involves activation of caspase-3 in differentiating myoblasts ». *Cell Death & Disease* 11 (5): 308. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2502-4>.
- Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach, et A. B. Lassar. 1995. « Correlation of Terminal Cell Cycle Arrest of Skeletal Muscle with Induction of P21 by MyoD ». *Science (New York, N.Y.)* 267 (5200): 1018-21.
- Hall, C. E., M. A. Jakus, et F. O. Schmitt. 1946. « An Investigation of Cross Striations and Myosin Filaments in Muscle ». *The Biological Bulletin* 90 (février): 32-50.
- Hannon, G. J., et D. Beach. 1994. « p15INK4B Is a Potential Effector of TGF-Beta-Induced Cell Cycle Arrest ». *Nature* 371 (6494): 257-61. <https://doi.org/10.1038/371257a0>.
- Hao, Jiaojiao, Hua Xu, Meihua Luo, Wendan Yu, Miao Chen, Yina Liao, Changlin Zhang, et al. 2018. « The Tumor-Promoting Role of TRIP4 in Melanoma Progression and Its Involvement in Response to BRAF-Targeted Therapy ». *The Journal of Investigative Dermatology* 138 (1): 159-70.
- Hashimoto, Satoshi, Takato Sugiyama, Reina Yamazaki, Risa Nobuta, et Toshifumi Inada. 2020. « Identification of a Novel Trigger Complex That Facilitates Ribosome-Associated Quality Control in Mammalian Cells ». *Scientific Reports* 10 (1): 3422.
- Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson, et W. H. Klein. 1993. « Muscle Deficiency and Neonatal Death in Mice with a Targeted Mutation in the Myogenin Gene ». *Nature* 364 (6437): 501-6. <https://doi.org/10.1038/364501a0>.
- Hawke, T. J., A. P. Meeson, N. Jiang, S. Graham, K. Hutcheson, J. M. DiMaio, et D. J. Garry. 2003. « P21 Is Essential for Normal Myogenic Progenitor Cell Function in Regenerating Skeletal Muscle ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (5): C1019-1027.

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2003>.

Hergersberg, M., M. Glatzel, A. Capone, S. Achermann, A. Hagmann, J. Fischer, J. Ersch, A. Aguzzi, et E. Boltshauser. 2000. « Deletions in the Spinal Muscular Atrophy Gene Region in a Newborn with Neuropathy and Extreme Generalized Muscular Weakness ». *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society* 4 (1): 35-38. <https://doi.org/10.1053/ejpn.1999.0258>.

Herrera, R. E., P. E. Shaw, et A. Nordheim. 1989. « Occupation of the C-Fos Serum Response Element in Vivo by a Multi-Protein Complex Is Unaltered by Growth Factor Induction ». *Nature* 340 (6228): 68-70. <https://doi.org/10.1038/340068a0>.

Hill, C. S., J. Wynne, et R. Treisman. 1994. « Serum-Regulated Transcription by Serum Response Factor (SRF): A Novel Role for the DNA Binding Domain ». *The EMBO Journal* 13 (22): 5421-32. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06877.x>.

———. 1995. « The Rho Family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs Regulate Transcriptional Activation by SRF ». *Cell* 81 (7): 1159-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80020-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80020-0).

Hill, Sarah J., Daniel A. Mordes, Lisa A. Cameron, Donna S. Neuberg, Serena Landini, Kevin Eggan, et David M. Livingston. 2016. « Two Familial ALS Proteins Function in Prevention/Repair of Transcription-Associated DNA Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (48): E7701-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611673113>.

Holtz, Mary L., et Ravi P. Misra. 2008. « Endothelial-Specific Ablation of Serum Response Factor Causes Hemorrhaging, Yolk Sac Vascular Failure, and Embryonic Lethality ». *BMC Developmental Biology* 8 (juin): 65. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-65>.

Horstick, Eric J., Jeremy W. Linsley, James J. Dowling, Michael A. Hauser, Kristin K. McDonald, Allison Ashley-Koch, Louis Saint-Amant, et al. 2013. « Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy ». *Nature communications* 4: 1952. <https://doi.org/10.1038/ncomms2952>.

Huang, Kun, Fang-Fang Bi, et Huan Yang. 2021. « A Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Congenital Myopathy ». *Frontiers in Neurology* 12: 761636. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.761636>.

Huet, Alexis, Ara Parlakian, Marie-Claire Arnaud, Jean-Marie Glandières, Pierre Valat, Serge Femandjian, Denise Paulin, Bernard Alpert, et Christian Zentz. 2005. « Mechanism of Binding of Serum Response Factor to Serum Response Element ». *The FEBS Journal* 272 (12): 3105-19. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04724.x>.

Huh, Michael S., Maura H. Parker, Anthony Scimè, Robin Parks, et Michael A. Rudnicki. 2004. « Rb Is Required for Progression through Myogenic Differentiation but Not Maintenance of Terminal Differentiation ». *The Journal of Cell Biology* 166 (6): 865-76.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200403004>.

Ishino, Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, et A Nakata. 1987. « Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. » *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429-33.

Ito, Takamichi, Kenichi Kohashi, Yuichi Yamada, Takeshi Iwasaki, Akira Maekawa, Masaaki Kuda, Daichi Hoshina, Riichiro Abe, Masataka Furue, et Yoshinao Oda. 2016. « Prognostic Significance of Forkhead Box M1 (FOXM1) Expression and Antitumor Effect of FOXM1 Inhibition in Angiosarcoma ». *Journal of Cancer* 7 (7): 823-30. <https://doi.org/10.7150/jca.14461>.

Ito, Takamichi, Kenichi Kohashi, Yuichi Yamada, Akira Maekawa, Masaaki Kuda, Masataka Furue, et Yoshinao Oda. 2016. « Prognostic Significance of Forkhead Box M1 (FoxM1) Expression and Antitumour Effect of FoxM1 Inhibition in Melanoma ». *Histopathology* 69 (1): 63-71. <https://doi.org/10.1111/his.12909>.

Iyer, Dinakar, Narasimhaswamy Belaguli, Martin Flück, Brian G. Rowan, Lei Wei, Nancy L. Weigel, Frank W. Booth, Henry F. Epstein, Robert J. Schwartz, et Ashok Balasubramanyam. 2003. « Novel Phosphorylation Target in the Serum Response Factor MADS Box Regulates Alpha-Actin Transcription ». *Biochemistry* 42 (24): 7477-86. <https://doi.org/10.1021/bi030045n>.

Iyer, Dinakar, David Chang, Joe Marx, Lei Wei, Eric N. Olson, Michael S. Parmacek, Ashok Balasubramanyam, et Robert J. Schwartz. 2006. « Serum Response Factor MADS Box Serine-162 Phosphorylation Switches Proliferation and Myogenic Gene Programs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4516-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505338103>.

Iyer, Lakshminarayan M., A. Maxwell Burroughs, et L. Aravind. 2006. « The ASCH Superfamily: Novel Domains with a Fold Related to the PUA Domain and a Potential Role in RNA Metabolism ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (3): 257-63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti767>.

Jiang, Lizhu, Peng Wang, Lili Chen, et Hongyan Chen. 2014. « Down-regulation of FoxM1 by thioestrepton or small interfering RNA inhibits proliferation, transformation ability and angiogenesis, and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (9): 5450-60.

Jo, Chulman, Sun-Jung Cho, et Sangmee Ahn Jo. 2011. « Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 (MEK1) Stabilizes MyoD through Direct Phosphorylation at Tyrosine 156 during Myogenic Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (21): 18903-13.

Johansen, F. E., et R. Prywes. 1993. « Identification of Transcriptional Activation and Inhibitory Domains in Serum Response Factor (SRF) by Using GAL4-SRF Constructs ». *Molecular and Cellular Biology* 13 (8): 4640-47. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4640-4647.1993>.

- Jovičić, Ana, Joseph W. Paul, et Aaron D. Gitler. 2016. « Nuclear Transport Dysfunction: A Common Theme in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia ». *Journal of Neurochemistry* 138 Suppl 1 (août): 134-44. <https://doi.org/10.1111/jnc.13642>.
- Jung, Dong-Ju, Hee-Sook Sung, Young-Wha Goo, Hyun Mi Lee, Ok Ku Park, Sung-Yun Jung, Janghoo Lim, et al. 2002. « Novel Transcription Coactivator Complex Containing Activating Signal Cointegrator 1 ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (14): 5203-11.
- Jungbluth, Heinz, et Mathias Gautel. 2014. « Pathogenic Mechanisms in Centronuclear Myopathies ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 6 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00339>.
- Jungbluth, Heinz, Julien Ochala, Susan Treves, et Mathias Gautel. 2017. « Current and Future Therapeutic Approaches to the Congenital Myopathies ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 64 (avril): 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.004>.
- Jungbluth, Heinz, Caroline A. Sewry, et Francesco Muntoni. 2011. « Core Myopathies ». *Seminars in Pediatric Neurology* 18 (4): 239-49. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.005>.
- Jungbluth, Heinz, Susan Treves, Francesco Zorzato, Anna Sarkozy, Julien Ochala, Caroline Sewry, Rahul Phadke, Mathias Gautel, et Francesco Muntoni. 2018. « Congenital Myopathies: Disorders of Excitation-Contraction Coupling and Muscle Contraction ». *Nature Reviews. Neurology* 14 (3): 151-67. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.191>.
- Juszkiewicz, Szymon, Shaun H. Speldewinde, Li Wan, Jesper Q. Svejstrup, et Ramanujan S. Hegde. 2020. « The ASC-1 Complex Disassembles Collided Ribosomes ». *Molecular Cell* 79 (4): 603-614.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.006>.
- Kaplan-Albuquerque, Nihal, Vicki Van Putten, Mary C. Weiser-Evans, et Raphael A. Nemenoff. 2005. « Depletion of Serum Response Factor by RNA Interference Mimics the Mitogenic Effects of Platelet Derived Growth Factor-BB in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 97 (5): 427-33. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000179776.40216.a9>.
- Karakaya, Mert, Markus Storbeck, Eike A. Strathmann, Andrea Delle Vedove, Irmgard Hölker, Janine Altmueller, Leyla Naghiyeva, et al. 2018. « Targeted Sequencing with Expanded Gene Profile Enables High Diagnostic Yield in Non-5q-Spinal Muscular Atrophies ». *Human Mutation* 39 (9): 1284-98. <https://doi.org/10.1002/humu.23560>.
- Kassar-Duchossoy, Lina, Barbara Gayraud-Morel, Danielle Gomès, Didier Rocancourt, Margaret Buckingham, Vasily Shinin, et Shahrugim Tajbakhsh. 2004. « Mrf4 Determines Skeletal Muscle Identity in Myf5:Myod Double-Mutant Mice ». *Nature* 431 (7007): 466-71. <https://doi.org/10.1038/nature02876>.
- Kaushal, Sunjay, Jay W. Schneider, Bernardo Nadal-Ginard, et Vijak Mahdavi. 1994. « Activation of the Myogenic Lineage by MEF2A, a Factor that Induces and Cooperates with MyoD ». *Science* 266 (5188): 1236-40. <https://doi.org/10.1126/science.7973707>.
- Kawamata, Aya, Yayoi Izu, Haruna Yokoyama, Teruo Amagasa, Erwin F. Wagner, Kazuhisa

Nakashima, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, et Masaki Noda. 2008. « JunD Suppresses Bone Formation and Contributes to Low Bone Mass Induced by Estrogen Depletion ». *Journal of Cellular Biochemistry* 103 (4): 1037-45. <https://doi.org/10.1002/jcb.21660>.

Kemp, P. R., et J. C. Metcalfe. 2000. « Four Isoforms of Serum Response Factor That Increase or Inhibit Smooth-Muscle-Specific Promoter Activity ». *The Biochemical Journal* 345 Pt 3 (Pt 3): 445-51.

Kiess, M., R. M. Gill, et P. A. Hamel. 1995. « Expression and Activity of the Retinoblastoma Protein (pRB)-Family Proteins, P107 and P130, during L6 Myoblast Differentiation ». *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (10): 1287-98.

Kim, Han-Jong, Ji-Young Yi, Hee-Sook Sung, David D. Moore, Byung Hak Jhun, Young Chul Lee, et Jae Woon Lee. 1999. « Activating Signal Cointegrator 1, a Novel Transcription Coactivator of Nuclear Receptors, and Its Cytosolic Localization under Conditions of Serum Deprivation ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (9): 6323-32.

Kim, Jisu, Jonghoon Park, Nahyun Kim, Hun-Young Park, et Kiwon Lim. 2019. « Inhibition of Androgen Receptor Can Decrease Fat Metabolism by Decreasing Carnitine Palmitoyltransferase I Levels in Skeletal Muscles of Trained Mice ». *Nutrition & Metabolism* 16: 82. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0406-z>.

Kitzmann, M., M. Vandromme, V. Schaeffer, G. Carnac, J. C. Labbé, N. Lamb, et A. Fernandez. 1999. « Cdk1- and Cdk2-Mediated Phosphorylation of MyoD Ser200 in Growing C2 Myoblasts: Role in Modulating MyoD Half-Life and Myogenic Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (4): 3167-76. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.3167>.

Knierim, Ellen, Hiromi Hirata, Nicole I. Wolf, Susanne Morales-Gonzalez, Gudrun Schottmann, Yu Tanaka, Sabine Rudnik-Schöneborn, et al. 2016a. « Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures ». *American Journal of Human Genetics* 98 (3): 473-89. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>.

Knierim, Ellen, Hiromi Hirata, Nicole I. Wolf, Susanne Morales-Gonzalez, Gudrun Schottmann, Yu Tanaka, Sabine Rudnik-Schöneborn, et al. 2016b. « Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures ». *American Journal of Human Genetics* 98 (3): 473-89.

Knöll, Bernd, Oliver Kretz, Christine Fiedler, Siegfried Alberti, Günther Schütz, Michael Frotscher, et Alfred Nordheim. 2006. « Serum Response Factor Controls Neuronal Circuit Assembly in the Hippocampus ». *Nature Neuroscience* 9 (2): 195-204. <https://doi.org/10.1038/nn1627>.

Koegel, Heidi, Lukas von Tobel, Matthias Schäfer, Siegfried Alberti, Elisabeth Kremmer, Cornelia Mauch, Daniel Hohl, et al. 2009. « Loss of Serum Response Factor in Keratinocytes

Results in Hyperproliferative Skin Disease in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (4): 899-910. <https://doi.org/10.1172/JCI37771>.

Kolupaeva, Victoria, et Veerle Janssens. 2013. « PP1 and PP2A Phosphatases – Cooperating Partners in Modulating Retinoblastoma Protein Activation ». *The FEBS Journal* 280 (2): 627-43. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08511.x>.

Kong, Fei-Fei, Zeng-Qiang Qu, Hai-Hua Yuan, Jiong-Yi Wang, Mei Zhao, Yue-Hui Guo, Jing Shi, et al. 2014. « Overexpression of FOXM1 Is Associated with EMT and Is a Predictor of Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Oncology Reports* 31 (6): 2660-68. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3129>.

Konigsberg, I. R. 1960. « The Differentiation of Cross-Striated Myofibrils in Short Term Cell Culture ». *Experimental Cell Research* 21 (novembre): 414-20. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90273-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90273-1).

Korinthenberg, R., M. Sauer, U. P. Ketelsen, C. O. Hanemann, G. Stoll, M. Graf, A. Baborie, et al. 1997. « Congenital Axonal Neuropathy Caused by Deletions in the Spinal Muscular Atrophy Region ». *Annals of Neurology* 42 (3): 364-68. <https://doi.org/10.1002/ana.410420314>.

Korzelius, Jerome, Inge The, Suzan Ruijtenberg, Martine B. W. Prinsen, Vincent Portegijs, Teije C. Middelkoop, Marian J. Groot Koerkamp, Frank C. P. Holstege, Mike Boxem, et Sander van den Heuvel. 2011. « Caenorhabditis Elegans Cyclin D/CDK4 and Cyclin E/CDK2 Induce Distinct Cell Cycle Re-Entry Programs in Differentiated Muscle Cells ». *PLoS Genetics* 7 (11): e1002362. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002362>.

Lahoute, Charlotte, Athanassia Sotiropoulos, Marilyne Favier, Isabelle Guillet-Deniau, Claude Charvet, Arnaud Ferry, Gillian Butler-Browne, Daniel Metzger, David Tuil, et Dominique Daegelen. 2008. « Premature Aging in Skeletal Muscle Lacking Serum Response Factor ». *PLoS One* 3 (12): e3910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003910>.

Lassar, A. B., J. N. Buskin, D. Lockshon, R. L. Davis, S. Apone, S. D. Hauschka, et H. Weintraub. 1989. « MyoD Is a Sequence-Specific DNA Binding Protein Requiring a Region of Myc Homology to Bind to the Muscle Creatine Kinase Enhancer ». *Cell* 58 (5): 823-31. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90935-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90935-5).

Lassar, A. B., R. L. Davis, W. E. Wright, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore, et H. Weintraub. 1991. « Functional Activity of Myogenic HLH Proteins Requires Hetero-Oligomerization with E12/E47-like Proteins in Vivo ». *Cell* 66 (2): 305-15. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90620-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90620-e).

Latella, L., A. Sacco, D. Pajalunga, M. Tiainen, D. Macera, M. D'Angelo, A. Felici, A. Sacchi, et M. Crescenzi. 2001. « Reconstitution of Cyclin D1-Associated Kinase Activity Drives Terminally Differentiated Cells into the Cell Cycle ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (16): 5631-43. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5631-5643.2001>.

Lawlor, Michael W, Coen A Ottenheijm, Vilma-Lotta Lehtokari, Kiyomi Cho, Katarina Pelin, Carina Wallgren-Pettersson, Henk Granzier, et Alan H Beggs. 2011. « Novel mutations in NEB cause abnormal nebulin expression and markedly impaired muscle force generation in severe nemaline myopathy ». *Skeletal Muscle* 1 (juin): 23. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-23>.

