



HAL
open science

L'hydroxychloroquine, une molécule anti-oxydante, présentant une efficacité dose-dépendante dans le déficit en lipin-1

Perrine Renard

► **To cite this version:**

Perrine Renard. L'hydroxychloroquine, une molécule anti-oxydante, présentant une efficacité dose-dépendante dans le déficit en lipin-1. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5130 . tel-04901619

HAL Id: tel-04901619

<https://theses.hal.science/tel-04901619v1>

Submitted on 20 Jan 2025

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 Bio Sorbonne Paris Cité n°562

Institut Necker Enfants Malades (INEM) – INSERM U1151 / CNRS URM8253

**L'hydroxychloroquine, une molécule anti-oxydante, présentant une efficacité
dose-dépendante dans le déficit en lipin-1**

Par Perrine RENARD

Thèse de doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par **Pascale DE LONLAY**

Présentée et soutenue publiquement le 10/11/2023

Devant un jury composé de :

Sylvie BANNWARTH
PU-PH, Université Côte d'Azur

Rapportrice

Vincent PROCACCIO
PU-PH, Université Angers

Rapporteur

Jocelyne HAMELIN
MCU-PH, HDR, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Pascal LAFORET
PU-PH, Université Paris-Saclay

Examineur

Pascale DE LONLAY
PU-PH, Université Paris Cité

Directrice de thèse

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité n°562

Institut Necker Enfants Malades (INEM) – INSERM U1151 / CNRS URM8253

**L'hydroxychloroquine, une molécule anti-oxydante, présentant une efficacité
dose-dépendante dans le déficit en lipin-1**

Par Perrine RENARD

Thèse de doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par Pascale DE LONLAY

Présentée et soutenue publiquement le 10/11/2023

Devant un jury composé de :

Sylvie BANNWARTH
PU-PH, Université Côte d'Azur

Rapportrice

Vincent PROCACCIO
PU-PH, Université Angers

Rapporteur

Jocelyne HAMELIN
MCU-PH, HDR, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Pascal LAFORET
PU-PH, Université Paris-Saclay

Examineur

Pascale DE LONLAY
PU-PH, Université Paris Cité

Directrice de thèse

RESUME

L'hydroxychloroquine, une molécule anti-oxydante, présentant une efficacité dose-dépendante dans le déficit en lipin-1

Le déficit en lipin-1 est une cause majeure d'épisodes aigus de rhabdomyolyses (RM) sévères, déclenchés principalement par le jeûne ou la fièvre, engageant le pronostic vital des patients. La prise en charge uniquement symptomatique en service de réanimation témoigne de la nécessité de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Une meilleure connaissance de la physiopathologie du déficit en lipin-1, liée à un défaut d'autophagie et de mitophagie, a permis d'identifier une cible thérapeutique, le récepteur de l'immunité innée *Toll-like receptor 9 (TLR9)*, et de mettre en place un traitement à visée compassionnelle par l'hydroxychloroquine sulfate (HCQ). Ce traitement a permis une amélioration des signes cliniques chroniques musculaires des patients ainsi qu'une diminution de leurs marqueurs inflammatoires plasmatiques. Cependant, certains patients ont présenté des accès de RM sous traitement par HCQ, dont nous avons cherché à comprendre l'origine.

Dans une première partie, nous avons montré que les patients ayant soufferts d'accès de RM sous traitement présentaient une concentration plasmatique plus élevée d'HCQ par rapport aux autres patients. Des études *in vitro* sur des myoblastes primaires de patients nous ont permis de montrer que l'HCQ bloque l'autophagie, par modification du pH lysosomal, à forte dose (10 μM) et non à de plus faibles doses (0,1 et 1 μM). Cet effet dose-dépendant *in vitro* pourrait expliquer la survenue de RM chez les patients ayant de fortes concentrations plasmatiques d'HCQ, en aggravant leur déficit d'autophagie initial. Afin d'étudier *in vitro* les effets cellulaires de la RM, les myoblastes primaires ont été soumis à un stress métabolique induit par un milieu pauvre en nutriments. En condition de stress, nous avons montré une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'ADN oxydé dans les myoblastes de patients. Cette accumulation a été prévenue par l'HCQ à faible dose (1 μM), suggérant un effet bénéfique de l'HCQ chez les patients à des doses inférieures à celles inhibant l'autophagie. Par ailleurs, le taux intracellulaire de calcium, l'un des marqueurs de la RM *in vitro*, a été étudié en condition de stress. Nos résultats ont montré une exacerbation de la fuite calcique du réticulum endoplasmique (RE) chez les patients par rapport aux contrôles lors du jeûne, non reversée par le traitement par l'HCQ aux doses de 10 et 1 μM .

Dans une seconde partie, nous avons étudié les mécanismes sous-jacents de l'effet antioxydant de l'HCQ dans des myoblastes immortalisés en recherchant son rôle dans les voies de dégradation et de production des ROS. Nos résultats ont révélé que la diminution des ROS intracellulaires par l'HCQ n'impliquait pas la modification de l'expression des gènes *Antioxidant response element (ARE)*, ni l'activité protéique du facteur de transcription *Nuclear factor erythroid-2-*

related factor 2 (Nrf2). D'autre part, nous avons également montré que le stress oxydatif, observé dans les myoblastes en condition de jeûne, était associé au stress du RE, indépendamment de la voie canonique médiée par *Inositol-requiring protein 1* (IRE1), mais aussi à un dysfonctionnement mitochondrial. Cependant, l'HCQ à la dose de 1 μ M n'a pas permis de réverser la survenue du stress du RE en condition de jeûne. Des résultats supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'impact de l'HCQ sur le fonctionnement de la mitochondrie.

L'ensemble de nos résultats suggèrent un effet de l'HCQ à faible dose sur le stress oxydatif, processus critique dans la physiopathologie du déficit en lipin-1.

Mots clés : déficit en lipin-1, rhabdomyolyse, myoblastes, hydroxychloroquine, stress oxydatif, flux calcique, réticulum endoplasmique, mitochondrie

ABSTRACT

Hydroxychloroquine, an antioxidant molecule with dose-dependent efficacy in lipin-1 deficiency

Lipin-1 deficiency is a major cause of acute episodes of severe rhabdomyolysis (RM), triggered mainly by fasting or fever, with life-threatening consequences. Management in intensive care units is symptomatic only, which highlights the need for new therapeutic approaches. A better understanding of the pathophysiology of lipin-1 deficiency, linked to a defect in autophagy and mitophagy, has led to the identification of a therapeutic target, the innate immunity receptor Toll-like receptor 9 (TLR9), and the introduction of a compassionate treatment with hydroxychloroquine sulfate (HCQ). This treatment led to an improvement in the patients' chronic clinical muscular symptoms and a reduction in their plasma inflammatory markers. However, some patients experienced acute of RM episodes under HCQ treatment, the origin of which we sought to understand.

In the first part, we showed that patients who suffered RM attacks under treatment had a higher plasma HCQ concentration than other patients. In vitro studies on primary myoblasts from patients enabled us to show that HCQ blocks autophagy, by altering lysosomal pH at high doses (10 μ M) and not at lower doses (0.1 and 1 μ M). This in vitro dose-dependent effect could explain the occurrence of RM in patients with high plasma HCQ concentrations, by aggravating their initial autophagy deficit. To investigate the cellular effects of RM in vitro, primary myoblasts were subjected to metabolic stress induced by a nutrient-poor environment. Under stress conditions, we showed an accumulation of reactive oxygen species (ROS) and oxidized DNA in patient myoblasts. This accumulation was prevented by HCQ at low dose (1 μ M), suggesting a beneficial effect of HCQ in patients at doses lower than those inhibiting autophagy. In addition, intracellular calcium levels, one of the markers of RM in vitro, were studied under stress condition. Our results showed an exacerbation of endoplasmic reticulum (ER) calcium leakage in patients compared to controls during fasting, not reversed by HCQ treatment at doses of 10 and 1 μ M.

In a second part, we investigated the mechanisms underlying the antioxidant effect of HCQ in immortalized myoblasts, looking for its role in ROS degradation and production pathways. Our results revealed that the decrease of intracellular ROS by HCQ did not involve the modification of Antioxidant response element (ARE) gene expression, nor in the protein activity of the transcription factor Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2). On the other hand, we also showed that oxidative stress, observed in myoblasts under fasting conditions, was associated with ER stress, independently of the canonical IRE1-mediated pathway, but also with mitochondrial dysfunction. However, HCQ at 1 μ M did

not reverse the occurrence of ER stress under fasting conditions. Further results are needed to conclude the impact of HCQ on mitochondrial function.

Taken together, our results suggest a low-dose effect of HCQ on oxidative stress, a critical process in the pathophysiology of lipin-1 deficiency.

Key words: lipin-1 deficiency, rhabdomyolysis, myoblasts, hydroxychloroquine, oxidative stress, calcium flux, endoplasmic reticulum, mitochondria

REMERCIEMENTS

Je rassemble mes dernières forces, ici, afin de remercier comme il se doit l'ensemble des personnes qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. J'espère de tout cœur être assez exhaustive et n'oublier personne. Je n'ai jamais été réputée pour être synthétique... Cependant, à cet instant, les mots me manquent. Veuillez par avance bien vouloir m'excuser pour ces quelques lignes maladroitement mais qui sont sincères.

Tout d'abord, un grand merci au Pr Sylvie Bannwarth et au Pr Vincent Procaccio de prendre de leur temps afin d'évaluer mon travail de thèse, en leur souhaitant une bonne lecture, ainsi qu'au Dr Jocelyne Hamelin et au Pr Pascal Lafôret d'avoir également accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un très grand merci à toi, Pascale, de m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de poursuivre cette aventure dans le monde des maladies métaboliques commencée quelques années plus tôt. Des années à naviguer contre vents et marées, avec des hauts et des bas, mais toujours en maintenant le cap sur l'objectif de la réussite de cette thèse, pour tout cela un grand merci ! Je remercie également Hortense pour ces derniers mois passés ensemble, pour ta disponibilité et tes relectures sans relâche du manuscrit jusqu'à la dernière minute. Petite pensée aussi pour Solène, que je ne connais malheureusement pas très bien, mais qui a su apporter aux dernières réunions d'équipe son sourire et sa bonne humeur, à quelques aléas administratifs près.

Je ne trouve pas les mots pour exprimer toute ma gratitude à Laure et Marjojo... Ces années passées ensemble furent intenses, pleines d'émotions en tout genre, de gros chagrins à des fous-rires incontrôlables, et je vous remercie de m'avoir épaulée pour que je puisse les traverser jusqu'ici. A Laure, pour m'avoir tant appris sur la recherche scientifique, pour m'avoir ouvert les yeux sur ma vision erronée de ce métier et pour m'avoir fait comprendre que c'est dans les échecs que nous apprenons le plus (après tout, comme dirait Maman Castor : « à faire et à défaire, on n'est jamais à rien faire »). Un grand merci également pour m'avoir soutenue à bout de bras dans toutes les événements de vie que j'ai pu vivre ces dernières années, portant ta bienveillance et ton soutien au-delà du cadre professionnel. A Marjojo, merci d'être aussi maniaque que moi ! Je suis reconnaissante de t'avoir rencontrée, une personne qui sait s'épanouir à la fois personnellement et professionnellement, en jonglant avec ses principes et ses valeurs écoresponsables, j'appelle cela désormais l'« objectif perfection Marjojo ». Merci de m'avoir acceptée comme je suis, malgré ma lenteur, mes petites digressions et mes habitudes de petite mamie. Petite pensée également pour Tim, désormais « consultant » en biologie moléculaire, qui a accepté de se faire payer en Smarties, et pour votre adorable boule de poils.

Mille mercis à Lucie et Maeva pour avoir affronté cette thèse ensemble. A toi, ma Lulu, pour nos conversations de fin de journée durant des heures à refaire le monde et surtout aux découvertes culinaires asiatiques. A Maeva, pour ce partage de notre amour pour les fournitures scolaires et ton grain de folie. Petites pensées aussi pour Ayse et Gabi, et leurs petits tips pour ne pas craquer et avancer petit pas par petit pas dans la rédaction de ce mémoire. Je souhaite également bon courage à l'ensemble des doctorantes du laboratoire : Nadia, Alice, Axelle, Fériel...