Lazaro, Jean-Bernard, Peter J. Bailey, et Andrew B. Lassar. 2002. « Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation ». *Genes & Development* 16 (14): 1792-1805. <https://doi.org/10.1101/gad.U-9988R>.

Lee, Yong Soo, Hyun-Jin Kim, Hyun Ju Lee, Jae Woon Lee, Sang-Young Chun, Sun-Kun Ko, et Keesook Lee. 2002. « Activating Signal Cointegrator 1 Is Highly Expressed in Murine Testicular Leydig Cells and Enhances the Ligand-Dependent Transactivation of Androgen Receptor ». *Biology of Reproduction* 67 (5): 1580-87. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006155>.

Lefebvre, S., L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, et M. Zeviani. 1995. « Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene ». *Cell* 80 (1): 155-65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3).

Lerbs, Tristan, Lu Cui, Claire Muscat, Atif Saleem, Camille van Neste, Pablo Domizi, Charles Chan, et Gerlinde Wernig. 2020. « Expansion of Bone Precursors through Jun as a Novel Treatment for Osteoporosis-Associated Fractures ». *Stem Cell Reports* 14 (4): 603-13. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.009>.

Li, Shijie, Michael P. Czubryt, John McAnally, Rhonda Bassel-Duby, James A. Richardson, Franziska F. Wiebel, Alfred Nordheim, et Eric N. Olson. 2005. « Requirement for Serum Response Factor for Skeletal Muscle Growth and Maturation Revealed by Tissue-Specific Gene Deletion in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (4): 1082-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>.

Li, Wenyang, Sheng Hu, Chunfang Tian, Xinyu Wan, Wendan Yu, Ping Guo, Feng Zhao, et al. 2021. « TRIP4 Transcriptionally Activates DDIT4 and Subsequent mTOR Signaling to Promote Glioma Progression ». *Free Radical Biology & Medicine* 177 (décembre): 31-47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.009>.

Li, Yun R., Oliver D. King, James Shorter, et Aaron D. Gitler. 2013. « Stress Granules as Crucibles of ALS Pathogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 201 (3): 361-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302044>.

Litovchick, Larisa, Laurence A. Florens, Selene K. Swanson, Michael P. Washburn, et James A. DeCaprio. 2011. « DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly ». *Genes & Development* 25 (8): 801-13. <https://doi.org/10.1101/gad.2034211>.

Littlefield, R., A. Almenar-Queralt, et V. M. Fowler. 2001. « Actin Dynamics at Pointed Ends

Regulates Thin Filament Length in Striated Muscle ». *Nature Cell Biology* 3 (6): 544-51. <https://doi.org/10.1038/35078517>.

Liu, L. N., P. Dias, et P. J. Houghton. 1998. « Mutation of Thr115 in MyoD Positively Regulates Function in Murine Fibroblasts and Human Rhabdomyosarcoma Cells ». *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (9): 699-711.

Liu, Xin-Hua, Rita De Gasperi, William A. Bauman, et Christopher P. Cardozo. 2018. « Nandrolone-Induced Nuclear Accumulation of MyoD Protein Is Mediated by Numb, a Notch Inhibitor, in C2C12 Myoblasts ». *Physiological Reports* 6 (1): e13520. <https://doi.org/10.14814/phy2.13520>.

Liu, Youhong, Yijun Liu, Bowen Yuan, Linglong Yin, Yuchong Peng, Xiaohui Yu, Weibing Zhou, et al. 2017. « FOXM1 promotes the progression of prostate cancer by regulating PSA gene transcription ». *Oncotarget* 8 (10): 17027-37. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15224>.

Lombard, David B., Katrin F. Chua, Raul Mostoslavsky, Sonia Franco, Monica Gostissa, et Frederick W. Alt. 2005. « DNA Repair, Genome Stability, and Aging ». *Cell* 120 (4): 497-512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.028>.

Lu, Weiliang, Mingxing Liang, Jiasun Su, Jin Wang, Lingxiao Li, Shujie Zhang, Zailong Qin, et al. 2020. « Novel Compound Heterozygous Pathogenic Variants in ASCC1 in a Chinese Patient with Spinal Muscular Atrophy with Congenital Bone Fractures 2 : Evidence Supporting a “Definitive” Gene-Disease Relationship ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 8 (5): e1212. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1212>.

Lubahn, D. B., D. R. Joseph, P. M. Sullivan, H. F. Willard, F. S. French, et E. M. Wilson. 1988. « Cloning of Human Androgen Receptor Complementary DNA and Localization to the X Chromosome ». *Science (New York, N.Y.)* 240 (4850): 327-30. <https://doi.org/10.1126/science.3353727>.

MacKrell, James G., Benjamin C. Yaden, Heather Bullock, Keyue Chen, Pamela Shetler, Henry U. Bryant, et Venkatesh Krishnan. 2015. « Molecular Targets of Androgen Signaling That Characterize Skeletal Muscle Recovery and Regeneration ». *Nuclear Receptor Signaling* 13: e005. <https://doi.org/10.1621/nrs.13005>.

Madabhushi, Ram, Ling Pan, et Li-Huei Tsai. 2014. « DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration ». *Neuron* 83 (2): 266-82. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>.

Majczenko, Karen, Ann E. Davidson, Sandra Camelo-Piragua, Pankaj B. Agrawal, Richard A. Manfready, Xingli Li, Sucheta Joshi, et al. 2012. « Dominant Mutation of CCDC78 in a Unique Congenital Myopathy with Prominent Internal Nuclei and Atypical Cores ». *American Journal of Human Genetics* 91 (2): 365-71. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.06.012>.

Mal, A., D. Chattopadhyay, M. K. Ghosh, R. Y. Poon, T. Hunter, et M. L. Harter. 2000. « P21 and Retinoblastoma Protein Control the Absence of DNA Replication in Terminally

Differentiated Muscle Cells ». *The Journal of Cell Biology* 149 (2): 281-92. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.281>.

Mal, Asoke, et Marian L. Harter. 2003. « MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (4): 1735-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437843100>.

Malfatti, E., et N. B. Romero. 2016. « Nemaline Myopathies: State of the Art ». *Revue Neurologique* 172 (10): 614-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.08.004>.

Marais, Anett, Aida M. Bertoli-Avella, Christian Beetz, Umut Altunoglu, Amal Alhashem, Sarar Mohamed, Abdulaziz Alghamdi, et al. 2022. « Further Clinical and Genetic Evidence of ASC-1 Complex Dysfunction in Congenital Neuromuscular Disease ». *European Journal of Medical Genetics* 65 (8): 104537. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104537>.

Martelli, F., C. Cenciarelli, G. Santarelli, B. Polikar, A. Felsani, et M. Caruso. 1994. « MyoD Induces Retinoblastoma Gene Expression during Myogenic Differentiation ». *Oncogene* 9 (12): 3579-90.

Matsuoka, S., M. C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J. W. Harper, et S. J. Elledge. 1995. « p57KIP2, a Structurally Distinct Member of the p21CIP1 Cdk Inhibitor Family, Is a Candidate Tumor Suppressor Gene ». *Genes & Development* 9 (6): 650-62. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.650>.

Mauro, A. 1961. « Satellite Cell of Skeletal Muscle Fibers ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9 (2): 493-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>.

McMurray, C. T. 2005. « To Die or Not to Die: DNA Repair in Neurons ». *Mutation Research* 577 (1-2): 260-74. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.006>.

Meadows, Stryder M., Andrew S. Warkman, Matthew C. Salanga, Eric M. Small, et Paul A. Krieg. 2008. « The myocardin-related transcription factor, MASTR, cooperates with MyoD to activate skeletal muscle gene expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (5): 1545-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703918105>.

Melki, J., S. Abdelhak, P. Sheth, M. F. Bachelot, P. Burlet, A. Marcadet, J. Aicardi, A. Barois, J. P. Carriere, et M. Fardeau. 1990. « Gene for Chronic Proximal Spinal Muscular Atrophies Maps to Chromosome 5q ». *Nature* 344 (6268): 767-68. <https://doi.org/10.1038/344767a0>.

Meunier, Justine, Rocio-Nur Villar-Quiles, Isabelle Duband-Goulet, et Ana Ferreira. 2021. « Inherited Defects of the ASC-1 Complex in Congenital Neuromuscular Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6039. <https://doi.org/10.3390/ijms22116039>.

Miano, Joseph M., Xiaochun Long, et Keigi Fujiwara. 2007. « Serum Response Factor: Master Regulator of the Actin Cytoskeleton and Contractile Apparatus ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292 (1): C70-81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>.

- Miano, Joseph M., Narendrakumar Ramanan, Mary A. Georger, Karen L. de Mesy Bentley, Rachael L. Emerson, Robert O. Balza, Qi Xiao, Hartmut Weiler, David D. Ginty, et Ravi P. Misra. 2004. « Restricted Inactivation of Serum Response Factor to the Cardiovascular System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17132-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406041101>.
- Michaely, Peter, et Vann Bennett. 1992. « The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition ». *Trends in Cell Biology* 2 (5): 127-29. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90084-Z](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90084-Z).
- Minty, A., et L. Kedes. 1986. « Upstream Regions of the Human Cardiac Actin Gene That Modulate Its Transcription in Muscle Cells: Presence of an Evolutionarily Conserved Repeated Motif ». *Molecular and Cellular Biology* 6 (6): 2125-36. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.6.2125-2136.1986>.
- Miralles, Francesc, Guido Posern, Alexia-Ileana Zaromytidou, et Richard Treisman. 2003. « Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL ». *Cell* 113 (3): 329-42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00278-2).
- Modak, Cristina, et Jianyuan Chai. 2010. « Serum Response Factor: Look into the Gut ». *World Journal of Gastroenterology* 16 (18): 2195-2201. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2195>.
- Molkentin, J. D., B. L. Black, J. F. Martin, et E. N. Olson. 1995. « Cooperative Activation of Muscle Gene Expression by MEF2 and Myogenic bHLH Proteins ». *Cell* 83 (7): 1125-36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90139-6).
- Monks, Douglas Ashley, Pengcheng Rao, Kaiguo Mo, Jamie Ann Johansen, Gareth Lewis, et Michael Quentin Kemp. 2008. « Androgen receptor and Kennedy disease/spinal bulbar muscular atrophy », *Hormones and behavior* 53 (5): 729-40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.12.009>.
- Morgan, Jennifer E., et Terence A. Partridge. 2003. « Muscle Satellite Cells ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (8): 1151-56. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00042-6).
- Moulin, Maryline, et Ana Ferreiro. 2017. « Muscle Redox Disturbances and Oxidative Stress as Pathomechanisms and Therapeutic Targets in Early-Onset Myopathies ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 64 (avril): 213-23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.003>.
- Murray, Thomas V. A., Jill M. McMahon, Breege A. Howley, Alanna Stanley, Thomas Ritter, Andrea Mohr, Ralf Zwacka, et Howard O. Fearnhead. 2008. « A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation ». *Journal of Cell Science* 121 (22): 3786-93. <https://doi.org/10.1242/jcs.024547>.
- Nabeshima, Y., K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, I. Nonaka, et Y. Nabeshima. 1993. « Myogenin Gene Disruption Results in Perinatal Lethality Because of Severe Muscle Defect ». *Nature* 364 (6437): 532-35. <https://doi.org/10.1038/364532a0>.

- Nair, Divya, Dong Li, Hannah Erdogan, Andrew Yoon, Margaret H. Harr, Gaber Bergant, Borut Peterlin, et al. 2021. « Discovery of a Neuromuscular Syndrome Caused by Biallelic Variants in *ASCC3* ». *HGG Advances* 2 (2): 100024. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100024>.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, et R. Treisman. 1988. « Isolation and Properties of cDNA Clones Encoding SRF, a Transcription Factor That Binds to the c-Fos Serum Response Element ». *Cell* 55 (6): 989-1003. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9).
- Novitch, B. G., G. J. Mulligan, Tyler Jacks, et A. B. Lassar. 1996. « Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle ». *The Journal of Cell Biology* 135 (2): 441-56.
- Novitch, B. G., D. B. Spicer, P. S. Kim, W. L. Cheung, et A. B. Lassar. 1999. « pRb Is Required for MEF2-Dependent Gene Expression as Well as Cell-Cycle Arrest during Skeletal Muscle Differentiation ». *Current Biology: CB* 9 (9): 449-59.
- Nowak, Kristen J., Gianina Ravenscroft, et Nigel G. Laing. 2013. « Skeletal Muscle α -Actin Diseases (Actinopathies): Pathology and Mechanisms ». *Acta Neuropathologica* 125 (1): 19-32. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1019-z>.
- Okada, Kaoru, Yoshiyuki Fujiwara, Tsuyoshi Takahashi, Yurika Nakamura, Shuji Takiguchi, Kiyokazu Nakajima, Hiroshi Miyata, et al. 2013. « Overexpression of Forkhead Box M1 Transcription Factor (FOXM1) Is a Potential Prognostic Marker and Enhances Chemoresistance for Docetaxel in Gastric Cancer ». *Annals of Surgical Oncology* 20 (3): 1035-43. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2680-0>.
- Oliveira, J., M. Martins, R. Pinto Leite, M. Sousa, et R. Santos. 2017. « The New Neuromuscular Disease Related with Defects in the ASC-1 Complex: Report of a Second Case Confirms *ASCC1* Involvement ». *Clinical Genetics* 92 (4): 434-39. <https://doi.org/10.1111/cge.12997>.
- Olson, Eric N., et Alfred Nordheim. 2010. « Linking Actin Dynamics and Gene Transcription to Drive Cellular Motile Functions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (5): 353-65. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>.
- Ordahl, C. P., et N. M. Le Douarin. 1992. « Two Myogenic Lineages within the Developing Somite ». *Development (Cambridge, England)* 114 (2): 339-53. <https://doi.org/10.1242/dev.114.2.339>.
- Paez-Colasante, Ximena, Claudia Figueroa-Romero, Stacey A. Sakowski, Stephen A. Goutman, et Eva L. Feldman. 2015. « Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutics in the Epigenomic Era ». *Nature Reviews. Neurology* 11 (5): 266-79. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.57>.
- Pappas, Christopher T., Nandini Bhattacharya, John A. Cooper, et Carol C. Gregorio. 2008. « Nebulin Interacts with CapZ and Regulates Thin Filament Architecture within the Z-Disc ».

Molecular Biology of the Cell 19 (5): 1837-47. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-07-0690>.

Parker, Maura H., Patrick Seale, et Michael A. Rudnicki. 2003. « Looking Back to the Embryo: Defining Transcriptional Networks in Adult Myogenesis ». *Nature Reviews. Genetics* 4 (7): 497-507. <https://doi.org/10.1038/nrg1109>.

Parker, S. B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A. T. Sands, A. Bradley, E. N. Olson, J. W. Harper, et S. J. Elledge. 1995. « P53-Independent Expression of p21Cip1 in Muscle and Other Terminally Differentiating Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 267 (5200): 1024-27. <https://doi.org/10.1126/science.7863329>.

Parlakian, Ara, Claude Charvet, Brigitte Escoubet, Mathias Mericskay, Jeffery D. Molkentin, Guillaume Gary-Bobo, Leon J. De Windt, et al. 2005. « Temporally Controlled Onset of Dilated Cardiomyopathy through Disruption of the SRF Gene in Adult Heart ». *Circulation* 112 (19): 2930-39. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778>.

Parlakian, Ara, David Tuil, Ghislaine Hamard, Geneviève Tavernier, Daniele Hentzen, Jean-Paul Concordet, Denise Paulin, Zhenlin Li, et Dominique Daegelen. 2004. « Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (12): 5281-89. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5281-5289.2004>.

Patapoutian, A., J. K. Yoon, J. H. Miner, S. Wang, K. Stark, et B. Wold. 1995. « Disruption of the Mouse MRF4 Gene Identifies Multiple Waves of Myogenesis in the Myotome ». *Development (Cambridge, England)* 121 (10): 3347-58. <https://doi.org/10.1242/dev.121.10.3347>.

Peeters, Kristien, Teodora Chamova, et Albena Jordanova. 2014. « Clinical and Genetic Diversity of SMN1-Negative Proximal Spinal Muscular Atrophies ». *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 11): 2879-96. <https://doi.org/10.1093/brain/awu169>.

Penn, Bennett H., Donald A. Bergstrom, F. Jeffrey Dilworth, Eyal Bengal, et Stephen J. Tapscott. 2004. « A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation ». *Genes & Development* 18 (19): 2348-53. <https://doi.org/10.1101/gad.1234304>.

Peters, Owen M., Mehdi Ghasemi, et Robert H. Brown. 2015. « Emerging Mechanisms of Molecular Pathology in ALS ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (5): 1767-79. <https://doi.org/10.1172/JCI71601>.

Phadke, Rahul. 2019. « Myopathology of Congenital Myopathies: Bridging the Old and the New ». *Seminars in Pediatric Neurology* 29 (avril): 55-70. <https://doi.org/10.1016/j.spn.2019.01.007>.

Philipparr, Ulrike, Gerhard Schrott, Christoph Dieterich, Judith M. Müller, Petra Galgóczy, Felix B. Engel, Mark T. Keating, et al. 2004. « The SRF Target Gene Fhl2 Antagonizes RhoA/MAL-Dependent Activation of SRF ». *Molecular Cell* 16 (6): 867-80.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.039>.

Piovesan, R. F., K. P. S. Fernandes, A. N. Alves, V. P. Teixeira, J. A. Silva Junior, M. D. Martins, S. K. Bussadori, R. Albertini, et R. A. Mesquita-Ferrari. 2013. « Effect of Nandrolone Decanoate on Skeletal Muscle Repair ». *International Journal of Sports Medicine* 34 (1): 87-82. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1311652>.