Mes excuses solennelles aux autres personnes qui ont été « contraintes » de partager le bureau avec moi, tout en sachant que je me parle à moi-même et à voix haute : Katrina, Moïse et Gorka. Merci à Moïse, pour tes petites réparties, rares mais au combien précieuses pour le moral ; à Gorka pour plein de petites choses du quotidien mais surtout ton accent chantant et tes chaussettes colorées qui ont su égayer mes journées.

Merci aux autres membres du labo : à Manu, et nos petits papotages improvisés devant les ascenseurs, et à Julien, même si je ne suis pas sûre d'être encore prête à te pardonner d'avoir mis au rebut notre vieille machine qPCR... Aux autres membres de l'Institut Necker : Thierry, entre chemises colorées et jeu de mots dans les échanges de mails pour répondre à mes innombrables questions, et Nicolas qui parle autant que moi ! Aux anciens membres de l'équipe : Marine, Fanny, Malou, Sebastian et Hugo qui, pour la plupart, m'ont accompagnée dans mes premiers pas au labo.

Big up pour la team Pharma, « loin des yeux, près du cœur » et plus particulièrement pour Sophie, mon frère pingouin, dont notre complicité est et sera toujours une source de grande force pour moi au quotidien. Petite pensée à Claire-Marine, pour être toujours restée en contact depuis notre rencontre, malgré un emploi du temps de médecin surchargé.

Toute mon affection à ma famille, un peu déconnectée et ne sachant pas toujours ce que je « fabrique » de mes journées ni de mes week-ends. Merci à la myriade de SMS de ma Maman ponctués d'innombrables emojis pour me montrer son soutien ; aux reportages photos de ma Nanou pour m'évader ; aux appels de Cysso, toujours présent pour me remonter le moral quel que soit l'heure du jour ou de la nuit ; à Papou et sa façon bien à lui de relativiser un travail de thèse.

Enfin, et pas des moindres, un « gigantesquissime » merci à mon compagnon, pour son soutien infailible depuis que j'ai commencé mes études de pharmacie. Merci pour tes petits bons petits plats réconfortants, pour avoir su sécher mes larmes et m'accompagner lors de mes insomnies, pour avoir toujours voulu me redonner le sourire, et cela parfois malgré toi. Merci d'avoir toujours cru en moi ! J'ai énormément de chance de partager ta vie et j'espère pouvoir profiter de ce long bout de chemin qui nous reste à faire ensemble pour te démontrer tous les jours à quel point je te suis reconnaissante.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : RHABDOMYOLYSES AIGUËS	1
A. Définition et présentation clinique de la rhabdomyolyse aiguë.....	1
B. Physiopathologie de la rhabdomyolyse aiguë	2
C. Étiologies de la rhabdomyolyse aiguë.....	4
D. Diagnostic de la rhabdomyolyse aiguë.....	5
CHAPITRE 2 : DÉFICIT EN LIPIN-1, UN EXEMPLE DE RHABDOMYOLYSES D'ORIGINE MÉTABOLIQUE .	7
A. Présentation générale de lipin-1.....	7
1) Description du gène <i>LPIN1</i>	7
2) Description de la protéine lipin-1.....	7
3) Deux mécanismes d'action moléculaires de lipin-1	8
a. Fonction enzymatique phosphatidate phosphatase 1 (PAP-1) de lipin-1	8
b. Activité transcriptionnelle de lipin-1	9
4) Régulation de lipin-1	10
a. Régulation transcriptionnelle du gène <i>LPIN1</i>	10
b. Régulation protéique de lipin-1	12
B. Rhabdomyolyses dans le déficit en lipin-1	13
1) Description du phénotype associé au déficit en lipin-1 chez les patients.....	13
2) Description du phénotype associé au déficit en lipin-1 dans les modèles murins	15
C. Physiopathologie du déficit en lipin-1 au niveau musculaire	16
1) Autophagie et mitophagie.....	16
a. Présentation générale de l'autophagie	16
b. Implication de lipin-1 dans l'autophagie et la mitophagie	18
2) Stress du réticulum endoplasmique.....	20
a. Présentation générale du stress du réticulum endoplasmique	20
b. Implication de lipin-1 dans le stress du réticulum endoplasmique.....	22
3) Inflammation.....	24
D. Prise en charge du déficit en lipin-1.....	26
CHAPITRE 3 : HYDROXYCHLOROQUINE	28
A. Présentation générale de l'hydroxychloroquine	28
1) Histoire de la découverte	28
2) Classification, structure et propriétés chimiques	28
B. Pharmacocinétique de l'hydroxychloroquine.....	31

1) Profil ADME (Absorption – Distribution – Métabolisation – Élimination).....	31
2) Interactions médicamenteuses.....	32
C. Deux mécanismes d’action principaux de l’hydroxychloroquine	33
1) Impact sur l’autophagie et les structures endolysosomales	33
a. Lysosomotropisme de la molécule.....	33
b. Inhibition de la fonction dégradative lysosomale et de la résolution autophagique....	34
c. Perméabilisation de la membrane lysosomale.....	34
d. Autres impacts au niveau des lysosomes et de l’appareil de Golgi.....	35
2) Impact sur les voies de signalisation médiées par des acides nucléiques.....	35
a. Interaction directe entre l’hydroxychloroquine et l’ADN.....	35
b. Inhibition de la voie de signalisation des TLRs.....	36
c. Inhibition de la voie de signalisation de c-GAS-STING.....	37
D. Implications cliniques de l’hydroxychloroquine	38
1) Indication dans les maladies rhumatismales auto-immunes	38
a. Diminution de la production et de la sécrétion de cytokines inflammatoires.....	38
b. Inhibition de la présentation antigénique	39
c. Autres mécanismes d’action.....	39
2) Indication empirique dans le paludisme	40
a. Actions sur le stade érythrocytaire du parasite	41
b. Actions sur le système immunitaire de l’hôte	42
3) Indication antivirale.....	42
4) Indications anticancéreuses.....	44
5) Autres impacts cliniques.....	45
E. Effets indésirables de l’hydroxychloroquine	46
1) Rétinopathies.....	47
2) Cardiomyopathie.....	47
3) Neuromyopathies.....	47
CHAPITRE 4 : STRESS OXYDATIF, UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE DE L’HYDROXYCHLOROQUINE ?	49
A. Présentation générale du stress oxydatif.....	49
B. Sources endogènes des ROS.....	50
1) Mitochondrie	50
2) Réticulum endoplasmique.....	50
3) Peroxysome	51
4) Autres sources de ROS, exemple des complexes NOX.....	51
C. Système antioxydant cellulaire.....	52
1) Présentation générale du système anti-oxydatif.....	52
2) Focus sur la voie de signalisation médiée par Nrf2.....	52
D. Hydroxychloroquine, molécule oxydante ou antioxydante intracellulaire ?	54

1) Stress oxydatif induit par l'hydroxychloroquine	54
2) Complexes NOX, cible thérapeutique de l'hydroxychloroquine ?	55
3) Implication de l'hydroxychloroquine sur la voie de signalisation Nrf2	56
PROBLÉMATIQUE	58
RÉSULTATS	60
CHAPITRE 1 : ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DES EFFETS DE L'HYDROXYCHLOROQUINE DANS LES MYOBLASTES PRIMAIRE DE PATIENTS PRÉSENTANT UN DÉFICIT EN LIPIN-1.....	60
A. Article : « Hydroxychloroquine sulfate: A novel treatment for lipin-1 deficiency? »	60
B. Caractérisation de l'ADN oxydé	81
C. Étude du flux calcique dans les myoblastes primaires.....	84
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DES MÉCANISMES ANTI-OXYDATIFS DE L'HYDROXYCHLOROQUINE DANS DES MYOBLASTES IMMORTALISÉS DE PATIENTS ET DE CONTRÔLES.....	86
A. Caractérisation des myoblastes immortalisés de patients.....	86
1) Expression génique et protéique de lipin-1.....	86
2) Stress oxydatif.....	88
B. Étude de la dégradation des ROS intracellulaires.....	90
1) Exploration transcriptomique.....	90
2) Implication de la voie Nrf2 dans la dégradation des ROS.....	93
C. Étude de la production de ROS intracellulaires	96
1) Implication du stress du RE dans la production de ROS.....	96
2) Implication de la mitochondrie dans la production de ROS	98
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	100
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	107
REFERENCES.....	118
ANNEXES.....	143

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Principaux mécanismes physiopathologiques de la rhabdomyolyse.....	3
Figure 2 : Caractéristiques structurales essentielles aux fonctions de la protéine lipin-1	8
Figure 3 : Implication de lipin-1 dans l'autophagie	19
Figure 4 : Schéma général de la voie de signalisation Unfolded Protein Response (UPR).....	22
Figure 5 : Implication de lipin-1 dans le stress du RS	23
Figure 6 : Implication de lipin-1 dans l'inflammation.....	25
Figure 7 : Structure moléculaire de l'HCQ et de la CQ	30
Figure 8 : Implication de l'HCQ et de la CQ dans l'activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice des maladies auto-immunes.....	40
Figure 9 : Implication de l'HCQ et de la CQ dans l'activité antivirale : exemple du SARS-CoV-2.....	44
Figure 10 : Schéma globale de la voie de signalisation canonique médiée par Nrf2.....	53
Figure 11 : Mise au point de la caractérisation de l'ADN oxydé	82
Figure 12 : Le jeûne exacerbe la fuite de calcium du réticulum endoplasmique dans les myoblastes primaires des patients, non inversée par l'HCQ.....	85
Figure 13 : L'immortalisation des myoblastes primaires ne modifie pas l'expression génique et protéique de lipin-1.....	87
Figure 14 : Le jeûne induit un stress oxydatif dans les myoblastes immortalisés, réduit par un effet antioxydant de l'HCQ	90
Figure 15 : La CQ régule l'expression de gènes impliqués dans des voies de signalisation du stress oxydatif.....	92
Figure 16 : L'HCQ ne modifie pas l'expression de gènes ARE.....	94
Figure 17 : L'HCQ ne modifie pas la translocation nucléaire de Nrf2 à la dose de 1 µM	95
Figure 18 : Le jeûne induit un stress du réticulum endoplasmique dans les myoblastes immortalisés, non inversé par l'hydroxychloroquine.....	97
Figure 19 : Le jeûne induit une altération fonctionnelle de la mitochondrie dans les myoblastes immortalisés	99
Figure 20 : : Cycle de température commun aux PCR quantitatives.....	102
Figure 21 : Cycle de température des PCR. Gènes MT-RNR1 et MT-ND2 (haut) ; gène XBP1 (bas) ...	102

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux paramètres pharmacocinétiques de l'hydroxychloroquine.....	31
Tableau 2 : Liste des couples d'amorces pour PCRq et PCR	103
Tableau 3 : Liste des réactifs utilisés en immunofluorescence.....	106
Tableau 4 : Cibles thérapeutiques potentielles d'HCQ et doses utilisées dans la littérature	117

LISTE DES ABBREVIATIONS

8-OHdG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	CREB : c-AMP response element binding protein
A2E : N-rétinylidène-N-rétinyléthanolamine	CT : Cycle threshold
ACACB : Acetyl-CoA Carboxylase β	CTDNEP : C-terminal domain nuclear envelope phosphatase
ACE2 : Angiotensin-converting enzyme 2	Cul3 : Cullin 3
ADN : Acide désoxyribonucléique	CYP : Cytochrome P450
ADP : Adénosine diphosphate	DAMP : Damage-associated molecular pattern
AMP : Adénosine monophosphate	DEPTOR : DEP domain-containing mTOR-interacting protein
AMPK : AMP-activated protein kinase	DMT1 : Dystrophie myotonique de type 1
ANXA6 : Annexin A6	Drp1 : Dynamin-related protein 1
AP-1 : Activator protein 1	EBSS : Earle's Balanced Salt Solution
ARE : Antioxydant response element	eIF2 α : Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ATF : Activating transcription factor	EDTA : éthylènediaminetétracétique
ATG : Autophagy related genes	EPR : Epithélium pigmentaire rétinien
ATP : Adénosine triphosphate	ERAD : Endoplasmic reticulum-associated protein degradation
Bnip3 : Bcl-2 interacting protein 3	ERO1 : Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1
BSA : Bovine Serum Albumin	FBS : Foetal Bovine Serum
C/EBP : CCAAT enhancer binding protein	FCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
C-LIP : Extrémité C-terminale de lipin-1	Fld : Fatty liver dystrophy
CAT : Catalase	FPG : Formamidopyrimidine DNA glycosylase
Cdk-4 : Cyclin-dependent kinase-4	FYCO1 : FYVE And Coiled-Coil Domain Containing 1
cGAS : cyclic GMP-AMP synthase	GEO : Gene Expression Omnibus
cGAMP : cyclic GMP-AMP	GM : Growth medium
CHOP : CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein	GMP : Guanosine monophosphate
CM-H ₂ DCFDA : Chloromethyl dichlorodihydrofluorescein diacetate	GPX : Glutathion peroxydase
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	GRX : Glutarédoxine
Covid-19 : Coronavirus disease 2019	GSH : Glutathion
CPK : Créatine phosphokinase	
CPT1 : Carnitine palmitoyltransferase I	
CpG : Cytosine-phosphate-guanine	
CQ : Chloroquine	

GTP : Guanosine triphosphate

HCQ : Hydroxychloroquine

hTERT : Human telomerase reverse transcriptase

HMOX1 : hème oxygénase

HNF4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 α

hOGG1 : human oxoguanine glycosylase 1

HOPS : Homolytic fusion and vacuole protein sorting

IFN : Interféron

IKK : I κ B kinase

IL : Interleukine

IP3 : Inositol triphosphate

IP3R : Inositol triphosphate receptor

IPA : Ingenuity Pathway Analysis

IRE1 : Inositol-requiring protein 1

IRF : Interferon regulatory factor

JNK : c-Jun N-terminal kinase

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

LES : Lupus érythémateux systémique

LMP : Lysosomal membrane permeabilization

MAM : Mitochondria-Associated ER Membranes

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MEF2 : Myocyte enhancer 2

mTOR(C1) : mammalian target of rapamycin (complex 1)

MyD88 : Myeloid differentiation primary response

N-LIP : Extrémité N-terminale de lipin-1

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ND2 : NADH dehydrogenase subunit 2

NEP1R1 : Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1

NF- κ B : *Nuclear factor- κ B*

NF-Y : Nuclear transcription factor Y

NFAT(c4) : Nuclear factor of activated T-cells (c4)

NLS : Nuclear localisation signal

NOR-1 : Neuron-derived orphan receptor 1

NOX : NADPH oxydase

NQO1 : NADPH dehydrogenase quinone 1

NFE2L2 (Nrf2) : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OATP1A2 : Organic anion transporting polypeptide 1A2

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PAP-1 : Phosphatidate phosphatase 1

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PDI : protéine disulfure isomérase

PERK : Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PGC-1 α : PPAR γ coactivator 1 α

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3 phosphate

PKD : Protéine kinase D

PMCA : Plasma membrane Ca²⁺ ATPase

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PPT1 : Palmitoyl-protéine thioestérase 1

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PRDX : Peroxyrédoxine

PRR : Pattern recognition receptor

Rab7 : Ras oncogene family 7
RANKL : Receptor activator of NF- κ B ligand
RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RE : Réticulum endoplasmique
RIDD : Regulated IRE1-dependent decay
RILP : Rab-interacting lysosomal protein
RM : Rhabdomyolyse
ROS : Reactive oxygen species
RS : Réticulum sarcoplasmique
RT : Reverse transcription
RYR (3) : Ryanodine receptor (3)
SARS-CoV : Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SDS : Sodioum dodecyl sulfate
SERCA : Sarco-endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
sMaf : small masculoaponeurotic fibrosarcoma
SNAP29 : Synaptosome Associated Protein 29
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor
SOD : Superoxyde dismutase

SP : Site protease
SQSTM1 : Sequestosome 1
SREBP(1) : Sterol response element binding protein (1)
STIM : Stromal interaction molecule
STING : Stimulator of interferon genes
TANGO2 : Transport And Golgi Organization 2 Homolog
TBHP : tert-butyl hydroperoxide
TFEB : Transcription factor EB
TLR : Toll-like receptor
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TKB1 : TANK-binding kinase 1
TRPC3 : Transient receptor channel 3
TUDCA : Tauroursodeoxycholic acid
UPR : Unfolded protein response
VAMP : Vesicle Associated Membrane Protein
VEGFR2 : Vascular endothelial growth factor receptor-2
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VPS13C : Vacuolar protein sorting 13 homolog
XBP1 : X-box binding protein 1

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : RHABDOMYOLYSES AIGÜES

A. Définition et présentation clinique de la rhabdomyolyse aiguë

La rhabdomyolyse (RM) aiguë correspond à la destruction des fibres musculaires squelettiques. Cette dernière a pour conséquence un relargage de différents constituants intracellulaires du tissu musculaire dans l'espace extracellulaire, la circulation sanguine et les urines (Warren *et al.*, 2002(1) ; Huerta-Alardín *et al.*, 2005(2)).

La présentation clinique d'un épisode aigu de RM est extrêmement variable, allant d'une forme asymptomatique, caractérisée seulement par une élévation des marqueurs plasmatiques de la lyse musculaire, à un tableau réanimatoire mettant en jeu le pronostic vital du patient. Lorsqu'elle est présente, la symptomatologie repose d'abord sur des signes locaux musculosquelettiques, liés à la lyse musculaire en elle-même, tels que des crampes, une myalgie et une faiblesse musculaire pouvant être associées à des signes inflammatoires du tissu musculaire (rougeur et gonflement). En parallèle, des signes cliniques généraux non spécifiques de la RM peuvent être associés comme un malaise général, de la fièvre, une tachycardie, des nausées et vomissements, un trouble de la conscience et/ou un choc hypovolémique (Vanholder *et al.*, 2000(3) ; Huerta-Alardín *et al.*, 2005(2) ; Cervellin *et al.*, 2010(4)). Enfin, des complications peuvent survenir lors d'un épisode aigu de RM à la suite du relargage rapide et excessif des composants musculaires dans la circulation sanguine. Ainsi, de façon précoce, peuvent être décrits des troubles hydroélectrolytiques (hypovolémie et hyperkaliémie notamment) à l'origine de troubles du rythme cardiaque de type arythmie pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardiaque, ainsi qu'une myoglobulinurie avec urines couleur porto. Par la suite, peuvent survenir plus tardivement une insuffisance rénale aiguë, liée à une myoglobulinémie excessive, et, de façon plus rare, une coagulation intravasculaire disséminée. Un syndrome des loges peut également être observé lors d'un épisode aigu de RM comme complication précoce ou tardive. L'ensemble de ces complications sont étroitement intriquées et sont responsable de l'engagement du pronostic vital du patient (Sauret *et al.*, 2002(5) ; Chatzizisis *et al.*, 2008(6)).

Les critères de gravité des épisodes de RM regroupent à la fois l'intensité des symptômes cliniques, le taux plasmatique des créatines phosphokinases (CPK) (cf. ci-dessous) ainsi que la survenue de complications rénales et cardiaques notamment.

B. Physiopathologie de la rhabdomyolyse aiguë

Les ions calciques (Ca^{2+}) jouent un rôle majeur dans différentes voies de signalisation au niveau des fibres musculaires squelettiques dont le couplage excitation-contraction assurant la fonction contractile de ces cellules. A l'inverse, des niveaux élevés de calcium intracellulaire peuvent être toxique pour la cellule en favorisant notamment une production accrue d'espèces réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species ou ROS), l'activation de protéases calcium-dépendantes et la mort cellulaire. L'homéostasie calcique repose donc sur un système de régulation complexe regroupant entre autres différents types de canaux, transporteurs et pompes ioniques assurant les échanges entre le cytosol et l'espace extracellulaire, mais également avec les deux principaux contenants calciques intracellulaires que sont le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mitochondries (Rossi *et al.*, 2019(7) ; Hyatt et Powers, 2020(8)).

Malgré les diverses étiologies d'un épisode aigu de RM, la voie pathogénique communément décrite est caractérisée par une augmentation accrue et non contrôlée de calcium intracellulaire dans la fibre musculaire à l'origine de sa lyse cellulaire. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire repose soit sur une lésion directe de la membrane plasmique de la fibre musculaire, ou sarcolemme, soit sur une déplétion énergétique dans la cellule musculaire. Dans ce dernier cas, la réduction de la production du substrat énergétique adénosine triphosphate (ATP) provoque le dysfonctionnement des pompes ioniques qui en sont dépendantes, telles que les pompes sodium (Na^+) / potassium (K^+) ATPases et calcium (Ca^{2+}) ATPases, à l'origine d'un défaut de régulation des flux calciques. En effet, le dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPases au niveau du sarcolemme entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ , responsable d'une augmentation de l'activité de l'échangeur $2 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ à l'origine de la sortie de l'excès de Na^+ intracellulaire et d'une entrée importante de Ca^{2+} cytosolique. Par la suite, ce surplus de Ca^{2+} intracellulaire ne peut pas être compensé par une entrée de calcium au niveau du RS, ni par efflux au niveau du sarcolemme par défaut des pompes Ca^{2+} ATPases reposant sur le déficit énergétique de la cellule (Giannoglou *et al.*, 2007(9) ; Torres *et al.*, 2015(10) ; Chavez *et al.*, 2016(11)) (Figure 1).

L'accumulation intracellulaire calcique présente différentes conséquences en parallèle qui amplifient ce phénomène et entraîne la lyse des cellules musculaires associée à la libération de leur contenu toxique dans l'espace extracellulaire. D'une part, une concentration cytosolique accrue de Ca^{2+} est responsable de l'activation de différentes phospholipases et protéases calcium-dépendantes dont la phospholipase A2 à l'origine de la dégradation des membranes phospholipidiques, que ce soit le sarcolemme ou les membranes des organelles. Cette digestion enzymatique entraîne non seulement une augmentation de la perméabilité des membranes, accentuant l'augmentation des concentrations

de calcium intracellulaire, mais également le relargage de composants membranaires, dont les acides gras libres, entraînant eux-mêmes des dommages toxiques directs sur les membranes. D'autre part, des taux importants de Ca^{2+} maintiennent la contraction continue des fibres musculaires, renforçant la déplétion en ATP intracellulaire. L'augmentation rapide du calcium cytosolique contribue également à une augmentation du calcium mitochondrial en raison de son gradient chimique entre le cytoplasme et la mitochondrie. A long terme, cette dernière affecte négativement l'intégrité structurelle et fonctionnelle mitochondriale, altérant finalement la production d'ATP. L'augmentation calcique mitochondriale est également responsable de la production accrue de ROS oxydant diverses biomolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. L'oxydation des protéines et des lipides, composants majoritaires des membranes cellulaires, renforce leur déstabilisation et les dysfonctions des divers organites dont les membranes sont affectées comme le RS et la mitochondrie. Enfin, l'accumulation de mutations de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial aggrave le déficit énergétique par dérégulation de l'expression des protéines impliquées dans la respiration mitochondriale, et, plus généralement, l'oxydation de l'ADN nucléaire entraîne une désorganisation fonctionnelle de la fibre musculaire (Giannaglou *et al.*, 2007(9)) (Figure 1).