Polesskaya, A., I. Naguibneva, L. Fritsch, A. Duquet, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, A. Vervisch, L.L. Pritchard, P. Cole, et A. Harel-Bellan. 2001. « CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle ». *The EMBO Journal* 20 (23): 6816-25. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6816>.

Posern, Guido, et Richard Treisman. 2006. « Actin' Together: Serum Response Factor, Its Cofactors and the Link to Signal Transduction ». *Trends in Cell Biology* 16 (11): 588-96. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>.

Price, M. A., A. E. Rogers, et R. Treisman. 1995. « Comparative Analysis of the Ternary Complex Factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET) ». *The EMBO Journal* 14 (11): 2589-2601. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07257.x>.

Puri, P. L., et V. Sartorelli. 2000. « Regulation of Muscle Regulatory Factors by DNA-Binding, Interacting Proteins, and Post-Transcriptional Modifications ». *Journal of Cellular Physiology* 185 (2): 155-73.

Puri, Pier Lorenzo, Vittorio Sartorelli, Xiang-Jiao Yang, Yasuo Hamamori, Vasily V Ogryzko, Bruce H Howard, Larry Kedes, et al. 1997. « Differential Roles of p300 and PCAF Acetyltransferases in Muscle Differentiation ». *Molecular Cell* 1 (1): 35-45. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80005-2).

Rao, S. S., C. Chu, et D. S. Kohtz. 1994. « Ectopic Expression of Cyclin D1 Prevents Activation of Gene Transcription by Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Regulators ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (8): 5259-67. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.8.5259-5267.1994>.

Ravenscroft, Gianina, Satoko Miyatake, Vilma-Lotta Lehtokari, Emily J. Todd, Pauliina Vornanen, Kyle S. Yau, Yukiko K. Hayashi, et al. 2013. « Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy ». *American Journal of Human Genetics* 93 (1): 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.004>.

Ravenscroft, Gianina, Flora Nolent, Sulekha Rajagopalan, Ana M. Meireles, Kevin J. Paavola, Dominique Gaillard, Elisabeth Alanio, et al. 2015. « Mutations of GPR126 Are Responsible for Severe Arthrogyrosis Multiplex Congenita ». *American Journal of Human Genetics* 96 (6): 955-61. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.014>.

Rech, J., I. Barlat, J. L. Veyrone, A. Vie, et J. M. Blanchard. 1994. « Nuclear Import of Serum Response Factor (SRF) Requires a Short Amino-Terminal Nuclear Localization Sequence and Is Independent of the Casein Kinase II Phosphorylation Site ». *Journal of Cell Science* 107 (Pt 11) (novembre): 3029-36. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.11.3029>.

« Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings - Dale - 1936 - The Journal of

Physiology - Wiley Online Library ». s. d. Consulté le 26 septembre 2023. <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1113/jphysiol.1936.sp003371>.

Reynaud, E. G., K. Pelpel, M. Guillier, M. P. Leibovitch, et S. A. Leibovitch. 1999. « P57(Kip2) Stabilizes the MyoD Protein by Inhibiting Cyclin E-Cdk2 Kinase Activity in Growing Myoblasts ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (11): 7621-29. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7621>.

Reynaud, Emmanuel G., Marie Pierre Leibovitch, Lionel A. J. Tintignac, Karine Pelpel, Martine Guillier, et Serge A. Leibovitch. 2000. « Stabilization of MyoD by Direct Binding to p57Kip2* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 18767-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M907412199>.

Rhodes, S. J., et S. F. Konieczny. 1989. « Identification of MRF4: A New Member of the Muscle Regulatory Factor Gene Family ». *Genes & Development* 3 (12B): 2050-61. <https://doi.org/10.1101/gad.3.12b.2050>.

Rodrigues, N. R., N. Owen, K. Talbot, J. Ignatius, V. Dubowitz, et K. E. Davies. 1995. « Deletions in the Survival Motor Neuron Gene on 5q13 in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy ». *Human Molecular Genetics* 4 (4): 631-34. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.4.631>.

Romero, Norma B., et Marc Bitoun. 2011. « Centronuclear Myopathies ». *Seminars in Pediatric Neurology* 18 (4): 250-56. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.006>.

Rosano, Kristen K., Daniel J. Wegner, Marwan Shinawi, Dustin Baldrige, Robert C. Bucelli, Sonika Dahiya, Frances V. White, et al. 2021. « Biallelic ASCC1 variants including a novel intronic variant result in expanded phenotypic spectrum of spinal muscular atrophy with congenital bone fractures 2 (SMABF2) ». *American journal of medical genetics. Part A* 185 (7): 2190-97. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62219>.

Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma, et R. Jaenisch. 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 (3): 383-90. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90508-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90508-a).

Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold, et R. Jaenisch. 1993. « MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle ». *Cell* 75 (7): 1351-59. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90621-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90621-v).

Rudnik-Schöneborn, S., R. Heller, C. Berg, C. Betzler, T. Grimm, T. Eggermann, K. Eggermann, R. Wirth, B. Wirth, et K. Zerres. 2008. « Congenital Heart Disease Is a Feature of Severe Infantile Spinal Muscular Atrophy ». *Journal of Medical Genetics* 45 (10): 635-38. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.057950>.

Ruiz, A., S. Heilmann, T. Becker, I. Hernández, H. Wagner, M. Thelen, A. Mauleón, et al. 2014. « Follow-up of Loci from the International Genomics of Alzheimer's Disease Project Identifies TRIP4 as a Novel Susceptibility Gene ». *Translational Psychiatry* 4 (2): e358.

<https://doi.org/10.1038/tp.2014.2>.

Ryan, M. M., C. Schnell, C. D. Strickland, L. K. Shield, G. Morgan, S. T. Iannaccone, N. G. Laing, A. H. Beggs, et K. N. North. 2001. « Neminine Myopathy: A Clinical Study of 143 Cases ». *Annals of Neurology* 50 (3): 312-20. <https://doi.org/10.1002/ana.1080>.

Sakuma, Kunihiro, Mai Akiho, Hiroyuki Nakashima, Hiroshi Akima, et Masahiro Yasuhara. 2008. « Age-Related Reductions in Expression of Serum Response Factor and Myocardin-Related Transcription Factor A in Mouse Skeletal Muscles ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1782 (7-8): 453-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.03.008>.

Sartorelli, V., K. A. Webster, et L. Kedes. 1990. « Muscle-Specific Expression of the Cardiac Alpha-Actin Gene Requires MyoD1, CARG-Box Binding Factor, and Sp1 ». *Genes & Development* 4 (10): 1811-22. <https://doi.org/10.1101/gad.4.10.1811>.

Schneider, J. W., W. Gu, L. Zhu, V. Mahdavi, et B. Nadal-Ginard. 1994. « Reversal of Terminal Differentiation Mediated by P107 in Rb-/- Muscle Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 264 (5164): 1467-71. <https://doi.org/10.1126/science.8197461>.

Schorling, David C., Janbernd Kirschner, et Carsten G. Bönnemann. 2017. « Congenital Muscular Dystrophies and Myopathies: An Overview and Update ». *Neuropediatrics* 48 (4): 247-61. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604154>.

Sedgwick, Barbara. 2004. « Repairing DNA-Methylation Damage ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (2): 148-57. <https://doi.org/10.1038/nrm1312>.

Serna, I. L. de la, K. A. Carlson, et A. N. Imbalzano. 2001. « Mammalian SWI/SNF Complexes Promote MyoD-Mediated Muscle Differentiation ». *Nature Genetics* 27 (2): 187-90. <https://doi.org/10.1038/84826>.

Serrano, Manuel, Gregory J. Hannon, et David Beach. 1993. « A New Regulatory Motif in Cell-Cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/CDK4 ». *Nature* 366 (6456): 704-7. <https://doi.org/10.1038/366704a0>.

Sewry, C. A., et C. Wallgren-Pettersson. 2017. « Myopathology in Congenital Myopathies ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 43 (1): 5-23. <https://doi.org/10.1111/nan.12369>.

Sewry, Caroline A., Jenni M. Laitila, et Carina Wallgren-Pettersson. 2019. « Neminine Myopathies: A Current View ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 40 (2): 111-26. <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09519-9>.

Shababi, Monir, Javad Habibi, Hsiao T. Yang, Spencer M. Vale, Will A. Sewell, et Christian L. Lorson. 2010. « Cardiac Defects Contribute to the Pathology of Spinal Muscular Atrophy Models ». *Human Molecular Genetics* 19 (20): 4059-71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq329>.

Sharova, Margarita, Darya Guseva, Alexey Kurenkov, Olga Novoselova, Aysylu Murtazina, et Mikhail Skoblov. 2022. « Congenital Myopathy as a New Phenotype Caused by Two Undescribed Variants in ASCC1 Gene ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 188

(10): 3100-3105. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62898>.

Shaw, P. E., H. Schröter, et A. Nordheim. 1989. « The Ability of a Ternary Complex to Form over the Serum Response Element Correlates with Serum Inducibility of the Human C-Fos Promoter ». *Cell* 56 (4): 563-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90579-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90579-5).

Shin, E. K., A. Shin, C. Paulding, B. Schaffhausen, et A. S. Yee. 1995. « Multiple Change in E2F Function and Regulation Occur upon Muscle Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (4): 2252-62. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.2252>.

Shore, P., et A. D. Sharrocks. 1995. « The MADS-Box Family of Transcription Factors ». *European Journal of Biochemistry* 229 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x>.

Simonatto, M., F. Marullo, F. Chiacchiera, A. Musaró, J. Y. J. Wang, L. Latella, et P. L. Puri. 2013. « DNA Damage-Activated ABL-MyoD Signaling Contributes to DNA Repair in Skeletal Myoblasts ». *Cell Death and Differentiation* 20 (12): 1664-74.

Sirri, Valentina, Marie Pierre Leibovitch, et Serge Alexandre Leibovitch. 2003. « Muscle Regulatory Factor MRF4 Activates Differentiation in Rhabdomyosarcoma RD Cells through a Positive-Acting C-Terminal Protein Domain ». *Oncogene* 22 (36): 5658-66. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206690>.

Skapek, S. X., J. Rhee, P. S. Kim, B. G. Novitch, et A. B. Lassar. 1996. « Cyclin-Mediated Inhibition of Muscle Gene Expression via a Mechanism That Is Independent of pRB Hyperphosphorylation ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (12): 7043-53. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.7043>.

Skapek, S. X., J. Rhee, D. B. Spicer, et A. B. Lassar. 1995. « Inhibition of Myogenic Differentiation in Proliferating Myoblasts by Cyclin D1-Dependent Kinase ». *Science (New York, N.Y.)* 267 (5200): 1022-24. <https://doi.org/10.1126/science.7863328>.

Soll, Jennifer M., Joshua R. Brickner, Miranda C. Mudge, et Nima Mosammaparast. 2018. « RNA Ligase-like Domain in Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 1 (ASCC1) Regulates ASCC Complex Function during Alkylation Damage ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (35): 13524-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000114>.

Sommer, H., J. P. Beltrán, P. Huijser, H. Pape, W. E. Lönnig, H. Saedler, et Z. Schwarz-Sommer. 1990. « Deficiens, a Homeotic Gene Involved in the Control of Flower Morphogenesis in *Antirrhinum Majus*: The Protein Shows Homology to Transcription Factors ». *The EMBO Journal* 9 (3): 605-13. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08152.x>.

Song, An, Qi Wang, Mark G. Goebel, et Maureen A. Harrington. 1998. « Phosphorylation of Nuclear MyoD Is Required for Its Rapid Degradation ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (9): 4994-99.

Soulez, M., C. G. Rouviere, P. Chafey, D. Hentzen, M. Vandromme, N. Lautredou, N. Lamb,

- A. Kahn, et D. Tuil. 1996. « Growth and Differentiation of C2 Myogenic Cells Are Dependent on Serum Response Factor ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (11): 6065-74. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.11.6065>.
- Spiegelman, Bruce M., et Reinhart Heinrich. 2004. « Biological Control through Regulated Transcriptional Coactivators ». *Cell* 119 (2): 157-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.037>.
- Stein, G. H. 1979. « T98G: An Anchorage-Independent Human Tumor Cell Line That Exhibits Stationary Phase G1 Arrest in Vitro ». *Journal of Cellular Physiology* 99 (1): 43-54. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040990107>.
- Sun, Qiang, Guang Chen, Jeffrey W. Streb, Xiaochun Long, Yumei Yang, Christian J. Stoeckert, et Joseph M. Miano. 2006. « Defining the Mammalian CARome ». *Genome Research* 16 (2): 197-207. <https://doi.org/10.1101/gr.4108706>.
- Tajbakhsh, S., E. Bober, C. Babinet, S. Pournin, H. Arnold, et M. Buckingham. 1996. « Gene Targeting the Myf-5 Locus with nlacZ Reveals Expression of This Myogenic Factor in Mature Skeletal Muscle Fibres as Well as Early Embryonic Muscle ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 206 (3): 291-300. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199607\)206:3<291::AID-AJA6>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199607)206:3<291::AID-AJA6>3.0.CO;2-D).
- Tajbakhsh, Shahrugim. 2003. « Stem Cells to Tissue: Molecular, Cellular and Anatomical Heterogeneity in Skeletal Muscle ». *Current Opinion in Genetics & Development* 13 (4): 413-22. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00090-x).
- Tajsharghi, Homa, et Anders Oldfors. 2013. « Myosinopathies: pathology and mechanisms ». *Acta Neuropathologica* 125 (1): 3-18. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1024-2>.
- Tassi, Renata A., Paola Todeschini, Eric R. Siegel, Stefano Calza, Paolo Cappella, Laura Ardighieri, Moris Cadei, et al. 2017. « FOXM1 expression is significantly associated with chemotherapy resistance and adverse prognosis in non-serous epithelial ovarian cancer patients ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 36 (mai): 63. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0536-y>.
- Taylor, J. Paul, Robert H. Brown, et Don W. Cleveland. 2016. « Decoding ALS: From Genes to Mechanism ». *Nature* 539 (7628): 197-206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>.
- Thayer, M. J., S. J. Tapscott, R. L. Davis, W. E. Wright, A. B. Lassar, et H. Weintraub. 1989. « Positive Autoregulation of the Myogenic Determination Gene MyoD1 ». *Cell* 58 (2): 241-48. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90838-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90838-6).
- Tintignac, Lionel A. J., Valentina Sirri, Marie Pierre Leibovitch, Yann Lécluse, Maria Castedo, Didier Metivier, Guido Kroemer, et Serge A. Leibovitch. 2004. « Mutant MyoD Lacking Cdc2 Phosphorylation Sites Delays M-Phase Entry ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (4): 1809-21. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1809-1821.2004>.
- Tintignac, Lionel A., Marie Pierre Leibovitch, Magali Kitzmann, Anne Fernandez, Bernard

Ducommun, Laurent Meijer, et Serge A. Leibovitch. 2000. « Cyclin E–Cdk2 Phosphorylation Promotes Late G1-Phase Degradation of MyoD in Muscle Cells ». *Experimental Cell Research* 259 (1): 300-307. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4973>.

Topaloglu, Haluk. 2020. « Core Myopathies - a Short Review ». *Acta Myologica: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology* 39 (4): 266-73. <https://doi.org/10.36185/2532-1900-029>.

Töpf, Ana, Angela Pyle, Helen Griffin, Leslie Matalonga, Katherine Schon, Solve-RD SNV-indel working group, Solve-RD DITF-euroNMD, et al. 2021. « Exome Reanalysis and Proteomic Profiling Identified TRIP4 as a Novel Cause of Cerebellar Hypoplasia and Spinal Muscular Atrophy (PCH1) ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 29 (9): 1348-53. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00851-8>.

Treisman, R. 1987. « Identification and Purification of a Polypeptide That Binds to the C-Fos Serum Response Element ». *The EMBO Journal* 6 (9): 2711-17. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02564.x>.

Treves, Susan, Heinz Jungbluth, Nicol Voermans, Francesco Muntoni, et Francesco Zorzato. 2017. « Ca²⁺ Handling Abnormalities in Early-Onset Muscle Diseases: Novel Concepts and Perspectives ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 64 (avril): 201-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.017>.

Vartiainen, Maria K., Sebastian Guettler, Banafshe Larijani, et Richard Treisman. 2007. « Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL ». *Science (New York, N.Y.)* 316 (5832): 1749-52. <https://doi.org/10.1126/science.1141084>.

Villar-Quiles, Rocío N., Fabio Catervi, Eva Cabet, Raul Juntas-Morales, Casie A. Genetti, Teresa Gidaro, Asuman Koparir, et al. 2020. « ASC-1 Is a Cell Cycle Regulator Associated with Severe and Mild Forms of Myopathy ». *Annals of Neurology* 87 (2): 217-32.

Vlahopoulos, Spiros, Warren E. Zimmer, Guido Jenster, Narasimhaswamy S. Belaguli, Steven P. Balk, Albert O. Brinkmann, Rainer B. Lanz, Vassilis C. Zoumpourlis, et Robert J. Schwartz. 2005. « Recruitment of the Androgen Receptor via Serum Response Factor Facilitates Expression of a Myogenic Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 7786-92.

Voraberger, Barbara, Johannes A. Mayr, Nadja Fratzi-Zelman, Stéphane Blouin, Suma Uday, Robert Kopajtich, Marijke Koedam, et al. 2023. « Investigating the Role of ASCC1 in the Causation of Bone Fragility ». *Frontiers in Endocrinology* 14: 1137573. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1137573>.

Wagner, E. F. 2002. « Functions of AP1 (Fos/Jun) in Bone Development ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 61 Suppl 2 (novembre): ii40-42. https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_2.ii40.

Wallgren-Pettersson, Carina, Caroline A. Sewry, Kristen J. Nowak, et Nigel G. Laing. 2011.

« Nemaline Myopathies ». *Seminars in Pediatric Neurology*, Congenital Myopathies, 18 (4): 230-38. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.004>.