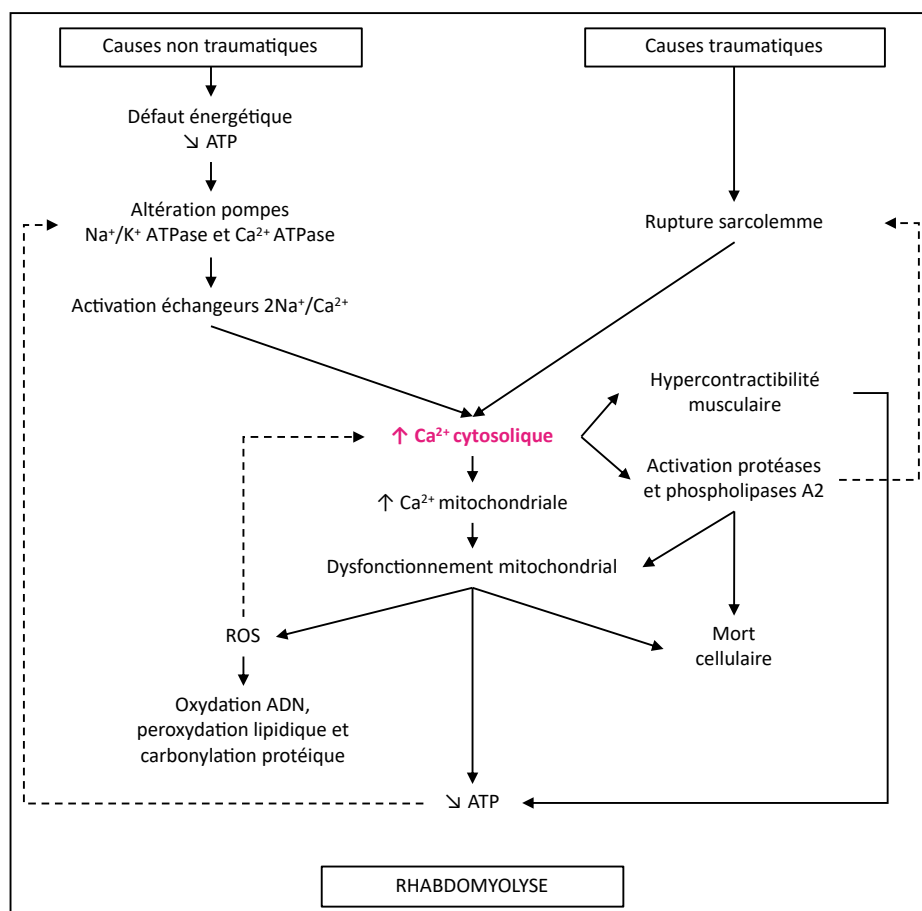


Figure 1 : Principaux mécanismes physiopathologiques de la rhabdomyolyse. Illustration modifiée de l'article Giannaglou *et al.*, 2007, *European Journal of Internal Medicine*.

C. Étiologies de la rhabdomyolyse aiguë

Les causes de RM sont multiples et peuvent être classées en deux grandes catégories, acquises ou génétiques. Dans certains cas, la survenue de RM est le résultat de la combinaison entre une prédisposition génétique et une ou des causes environnementales. D'une part, les étiologies acquises, nombreuses et variées, regroupent notamment des causes toxiques (abus d'alcool ou de substances illicites, toxines ou iatrogénie médicamenteuse dont notamment les hypocholestérolémiants de la famille des statines), des efforts musculaires intenses, des causes traumatiques et/ou ischémiques musculaires, des changements importants de température corporelle, des troubles hydroélectrolytiques et endocriniens, des infections bactériennes ou virales notamment à tropisme musculaire, et certaines pathologies auto-immunes inflammatoires de type myosites. D'autre part, les RM d'origine génétique rassemblent notamment les myopathies métaboliques, certaines myopathies structurelles et des canalopathies musculaires (Shapiro *et al.*, 2012(12) ; Torres *et al.*, 2015(10)).

Les causes génétiques d'épisodes aigus de RM impliquent principalement le métabolisme musculaire et les canaux calciques. Ces causes intègrent essentiellement des myopathies métaboliques d'origine héréditaire. Il s'agit d'un ensemble des pathologies musculaires hétérogènes rares reposant sur une ou des mutations géniques impliquant des milliers de protéines, principalement des enzymes, des récepteurs et des transporteurs impliqués dans différentes voies biochimiques (Morava *et al.*, 2015(13)). Classiquement, trois grandes voies métaboliques sont principalement affectées : le métabolisme glucidique, et plus particulièrement la glycolyse et glycogénolyse (ou glycogénoses), le métabolisme lipidique (ou lipidoses), et notamment la β -oxydation des acides gras, et la chaîne respiratoire mitochondriale (myopathies mitochondriales) (Di Mauro *et al.*, 2010(13)). Cependant, la classification de ce groupe de maladies est en constante évolution, intégrant de nouveaux mécanismes pathologiques, notamment la biosynthèse lipidique complexe impliquée dans des défauts de remodelage protéique (défaut de glycosylation notamment) (Lamari *et al.*, 2015(14) ; Saudubray *et al.*, 2019(15)) et de trafic cellulaire (trafic vésiculaire et/ou l'autophagie) (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2016(16) ; García-Cazorla *et al.*, 2022(17)). La particularité des RM d'origine métabolique est l'identification de facteurs déclenchants tels qu'un exercice soutenu, un jeûne, de la fièvre ou une infection) (Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19)).

Dans le cadre des RM aiguës d'origine génétique, notre laboratoire a pour objectif de comprendre leur physiopathologie, notamment en étudiant les mécanismes sous-jacents liant l'autophagie, l'homéostasie calcique et le métabolisme lipidique dans la survenue d'épisodes aigus de RM à travers l'exemple de patients présentant des mutations des gènes *LPIN1*, *Transport And Golgi Organization 2 Homolog (TANGO2)*, *Ryanodine receptor 3 (RYR3)*, *Vacuolar protein sorting 13 homolog*

C (VPS13C) ou *Annexin A6 (ANXA6)*. Dans cette thèse, nous nous focaliserons sur l'exemple du gène *LPIN1*, dont les mutations sont des causes de prédisposition à la survenue d'épisodes aigus de RM.

D. Diagnostic de la rhabdomyolyse aiguë

Le diagnostic de la RM comprend un examen clinique, à la recherche des symptômes précédemment décrits, l'anamnèse pour comprendre le contexte de survenu de l'épisode aigu de RM en identifiant, si possible, le ou les facteurs déclenchants, et les antécédents familiaux. Cependant, comme précisé précédemment, la présentation clinique d'une RM est très large et ne permet pas à elle-seule de poser le diagnostic, notamment par l'absence ou la présence incomplète de la triade clinique (faiblesse musculaire, myalgie, myoglobulinurie avec urines porto) dans la plupart des cas.

Le diagnostic de RM repose davantage sur des paramètres biologiques, reflétant le relargage dans la circulation sanguine et les urines des composants intracellulaires de la fibre musculaire. Parmi les analyses mises en place en routine, le dosage plasmatique des CPK, et plus particulièrement son sous-type CPK-MM spécifique du muscle, est considéré comme le paramètre de référence dans le diagnostic de la RM. Il s'agit d'enzymes catalysant le transport d'un groupement phosphate de la créatine vers l'adénosine diphosphate (ADP) pour former de l'ATP. Les taux de CPK augmentent progressivement de façon rapide après le début de la RM pour atteindre un plateau en 24 à 72 heures, puis diminuent progressivement sur plusieurs jours voire semaines. Actuellement, il n'existe pas de seuil pour définir une RM, la règle admise étant une valeur des taux de CPK supérieure à cinq fois la normale, soit des valeurs généralement supérieures à 1 000 UI/L (Chavez *et al.*, 2016(11)) voire 10 000 UI/L dans le cas d'une RM aiguë sévère. D'autres analyses faciles à mettre en œuvre en routine peuvent également appuyer le diagnostic comme le dosage d'autres enzymes musculaires, l'ionogramme sanguin ou encore l'analyse urinaire à la recherche de troubles électrolytiques et d'une myoglobulinurie respectivement. Par la suite, d'autres examens peuvent être mis en place pour évaluer et suivre la survenue de complications dont l'exploration de troubles du rythme cardiaque, de la fonction rénale et des troubles de la coagulation (Khan *et al.*, 2009(20) ; Nance et Mammen 2015(21)).

Enfin, il s'agit d'identifier l'origine de la survenue de l'épisode aigu de RM. Pour cela, l'examen clinique, et notamment la présence de signes extra-musculaires, ainsi que l'anamnèse peuvent permettre d'orienter les examens à réaliser pour le diagnostic étiologique. Après exclusion de causes acquises, une origine génétique doit être suspectée en se basant sur les antécédents du patient (apparition dans l'enfance et récurrence des épisodes de RM, antécédents d'intolérance à l'exercice) et l'histoire familiale (antécédents familiaux de troubles neuromusculaires et recherche de consanguinité car transmission le plus souvent autosomique récessive). L'évolution des CPK après

l'épisode de RM aiguë permet également d'orienter le diagnostic sous-jacent (Durigneux *et al.*, 2023(22)). Par la suite des tests génétiques sont mis en place, tels que le panel de gènes ou le séquençage de l'exome entier ou ciblé de nouvelle génération. Enfin, la recherche d'un trouble métabolique peut reposer sur différents tests d'effort ischémique, dont le test de préhension soutenue (ou Grip test) et l'épreuve d'effort, mais également sur la mesure ciblée de l'activité des enzymes du métabolisme (Nance et Mammen, 2015(21) ; Lilleker *et al.*, 2018(23)).

CHAPITRE 2 : DÉFICIT EN LIPIN-1, UN EXEMPLE DE RHABDOMYOLYSES D'ORIGINE MÉTABOLIQUE

A. Présentation générale de lipin-1

1) Description du gène LPIN1

Le gène *LPIN1* a été identifié en 2001 par clonage positionnel suite à l'observation d'une mutation spontanée nulle dans un modèle murin responsable d'un phénotype caractérisé essentiellement par une stéatose hépatique néonatale transitoire, d'où le nom de modèle murin fld pour *fatty liver dystrophy* (Langner *et al.*, 1989(24) ; Reue *et al.*, 2000(25) ; Péterfy *et al.*, 2001(26)). Par clonage et séquençage, il a été identifié deux autres gènes paralogues, *LPIN2* et *LPIN3*, ainsi que d'autres gènes orthologues conservés au sein de différentes espèces, dont certaines très éloignées sur le plan de l'évolution (souris, drosophile, nématode tel que *C. elegans*, levures comme *S. cerevisiae* ou *S. pombe*, plante comme *A. thaliana*, protozoaire unicellulaire comme *P. falciparum*) (Péterfy *et al.*, 2001(26)), soulignant le rôle fondamental de la famille de gènes *LPIN*. Chez l'Homme, les gènes *LPIN1*, *LPIN2* et *LPIN3* sont situés respectivement sur les chromosomes 2 (2p25.1), 18 (18p11.31) et 20 (20q12).

2) Description de la protéine lipin-1

La protéine lipin-1, issu du gène homonyme *LPIN1*, est une protéine soluble d'environ 98 kDa caractérisée par une double fonction participant notamment à l'homéostasie et au métabolisme lipidique. En effet, elle possède à la fois une activité enzymatique de type phosphatidate phosphatase, impliquée dans la synthèse de triglycérides et de phospholipides membranaires, mais également une activité transcriptionnelle participant notamment à la régulation de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras (Csaki et Reue, 2013(27) ; Chen *et al.*, 2014(28) ; Zhang et Reue, 2017(29) ; Lutkewitte et Finck, 2020(30)) (fonctions moléculaires décrites plus en détails dans la partie suivante). La protéine lipin-1 présente une distribution tissulaire relativement ubiquitaire mais son niveau d'expression est tissu-dépendant avec une prédominance au niveau du tissu adipeux et du muscle. Il est à noter une prédominance d'expression différente pour les deux autres paralogues : ainsi, lipin-2 est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux, le foie et le cerveau, et lipin-3 au niveau du tractus digestif (Donkor *et al.*, 2007(31)).

La structure protéique de lipin-1 comporte des domaines hautement conservés à travers les espèces, et présents dans les deux paralogues lipin-2 et lipin-3, qui sont essentiels à ses fonctions

(Péterfy *et al.*, 2001(26)). Ainsi, l'extrémité carboxy-terminale (C-LIP) de la protéine possède deux motifs clés : le motif DXDXT, correspondant au site catalytique nécessaire à l'activité enzymatique de lipin-1 (Han *et al.*, 2006(32)), et le motif LXXIL assurant sa liaison à des facteurs nucléaires permettant son activité transcriptionnelle (Finck *et al.*, 2006(33)). Proche de l'extrémité amino-terminale (N-LIP), il existe également un domaine *Nuclear localization signal* (NLS), dont le motif polybasique riche en acides aminés positivement chargés (lysinine et arginine), est nécessaire à la fois à la translocation nucléaire de la protéine lipin-1, mais également à sa liaison aux membranes riches en acide phosphatidique lui permettant de réguler son activité enzymatique (Ren *et al.*, 2010(34)) (Figure 2).

Enfin, la protéine lipin-1 présente trois isoformes, lipin1 α , lipin1 β et lipin1 γ , à la suite de l'épissage alternatif du gène *LPIN1*, phénomène de transcription conservé à travers les espèces. Cela consiste en l'ajout d'un exon en phase supplémentaire de 36 ou 26 acides aminés, pour lipin-1 β et lipin1 γ respectivement, à la séquence de 890 aminés de lipin-1 α (Péterfy *et al.*, 2005(35) ; Han et Carman, 2010(36)). Il est à noter que l'inclusion de ces exons n'altère aucun site fonctionnel connu de la séquence protéique de lipin1 (Csaki et Reue, 2013(27)). Les trois isoformes de lipin1 ayant des différences d'activité enzymatique, d'expression tissulaire, de localisation cellulaire et de fonctions physiologiques, cet épissage alternatif constitue un élément de régulation des activités de la protéine lipin1 (Csaki et Reue, 2013(27)) (partie davantage détaillée plus loin).

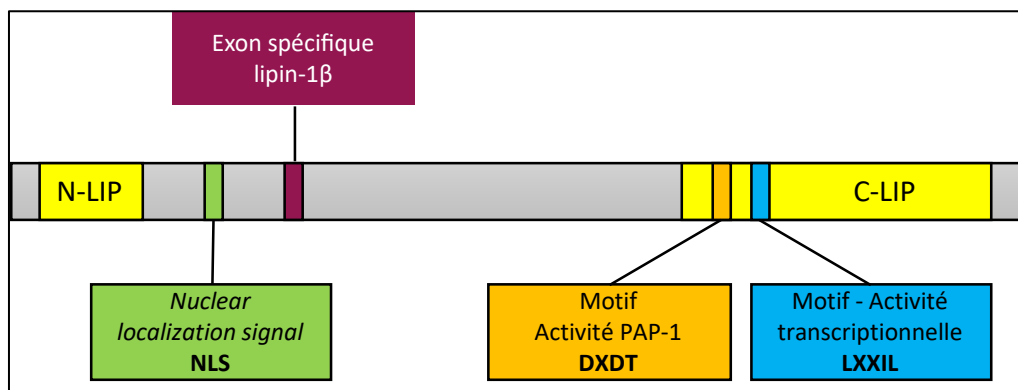


Figure 2 : Caractéristiques structurales essentielles aux fonctions de la protéine lipin-1. Illustration modifiée de l'article Chen *et al.*, 2014, *Annals of Nutrition and Metabolism*. La protéine contient deux régions conservées au cours de l'évolution à ses extrémités N et C-terminales (N-LIP et C-LIP), contenant des motifs fonctionnels clés (DXDT et LXXIL), ainsi qu'un domaine NLS nécessaire à sa translocation nucléaire.

3) Deux mécanismes d'action moléculaires de lipin-1

a. **Fonction enzymatique phosphatidate phosphatase 1 (PAP-1) de lipin-1**

L'activité enzymatique de type phosphatidate phosphatase 1 (PAP-1), portée par les protéines lipin, intervient au niveau de la voie principale de synthèse des triglycérides à partir du glycérol-3-

phosphate. Les triglycérides sont des composants essentiels de réserve énergétique dans le tissu adipeux et de source énergétique pour la β -oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques et le myocarde. Au sein de cette voie de synthèse, les protéines lipin permettent la conversion de l'acide phosphatidique en diacylglycérol, précurseur non seulement des triglycérides mais également des phospholipides neutres (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine), composants lipidiques majeurs des membranes cellulaires (Csaki et Reue, 2013(27) ; Chen *et al.*, 2014(28) ; Zhang et Reue, 2017(29) ; Lutkewitte et Finck, 2020(30)).

La purification de l'activité PAP-1 dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a permis l'obtention de la séquence protéique de Pah1p, protéine codée par le gène orthologue de la famille de gènes *LPIN* chez les mammifères. Basée sur leur homologie structurale, l'activité PAP-1 a également été démontrée pour les autres protéines lipin chez les mammifères (Han *et al.*, 2006(32)). Par la suite, des précisions ont été apportées quant à l'activité PAP-1 des protéines lipin : cette activité est spécifique de l'acide phosphatidique, dépendante du magnésium (Mg^{2+}) et peut être inhibée par le N-éthylmaléimide (Han *et al.*, 2006(32) ; Donkor *et al.*, 2007(31)). Ne possédant pas de domaine transmembranaire, les protéines lipin peuvent circuler librement dans le cytosol jusqu'à leur cible, l'acide phosphatidique, contenu au niveau des membranes des organelles tels que le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie, mais également au niveau des autophagosomes et lysosomes. (Zhang et Reue, 2017(29)).

b. Activité transcriptionnelle de lipin-1

En plus de sa localisation au niveau des membranes cellulaires pour y exercer sa fonction enzymatique PAP-1, lipin-1 peut également être localisée au niveau du noyau cellulaire (Péterfy *et al.*, 2001(26)). Sa fonction transcriptionnelle a ensuite été décrite pour la première fois par Finck *et al.*, 2006 en montrant son interaction avec le facteur de transcription *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) α et son coactivateur transcriptionnel *PPAR γ coactivator 1 α* (PGC-1 α) en réponse au jeûne au niveau hépatique dans un modèle murin. Il en résulte ainsi une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative mitochondriale notamment, ainsi que la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*. Par la suite, d'autres interactions de lipin-1 ont été identifiées permettant son activité transcriptionnelle. Par exemple, lipin-1 participe à l'activation d'autres partenaires de PGC1 α comme les récepteurs nucléaires PPAR β/γ , *Hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF4 α) et les récepteurs aux glucocorticoïdes, ainsi qu'à l'activation d'autres facteurs de transcription comme *Myocyte enhancer 2* (MEF2). La protéine lipin-1 est également capable d'entraîner la répression du facteur de transcription *Nuclear factor of activated T-cells c4* (NFATc4) (Csaki et Reue, 2013(27) ; Chen *et al.*, 2014(28) ; Zhang et Reue, 2017(29)).

Les mécanismes par lesquels la protéine lipin-1 exerce sa fonction transcriptionnelle ne sont pas élucidés actuellement. Ils semblent être multiples et dépendants du facteur de transcription impliqué : 1) présence au sein de complexes associés aux promoteurs de gènes cibles ; 2) constitution d'un échafaudage moléculaire à l'origine du recrutement de modificateurs d'histones, soit désacétylases soit acétylases, responsables de la répression ou de l'activation génique respectivement ; 3) formation de liaison avec des phospholipides, ligands de récepteurs nucléaires, de façon similaire à une protéine chaperonne (Harris et Finck, 2011(37) ; Csaki et Reue, 2013(27)).

4) Régulation de lipin-1

Il existe différents niveaux de régulation de lipin-1, au niveau transcriptionnel (modulation de son expression et épissage alternatif), mais aussi protéique (modifications post-traductionnelles et formation oligomérique).

a. Régulation transcriptionnelle du gène *LPIN1*

Modulation de l'expression génique

Plusieurs stimuli ont été identifiés comme à l'origine de l'induction de l'expression du gène *LPIN1* au niveau hépatique : obésité, jeûne, diabète, régime riche en graisses, exercice intense, ou encore exposition chronique à l'éthanol (Harris et Finck, 2011(37)). Certains de ces stimuli ont été identifiés comme responsables d'une augmentation de l'activité enzymatique PAP-1 au niveau hépatique avant même l'identification du gène *LPIN1*, tels que le jeûne, le diabète et l'exposition chronique à l'éthanol. A l'inverse, le jeûne et le diabète ont été décrits comme étant responsables d'une diminution de l'activité PAP-1 au niveau du tissu adipeux. La régulation de l'activité PAP-1 semble donc tissu-dépendante (Reue et Brindley, 2008(38) ; Chen *et al.*, 2014(28)).

Plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme à l'origine de la régulation de l'expression du gène *LPIN1*. Par exemple, une déplétion intracellulaire de stérols au niveau hépatique ou l'exposition chronique à l'éthanol contribue à une augmentation de l'expression de *LPIN1* via les facteurs de transcription *Sterol response element binding protein-1* (SREBP1) et *Nuclear transcription factor Y* (NF-Y). PGC-1 α induit également l'expression de *LPIN1* via le facteur de transcription HNF4 α dans les hépatocytes. De plus, les glucocorticoïdes, augmentés en cas d'obésité ou de jeûne, se fixent à leur récepteur situé en amont de la séquence du gène *LPIN1* et augmentent ainsi son expression au cours de la différenciation adipocytaire. Au niveau des adipocytes, il existe également une corrélation entre la sensibilité à l'insuline et l'expression du gène *LPIN1* puisque cette dernière est augmentée en présence de produits sensibilisant à l'insuline (thiazolidinediones et harmine). Enfin, au niveau

musculaire, l'activation des récepteurs β 2-adrénrgiques, en cas d'exercice intense, entraîne une augmentation de l'expression du gène *LPIN1* via le facteur de transcription *Neuron-derived orphan receptor 1* (NOR-1) (Reue et Brindley, 2008(38) ; Chen *et al.* , 2014(28)). Il est à noter que certains facteurs de transcription se lient directement à la région promotrice du gène *LPIN1* : NOR-1, SREBP1, NF-Y, mais également *CCAAT enhancer binding protein* (C/EBP) et *c-Adenosine monophosphate (AMP) response element binding protein* (CREB). De façon générale, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du gène *LPIN1* sont activés par des stimuli lipogéniques (C/EBP, GR, SREBP-1) ou des voies de signalisation liées à des besoins énergétiques accrus (NOR-1, CREB, PGC-1 α) (Harris et Finck, 2011(37)).

A l'inverse, l'activation des récepteurs de l'immunité innée *Toll-like receptor* (TLR) 4 et 2, respectivement par le LPS et le zymosan, et certaines cytokines inflammatoires, ainsi que l'utilisation d'inducteurs du stress du RE (tunicamycine et thapsigargine) entraînent une répression du gène *LPIN1* au niveau du tissu adipeux. Il existe également une diminution de l'expression du gène *LPIN1* au niveau hépatique et utérin par l'estrogène (Chen *et al.*, 2014(28)). Enfin, il est à noter que, dans des hépatocytes et des adipocytes *in vitro*, l'inhibition transcriptionnelle de lipin-1 ou de lipin-2 est à l'origine de l'augmentation du transcrit et de la protéine de l'autre paralogue. Cependant, l'impact de ces changements sur l'activité enzymatique PAP-1 n'est pas intuitif au niveau des hépatocytes : l'inhibition de lipin-1 réduit drastiquement l'activité enzymatique PAP-1 alors que l'inhibition de lipin-2 augmente cette dernière par surexpression de *LPIN1* (Grimsey *et al.*, 2008(39)).

Epissage alternatif du gène LPIN1

Comme décrit précédemment, la protéine lipin-1 possède trois isoformes différentes à la suite d'un épissage alternatif du gène *LPIN1* possédant des caractéristiques différentes. En effet, dans un modèle murin fdl, l'isoforme α est prédominante au niveau du cerveau, de la rate et des pré-adipocytes, alors que l'isoforme β est présente essentiellement dans le foie, le cœur, le rein et les adipocytes matures (Péterfy *et al.*, 2005(35) ; Han et Carman, 2010(36)). Cette différence d'expression tissulaire des différentes isoformes souligne un épissage alternatif du gène *LPIN1* tissu-dépendant. De plus, dans ce modèle, la localisation subcellulaire des isoformes de lipin-1 est différente : localisation nucléaire pour l'isoforme α , cytosolique pour l'isoforme β , et au niveau des gouttelettes lipidiques pour l'isoforme γ . Ce modèle murin montre également des différences d'activité transcriptionnelle des isoformes, notamment dans l'exemple de la différenciation adipocytaire : dans l'adipocyte, lipin-1 α stimule l'expression de gènes adipogéniques, tandis que lipin-1 β promeut des gènes lipogéniques (Péterfy *et al.*, 2005(35)). Enfin, dans un modèle d'*E. coli*, il a été décrit que les isoformes α et β ont une activité PAP-1 plus importante que celle de l'isoforme γ , mais que cette dernière présente une plus grande affinité pour leur substrat, l'acide phosphatidique (Han et Carman, 2010(36)). Ainsi, la

nature de l'isoforme de lipin-1 ayant un impact sur sa localisation tissulaire et subcellulaire, ainsi que sur ses activités enzymatiques et transcriptionnelles, la régulation de l'épissage alternatif du transcrit est à prendre en considération dans la régulation des fonctions physiologiques de lipin-1. Cependant, actuellement, il existe peu de données sur la régulation de cet épissage alternatif (Csaki et Reue, 2013(27)).