Walsh, K., et H. Perlman. 1997. « Cell Cycle Exit upon Myogenic Differentiation ». *Current Opinion in Genetics & Development* 7 (5): 597-602.

Wang, J., K. Helin, P. Jin, et B. Nadal-Ginard. 1995. « Inhibition of in Vitro Myogenic Differentiation by Cellular Transcription Factor E2F1 ». *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (10): 1299-1306.

Wang, J., Q. Huang, W. Tang, et B. Nadal-Ginard. 1996. « E2F1 Inhibition of Transcription Activation by Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Regulators ». *Journal of Cellular Biochemistry* 62 (3): 405-10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(199609\)62:3%3C405::AID-JCB10%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(199609)62:3%3C405::AID-JCB10%3E3.0.CO;2-H).

Wang, J., et K. Walsh. 1996. « Resistance to Apoptosis Conferred by Cdk Inhibitors during Myocyte Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5273): 359-61. <https://doi.org/10.1126/science.273.5273.359>.

Wang, Ke, Xue Zhu, Kai Zhang, Ling Zhu, et Fanfan Zhou. 2016. « FoxM1 Inhibition Enhances Chemosensitivity of Docetaxel-Resistant A549 Cells to Docetaxel via Activation of JNK/Mitochondrial Pathway ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 48 (9): 804-9. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw072>.

Wasserman, W. W., et J. W. Fickett. 1998. « Identification of Regulatory Regions Which Confer Muscle-Specific Gene Expression ». *Journal of Molecular Biology* 278 (1): 167-81. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1700>.

Webster, C., L. Silberstein, A. P. Hays, et H. M. Blau. 1988. « Fast Muscle Fibers Are Preferentially Affected in Duchenne Muscular Dystrophy ». *Cell* 52 (4): 503-13. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90463-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90463-1).

Weintraub, H., S. J. Tapscott, R. L. Davis, M. J. Thayer, M. A. Adam, A. B. Lassar, et A. D. Miller. 1989. « Activation of Muscle-Specific Genes in Pigment, Nerve, Fat, Liver, and Fibroblast Cell Lines by Forced Expression of MyoD ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14): 5434-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5434>.

Werth, Daniela, Gabriele Grassi, Nina Konjer, Barbara Dapas, Rossella Farra, Carlo Giansante, Reinhard Kandolf, Gianfranco Guarnieri, Alfred Nordheim, et Olaf Heidenreich. 2010. « Proliferation of Human Primary Vascular Smooth Muscle Cells Depends on Serum Response Factor ». *European Journal of Cell Biology* 89 (2-3): 216-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.12.002>.

Wickramasinghe, S. Rasika, Rebecca S. Alvania, Narendrakumar Ramanan, John N. Wood, Kenji Mandai, et David D. Ginty. 2008. « Serum Response Factor Mediates NGF-Dependent

Target Innervation by Embryonic DRG Sensory Neurons ». *Neuron* 58 (4): 532-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.006>.

Wilmshurst, J. M., S. Lillis, H. Zhou, K. Pillay, H. Henderson, W. Kress, C. R. Müller, et al. 2010. « RYR1 Mutations Are a Common Cause of Congenital Myopathies with Central Nuclei ». *Annals of Neurology* 68 (5): 717-26. <https://doi.org/10.1002/ana.22119>.

Witt, Christian C., Christoph Burkart, Dietmar Labeit, Mark McNabb, Yiming Wu, Henk Granzier, et Siegfried Labeit. 2006. « Nebulin Regulates Thin Filament Length, Contractility, and Z-Disk Structure in Vivo ». *The EMBO Journal* 25 (16): 3843-55. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601242>.

Wyce, Anastasia, Yuchen Bai, Sunil Nagpal, et Catherine C. Thompson. 2010. « Research Resource: The Androgen Receptor Modulates Expression of Genes with Critical Roles in Muscle Development and Function ». *Molecular Endocrinology* 24 (8): 1665-74. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0138>.

Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, et D. Beach. 1993. « P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases ». *Nature* 366 (6456): 701-4. <https://doi.org/10.1038/366701a0>.

Yaffe, D., et O. Saxel. 1977. « Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle ». *Nature* 270 (5639): 725-27. <https://doi.org/10.1038/270725a0>.

Yang, Heng, Jia Ren, Yu Bai, Jieli Jiang, et Shiyao Xiao. 2020. « MicroRNA-518-3p Suppresses Cell Proliferation, Invasiveness, and Migration in Colorectal Cancer via Targeting TRIP4 ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 98 (5): 575-82. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0442>.

Yoo, Hee Min, Sung Hwan Kang, Jae Yeon Kim, Joo Eun Lee, Min Woo Seong, Seong Won Lee, Seung Hyeun Ka, et al. 2014. « Modification of ASC1 by UFM1 Is Crucial for ER α Transactivation and Breast Cancer Development ». *Molecular Cell* 56 (2): 261-74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.007>.

Yu, Chao, Lili Chen, Lin Yie, Lei Wei, Taoyu Wen, Yanan Liu, et Hongyan Chen. 2015. « Targeting FoxM1 Inhibits Proliferation, Invasion and Migration of Nasopharyngeal Carcinoma through the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Pathway ». *Oncology Reports* 33 (5): 2402-10. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3834>.

Yu, Ji-Guo, Patrik Bonnerud, Anders Eriksson, Per S. Stål, Yelverton Tegner, et Christer Malm. 2014. « Effects of Long Term Supplementation of Anabolic Androgen Steroids on Human Skeletal Muscle ». *PloS One* 9 (9): e105330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105330>.

Zacksenhaus, E., Z. Jiang, D. Chung, J. D. Marth, R. A. Phillips, et B. L. Gallie. 1996. « pRb Controls Proliferation, Differentiation, and Death of Skeletal Muscle Cells and Other Lineages during Embryogenesis ». *Genes & Development* 10 (23): 3051-64.

<https://doi.org/10.1101/gad.10.23.3051>.

Zalc, Antoine, Shinichiro Hayashi, Frédéric Auradé, Dominique Bröhl, Ted Chang, Despoina Mademtoglou, Philippos Mourikis, et al. 2014. « Antagonistic Regulation of P57kip2 by Hes/Hey Downstream of Notch Signaling and Muscle Regulatory Factors Regulates Skeletal Muscle Growth Arrest ». *Development (Cambridge, England)* 141 (14): 2780-90. <https://doi.org/10.1242/dev.110155>.

Zaromytidou, Alexia-Ileana, Francesc Miralles, et Richard Treisman. 2006. « MAL and Ternary Complex Factor Use Different Mechanisms To Contact a Common Surface on the Serum Response Factor DNA-Binding Domain ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (11): 4134-48. <https://doi.org/10.1128/MCB.01902-05>.

Zhang, Hongmei, Hua Zhong, Lei Li, Wansheng Ji, et Xiaoqian Zhang. 2016. « Overexpressed Transcription Factor FOXM1 Contributes to the Progression of Colorectal Cancer ». *Molecular Medicine Reports* 13 (3): 2696-2700. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4875>.

Zhang, J. M., Q. Wei, X. Zhao, et B. M. Paterson. 1999. « Coupling of the Cell Cycle and Myogenesis through the Cyclin D1-Dependent Interaction of MyoD with Cdk4 ». *The EMBO Journal* 18 (4): 926-33. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.926>.

Zhang, J. M., X. Zhao, Q. Wei, et B. M. Paterson. 1999. « Direct Inhibition of G(1) Cdk Kinase Activity by MyoD Promotes Myoblast Cell Cycle Withdrawal and Terminal Differentiation ». *The EMBO Journal* 18 (24): 6983-93. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6983>.

Zhang, Pumin, Calvin Wong, Dou Liu, Milton Finegold, J. Wade Harper, et Stephen J. Elledge. 1999. « p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step ». *Genes & Development* 13 (2): 213-24.

Zhang, W., R. R. Behringer, et E. N. Olson. 1995. « Inactivation of the Myogenic bHLH Gene MRF4 Results in Up-Regulation of Myogenin and Rib Anomalies ». *Genes & Development* 9 (11): 1388-99. <https://doi.org/10.1101/gad.9.11.1388>.

Zhao, Weihua, David R. Beers, Shaughn Bell, Jinghong Wang, Shixiang Wen, Robert H. Baloh, et Stanley H. Appel. 2015. « TDP-43 Activates Microglia through NF-κB and NLRP3 Inflammasome ». *Experimental Neurology* 273 (novembre): 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.019>.

Zhong, Shibiao, Aiyan Zhou, Fanghua Qi, Zhen Li, Zeyan Yu, Yongchao Lu, et Xudong Liu. 2017. « Downregulating forkhead box M1 inhibits proliferation by inhibiting autophagy in the sw480 cell line ». *Biomedical Reports* 7 (1): 47-50. <https://doi.org/10.3892/br.2017.915>.

Zhou, Haiyan, Ori Rokach, Lucy Feng, Iulia Munteanu, Kamel Mamchaoui, Jo M. Wilmshurst, Caroline Sewry, et al. 2013. « RyR1 Deficiency in Congenital Myopathies Disrupts Excitation-Contraction Coupling ». *Human Mutation* 34 (7): 986-96. <https://doi.org/10.1002/humu.22326>.

Zhu, Z., et J. B. Miller. 1997. « MRF4 Can Substitute for Myogenin during Early Stages of Myogenesis ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association*

of Anatomists 209 (2): 233-41. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199706\)209:2<233::AID-AJA9>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199706)209:2<233::AID-AJA9>3.0.CO;2-J).

Zhuang, Y., C. G. Kim, S. Bartelmez, P. Cheng, M. Groudine, et H. Weintraub. 1992. « Helix-Loop-Helix Transcription Factors E12 and E47 Are Not Essential for Skeletal or Cardiac Myogenesis, Erythropoiesis, Chondrogenesis, or Neurogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (24): 12132-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12132>.

ANNEXES

Annexe 1 : Anticorps utilisés pour les expériences de Western-Blot et d'Immunofluorescence

Anticorps primaires :

Anticorps	Fournisseur, Référence	Espèce	Dilutions WB	Dilutions IF
Androgen Receptor	Don de D. Metzger	Lapin	1 :500	
ASC-1	Abcam, Ab70627	Lapin	1 :1000	
ASCC1	Santa Cruz, sc-160156	Chèvre	1 :500	
ASCC2	Bethyl, A304-020A	Lapin	1 :2500	
Aurora B	Invitrogen, PA5-17632	Lapin	1 :1000	
Caspase 3	Cell Signalling, 9664	Lapin	1 :1000	
Caspase 3 clivée	Cell Signalling, 9662S	Lapin	1 :1000	
Caspase 9	Cell Signalling, 9508	Souris	1 :1000	
Cycline A2	Cell Signalling, 4656	Souris	1 :1000	
Cycline D1	Santa Cruz, sc-450	Souris	1 :200	
FOXM1	Cell Signalling, 20459	Lapin	1 :1000	
KI-67	BD Pharm, 556003	Souris		1 :100
LIN54	Bethyl, A303-799A	Lapin	1 :2500	
MyHC (MF-20)	DSHB	Souris	1 :5000	
MyoD	Santa Cruz, sc-304	Lapin	1 :500	
MyoD	Santa Cruz, sc-32758	Souris	1 :500	1 :50
Myogénine	DSHB	Souris	1 :500	
Myogénine	BD Pharm, 556358	Souris		1 :100
PLK1	Cell Signalling, 4513	Lapin	1 :1000	
RBL2 (p130)	Cell Signalling, 13610S	Lapin	1 :1000	
p27 Kip1	Cell Signalling, 2552S	Lapin	1 :1000	
SRF	Santa Cruz, sc-335	Lapin	1 :500	1 :50
Tubuline	Sigma, T5168	Souris	1 :10000	
Tubuline	Cell Signalling, 11H10	Lapin	1 :1000	

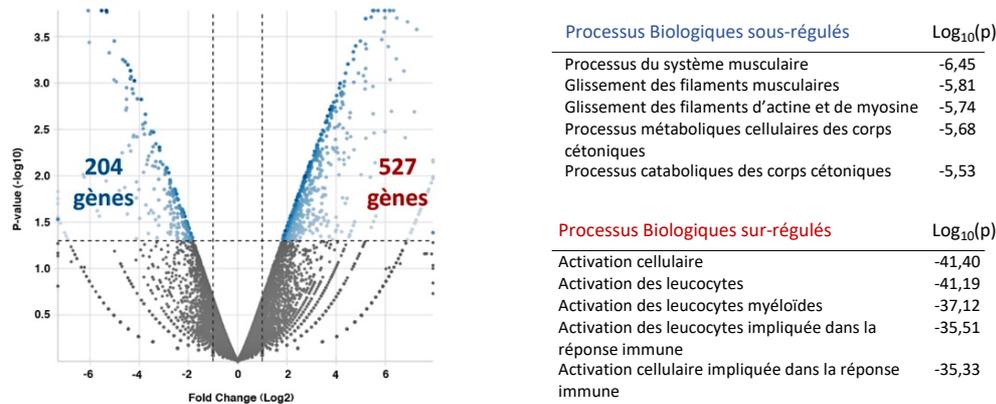
Anticorps secondaires :

	Fournisseur, Référence	Expérience	Dilution
Mouse anti-Rabbit Igg conformation specific	Cell Signalling, 5127	Western-Blot	1 :2000
Mouse anti-Rabbit Igg light chain specific	Cell Signalling, 93702	Western-Blot	1 :2000
Goat anti-Rabbit Igg (H+L), HRP conjugate	Promega, W4011	Western-Blot	1 :2500
Goat anti-Mouse Igg (H+L), HRP conjugate	Promega, W402B	Western-Blot	1 :2500
Rabbit anti-Goat Igg/HRP	Dako, P0449	Western-Blot	1 :2000
Goat anti-Rabbit Igg Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11034	Immunofluorescence	1 :10000
Goat anti-Mouse Igg Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11001	Immunofluorescence	1 :10000

Annexe 2 : Amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR

Gène	Séquence Forward	Séquence Reverse
<i>Rpl19</i>	5'-GGGCAGGCATATGGGCATA-3'	5'-GGCGGTCAATCTTCTTGGATT-3'
<i>Trip4</i>	5'-TTCCAGGAAGGCTTTGATGGCG-3'	5'-CCAAAGTCTTCTCTGTGAGGAG-3'
<i>Myog</i>	5'-CCAACCCAGGAGATCATTTC-3'	5'-CACCCAGCCTGACAGACAAT-3'
<i>Myh4</i>	5'-GCTTGAAAACGAGGTGGAAA-3'	5'-CCTCCTCAGCCTGTCTCTTG-3'
<i>Myh7</i>	5'-AGGGCGACCTCAACGAGAT-3'	5'-CAGCAGACTCTGGAGGCTCTT-3'
<i>Ckm</i>	5'-GGCTTCACTCTGGACGATGTCA-3'	5'-CCTTGAAGACCGTGTAGGACTC-3'
<i>Myod1</i>	5'-ATGGCATGATGGATTACAGCGGCC-3'	5'-GCTCCACTATGCTGGACAGGCAC-3'
<i>Cnn1</i>	5'-ACAAGAGCGGAGATTTGAGCCG-3'	5'-TCATAGAGGTGACGCCGTGTAC-3'
<i>Mb</i>	5'-CAATCACACGCCACCAAGCACA-3'	5'-CCTGAGCATCTGCTCCAAAGTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'- TCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'	5'- GACAAGCTTCCCCTTCTCAG-3'
<i>TRIP4-1</i>	5'- TCAGGAAGGCTTTGATGGTGGC-3'	5'- GTGGCTGCTATCCAAAGTCGTC-3'

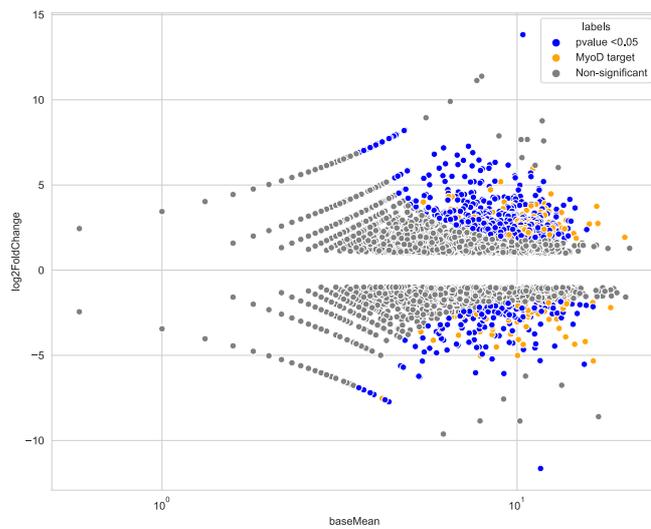
Annexe 3 : Gènes différentiellement exprimés dans les résultats RNAseq de muscle du patient FIII.1 et de muscle contrôle



Analyse transcriptomique par RNAseq d'un échantillon de muscle de patient. (A) Volcano-Plot des données RNAseq du muscle de patient FIII.1 et d'un muscle contrôle prélevé à un âge comparable. (B) Ontologie des gènes sous-régulés (haut) et sur-régulés (bas) dans le muscle du patient FIII.1 par rapport au muscle contrôle.