Ainsi, lipin-1, jouant un rôle sur la lipogénèse et la lipolyse, est finement régulé en fonction des besoins énergétiques et de l'environnement.

b. Régulation protéique de lipin-1

Modifications post-traductionnelles

Des modifications post-transcriptionnelles de la protéine lipin-1 chez les mammifères peuvent également réguler sa localisation subcellulaire et, par conséquent, ses différentes fonctions, incluant des modifications principalement par phosphorylation et sumoylation, ainsi que par acétylation ou ubiquitination (Csaki et Reue, 2013(27) ; Reue et Wang, 2019(40) ; Lutkewitte et Finck, 2020(30)). En effet, la phosphorylation de lipin-1, et dans une moindre mesure l'acétylation, influence la translocation de lipin-1 du cytosol vers les membranes cellulaires, principalement au niveau du RE mais aussi de la mitochondrie et autophagosomes/lysosomes, permettant de réguler indirectement son activité PAP-1 par accès à son substrat, l'acide phosphatidique (Csaki et Reue, 2013(27) ; Reue et Wang, 2019(40) ; Lutkewitte et Finck, 2020(30)). De plus, la sumoylation, sur des résidus lysine, est également responsable de la translocation nucléaire de lipin-1 régulant ainsi sa fonction comme co-régulateur transcriptionnel (Liu et Gerace., 2009(41)). Enfin, comme pour la plupart des protéines, la polyubiquitination de la protéine lipin-1 entraîne sa dégradation par le protéasome (Shimizu *et al.*, 2017(42)).

La phosphorylation de lipin-1 est la modification post-traductionnelle la plus décrite. Ainsi, une hyperphosphorylation sur de multiples résidus sérine et thréonine de lipin-1 entraîne sa séquestration dans le cytoplasme par interaction avec les protéines 14-3-3 (Péterfy *et al.*, 2010(43)). A contrario, le complexe *C-terminal domain nuclear envelope phosphatase* (CTDNEP) / *Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1* (NEP1R1) entraîne la déphosphorylation de lipin-1 et promeut sa translocation au niveau des membranes (Kim *et al.*, 2007(44) ; Han *et al.*, 2012(45)). La phosphorylation de lipin-1 a été observée en présence d'insuline et d'acides aminés, dépendante de la voie de signalisation médiée par *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) / phosphoinositide 3-kinase (PI3K) en présence d'insuline (Huffman *et al.*, 2002(46) ; Harris *et al.*, 2007(47) ; Peterson *et al.*, 2011(48)). A l'inverse, la déphosphorylation de lipin-1 a été décrite en présence d'acides gras insaturés, comme l'acide oléique, qui participe notamment à la fluidité membranaire (Harris *et al.*, 2007(47)) . Cette

modification post-traductionnelle fait partie d'un ensemble complexe de facteurs impliqués dans la modification des interactions entre la protéine lipin-1 et son substrat, dont la composition phospholipidique des membranes et le pH environnant modifiant l'état d'ionisation de l'acide phosphatidique (Peterson *et al.*, 2011(48) ; Eaton *et al.*, 2013(49)).

Formation d'oligomères

La protéine lipin-1 peut former des structures homo-oligomériques, sous forme de dimères ou de tétramères, via des interactions de type N-LIP/N-LIP ou C-LIP/C-LIP à l'état natif. Lipin-1 peut également former des hétéro-oligomères avec ses paralogues, lipin-2 ou lipin-3. Cependant, les monomères de lipin-1 étant capables indépendamment d'assurer la fonction enzymatique de cette protéine, l'implication de ces formations oligomériques dans les fonctions physiologiques de lipin-1 restent à élucider (Liu *et al.*, 2010(50)).

B. Rhabdomyolyses dans le déficit en lipin-1

1) Description du phénotype associé au déficit en lipin-1 chez les patients

En clinique, plusieurs mutations du gène *LPIN1* (NM_145693.4) ont été identifiées, depuis les premières mutations observées par Zeharia *et al.*, 2008, et peuvent être classées comme suit : 44 mutations par substitutions nucléotidiques (non-sens et faux-sens), 8 épissages, 9 petites délétions et 5 petites insertions, 1 petite insertion/délétion et 8 grosses délétions (HGMD® Professional 2023.1). La majorité des mutations pathogéniques du gène *LPIN1* sont des mutations nulles conduisant à une protéine tronquée non fonctionnelle rapidement dégradée ou à l'absence de protéine, majoritairement à la suite de mutations non-sens, de décalages du cadre de lecture aboutissant à l'apparition précoce d'un codon stop (*frameshift*), ou de délétions (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19) ; Meijer *et al.*, 2015(52) ; Kanderi *et al.*, 2022(53)).

Le déficit en lipin-1 est une pathologie rare, héréditaire et autosomique récessive (n° OMIM 268200) qui repose essentiellement sur des épisodes aigus de RM avec myoglobulinurie pouvant être fatales et déclenchés le plus souvent par la fièvre, le jeûne ou un exercice musculaire intense. Une faiblesse musculaire et/ou des myalgies peuvent également compléter ce tableau clinique en dehors des épisodes aigus de RM (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2012(19)), ainsi qu'une atteinte cardiaque de type cardiomyopathie voire insuffisance cardiaque (Michot *et al.*, 2012(19) ; Legendre *et al.*, 2018(54)). Les RM aigus surviennent principalement dans l'enfance, probablement car les infections virales sont plus fréquentes chez le jeune enfant, mais des cas ont aussi été rapportés chez l'adulte (Stepien *et al.*, 2019(55) ; Minton *et al.*, 2020(56) ; Indika *et al.*, 2020(57)). Des cas de RM ayant

été détectés chez des patients traités par des statines et présentant une haploinsuffisance (mutation hétérozygote) du gène *LPIN1* (Zeharia *et al.*, 2008(51)), le déficit en lipin-1 est donc considéré comme un facteur de risque de myotoxicité lors d'un traitement par statine (Thompson *et al.*, 2016(58)). Chez les patients, il n'y a pas de lipodystrophie car il semblerait que les adipocytes possèdent des mécanismes compensatoires, non présents dans les modèles murins, incluant une synthèse de triglycérides indépendante de lipin et une réduction de la lipolyse des triglycérides stockés (Temprano *et al.*, 2016(59)). Cette absence de lipodystrophie est également corrélée à une absence de dyslipidémie, de stéatose hépatique et d'insulino-résistance chez les patients (Michot *et al.*, 2010(18) ; Schweitzer *et al.*, 2015(60)). Par opposition au modèle murin dont le phénotype est présenté ci-dessous, il est à noter qu'un seul cas de neuropathie périphérique a été décrit chez l'Homme (Lu *et al.*, 2021(61)).

Lorsqu'elle est réalisée en phase aiguë, notamment en cas d'autopsie, la biopsie musculaire des patients présentant un déficit en lipin-1 révèle une nécrose des fibres musculaires sans infiltration de cellules immunitaires (Bergounioux *et al.*, 2012(62)). L'histologie du muscle est aussi caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques, retrouvée également lors de biopsies de muscle réalisées en dehors d'un épisode aigu de RM. En dehors des gouttelettes lipidiques, l'histologie du muscle en phase non aiguë ne montre pas de franche anomalie. L'étude lipidique réalisée à partir de tissus musculaires révèle l'accumulation d'intermédiaires lipidiques de la voie du glycérol 3-phosphate en amont du déficit enzymatique, notamment de l'acide phosphatidique et des phospholipides, sans modification de la quantité de diacylglycérol en aval du déficit (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19)).

Une étude menée par Michot *et al.*, 2013 a montré dans des myoblastes primaires de patients déficients en lipin-1 que l'absence d'expression génique et protéique était associée à une diminution de son activité enzymatique PAP-1, sans modification de son activité transcriptionnelle. L'observation de l'accumulation de gouttelettes lipidiques et d'acides gras libres dans ces cellules musculaires a été corrélée en partie à une augmentation du gène *Acetyl-CoA Carboxylase β (ACACB)* et une diminution partielle de l'activité de *Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)*, impliqués dans la synthèse et la β-oxydation des acides gras respectivement. Ces altérations du métabolisme lipidique au niveau des cellules musculaires ont été exacerbées par le traitement de ces dernières par la combinaison de deux cytokines proinflammatoires (*Tumor necrosis factor α (TNF-α)* et interleukine (IL)-1β), mimant une infection, et diminuées en présence d'un glucocorticoïde de synthèse anti-inflammatoire (dexaméthasone). Ainsi, le mécanisme pathogénique de la RM chez les patients déficients en lipin-1 résulte de l'altération constitutive du métabolisme lipidique qui est exacerbée par des cytokines pro-inflammatoires (Michot *et al.*, 2013(63)).

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels un déficit en lipin-1 entraîne des dommages musculaires, ont été mis en place des études sur plusieurs modèles murins notamment, dont les phénotypes sont présentés ci-dessous.

2) Description du phénotype associé au déficit en lipin-1 dans les modèles murins

Le modèle murin fld porte un réarrangement complexe du gène *Lpin1* à l'origine d'une mutation nulle expliquant des troubles du métabolisme lipidique notamment. Une mutation ponctuelle (Gly84Arg) a également été décrite dans un modèle murin nommé fld^{2j}, présentant un phénotype identique à celui du modèle murin fld (Péterfy *et al.*, 2001(26)). Ces modèles murins sont caractérisés par un retard de croissance et une stéatose hépatique néonatale spontanément résolutifs, une lipodystrophie associée à une hypertriglycéridémie et à une insulino-résistance, ainsi que le développement d'une neuropathie périphérique et une infertilité chez le jeune adulte. Ce phénotype est cohérent avec le profil d'expression majoritaire de la protéine lipin-1 dans le tissu adipeux et les testicules, et une expression plus faible dans le foie (Donkor *et al.*, 2007(31)). Afin de mieux appréhender les altérations musculaires du déficit en lipin-1, sans les effets confondants des perturbations métaboliques décrites dans l'organisme entier (lipodystrophie et neuropathie périphérique notamment), des modèles murins présentant une délétion spécifique de lipin-1 dans le muscle squelettique ont été générés (Phan et Reue, 2005(64) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)).

Dans ces modèles murins, le phénotype musculaire correspond à une diminution de la force musculaire (Rashid *et al.*, 2019(66)) et à une réduction de la tolérance à l'exercice associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de CPK (Schweitzer *et al.*, 2019(65)). L'histologie révèle une nécrose des fibres musculaires mais aussi des marqueurs de régénération musculaire (centralisation anormale des noyaux des fibres musculaires, fibrose et infiltrats de cellules immunitaires), notamment en condition de stress métabolique (jeûne de 12 à 16h environ) (Zhang *et al.*, 2014(67) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)). Ces marqueurs de myopathie sont également associés à des modifications du profil lipidique musculaire, avec une accumulation de gouttelettes lipidiques, d'acide phosphatidique, de lipides neutres et de phospholipides. De par la construction des mutations de lipin-1 spécifiques du muscle et dissociant les deux fonctions moléculaires de la protéine, il a été démontré que ces altérations musculaires sont davantage liées à une perte de l'activité enzymatique PAP-1 de lipin-1 qu'à la perte de son activité transcriptionnelle (Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)).