Gènes	TPM Muscle Ctrl	TPM muscle patient FIII.1	TPM Ctrl/TPM patient
Gènes du système musculaire sous-régulés			
<i>MYH2</i>	360,70	26,07	0,07
<i>MYL3</i>	1228,74	278,54	0,23
<i>MYBPC2</i>	300,63	19,46	0,06
<i>MYLK2</i>	172,30	57,68	0,33
<i>TNNT3</i>	775,94	113,04	0,14
<i>MYOM2</i>	658,71	196,91	0,3
Gènes d'activation cellulaire sur-régulés			
<i>LILRB2</i>	0,34	2,69	7,91
<i>CD83</i>	0,92	7,74	8,41
<i>TLR6</i>	0,12	1	8,33
<i>TLR8</i>	0,2	2,16	10,8
Gènes cibles de SRF			
<i>ACTA1</i>	29525,43	13055,4	0,44
<i>CKM</i>	7927,33	2284,34	0,29
<i>DNAJB1</i>	153,37	56,41	0,37
<i>MYL2</i>	23230,60	12260,84	0,53
<i>TNNC1</i>	5965,24	4234,81	0,71

Exemples de gènes différentiellement exprimés dans le muscle du patient FIII.1 et le muscle contrôle. Transcrits ARN (Transcripts per million, TPM) de gènes du système musculaire, de gènes d'activation cellulaire et de gènes cibles de SRF dans le muscle de patient et dans le muscle contrôle.



MA plot représentant la superposition des potentiels gènes cibles de MyoD, issus de la banque ChIP atlas, et des gènes dérégulés dans le muscle du patient FIII.1. Les points jaunes représentent les potentiels gènes cibles de MyoD significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq ; Les points bleus représentent les gènes significativement dérégulés dans nos résultats RNAseq qui ne sont pas des cibles de MyoD.

Annexe 4 : Bilan des actions de diffusion et des productions scientifiques et techniques

- **Publications dans des journaux avec comité de lecture :**

Meunier et coll., 2021 : « Inherited Defects of the ASC-1 Complex in Congenital Neuromuscular Diseases », International Journal of Molecular Sciences, Review ; Justine Meunier, Rocio-Nur Villar-Quiles, Isabelle Duband-Goulet, Ana Ferreiro

- **Communications à des colloques/congrès avec actes :**

Inaugural Conference of the Myoparis Consortium, 6 Décembre 2021, Paris: “The ASC-1 Complex, an Emerging Critical Node in Muscle and Motoneuron Development and Disease”, Justine Meunier, Andrew HO, Rocio-Nur Villar-Quiles, Bertrand Cosson, Ana Ferreiro, Isabelle Duband-Goulet

- **Présentation de poster:**

Myology 2022, Nice: “Congenital Neuromuscular Disorders Associated with the ASC-1 Complex: Phenotype and Molecular Update and Review of the Literature”, Justine Meunier, Rocio-Nur Villar-Quiles, Isabelle Duband-Goulet, Pascal Cintas, Emanuelle Uro-Coste, Mireille Cossee, Ana Ferreiro



Review

Inherited Defects of the ASC-1 Complex in Congenital Neuromuscular Diseases

Justine Meunier^{1,†}, Rocio-Nur Villar-Quiles^{1,2,†}, Isabelle Duband-Goulet^{1,*,‡} and Ana Ferreiro^{1,2,*,‡}

¹ Basic and Translational Myology Laboratory, UMR8251, University of Paris/National Center for Scientific Research, 75013 Paris, France; justine.meunier@etu.u-paris.fr (J.M.); rocionur.villarquiles@aphp.fr (R.-N.V.-Q.)

² Reference Center for Neuromuscular Disorders, Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP, Institute of Myology, 75013 Paris, France

* Correspondence: isabelle.duband-goulet@univ-paris-diderot.fr (I.D.-G.); ana.b.ferreiro@gmail.com (A.F.); Tel.: +33-1-5727-7965 (I.D.-G.); +33-1-5727-7959 (A.F.)

† Both authors are first co-authors.

‡ I.D.-G. and A.F. are co-last authors.



Citation: Meunier, J.; Villar-Quiles, R.-N.; Duband-Goulet, I.; Ferreiro, A. Inherited Defects of the ASC-1 Complex in Congenital Neuromuscular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6039. <https://doi.org/10.3390/ijms22116039>

Academic Editor:
Alberto Fernandez-Teruel

Received: 3 May 2021
Accepted: 27 May 2021
Published: 3 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Defects in transcriptional and cell cycle regulation have emerged as novel pathophysiological mechanisms in congenital neuromuscular disease with the recent identification of mutations in the *TRIP4* and *ASCC1* genes, encoding, respectively, ASC-1 and ASCC1, two subunits of the ASC-1 (Activating Signal Cointegrator-1) complex. This complex is a poorly known transcriptional coregulator involved in transcriptional, post-transcriptional or translational activities. Inherited defects in components of the ASC-1 complex have been associated with several autosomal recessive phenotypes, including severe and mild forms of striated muscle disease (congenital myopathy with or without myocardial involvement), but also cases diagnosed of motor neuron disease (spinal muscular atrophy). Additionally, antenatal bone fractures were present in the reported patients with *ASCC1* mutations. Functional studies revealed that the ASC-1 subunit is a novel regulator of cell cycle, proliferation and growth in muscle and non-muscular cells. In this review, we summarize and discuss the available data on the clinical and histopathological phenotypes associated with inherited defects of the ASC-1 complex proteins, the known genotype–phenotype correlations, the ASC-1 pathophysiological role, the puzzling question of motoneuron versus primary muscle involvement and potential future research avenues, illustrating the study of rare monogenic disorders as an interesting model paradigm to understand major physiological processes.

Keywords: congenital myopathies; spinal muscular atrophy; *TRIP4*; *ASCC1*; cell cycle; cell proliferation; muscle growth; arthrogryposis multiplex congenita; antenatal bone fractures; ASC-1 complex

1. Introduction

Congenital myopathies (CMs) are a group of rare inherited muscle disorders, genetically and clinically heterogeneous. They usually present at birth or in early childhood with delayed motor development and static or slowly progressive muscular weakness and hypotonia [1]. CMs are often associated with cardiac and/or respiratory failure [2–4] and most of them have no specific treatment so far [5]. The hallmark of congenital myopathies is the presence of characteristic abnormalities in the internal architecture of muscle fibers, typically without significant dystrophic lesions (necrosis, regeneration or fibrosis); dystrophic changes are the hallmark of congenital muscular dystrophies, a different nosological group. The type of structural lesion observed in muscle biopsies defines each individual congenital myopathy. For instance, the presence of sarcoplasmic and/or nuclear rod-shaped inclusions is characteristic of nemaline myopathy; focal areas of sarcomere disorganization and mitochondria depletion (cores) identify core myopathies; abundant internalized (rather than peripheral/subsarcolemmal) nuclei are observed in centronuclear myopathies; and subsarcolemmal croissant-shaped areas of myofilament disarray (termed caps) define cap disease.

Next-generation sequencing has allowed the identification of a growing number of genes associated with CMs. Most of these genes encode proteins involved in the architecture or the contractile function of muscle fibers, including calcium homeostasis [6], excitation-contraction coupling [7], membrane remodeling [8,9], myofibrillar force generation [10,11] or thin-thick filament assembly [12] and interactions [13]. More than 30 genes have been associated with CMs; most individual CMs show a remarkable genetic heterogeneity and phenotypical overlap with other subtypes, blurring the classically established boundaries [3,14,15]. However, a significant proportion of CM patients (up to 40% cases [16,17]) remain genetically uncharacterized.

Defects in transcriptional or post-transcriptional regulation had not been associated with human neuromuscular diseases until recent times. We reported five years ago a novel and severe recessive congenital myopathy with core lesions in a large consanguineous family presenting with a so-far unreported histological phenotype [18]. The causative gene identified, *TRIP4* (Thyroid Hormone Receptor Interactor 4), encodes a poorly known transcriptional co-activator, ASC-1 (Activating Signal Cointegrator-1). ASC-1 is predicted to contain two functional domains: a zinc finger motif interacting in vitro with basal transcription factors, transcription integrators or nuclear receptors [19] and a ASCH domain potentially binding RNA [20,21]. Lately, we found that ASC-1 is a novel regulator of cell cycle, cell proliferation and muscle cell growth [21], key mechanisms in myogenesis. Thus, transcriptional and cell cycle regulation have emerged as novel mechanisms and pathophysiological pathways in congenital muscle disease, and ASC-1 as a pivotal actor in skeletal muscle physiology [18,22]. Since ASC-1 interacts with three protein partners in a complex called the ASC-1 complex [19], genes encoding other proteins of this complex represented potential candidate genes for congenital muscle disease. This was confirmed by the identification of mutations in the gene *ASCC1*, encoding the ASC-1 partner protein ASCC1 (Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 1) [23].

Unexpectedly, defects in components of the ASC-1 complex seem to lead to an unusually large spectrum of neuromuscular diseases. Mutations of *TRIP4* or *ASCC1* have been reported both in patients with a congenital myopathy without any sign of motor neuron involvement, and in patients with a diagnosis of congenital motor neuron disease (Spinal Muscular Atrophy, SMA) associated with prenatal bone fractures [23,24]. Indeed, the ASC-1 complex was recently proposed to play a relevant role in congenital and degenerative motor neuron diseases and to represent a common link between SMA and the neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [25]. Thus, the ASC-1 complex is attracting increasing attention beyond the study of rare diseases, both on the neuromuscular and the basic science fields.

The pathomechanisms underlying congenital and degenerative motor neuron and muscle diseases being far from fully understood, which hinders their potential use as therapeutic targets, the study of ASC-1 related diseases might represent a useful model paradigm. We will review here the available data on their clinical and histopathological phenotype, genotype–phenotype correlations, the role of ASC-1 as a new regulator of cell cycle and muscle cell growth and the puzzling question of motor neuron versus primary muscle involvement.

2. *TRIP4* Mutations Are Associated with a Large Spectrum of Clinical and Histological Phenotypes, Potentially Affecting Cardiac Muscles

In 2016, we studied four patients from a large consanguineous family who presented with severe neonatal hypotonia and muscle weakness. The latter affected limb muscles, leading to failure to acquire independent ambulation, as well as trunk and neck muscles, leading to severe scoliosis and to respiratory failure causing death in infancy in the absence of assisted ventilation. Patients showed no or little joint contractures but joint hyperlaxity and skin abnormalities (hyperkeratosis, hyperelasticity). Using a combination of positional cloning and high-throughput exome studies, we found that the affected family members were homozygous for a recessive nonsense mutation (c.950G>A, p.Trp297Ter) of the *TRIP4* gene, encoding the ASC-1 protein. Thus, we coined the term ASC-1 related myopathy

(ASC1-RM) for this novel phenotypical and molecular entity [18]. A recent study of five additional families with seven novel *TRIP4* mutations [22] has expanded the phenotypical spectrum of this disease beyond very severe congenital forms, to include mild ambulatory adult patients. Overall, the clinical phenotype is marked by early-onset weakness of axial (neck and trunk) and proximal limb muscles, progressive scoliosis—sometimes associated with rigid spine—dysmorphic features and skin abnormalities reminiscent of those observed in collagen VI-related myopathies [26]. Variable respiratory involvement correlates with disease severity. Extraocular muscle involvement can be present in some patients. Electromyography studies performed in several patients from these six families revealed pure myogenic patterns, with no neurogenic findings. Muscle MRI of the lower limbs in *TRIP4*-mutant patients revealed predominant involvement of the posterior compartment of the thigh and relative preservation of semitendinosus, gracilis and sartorius [18,22]. Interestingly, cardiac involvement, including adult-onset cardiomyopathy, is part of the clinical spectrum of the disease [22], consistently with a primary involvement of striated muscles due to ASC-1 defects.

From the histopathological point of view, the spectrum of muscle fiber architectural lesions associated with *TRIP4* mutations is particularly large (Figure 1). Short core lesions termed multi-minicores are almost constantly observed, but they can coexist with cap lesions, nemaline or cytoplasmic bodies and mild dystrophic lesions [18,22]. Furthermore, rimmed fibers (with intense oxidative rims beneath the sarcolemma) have also been observed in *TRIP4*-mutant patients [21]. Thus, there is a clinical and histopathological overlap with other early-onset primary muscle disorders such as other forms of multi-minicores disease including SELENON-related myopathy [27–30], nemaline myopathy, cytoplasmic body myopathy, cap myopathy [31,32], or collagen VI-related congenital muscular dystrophy [26].

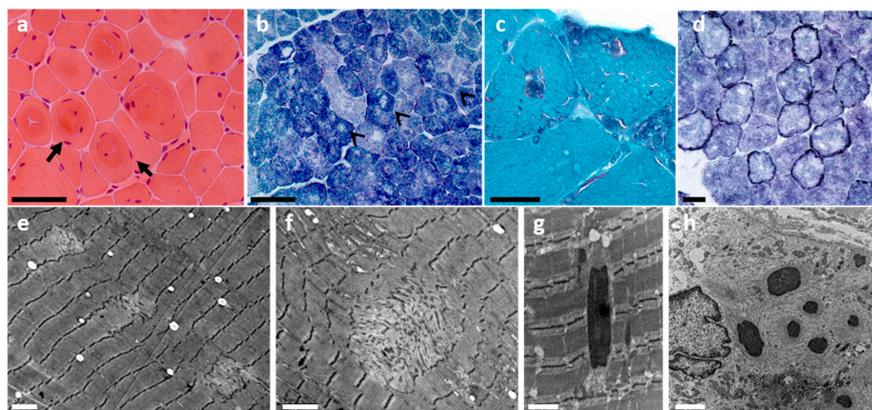


Figure 1. Histological spectrum of ASC1-related myopathy. Note histological features typical of a congenital myopathy such as fiber size variation (a,b), internalized nuclei (a) or whorled fibers (a, black arrows). Multi-minicores are the main histological features and can be seen as multiple lighter areas lacking oxidative activity on oxidative staining (black arrowheads in b) and areas of mitochondrial depletion and sarcomere disorganization on electron microscopy (EM; e,f). Modified Gomori trichrome revealed in some patients multiple inclusions (c), which corresponded to electron-dense nemaline rods (g) on EM. Intense oxidative rims beneath the sarcolemma (d, darker peripheral staining), compatible with mitochondrial proliferation or mislocalization, can be observed in some patients with *TRIP4* mutations and are comparable to those reported in *ASCC1*-mutated patients. Subsarcolemmal myofibrillar disorganization (sometimes forming cap lesions), cytoplasmic bodies and/rods can also be found (h). Transversal frozen sections: hematoxylin and eosin (a), NADH-TR (b,d), modified Gomori trichrome (c), EM (e–h). Scale bars = 50 μ m (a,b), 25 μ m (c,d), 2 μ m (e,f,h), 1 μ m (g). This figure has been modified from *Ann Neurol* 2020;87(2):217–232 and reproduced with permission from the publisher.

It is therefore intriguing that, simultaneously to the first report of ASC1-RM, Knierim et al. reported recessive *TRIP4* mutations associated with an antenatal phenotype diagnosed as spinal muscular atrophy (SMA) [23]. Five patients from three families presented with a phenotype marked by arthrogryposis multiplex congenita, neonatal respiratory distress requiring assisted ventilation and congenital bone fractures. Muscles did not react upon stimulation and neurography reportedly showed axonal neuropathy. Most children died from respiratory failure or acute heart failure within the first 16 months of life. Indeed, congenital heart defects (atrial septal defect, patent ductus arteriosus), a rare finding in congenital SMA, were associated in two families with cardiomyopathy; the latter is frequently associated with primary diseases of striated muscles but, to our knowledge, has not been reported in SMA patients.

Skeletal muscle biopsies from some of these children showed major reduction in and variability of myofiber size, suggesting that a primary muscle component in this second ASC-1 associated phenotype cannot be excluded. However, a tendency to clustering of type I muscle fibers (considered a sign of denervation) and the presence of apoptotic α -motoneurons in the anterior horn of the spinal cord in one patient were compatible with SMA. Sural nerve biopsies from one child showed normal density of myelinated fibers but loss of unmyelinated axons (mostly carrying autonomic or sensory information). Interestingly, *trip4*- and *ascc1*-knocked-down zebrafish models revealed severe disorganization of both myotomes and neuromuscular endplates [23].

No abnormality in brain imaging studies has been reported in patients with *TRIP4* mutations so far.

3. *ASCC1* Mutations: Lethal Involvement of Central Nervous System, Skeletal Muscles and Bones

Knierim et al. also reported the first mutation in the *ASCC1* gene, encoding the ASC-1 partner *ASCC1*, in two siblings. Their severe clinical presentation was marked by prenatal manifestations (decreased fetal movements, polyhydramnios), premature birth, severe neonatal hypotonia, areflexia, respiratory distress, difficult feeding, multiple congenital contractures (arthrogryposis multiplex congenita) and congenital bone fractures. Both patients also exhibited cardiac defects such as patent ductus arteriosus and patent foramen ovale but, although both *trip4* and *ascc1* are expressed in cardiac muscles in zebrafish, they had no myocardial disease. These patients were diagnosed as having a severe antenatal-onset SMA and died within the first months of life due to respiratory failure. Cerebral MRI performed in both siblings revealed a simplified gyral pattern of the cerebral cortex. Muscle biopsy from one of these patients showed fiber size variation, atrophic fibers and muscle fiber immaturity (intense staining for MHC_{dev}). Sural biopsy from one patient showed normal density of myelinated fibers but unmyelinated axon loss [23].

Interestingly, Böhm et al. reported three additional families with *ASCC1* recessive nonsense or frameshift mutations presenting with the same lethal clinical phenotype. The muscle biopsies from these patients disclosed myopathic features (i.e., fiber size variability, myofibrillar disorganization and enlargement of the Z-bands on electron microscopy) and their EMG studies were not suggestive of motor neuron involvement but of a severe form of congenital myopathy [24]. Rimmed fibers comparable to those associated with *TRIP4* mutations were observed in patients with *ASCC1* mutations [24]. These findings suggested that *TRIP4* and *ASCC1* are implicated in a common pathophysiological pathway that leads to multiple forms of myofibrillar disarray, and thus to an overlap of different histopathological CM lesions.

The question of primary motor neuron versus muscle involvement has not been clarified by more recent reports of three other patients with 5 novel *ASCC1* mutations. Their clinical presentation was consistent with the lethal perinatal phenotype described above, including congenital bone fractures [33–35], mild brain ventricle dilatation abnormalities in one patient [35] and one stillbirth [24]. The muscle biopsy from one of them was reported as atrophic with no further description [33] and no muscle biopsies were performed in the remaining two cases. Dysmorphic features and a myopathic appearance were observed in

most of these cases [33,35]. Although some of these patients were labeled as having SMA by analogy with the first cases with *ASCC1* mutations reported, no electrophysiological study or in-depth histopathological examination was performed supporting or clarifying this diagnosis.

4. Genetic Bases of the ASC-1 and *ASCC1* Related Disorders

TRIP4 is a 67.5 kbp gene localized in chromosome 15, contains 13 exons and encodes the ubiquitous 65 kDa transcriptional co-activator protein ASC-1. So far, 10 mutations in the *TRIP4* gene have been reported in 16 patients from 9 families. Most of them are frameshift mutations but one missense variant and one homozygous deletion of exons 8–9, predicting loss of ASC-1 functional domains, have also been identified [22]. Transmission was autosomal recessive in all cases, with no de novo mutations (Table 1). All heterozygous parents were asymptomatic for CNS or neuromuscular disease.

Table 1. Summary of the 10 *TRIP4* mutations identified so far. Some patients were compound heterozygous (comp het) for a missense and a truncating mutation (in exons 4 + 11) or for two different truncating mutations (in exons 1 + 9 or 6 + 7).

Publications	<i>TRIP4</i> Exon	cDNA Change	Protein Change	Variation Type	Predicted Effect	Primary Involvement Reported
Davignon et al., 2016	7	c.950G>A (homozygous)	p.Trp297Ter	substitution	nonsense	muscle
Knierim et al., 2016	6	c.760C>T (hom or comp het)	p.Arg254Ter	deletion	nonsense	motor neuron + bone
	7	c.832C>T (hom or comp het)	p.Arg278Ter	deletion	nonsense	motor neuron + bone
Villar-Quiles et al., 2020	2	c.141_142delAT (homozygous)	p.Tyr48CysfsTer3	deletion	frameshift	muscle
	4	c.534C>G (comp het)	p.His178Gln	substitution	missense	muscle
	11	c.1544_1547delACTG (comp het)	p.Asp515AlafsTer34	deletion	frameshift	muscle
	8	c.1065delC (homozygous)	p.Ile356LeufsTer6	deletion	frameshift	muscle
	1	c.55_56insCT (comp het)	p.Gln19ProfsTer47	insertion	frameshift	muscle
	9	c.1197delA (comp het)	p.Ser399SerfsTer12	deletion	frameshift	muscle
	8 + 9	homozygous deletion exons 8 and 9		deletion	in-frame deletion	muscle

Mutations are distributed along the entire length of the gene (Figure 2). Some of them affect the predicted functional domains of the protein. For instance, the p.His178Gln substitution lies in the central Zinc Finger domain, while some deletions disrupt the ASCH domain located in the carboxy-terminal part (p.Asp515AlafsTer34; p.Ser399SerfsTer12; p.Ile356LeufsTer6; homozygous deletion of exons 8 + 9). Other frameshift mutations were predicted to lead to very short truncated proteins lacking any functional domain (p.Gln19ProfsTer47; p.Tyr48CysfsTer3), while three nonsense mutations were compatible with the synthesis of truncated proteins preserving at least one of the two functional domains (p.Trp297Ter; p.Arg254Ter; p.Arg278Ter). However, experimental studies using patient-derived samples disclosed ASC-1 severe depletion or absence associated with 6 of these mutations, including the *TRIP4* missense mutation (p.His178Gln), suggesting elimination by transcriptional or post-transcriptional quality-control mechanisms. Indeed, in the first ASC1-RM family reported, patients homozygous for the non-sense *TRIP4* mutation c.950G>A (NM_016213.4) or p.Trp297Ter (NP_057297.2), which introduces a premature termination codon, showed mRNA decay and absence of protein expression. Interestingly, ASC-1 was undetectable both in the mildest and the first severe cases reported [18,22], suggesting modulators of phenotype severity other than the amount of ASC-1 protein present. Along these lines, two *TRIP4* nonsense mutations resulted in loss of the full-length

protein but also, through corrective splicing events (exon skipping), in upregulation of a shorter isoform containing most ASC-1 functional domains. In spite of this, homozygous or compound heterozygous patients with these mutations (originating from the Balkan region) had a very severe neonatal neuromuscular phenotype, leading to death in the first weeks of life [23].

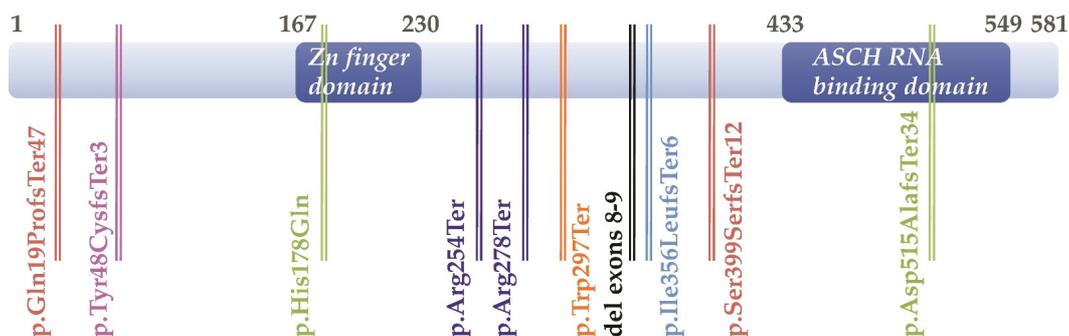


Figure 2. Schematic representation of the ASC-1 protein and localization of the patients' mutations regarding the two predicted functional domains (deep blue boxes).

The *ASCC1* gene, located on chromosome 10, contains 13 exons (named 1–2, 3a, 3b, 4–8, 9a, 9b, 9c and 10) of which 11 are coding, generating multiple alternatively spliced transcripts which encode more than 20 isoforms. The transcript encoding the 41 kDa *ASCC1* is the most abundant. Exon 3b is only marginally expressed according to brain and muscle RNAseq datasets [23]. Up to date, 7 mutations in the *ASCC1* gene have been identified in a total of 12 patients from 7 families. All are nonsense or frameshift variants leading to autosomal recessive phenotypes in patients. These include homozygous nonsense mutations (two mutations, four families), as well as compound heterozygosity of a nonsense mutation with either hemizygous deletions (two families) or duplication of a single nucleotide (one family). A single-nucleotide duplication in exon 3 (c.157dupG, p.Glu53GlyfsTer19) is the most frequently reported mutation. It has been identified so far in four families originating from the Mediterranean area (Turkey, Portugal, Tunisia and Morocco), both in homozygosity and in compound heterozygosity. This variant is predicted to generate a premature termination codon compatible with elimination of the mutant transcript through nonsense mediated decay. Indeed, complete absence of *ASCC1* protein has been experimentally confirmed in one patient homozygous for the c.157dupG [23] (Table 2).

Table 2. Summary of the 7 *ASCC1* mutations identified so far. Some patients were compound heterozygous (comp het) for a nonsense mutation associated with a nucleotide duplication (in exons 3a and 5, respectively) or with microdeletions (in exons 9a and 6-9a or in exons 5 and 9). The localization of the mutations reported in the table corresponds to those mentioned in each article. Authors generally used the exon nomenclature from the first description by Knierim et al. [23] with the exception of Lu et al. [35]; n.c.: non-characterized.

Publications	<i>ASCC1</i> Exon	cDNA Change	Protein Change	Variation Type	Predict Effect	Primary Involvement Reported
Knierim et al., 2016	3a	c.157dupG (homozygous)	p.Glu53GlyfsTer19	single base pair duplication	frameshift	motor neuron/CNS + bone
Oliveira et al., 2017	3a	c.157dupG (homozygous)	p.Glu53GlyfsTer19	single base pair duplication	frameshift	n.c. muscle? + bone

Table 2. Cont.

Publications	ASCC1 Exon	cDNA Change	Protein Change	Variation Type	Predict Effect	Primary Involvement Reported
Böhm et al., 2019	3a	c.157dupG (hom or comp het)	p.Glu53GlyfsTer19	single base pair duplication	frameshift	muscle + bone
	5	c.466C>T (comp het)	p.Arg156Ter	substitution	nonsense	muscle + bone
	6	c.667C>T (homozygous)	p.Glu223Ter	substitution	nonsense	muscle +bone
Giuffrida et al., 2019	9a	c.1027C>T (comp het)	p.Arg343Ter	substitution	nonsense	bone + ?
	6–9a	hemizygous deletion exons 6 to 9a		microdeletion	in-frame deletion	bone + ?
Lu et al., 2020	5	hemizygous deletion in exon 5		microdeletion	frameshift	CNS + bone
	9	c.932C>G (comp het)	p.Ser311Ter	substitution	nonsense	CNS + bone

Regarding potential genotype–phenotype correlations, two of the families reported by Knierim et al. as having a severe form of SMA with congenital bone fractures [23] carried *TRIP4* nonsense mutations resulting in exon skipping and upregulation of a shorter isoform containing most ASC-1 functional domains (Figure 2). By contrast, *TRIP4* mutations associated with a congenital myopathy phenotype [18,22] lead to ASC-1 protein depletion. Although it cannot be excluded that a component of primary muscle involvement contributed to the severe phenotype in the *TRIP4* mutant patients reported in [23], these genetic data suggest that absence of ASC-1 (haploinsufficiency) might be associated with a primary striated muscle phenotype, whereas expression of a shorter ASC-1 protein might lead to a partially different pathophysiological cascade, including preferential motor neuron involvement. Detailed analyses and deep phenotyping of additional patients with different *TRIP4* mutations are necessary to clarify this point. As mentioned above, absence of ASC-1 protein has been observed in both mild and severe cases and therefore does not seem to correlate with phenotype severity.

In the case of *ASCC1* mutations, no genotype–phenotype correlation can be established so far. All mutations lead to a predicted total absence of *ASCC1* protein and all patients share the severe congenital phenotype described above, lethal in the perinatal period, associated with congenital bone fractures.

5. Different ASC-1 Complex Conformations Reveal Specific Roles of ASC-1 and ASCC1

The ASC-1 complex was first described as a tetrameric protein complex containing four protein subunits, ASC-1, ASCC1, ASCC2 and ASCC3. Few structural and functional data are available on these proteins. As mentioned above, ASC-1, which gives its name to the complex, is predicted to contain two functional domains (Figure 2) potentially involved in protein–protein interactions or RNA binding [19,20]. The smallest partner is the ASCC1 protein (45 kDa), that contains an RNA binding K-homology (KH) domain fused to a C-terminal RNA ligase-like domain [36]. The ASCC2 (Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 2) partner is a 100 kDa subunit shown to contain a coupling of ubiquitin to ER degradation (CUE) domain [37] suspected to be involved in ubiquitin signaling. ASCC3 (Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 3) is the largest subunit (200 kDa), with a strong homology with DEXH-type RNA helicase domains. However, it has recently been characterized as a DNA helicase involved in DNA damage repair [38]. The stoichiometric association of the four subunits forming the ASC-1 complex in vitro was first shown to transactivate a class of transcription factors, namely AP-1, NF- κ B and Serum Response Factor (SRF), involved in cell-fate controlling pathways, including proliferation, differentiation, migration or cell survival. ASC-1 was shown to be critical for the functional interaction between the ASC-1 complex and those three transcription factors through its

N-terminal part, and ASCC1 was essential for AP-1 transactivation [19]. Three years ago, new transcriptional and post-transcriptional activities of this complex were discovered, revealing its contribution to general transcription and splicing events through interactions with the RNAP II machinery. Again, the ASC-1 subunit plays an essential role as this interaction was disrupted by the deletion of its C-terminal part [25].

Interestingly, the subunits of the ASC-1 complex can also associate in a different way to fulfill other activities (Figure 3). Thus, ASC-1 or ASCC1 appeared dispensable in two regulatory processes contributing to DNA damage response and resolution of ribosome stalls [36,37,39,40].

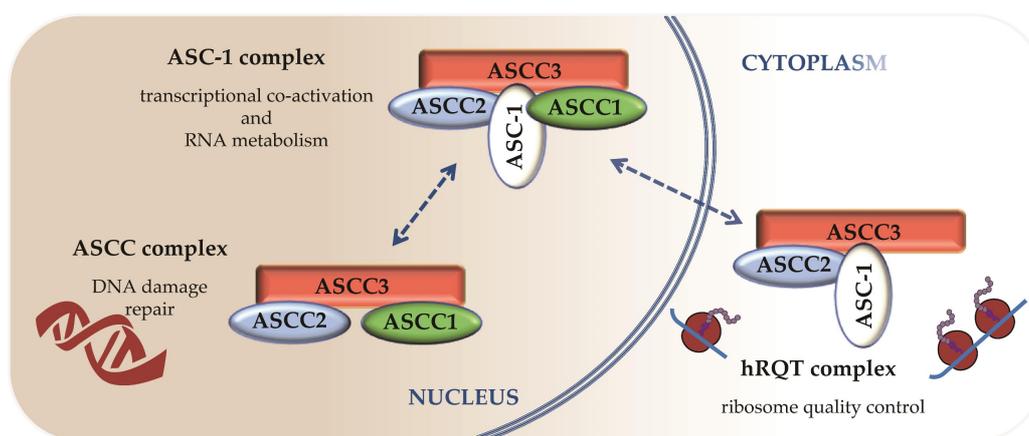


Figure 3. Proposed model for the different complexes containing ASC-1, ASCC1, ASCC2 and ASCC3 subunits and their distribution in cell compartments. Dashed double arrows indicate potential localization or composition changes that are yet to be demonstrated.

The smallest ASCC complex has been discovered while studying a new molecular mechanism coupling a helicase and a dealkylating enzyme to perform DNA damage repair and maintain genomic integrity [38]. An unbiased proteomic approach identified ASCC1, ASCC2 and ASCC3 as the subunits associated with this DNA alkylation repair complex. The latter acts as a sensor of a new ubiquitin-dependent signaling involved in DNA repair, resulting in the recruitment of alkylation repair enzymes, ASCC3 and ALKBH3. The ubiquitin binding and the helicase activities of ASCC2 and ASCC3, respectively, were essential to the function of this alkylation damage signaling pathway [37]. So far, the proper assembly of this ASCC complex appears to rely on ASCC1, which also contributes to address the ASCC complex to alkylated nucleotides foci via a mechanism that still needs to be clarified [36].

A third complex containing ASCC3, ASCC2 and ASC-1 is associated with abnormal ribosome stalling resolution. Collided ribosomes marked with ubiquitin trigger the formation of the so-called human Ribosome-associated Quality Control (RQC)-Trigger complex (hRQT). Dedicated to quality control of translation, this complex ensures accurate gene expression and maintenance of protein homeostasis. Recognition and disassembly of stalled ribosomes are achieved, respectively, through ASCC2 ubiquitin binding activity and ASCC3 helicase activity. The role of ASC-1 is less well defined. However, lack of ASC-1 causes unstable association of the hRQT complex with ubiquitinated ribosomes, resulting in lower efficiency of RQC induction. Therefore, ASC-1 is suspected to play a critical role in the stabilization of this association through a potential RNA binding activity [39]. In a recent study, authors showed that ASCC1 was not required for RQC induction and that this novel hRQT complex can form without ASCC1. However, another article extended the

composition of the hRQT complex to the four subunits of the ASC-1 complex, illustrating the difficulty to determine the functional minimal complex required for this activity [40].

The main difference between these transcriptional, post-transcriptional or translational activities appears to be their subcellular localization: RQC is performed in the cytoplasm whereas transcriptional and post-transcriptional regulation occurs in the nucleus. This clearly suggests that each individual subunit of those complexes may localize in both the cytoplasm and the nucleus. Up to date, evidence concerning their potential shuttling between both cellular compartments is poor. ASC-1 has been found by indirect immunofluorescence to be a nuclear protein that localizes into the cytoplasm under conditions of serum deprivation [41], but more recent studies in human fibroblasts did not confirm this point [23].

ASCC2 and ASCC3 appear as the functional core common to the 3 complexes described above (see Figure 3). Moreover, ASCC3 may be essential in the occurrence of the 3 different complexes, since its depletion by silencing was reported to reduce levels of expression of all the other components [40]. According to our current knowledge, the functional differences between those complexes appear to rely on the presence or absence of the last two subunits, ASCC1 and ASC-1. They contribute to the localization or the assembly of the complexes and they also play a critical role in stabilizing interactions involving a broad range of partners such as ribosomes, elements of the RNA polII machinery, transcription factors or transcriptional regulators.

Consequently, their absence or any alteration in their structure might lead to pathological outcomes. For instance, the deficit in ASC-1 protein observed in CM patients may impact the formation of some complexes causing a loss of function, with expected outcomes in essential cellular processes such as proliferation-differentiation, migration or cell survival, and RNA metabolism and translation. By contrast, shorter forms of ASC-1 could induce other types of complex dysfunction with impact on neuromuscular development and bone metabolism. Much remains to be elucidated regarding the function of the individual subunits of the ASC-1 complex as few functional domains have been identified so far.

6. ASC-1 Is a Novel Regulator of Cell Proliferation, Growth and Cell Cycle

While the specific role of ASCC1 in the neuromuscular system has not been experimentally studied so far, ASC-1 has emerged in the last years as a novel regulator of several cell mechanisms and pathways which are pivotal for muscle development and growth.