La lipodystrophie du modèle fld entraîne une inversion des sources énergétiques musculaires mobilisées en fonction des régimes alimentaires : utilisation du glucose issu de la glycogénolyse lors d'un jeûne et des acides gras en période de nutrition (Xu *et al.*, 2006(68)). Ainsi, la lipodystrophie serait à l'origine d'une augmentation des gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras et d'une diminution de la synthèse et du stockage de ces derniers au niveau du muscle en période de jeûne (Phan et Reue, 2005(64)). Des changements phénotypiques dans les fibres musculaires peuvent être associés et reflètent une adaptation à cette situation métabolique : augmentation des fibres de type glycolytiques aux dépens des fibres de type oxydatives (Sellers *et al.*, 2019(69)). Cette adaptation des fibres musculaires n'est pas retrouvée dans un modèle présentant un déficit en lipin-1 spécifique du muscle, dans lequel l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras est diminuée au profit de celle des gènes régulant la synthèse et le stockage de ces derniers (Phan et Reue, 2005(64) ; Rashid *et al.*, 2019(66)). Enfin, les modèles avec un déficit en lipin-1 spécifique du muscle ne présentent pas de diminution de la quantité musculaire de diacylglycérol (Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)), contrairement au modèle murin fld (Zhang *et al.*, 2014(67)), se rapprochant des observations faites dans les myoblastes primaires de patients (Michot *et al.*, 2013(63)).

La protéine lipin-1 est le seul paralogue présentant une expression significative musculaire chez l'Homme et une expression élevée chez la souris. Sa délétion spécifique au niveau musculaire est suffisante pour entraîner une myopathie chronique chez l'animal. De plus, un sauvetage de cette myopathie et de l'altération de l'utilisation des acides gras a été observé après une surexpression transgénique de lipin-1 au niveau du muscle dans le modèle murin fld (Phan et Reue, 2005(64) ; Zhang *et al.*, 2014(67)). Ces observations, ainsi que la récurrence de RM sévères chez les patients présentant un déficit en lipin-1, suggère un effet intrinsèque de cette protéine au niveau du muscle. Par la suite, nous nous intéresserons donc aux éléments de physiopathologie au niveau musculaire pouvant expliquer les phénotypes présentés ci-dessus.

C. Physiopathologie du déficit en lipin-1 au niveau musculaire

1) Autophagie et mitophagie

a. Présentation générale de l'autophagie

La macroautophagie (ci-après dénommée autophagie) est une voie de dégradation lysosomale impliquée dans le recyclage et le renouvellement des macromolécules et des organelles intracellulaires. L'autophagie est caractérisée par la formation *de novo* de vésicules à double

membrane, les autophagosomes, dans lesquelles est chargé du matériel cytosolique (ou cargo) préalablement à sa dégradation lysosomale (Levine et Kroemer, 2008(70) ; Mizushima *et al.*, 2008(71)).

L'autophagie constitue un processus de remodelage membranaire regroupant plusieurs étapes : initiation, formation des autophagosomes à partir d'une membrane isolée, ou phagophore (comprenant les sous-étapes de nucléation, élongation et fermeture), fusion avec les structures endolysosomales, et dégradation lysosomale. L'exécution de l'ensemble de ces étapes implique la mise en place de protéines issues de gènes hautement conservés au cours de l'évolution, les gènes *Autophagy related genes (ATG)*, notamment requis pour la formation des autophagosomes (Levine et Kroemer, 2019). A la suite de l'initiation de l'autophagie, la nucléation et l'élongation du phagophore sont sous le contrôle d'un complexe multiprotéique contenant principalement PI3K, dont la sous-unité catalytique Vps34, une fois activée, produit du phosphatidylinositol-3 phosphate (PI3P) permettant l'expansion des membranes autophagosomales jusqu'à leur fermeture (Parzych et Klionsky, 2014(72) ; Galluzzi *et al.*, 2017(73)). L'élongation du phagophore est également associée à l'activité de deux systèmes de conjugaison, dont la forme lipidique de *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3)*, notée LC3-II, générée sur les autophagosomes en formation. Ce dernier permet notamment l'absorption du cargo lors de sa liaison à plusieurs récepteurs de l'autophagie, dont p62, lors d'une autophagie sélective (Parzych et Klionsky, 2014(72) ; Galluzzi *et al.*, 2017(73)). L'accumulation de LC3-II, tout comme p62, et sa localisation dans les structures vésiculaires sont couramment utilisées comme marqueurs de l'autophagie (Mizushima *et al.*, 2010(74) ; Pasquier, 2016(75) ; Klionsky *et al.*, 2021(76)). Enfin, la fusion de l'autophagosome mature avec le lysosome est nécessaire afin d'assurer la dégradation du cargo et implique notamment la protéine *Ras oncogene family 7 (Rab7)*, mais également aux *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor (SNARE)*, dont la syntaxine 17, et les complexes *Homolytic fusion and vacuole protein sorting (HOPS)* (Parzych et Klionsky, 2014(72) ; Galluzzi *et al.*, 2017(73)).

De par son rôle fondamental dans l'homéostasie cellulaire, l'autophagie est finement régulée de façon dynamique : elle présente un niveau basal constitutif qui peut être fortement exacerbée par de nombreux stimuli, tels que le jeûne par exemple durant lequel elle permet de dégrader le matériel cytoplasmique en métabolites pouvant être utilisés dans des processus de biosynthèse ou dans la production d'énergie, permettant ainsi la survie cellulaire (Yorimitsu *et al.*, 2005). La régulation de l'autophagie est complexe et fait intervenir de nombreuses voies de signalisation qui convergent principalement vers la cascade de signalisation médiée par PI3K / Akt / mTOR, mTOR étant une sérine/thréonine kinase clé dans la régulation du métabolisme cellulaire, dont l'autophagie via sa sous-unité mTORC1 (Jung *et al.*, 2010(77) ; Kim et Guan, 2015(78)). A l'inverse, une altération de l'autophagie, notamment son inhibition, peut survenir dans des contextes pathologiques tels que la

formation de tumeurs, ainsi que des maladies neurodégénératives, infectieuses ou inflammatoires (Jiang et Mizushima, 2014 ; Klionsky *et al.*, 2021). Il est intéressant de noter que des défauts au niveau de toutes les étapes de l'autophagie ont été associés à des pathologie des muscles squelettiques (Grumati et Bonaldo, 2012(79) ; Xia *et al.*, 2021).

b. Implication de lipin-1 dans l'autophagie et la mitophagie

Altération de l'autophagie dans le déficit en lipin-1

Dans différents modèles murins et humains ainsi que chez la drosophile présentant un déficit en lipin-1, un déficit du flux autophagique a été observé, notamment en phase terminale lorsque les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes afin de former des autolysosomes matures permettant ainsi la dégradation des composants cellulaires endommagés (Ugrankar *et al.*, 2011(80) ; Zhang *et al.*, 2014(67) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66) ; Hamel *et al.*, 2021(81)). Grâce à un modèle murin entraînant la perte de l'activité PAP-1 uniquement (conservation de l'activité transcriptionnelle de la protéine lipin-1), il a été montré que l'implication de lipin-1 dans l'autophagie est dépendante de son activité enzymatique (Schweitzer *et al.*, 2019(65)). Plusieurs mécanismes moléculaires sous-jacents ont été rapportés par la suite.

Dans un modèle fld, la perte de l'activité enzymatique PAP-1 de la protéine lipin-1 a entraîné une diminution de diacylglycérol responsable d'une altération de la voie de signalisation médiée par la protéine kinase D (PKD) et Vps34 et d'une diminution des taux de PI3P, impliqué physiologiquement dans la formation des autophagosomes (Zhang *et al.*, 2014(67)) (Figure 3). Par ailleurs, dans des myoblastes primaires humains, une diminution de PI3P au niveau des compartiments subcellulaires, tels que les autophagosomes et les endosomes tardifs, a été associée à un défaut de recrutement de la guanosine triphosphate (GTP) -ase Armus au niveau de ces structures entraînant une altération de la régulation dynamique de la protéine Rab7 maintenue sous forme active associée au GTP. L'état d'activation de Rab7 étant étroitement corrélé au trafic cellulaire bidirectionnel des structures autophagiques grâce à ses effecteurs *FYVE And Coiled-Coil Domain Containing 1* (FYCO1) et *Rab-interacting lysosomal protein* (RILP), son hyperactivation a entraîné des modifications de la localisation intracellulaire de ces structures qui, associées à une diminution de la fonction lysosomale, ont été à l'origine d'un blocage de la résolution autophagique (Hamel *et al.*, 2021(81)) (Figure 3).

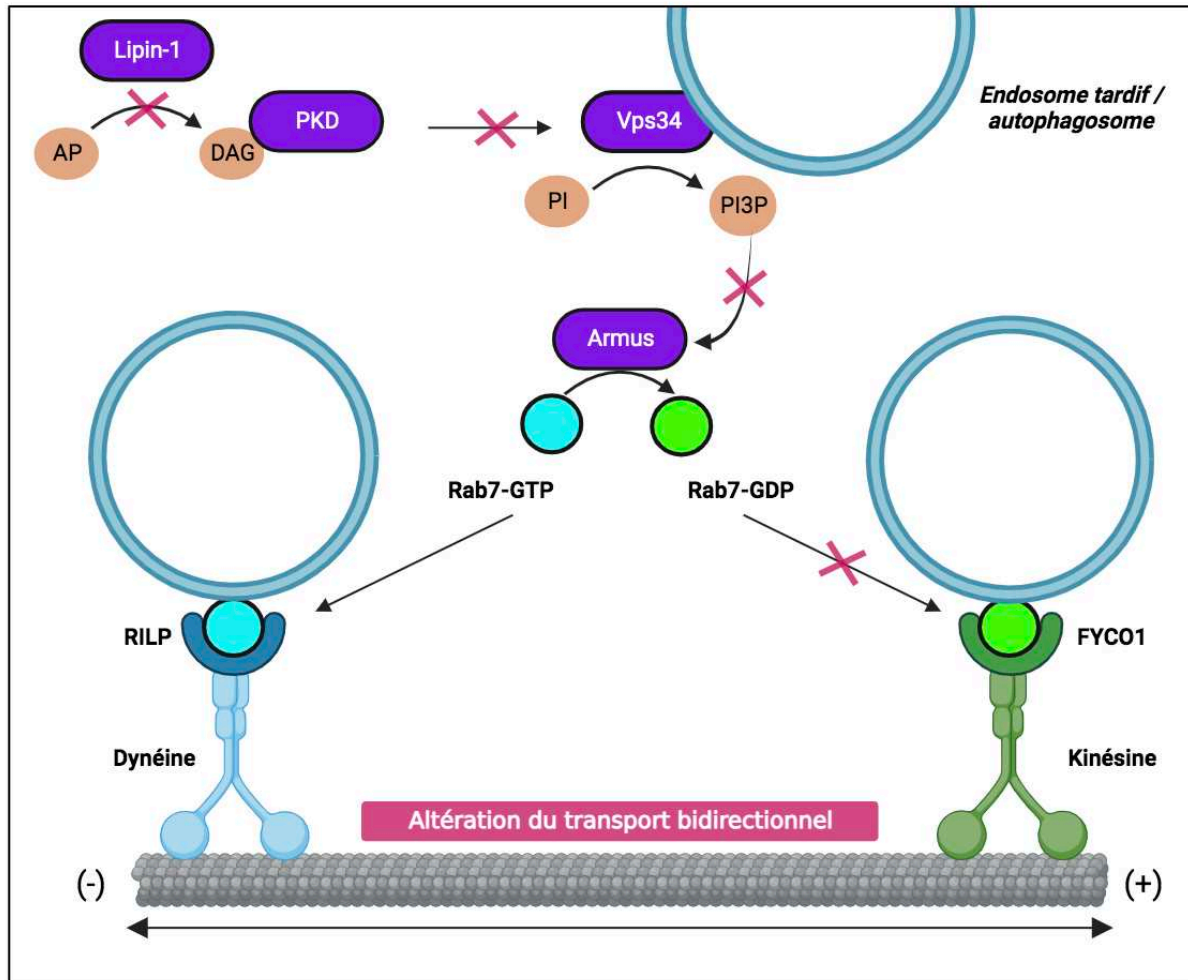


Figure 3 : Implication de lipin-1 dans l'autophagie. Le déficit en lipin-1 ne permet pas la production de DAG, inhibant l'activation de la voie de signalisation médiée par PKD/Vps34 et donc la synthèse de PI3P au niveau de la membrane endosomale. L'absence de PIP3 inhibe le recrutement membranaire de la GTPase Armus responsable de la régulation dynamique de la protéine Rab7. La persistance de la forme GTP de Rab7 empêche le transport bidirectionnel des structures endosomales inhibant par conséquent la fusion avec le lysosome et ainsi la résolution autophagique. Créée avec BioRender.com.