The formation of skeletal muscle (myogenesis) is a sequential process which includes the proliferation of myogenic mononucleated cells, followed by induction of muscle-specific gene expression, exit from the cell cycle and fusion to form multinucleated myotubes which subsequently will grow to become differentiated muscle fibers [42]. Using patient-derived cultured muscle cells, we found that ASC-1 absence impairs the growth of myotubes. This was confirmed by in vitro experiments using a *Trip4* knockdown (*Trip4KD*) murine myogenic cell line, which showed a reduced myotube diameter and a significant decrease in the expression of sarcomere proteins such as myosin heavy chain. Both ex vivo and in vitro results contributed to identify ASC-1 as a new regulator of late myogenic differentiation and myofiber growth [18]. This work established for the first time that ASC-1 is indispensable for human skeletal muscle, identified transcriptional co-regulation as a novel pathophysiological pathway and suggested defects in myotube growth as a novel myopathic mechanism.

The complex mechanisms that regulate muscle fiber growth are still incompletely understood, and identifying a novel regulatory protein is interesting progress. However, part of the cell growth is determined at pre-differentiation (proliferation) stages. Thus, using the aforementioned *Trip4KD* C2C12 cell line, we investigated the role of ASC-1 in cell proliferation. We found increased myoblast proliferation in the absence of ASC-1 due to a shortening of the G0/G1 phase of the cell cycle, leading to acceleration of the cell cycle progression and reduction in myoblast size [22]. This cell phenotype was associated with

altered expression of proteins controlling the progression of the cell cycle. Levels of cyclin D1 and p21, two leading actors of the cell cycle G1 phase, were significantly increased in the absence of ASC-1, suggesting an increased formation of the cyclin D1-Cdk4/6 complex responsible for phosphorylation the Retinoblastoma protein (pRb). This master cell-cycle control protein also regulates muscle-specific gene expression through its target E2F. Hypophosphorylated pRb inhibits E2F transcription factors required for G0/G1-S transition and S phase entry. Indeed, ASC-1 depleted cells showed a strong tendency towards a decrease in the hypophosphorylated forms of pRb in favor of hyperphosphorylation. Thus, cyclin D1 and p21 overexpression in the absence of ASC-1 induced a hyperphosphorylation of pRb which possibly leads to loss of pRb-mediated inhibition of the G0/G1-S transition, to cell cycle acceleration and to reduced cell growth. Increased cell proliferation was also confirmed in primary skin fibroblasts derived from *TRIP4*-mutant patients, which is consistent with the presence of skin abnormalities in ASC1-RM [22] and indicates that ASC-1 is involved in cell cycle regulation in both fibroblasts and myogenic cells. As proliferation is a basal physiological process, this cell phenotype could have implications also for other extra-muscular tissues including adipose tissue, whose distribution was altered in some ASC1-RM patients [18,22].

Correlations between cell cycle and cell size and/or growth have long been studied in budding yeast and more recently in mammalian cells [41,43]. Increasing evidence suggests that alterations in regulatory mechanisms of cell size control may impact protein synthesis threshold in particular cell types [43], and might contribute to explain the decreased expression of some key myogenic proteins observed in the *Trip4*KD C2C12 model. Additionally, pRb also regulates late muscle development, promoting myofibrillogenesis and muscle cell growth by activating transcription of myogenic and metabolic genes. Consistently, we also found an abnormal expression of cyclins in post-mitotic frozen muscle biopsies from patients with *TRIP4*-mutations leading to ASC-1 absence [22]. Thus, these mechanisms are not only relevant for the late myogenic differentiation and myofiber growth defects reported in ASC-1 devoid myotubes, but might contribute as well to explaining the various myofibrillar defects observed in patients' biopsies.

Taken together, the current data suggest that ASC-1 regulates at least two steps of myogenesis, as a negative cell-cycle regulator of proliferation and as a key player in promoting the growth of both proliferating myoblasts and differentiated myotubes (Figure 4).

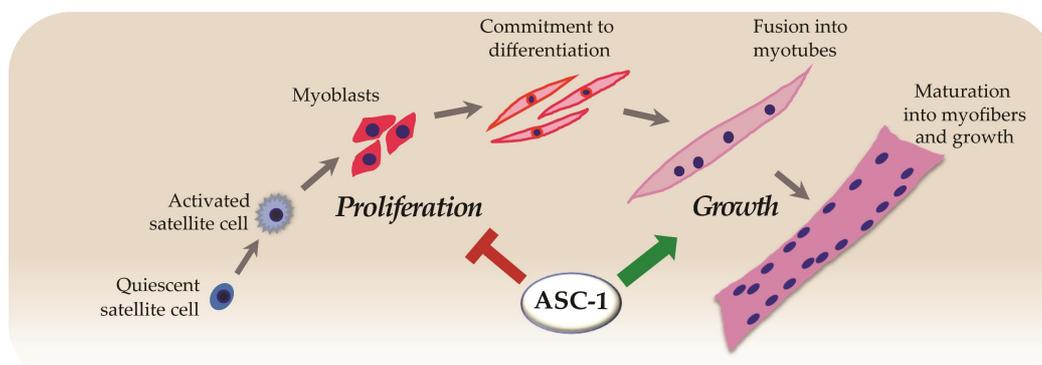


Figure 4. ASC-1 modulates cell cycle progression in proliferative myogenic cells by regulating cell cycle protein expression and phosphorylation [22] and promotes muscle cell growth [18].

7. Discussion

In the last years, identification of inherited defects in the ASC-1 complex and their association with monogenic congenital neuromuscular disease has represented a significant

progress in the molecular characterization of these rare disorders, and revealed defects in co-transcriptional regulation, cell cycle and cell growth as novel pathomechanisms. However, it has also raised interesting questions which remain so far unanswered and represent interesting avenues of future investigation. Transcriptional cointegrators act as coactivators or corepressors through the integration of transcription factors or nuclear receptors in multi-protein complexes, and can thereby adapt cell metabolism to environmental changes or modulate gene expression in a tissue-specific way [44]. Thus, unraveling their physiological role can help to understand a variety of physiological pathways, and to clarify why inherited defects of a ubiquitous protein are often associated with a tissue-specific phenotype.

An important step would be establishing definitely which tissues and systems are affected in individuals with *TRIP4* or *ASCC1* mutations, namely clarifying the puzzling question of motoneuron versus primary muscle involvement. The answer to this might not be a simple one, since antenatal development of motoneurons and muscle are bidirectionally interdependent; full maturation of muscles requires adequate contact with motoneuron endplates, and conversely retrograde signaling from muscle towards motoneurons contributes to motor neuron survival and synapse maturation at postnatal stages [45]. Thus, primary defects in either motoneurons or muscle fibers can lead to a structurally and/or functionally abnormal neuromuscular junction (NMJ) and to overlapping phenotypes, particularly difficult to differentiate in newborn patients.

So far, 6 out of the 9 reported families with *TRIP4* mutations presented clinically, electrophysiologically and histopathologically with a primary skeletal muscle phenotype, associated in some cases with cardiac muscle disease (cardiomyopathy), and had severe depletion or absence of ASC-1 protein. Thus, the most common phenotype associated hitherto with *TRIP4* defects is a congenital myopathy termed ASC-1 related myopathy. Strikingly, three families sharing two *TRIP4* mutations which led to upregulation of a shorter ASC-1 isoform presented with a more severe antenatal phenotype. Muscle biopsies from these patients disclosed immature muscle fibers of reduced and variable size, which is compatible with a primary muscle disease and with the reported role of ASC-1 in promoting muscle fiber growth. The cardiomyopathy in two of these three families also supports a potential primary striated (skeletal and cardiac) muscle involvement. However, in some patients from these severe families, grouping of type 1 fibers (classically a neuropathic sign), neurography studies suggesting axonal neuropathy and/or, for one patient, apoptotic spinal cord α -motoneurons were reported. These findings prompted the diagnosis of a primary motor neuron disease. Interestingly, knock-down of *trip4* in zebrafish led both to perturbed outgrowth of α -motoneuron axons and to abnormal muscle structures (myotomes with severely reduced myofibril formation), together with defective NMJs [23]. These findings could be secondary to a neuropathy with downstream effects on NMJ and muscle, but might also be compatible with a retrograde involvement of NMJ and motoneurons secondary to a primary muscle defect. Actually, both mechanisms could coexist, although it cannot be excluded at this point that different types of *TRIP4* mutations are associated with preferential involvement of different tissues. Thorough studies of additional cases with other *TRIP4* mutations, including deep-phenotyping (electromyography, muscle biopsy, neuroimaging), ASC-1 protein studies and careful phenotype-genotype correlations, will hopefully contribute to clarify this point.

The situation is not very different regarding *ASCC1*. Patients from the seven reported families with *ASCC1* mutations share a common clinical phenotype, but for some of these families, muscle biopsy or electromyographies have not been performed. Böhm and colleagues studied exhaustively three families with *ASCC1* mutations, reporting myopathic histopathological and electromyographic features without signs of motor neuron involvement. Thus, they considered *ASCC1*-related disease as a severe congenital myopathy [24]. In contrast, the family described by Knierim et al. had, aside from major reduction in fiber size, fiber type grouping and neurogenic EMG. In a more recent case, muscle biopsy was described as atrophic with no further description [25]. However, unlike in *TRIP4*-mutant patients, brain MRI abnormalities were observed in two families with *ASCC1* defects

and myocardial involvement has never been reported, which might support a stronger association of *ASCC1* defects with neuronal involvement. Furthermore, transcriptomic studies in skin fibroblasts from one *ASCC1*-mutant patient showed downregulation of genes associated with neurogenesis, neuronal migration, and pathfinding, as well as with bone development [23].

In fact, a growing body of evidence suggests that the ASC-1 complex could be involved in neurodegenerative pathomechanisms. The ASC-1 complex associates with the RNAP II machinery and ALS or SMA-causative proteins [25]. Besides, known targets of the ASC-1 complex including NF- κ B and AP-1 transcription factors have been recently linked to ALS [46–48]. Furthermore, the ASC-1 complex contributes to counteracting defective DNA damage repair (DDR), one of the mechanisms underlying neurodegenerative disorders [49,50]. Neurons are highly metabolically active, produce great amounts of ROS and usually lack the homologous recombination pathway of DDR, all of which can potentially result in neurodegeneration due to accumulation of DNA damage [51,52]. The latter includes DNA alkylation [53] requiring a dealkylation repair complex whose formation, as we previously mentioned, is regulated by *ASCC1* [36].

Congenital bone fractures, present in only two families with *TRIP4* mutations [23], are part of the clinical phenotype in all the *ASCC1*-mutated patients [24,33–35]. Although prenatal fractures have been non-specifically reported in other forms of congenital muscle disease [54–56], their frequency in *ASCC1*-mutant cases suggests that, in this context, they are not an unspecific consequence of fetal immobility but directly linked to a role of *ASCC1* in bone. Interestingly, *ASCC1* absence has been shown to inhibit AP-1 transactivation by the ASC-1 complex [19], and several transcription factors from the AP-1 family were recently shown to play a role in bone development [57–60]. Furthermore, down-regulation of osteoprogenitor proliferation is a critical step for osteoblast differentiation, and several cell cycle regulators such as p27 [61] or Cdk6 [62] contribute to growth and differentiation of osteoblasts. This suggests that *ASCC1* might regulate proliferation and differentiation of bone progenitors, its defects resulting in abnormal bone structure.

Indeed, our data suggest a potential function of the ASC-1 complex in modulation of the balance between cell proliferation and cell differentiation in different tissues [18,22]. Deregulation of cell proliferation is a hallmark of cancer. Germline mutations in the *ASCC1* gene have been associated with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma [63,64]. It has been shown that *TRIP4* is highly expressed in human melanoma [65], cervical cancer [66] and colorectal cancer [67] cell lines and tumor tissues, and that *TRIP4* knockdown reduces proliferation, migration and invasion of tumor cells. The latter seems in contradiction with our data showing negative regulation of cell proliferation by ASC-1 in non-cancerous cells. However, it is conceivable that the ASC-1 complex, as a transcriptional co-integrator, does not only have a unidirectional direct role but, depending on the cell environment and on its association with different proteins, can differentially modulate diverse pathways in different cell types. Thus, ASC-1 can modulate estrogen receptor- α [68], essential for proliferation, in breast cancer cells, activate MAPK and PI3K/AKT signaling in cervical malignant cells [66] or co-regulate the expression of proinflammatory cytokines COX-2/iNOS with p300 in melanoma cells [65]. Further functional studies are needed to characterize fully its functional role in human cancer.

In conclusion, the transcriptional coregulator ASC-1 complex is emerging as a key player in several major physiological and pathophysiological processes. We recommend that *TRIP4*, *ASCC1* and potentially the genes encoding the other protein components of the ASC-1 complex should be systematically included in diagnostic gene panels of congenital neuromuscular, myocardial and/or bone diseases. Further studies including deep phenotyping and careful phenotype-genotype correlations in additional patients with new inherited defects of ASC-1 complex proteins are mandatory in order to establish a diagnosis of congenital myopathy or spinal muscular atrophy. Further functional studies will hopefully contribute to a clarification of the role(s) of the ASC-1 complex and provide additional illustration of the interest of mechanistic studies of rare or ultra-rare mono-

genic disorders as a useful model paradigm to understand complex pathophysiological pathways underlying many different prevalent human conditions, including malignant or neurodegenerative diseases.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, J.M., R.-N.V.-Q., I.D.-G., A.F.; Writing—review and editing, J.M., R.-N.V.-Q., I.D.-G., A.F.; Supervision, I.D.-G., A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the French Association against Myopathies (grant 20923), the National Center for Scientific Research, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the University of Paris; J.M. is the recipient of a doctoral grant from the University of Paris; R.N.V.-Q. is the recipient of a research grant from the Alfonso Martín Escudero Foundation (Research Fellowship at Universities or Centers Abroad, Convocation 2017).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge Chantal Riga for excellent administrative assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ALKBH3	Alpha-ketoglutarate-dependent Dioxygenase alkB Homolog 3
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
AP-1	Activator Protein 1
ASC1-RM	ASC-1 Related Myopathy
ASC-1	Activating Signal Cointegrator-1
ASCC1	Activating Signal Cointegrator-1 complex subunit 1
ASCC2	Activating Signal Cointegrator-1 complex subunit 2
ASCC3	Activating Signal Cointegrator-1 complex subunit 3
ASCC	Activation Signal Cointegrator Complex
ASCH domain	ASC-1 homology domain
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4 and 6
CM	Congenital Myopathy
CNS	Central Nervous System
COX-2	Cyclooxygenase 2
CUE	Coupling of ubiquitin to ER degradation
DDR	DNA Damage Response
EM	Electron Microscopy
EMG	Electromyogram
ER	Endoplasmic Reticulum
G0	quiescent phase of the cell cycle
G1	gap1 phase of the cell cycle
KH domain	K-homology domain
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC	Myosin Heavy Chain
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	messenger RNA
NADH-TR	NADH-tetrazolium reductase
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NOS	Nitric Oxide Synthase
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
pRb	Retinoblastoma protein
RNAP II	RNA polymerase II
ROS	Reactive Oxygen Species
RQC	Ribosome-associated Quality Control
hRQT	human RQC-trigger complex

SMA	Spinal Muscular Atrophy
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SRF	Serum Response Factor
TRIP4	Thyroid Hormone Receptor Interactor 4

References

- Böhm, J.; Vasli, N.; Malfatti, E.; Le Gras, S.; Feger, C.; Jost, B.; Monnier, N.; Brocard, J.; Karasoy, H.; Gérard, M.; et al. An Integrated Diagnosis Strategy for Congenital Myopathies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e0067527. [\[CrossRef\]](#)
- Bönnemann, C.G.; Wang, C.H.; Quijano-Roy, S.; Deconinck, N.; Bertini, E.; Ferreira, A.; Muntoni, F.; Sewry, C.; Béroud, C.; Mathews, K.D.; et al. Diagnostic Approach to the Congenital Muscular Dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* **2014**, *24*, 289–311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schorling, D.C.; Kirschner, J.; Bönnemann, C.G. Congenital Muscular Dystrophies and Myopathies: An Overview and Update. *Neuropediatrics* **2017**, *48*, 247–261. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- North, K.N.; Wang, C.H.; Clarke, N.; Jungbluth, H.; Vainzof, M.; Dowling, J.J.; Amburgey, K.; Quijano-Roy, S.; Beggs, A.H.; Sewry, C.; et al. Approach to the Diagnosis of Congenital Myopathies. *Neuromuscul. Disord.* **2014**, *24*, 97–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jungbluth, H.; Ochala, J.; Treves, S.; Gautel, M. Current and Future Therapeutic Approaches to the Congenital Myopathies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *64*, 191–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Treves, S.; Jungbluth, H.; Voermans, N.; Muntoni, F.; Zorzato, F. Ca²⁺ Handling Abnormalities in Early-Onset Muscle Diseases: Novel Concepts and Perspectives. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *64*, 201–212. [\[CrossRef\]](#)
- Horstick, E.J.; Linsley, J.W.; Dowling, J.J.; Hauser, M.A.; McDonald, K.K.; Ashley-Koch, A.; Saint-Amant, L.; Satish, A.; Cui, W.W.; Zhou, W.; et al. Stac3 Is a Component of the Excitation-Contraction Coupling Machinery and Mutated in Native American Myopathy. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jungbluth, H.; Gautel, M. Pathogenic Mechanisms in Centronuclear Myopathies. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*. [\[CrossRef\]](#)
- Fujise, K.; Okubo, M.; Abe, T.; Yamada, H.; Nishino, I.; Noguchi, S.; Takei, K.; Takeda, T. Mutant BIN1-Dynamin 2 Complexes Dysregulate Membrane Remodeling in the Pathogenesis of Centronuclear Myopathy. *J. Biol. Chem.* **2020**, *296*. [\[CrossRef\]](#)
- Lawlor, M.W.; Ottenheijm, C.A.; Lehtokari, V.-L.; Cho, K.; Pelin, K.; Wallgren-Pettersson, C.; Granzier, H.; Beggs, A.H. Novel Mutations in NEB Cause Abnormal Nebulin Expression and Markedly Impaired Muscle Force Generation in Severe Nemaline Myopathy. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nowak, K.J.; Ravenscroft, G.; Laing, N.G. Skeletal Muscle α -Actin Diseases (Actinopathies): Pathology and Mechanisms. *Acta Neuropathol.* **2013**, *125*, 19–32. [\[CrossRef\]](#)
- Gonchar, A.D.; Kopylova, G.V.; Kochurova, A.M.; Berg, V.Y.; Shchepkin, D.V.; Koubasova, N.A.; Tsaturyan, A.K.; Kleymenov, S.Y.; Matyushenko, A.M.; Levitsky, D.I. Effects of Myopathy-Causing Mutations R91P and R245G in the TPM3 Gene on Structural and Functional Properties of Slow Skeletal Muscle Tropomyosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *534*, 8–13. [\[CrossRef\]](#)
- Jungbluth, H.; Treves, S.; Zorzato, F.; Sarkozy, A.; Ochala, J.; Sewry, C.; Phadke, R.; Gautel, M.; Muntoni, F. Congenital Myopathies: Disorders of Excitation-Contraction Coupling and Muscle Contraction. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 151–167. [\[CrossRef\]](#)
- Kaplan, J.-C.; Hamroun, D. The 2016 Version of the Gene Table of Monogenic Neuromuscular Disorders (Nuclear Genome). *Neuromuscul. Disord.* **2015**, *25*, 991–1020. [\[CrossRef\]](#)
- Gonozakzy, H.D.; Bönnemann, C.G.; Dowling, J.J. The Genetics of Congenital Myopathies. *Handb. Clin. Neurol.* **2018**, *148*, 549–564. [\[CrossRef\]](#)
- Majcenko, K.; Davidson, A.E.; Camelo-Piragua, S.; Agrawal, P.B.; Manfready, R.A.; Li, X.; Joshi, S.; Xu, J.; Peng, W.; Beggs, A.H.; et al. Dominant Mutation of CCDC78 in a Unique Congenital Myopathy with Prominent Internal Nuclei and Atypical Cores. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *91*, 365–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ravenscroft, G.; Bryson-Richardson, R.J.; Nowak, K.J.; Laing, N.G. Recent Advances in Understanding Congenital Myopathies. *F1000Research* **2018**, *7*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Davignon, L.; Chauveau, C.; Julien, C.; Dill, C.; Duband-Goulet, I.; Cabet, E.; Buendia, B.; Lilienbaum, A.; Rendu, J.; Minot, M.C.; et al. The Transcription Coactivator ASC-1 Is a Regulator of Skeletal Myogenesis, and Its Deficiency Causes a Novel Form of Congenital Muscle Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 1559–1573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jung, D.-J.; Sung, H.-S.; Goo, Y.-W.; Lee, H.M.; Park, O.K.; Jung, S.-Y.; Lim, J.; Kim, H.-J.; Lee, S.-K.; Kim, T.S.; et al. Novel Transcription Coactivator Complex Containing Activating Signal Cointegrator 1. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5203–5211. [\[CrossRef\]](#)
- Auboeuf, D.; Hönl, A.; Berget, S.M.; O'Malley, B.W. Coordinate Regulation of Transcription and Splicing by Steroid Receptor Coregulators. *Science* **2002**, *298*, 416–419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Iyer, L.M.; Burroughs, A.M.; Aravind, L. The ASCH Superfamily: Novel Domains with a Fold Related to the PUA Domain and a Potential Role in RNA Metabolism. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 257–263. [\[CrossRef\]](#)
- Villar-Quiles, R.N.; Catervi, F.; Cabet, E.; Juntas-Morales, R.; Genetti, C.A.; Gidaro, T.; Koparir, A.; Yüksel, A.; Coppens, S.; Deconinck, N.; et al. ASC-1 Is a Cell Cycle Regulator Associated with Severe and Mild Forms of Myopathy. *Ann. Neurol.* **2020**, *87*, 217–232. [\[CrossRef\]](#)

23. Knierim, E.; Hirata, H.; Wolf, N.I.; Morales-Gonzalez, S.; Schottmann, G.; Tanaka, Y.; Rudnik-Schöneborn, S.; Orgeur, M.; Zerres, K.; Vogt, S.; et al. Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *98*, 473–489. [[CrossRef](#)]
24. Böhm, J.; Malfatti, E.; Oates, E.; Jones, K.; Brochier, G.; Boland, A.; Deleuze, J.-F.; Romero, N.B.; Laporte, J. Novel ASCC1 Mutations Causing Prenatal-Onset Muscle Weakness with Arthrogryposis and Congenital Bone Fractures. *J. Med. Genet.* **2019**, *56*, 617–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chi, B.; O'Connell, J.D.; Iocolano, A.D.; Coady, J.A.; Yu, Y.; Gangopadhyay, J.; Gygi, S.P.; Reed, R. The Neurodegenerative Diseases ALS and SMA Are Linked at the Molecular Level via the ASC-1 Complex. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 11939–11951. [[CrossRef](#)]
26. Bönnemann, C.G. The Collagen VI-Related Myopathies: Muscle Meets Its Matrix. *Nat. Rev. Neurol.* **2011**, *7*, 379–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Moghadaszadeh, B.; Petit, N.; Jaillard, C.; Brockington, M.; Quijano Roy, S.; Merlini, L.; Romero, N.; Estournet, B.; Desguerre, I.; Chaigne, D.; et al. Mutations in SEPN1 Cause Congenital Muscular Dystrophy with Spinal Rigidity and Restrictive Respiratory Syndrome. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 17–18. [[CrossRef](#)]
28. Ferreira, A.; Quijano-Roy, S.; Pichereau, C.; Moghadaszadeh, B.; Goemans, N.; Bönnemann, C.; Jungbluth, H.; Straub, V.; Villanova, M.; Leroy, J.-P.; et al. Mutations of the Selenoprotein N Gene, Which Is Implicated in Rigid Spine Muscular Dystrophy, Cause the Classical Phenotype of Multiminicore Disease: Reassessing the Nosology of Early-Onset Myopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 739–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Clarke, N.F.; Kidson, W.; Quijano-Roy, S.; Estournet, B.; Ferreira, A.; Guicheney, P.; Manson, J.I.; Kornberg, A.J.; Shield, L.K.; North, K.N. SEPN1: Associated with Congenital Fiber-Type Disproportion and Insulin Resistance. *Ann. Neurol.* **2006**, *59*, 546–552. [[CrossRef](#)]
30. Scoto, M.; Cirak, S.; Mein, R.; Feng, L.; Manzur, A.Y.; Robb, S.; Childs, A.-M.; Quinlivan, R.M.; Roper, H.; Jones, D.H.; et al. SEPN1-Related Myopathies: Clinical Course in a Large Cohort of Patients. *Neurology* **2011**, *76*, 2073–2078. [[CrossRef](#)]
31. Feng, J.-J.; Marston, S. Genotype-Phenotype Correlations in ACTA1 Mutations That Cause Congenital Myopathies. *Neuromuscul. Disord.* **2009**, *19*, 6–16. [[CrossRef](#)]
32. Sparrow, J.C.; Nowak, K.J.; Durling, H.J.; Beggs, A.H.; Wallgren-Pettersson, C.; Romero, N.; Nonaka, I.; Laing, N.G. Muscle Disease Caused by Mutations in the Skeletal Muscle Alpha-Actin Gene (ACTA1). *Neuromuscul. Disord.* **2003**, *13*, 519–531. [[CrossRef](#)]
33. Oliveira, J.; Martins, M.; Pinto Leite, R.; Sousa, M.; Santos, R. The New Neuromuscular Disease Related with Defects in the ASC-1 Complex: Report of a Second Case Confirms ASCC1 Involvement. *Clin. Genet.* **2017**, *92*, 434–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Giuffrida, M.G.; Mastromoro, G.; Guida, V.; Truglio, M.; Fabbretti, M.; Torres, B.; Mazza, T.; De Luca, A.; Roggini, M.; Bernardini, L.; et al. A New Case of SMABF2 Diagnosed in Stillbirth Expands the Prenatal Presentation and Mutational Spectrum of ASCC1. *Am. J. Med. Genet. A* **2020**, *182*, 508–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lu, W.; Liang, M.; Su, J.; Wang, J.; Li, L.; Zhang, S.; Qin, Z.; Huang, L.; Lu, Y.; Yi, S.; et al. Novel Compound Heterozygous Pathogenic Variants in ASCC1 in a Chinese Patient with Spinal Muscular Atrophy with Congenital Bone Fractures 2: Evidence Supporting a “Definitive” Gene-Disease Relationship. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2020**, *8*, e1212. [[CrossRef](#)]
36. Soll, J.M.; Brickner, J.R.; Mudge, M.C.; Mosammaparast, N. RNA Ligase-like Domain in Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 1 (ASCC1) Regulates ASCC Complex Function during Alkylation Damage. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 13524–13533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Brickner, J.R.; Soll, J.M.; Lombardi, P.M.; Vågbo, C.B.; Mudge, M.C.; Oyeniran, C.; Rabe, R.; Jackson, J.; Sullender, M.E.; Blazosky, E.; et al. A Ubiquitin-Dependent Signalling Axis Specific for ALKBH-Mediated DNA Dealkylation Repair. *Nature* **2017**, *551*, 389–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dango, S.; Mosammaparast, N.; Sowa, M.E.; Xiong, L.-J.; Wu, F.; Park, K.; Rubin, M.; Gygi, S.; Harper, J.W.; Shi, Y. DNA Unwinding by ASCC3 Helicase Is Coupled to ALKBH3-Dependent DNA Alkylation Repair and Cancer Cell Proliferation. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 373–384. [[CrossRef](#)]
39. Hashimoto, S.; Sugiyama, T.; Yamazaki, R.; Nobuta, R.; Inada, T. Identification of a Novel Trigger Complex That Facilitates Ribosome-Associated Quality Control in Mammalian Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3422. [[CrossRef](#)]
40. Juskiewicz, S.; Speldewinde, S.H.; Wan, L.; Svejstrup, J.Q.; Hegde, R.S. The ASC-1 Complex Disassembles Collided Ribosomes. *Mol. Cell* **2020**, *79*, 603–614.e8. [[CrossRef](#)]
41. Schmoller, K.M.; Skotheim, J.M. The Biosynthetic Basis of Cell Size Control. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 793–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ruijtenberg, S.; van den Heuvel, S. Coordinating Cell Proliferation and Differentiation: Antagonism between Cell Cycle Regulators and Cell Type-Specific Gene Expression. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 196–212. [[CrossRef](#)]
43. Ginzberg, M.B.; Kafri, R.; Kirschner, M. Cell Biology. On Being the Right (Cell) Size. *Science* **2015**, *348*, 1245075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Spiegelman, B.M.; Heinrich, R. Biological Control through Regulated Transcriptional Coactivators. *Cell* **2004**, *119*, 157–167. [[CrossRef](#)]
45. Baudet, C.; Pozas, E.; Adameyko, I.; Andersson, E.; Ericson, J.; Ernfors, P. Retrograde Signaling onto Ret during Motor Nerve Terminal Maturation. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 963–975. [[CrossRef](#)]

46. Frakes, A.E.; Ferraiuolo, L.; Haidet-Phillips, A.M.; Schmelzer, L.; Braun, L.; Miranda, C.J.; Ladner, K.J.; Bevan, A.K.; Foust, K.D.; Godbout, J.P.; et al. Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF-KB Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* **2014**, *81*, 1009–1023. [[CrossRef](#)]
47. Zhao, W.; Beers, D.R.; Bell, S.; Wang, J.; Wen, S.; Baloh, R.H.; Appel, S.H. TDP-43 Activates Microglia through NF-KB and NLRP3 Inflammasome. *Exp. Neurol.* **2015**, *273*, 24–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bhinge, A.; Namboori, S.C.; Zhang, X.; VanDongen, A.M.J.; Stanton, L.W. Genetic Correction of SOD1 Mutant iPSCs Reveals ERK and JNK Activated AP1 as a Driver of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 856–869. [[CrossRef](#)]
49. Madabhushi, R.; Pan, L.; Tsai, L.-H. DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration. *Neuron* **2014**, *83*, 266–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hill, S.J.; Mordes, D.A.; Cameron, L.A.; Neuberger, D.S.; Landini, S.; Eggan, K.; Livingston, D.M. Two Familial ALS Proteins Function in Prevention/Repair of Transcription-Associated DNA Damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E7701–E7709. [[CrossRef](#)]
51. McMurray, C.T. To Die or Not to Die: DNA Repair in Neurons. *Mutat. Res.* **2005**, *577*, 260–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lombard, D.B.; Chua, K.F.; Mostoslavsky, R.; Franco, S.; Gostissa, M.; Alt, F.W. DNA Repair, Genome Stability, and Aging. *Cell* **2005**, *120*, 497–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sedgwick, B. Repairing DNA-Methylation Damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 148–157. [[CrossRef](#)]
54. Ryan, M.M.; Schnell, C.; Strickland, C.D.; Shield, L.K.; Morgan, G.; Iannaccone, S.T.; Laing, N.G.; Beggs, A.H.; North, K.N. NemaLine Myopathy: A Clinical Study of 143 Cases. *Ann. Neurol.* **2001**, *50*, 312–320. [[CrossRef](#)]
55. Garcia-Angarita, N.; Kirschner, J.; Heiliger, M.; Thirion, C.; Walter, M.C.; Schnittfeld-Acarlioglu, S.; Albrecht, M.; Müller, K.; Wieczorek, D.; Lochmüller, H.; et al. Severe NemaLine Myopathy Associated with Consecutive Mutations E74D and H75Y on a Single ACTA1 Allele. *Neuromuscul. Disord.* **2009**, *19*, 481–484. [[CrossRef](#)]
56. Ravenscroft, G.; Miyatake, S.; Lehtokari, V.-L.; Todd, E.J.; Vornanen, P.; Yau, K.S.; Hayashi, Y.K.; Miyake, N.; Tsurusaki, Y.; Doi, H.; et al. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive NemaLine Myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2013**, *93*, 6–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wagner, E.F. Functions of AP1 (Fos/Jun) in Bone Development. *Ann. Rheum. Dis.* **2002**, *61*, ii40–ii42. [[CrossRef](#)]
58. Kawamata, A.; Izu, Y.; Yokoyama, H.; Amagasa, T.; Wagner, E.F.; Nakashima, K.; Ezura, Y.; Hayata, T.; Noda, M. JunD Suppresses Bone Formation and Contributes to Low Bone Mass Induced by Estrogen Depletion. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *103*, 1037–1045. [[CrossRef](#)]
59. Bozec, A.; Bakiri, L.; Jimenez, M.; Schinke, T.; Amling, M.; Wagner, E.F. Fra-2/AP-1 Controls Bone Formation by Regulating Osteoblast Differentiation and Collagen Production. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 1093–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lerbs, T.; Cui, L.; Muscat, C.; Saleem, A.; van Neste, C.; Domizi, P.; Chan, C.; Wernig, G. Expansion of Bone Precursors through Jun as a Novel Treatment for Osteoporosis-Associated Fractures. *Stem Cell Rep.* **2020**, *14*, 603–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Drissi, H.; Hushka, D.; Aslam, F.; Nguyen, Q.; Buffone, E.; Koff, A.; van Wijnen, A.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S. The Cell Cycle Regulator P27kip1 Contributes to Growth and Differentiation of Osteoblasts. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3705–3711. [[PubMed](#)]
62. Ogasawara, T.; Mori, Y.; Abe, M.; Suenaga, H.; Kawase-Koga, Y.; Saijo, H.; Takato, T. Role of Cyclin-Dependent Kinase (Cdk)6 in Osteoblast, Osteoclast, and Chondrocyte Differentiation and Its Potential as a Target of Bone Regenerative Medicine. *Oral Sci. Int.* **2011**, *8*, 2–6. [[CrossRef](#)]
63. Orloff, M.; Peterson, C.; He, X.; Ganapathi, S.; Heald, B.; Yang, Y.; Bebek, G.; Romigh, T.; Song, J.H.; Wu, W.; et al. Germline Mutations in MSR1, ASCC1, and CTHRC1 in Patients with Barrett Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *JAMA* **2011**, *306*, 410–419. [[CrossRef](#)]
64. Van Nistelrooij, A.M.J.; Dinjens, W.N.M.; Wagner, A.; Spaander, M.C.W.; van Lanschot, J.J.B.; Wijnhoven, B.P.L. Hereditary Factors in Esophageal Adenocarcinoma. *Gastrointest. Tumors* **2014**, *1*, 93–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hao, J.; Xu, H.; Luo, M.; Yu, W.; Chen, M.; Liao, Y.; Zhang, C.; Zhao, X.; Jiang, W.; Hou, S.; et al. The Tumor-Promoting Role of TRIP4 in Melanoma Progression and Its Involvement in Response to BRAF-Targeted Therapy. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 159–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Che, Y.; Li, Y.; Zheng, F.; Zou, K.; Li, Z.; Chen, M.; Hu, S.; Tian, C.; Yu, W.; Guo, W.; et al. TRIP4 Promotes Tumor Growth and Metastasis and Regulates Radiosensitivity of Cervical Cancer by Activating MAPK, PI3K/AKT, and HTER T Signaling. *Cancer Lett.* **2019**, *452*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yang, H.; Ren, J.; Bai, Y.; Jiang, J.; Xiao, S. MicroRNA-518-3p Suppresses Cell Proliferation, Invasiveness, and Migration in Colorectal Cancer via Targeting TRIP4. *Biochem. Cell Biol.* **2020**, *98*, 575–582. [[CrossRef](#)]
68. Yoo, H.M.; Kang, S.H.; Kim, J.Y.; Lee, J.E.; Seong, M.W.; Lee, S.W.; Ka, S.H.; Sou, Y.-S.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; et al. Modification of ASC1 by UFM1 Is Crucial for ER α Transactivation and Breast Cancer Development. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 261–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]