Le processus autophagique, dans lequel est impliqué l'activité PAP-1 de la protéine lipin-1, est dépendant de mTOR. En effet, le traitement par statines du modèle fld a pu exacerber un déficit en lipin-1, même partiel (ou haplo-insuffisance), par deux mécanismes différents : 1) diminution de l'activité de mTOR qui permet d'augmenter l'induction de l'autophagie ; 2) accumulation de l'acide phosphatidique avec diminution de l'activation de la PKD et donc inhibition de la maturation des autolysosomes (Zhang *et al.*, 2014(67)). De plus, un traitement par le temsirolimus, un inhibiteur de mTOR, a permis d'améliorer l'altération du flux autophagique dans un modèle murin déficient en lipin-1 (Rashid *et al.*, 2019(66)). Enfin, il a été montré dans différents types cellulaires (cellules HEK293, C2C12 et 3T3) qu'une accumulation d'acide phosphatidique induit l'activité kinase de mTOR, en

maintenant sa dissociation avec son inhibiteur endogène *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) (Yoon *et al.*, 2015(82)).

Altération de la mitophagie et dysfonctionnement mitochondrial dans le déficit en lipin-1

L'altération du flux autophagique dans ces différents modèles a été associée à l'accumulation de mitochondries altérées morphologiquement et fonctionnellement, suggérant ainsi un défaut de mitophagie. Ces anomalies mitochondriales observées dans le déficit en lipin-1 pourraient reposer sur un défaut de la dynamique mitochondriale (fission/fusion) nécessaire à son homéostasie. En effet, il a été montré que la consommation d'acide phosphatidique par l'isoforme lipin-1 β réduit son interaction inhibitrice avec la protéine *Dynamin-related protein 1* (Drp1), ce qui promeut la fission mitochondriale (Baba *et al.*, 2014(83) ; Kameoka *et al.*, 2018(84)). Ainsi, un déficit en lipin-1 pourrait être associé à un dysfonctionnement mitochondrial.

Afin de préciser l'altération mitophagique, deux mécanismes ont été proposés. D'une part, une étude a montré qu'une altération de l'interaction entre la protéine mitochondriale *Bcl-2 interacting protein 3* (Bnip3) et la protéine autophagosomale LC3-II induit un défaut de chargement de la mitochondrie dans l'autophagosome en formation et donc de la mitophagie (Alshudukhi *et al.*, 2018(85)) (Figure 5). D'autre part, une deuxième étude a démontré qu'un défaut de recrutement de lipin-1 à la membrane mitochondriale médiée par Parkin, et par conséquent l'absence de formation de diacylglycérol, entraîne un défaut de dispersion des agrégats mitochondriaux et de formation des autophagosomes, étapes préliminaires à la mitophagie (Lin *et al.*, 2022(86)) .

2) Stress du réticulum endoplasmique

a. Présentation générale du stress du réticulum endoplasmique

Le RE possède de nombreuses fonctions physiologiques, comme par exemple son implication dans l'homéostasie calcique (principal réservoir de calcium intracellulaire), dans des processus métaboliques (gluconéogenèse et synthèse lipidique) ou dans l'autophagie (formation des autophagosomes). Il exerce également un rôle fondamental dans la régulation de la biogenèse, du repliement, de l'assemblage, du trafic et de la dégradation des protéines.

De nombreux stimuli peuvent altérer sa fonction de dégradation protéique et ainsi entraîner une accumulation de protéines de conformation anormale (*unfolded*), définissant ainsi le stress du RE. Ces stimuli rassemblent, par exemple, des perturbations de l'homéostasie calcique du RE, des modifications de la composition lipidique de sa membrane, ou encore un stress oxydatif et/ou métabolique. L'accumulation protéines anormales déclenche une réponse adaptative du RE,

l'*Unfolded protein response* (UPR), dont la finalité est de restaurer le bon repliement des protéines ou de procéder à leur élimination par le système *Endoplasmic reticulum-associated protein degradation* (ERAD), ou par autophagie, permettant ainsi la survie cellulaire. En revanche, en cas de persistance du stress du RE, la réponse UPR peut également conduire à l'induction de signaux pro-apoptotiques (Hetz, 2012(87) ; Almanza *et al.*, 2019(88)). L'UPR est une voie complexe de transduction du signal qui est initiée par l'activation d'au moins trois récepteurs membranaires, *Inositol-requiring protein 1* (IRE1), *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) et *Activating transcription factor* (ATF) 6. En l'absence de stress du RE, une protéine chaperonne BiP (ou GRP78) se lie à ces trois récepteurs membranaires afin d'inhiber leur activation. En cas de stress du RE, BiP se lie aux protéines anormales et se dissocie de ces récepteurs, dont l'activation permet d'initier les voies de signalisation de la réponse UPR (Hetz, 2012(87)) (Figure 4).

A ce jour, IRE1 α est le facteur de la réponse UPR le plus conservé au cours de l'évolution et le plus décrit. Grâce à son activité endonucléase, IRE1 α , une fois activé par dimérisation et autophosphorylation, favorise l'épissage de *X-box binding protein 1* (Xbp1). Par la suite, ce dernier agit comme un facteur de transcription permettant l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes impliquées dans la restauration du bon repliement des protéines ou de leur dégradation par le système ERAD. Il a également été rapporté que IRE1 α clive directement plusieurs acides ribonucléiques (ARN) messagers spécifiques, via un processus *Regulated IRE1-dependent decay* (RIDD), lui permettant d'atténuer la charge protéique au sein du RE. En cas de stress prolongé, l'activité kinase de IRE1 α devient plus importante, ce qui conduit à l'activation des voies de signalisation pro-apoptotique et proinflammatoires médiées par *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) respectivement (Hetz, 2012(87)) (Figure 4). Lors de son activation par dimérisation et autophosphorylation, PERK phosphoryle à son tour le facteur de transcription *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), induisant une réponse anti-oxydative, et le facteur d'initiation de la traduction *Eukaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α), afin d'atténuer la synthèse générale protéique. Paradoxalement, cela permet d'augmenter la synthèse du facteur de transcription ATF4, augmentant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie, l'apoptose (notamment *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein* ou *CHOP*), le métabolisme des acides aminés et des réponses antioxydantes (Hetz, 2012(87)) (Figure 4). En réponse au stress du RE, l'ATF6 se déplace du RE vers l'appareil de Golgi pour être clivé par des protéases *Site protease* (SP) 1 et 2. Par la suite, le fragment N-terminal d'ATF6 peut être transloqué au niveau nucléaire et devenir un facteur de transcription qui coopère avec Xbp1 épissé pour assurer les mêmes fonctions transcriptionnelles décrites précédemment pour IRE1 α (Hetz, 2012(87)) (Figure 4).

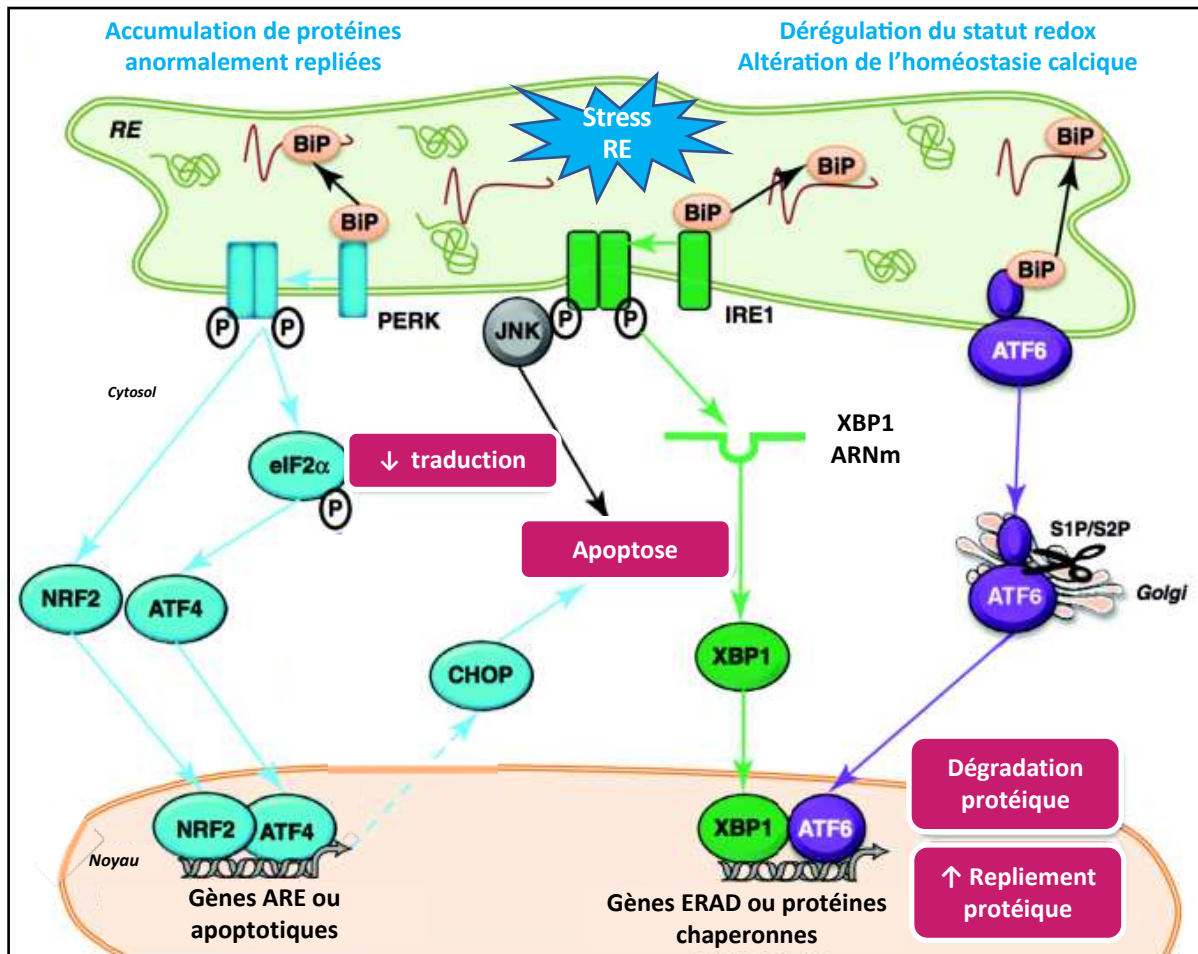


Figure 4 : Schéma général de la voie de signalisation Unfolded Protein Response (UPR). Illustration modifiée de l'article Flamment *et al.*, 2012, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Lors d'un stress du RE, les trois branches de la voie UPR médiée par IRE1, PERK et ATF6, conduisent à l'activation de facteurs de transcription XBP1, ATF4/Nrf2 et ATF6 respectivement, entraînant l'expression de gènes antioxydants ou apoptotiques, mais aussi des gènes codant des protéines chaperonnes ou de dégradation du RE. Ainsi, cette voie de signalisation permet de corriger le repliement des protéines ou entrainer leur dégradation, ainsi que de diminuer la traduction et donc la surcharge protéique au sein du RE en cas de stress. Sans résolution du stress du RE, la voie UPR peut également aboutir à l'induction de l'apoptose.

b. Implication de lipin-1 dans le stress du réticulum endoplasmique

Le modèle murin de Rashid *et al.*, 2019 a montré que le défaut d'activité enzymatique de la protéine lipin-1 est suffisant pour entrainer une myopathie chez l'animal, caractérisée par une faiblesse musculaire mais aussi par une analyse histopathologique évocatrice (présence de fibres nécrosées avec infiltrat de cellules immunitaires notamment). Cette dernière a également montré une accumulation de lipides neutres et de phospholipides au niveau des fibres musculaires. Le défaut enzymatique de la protéine lipin-1 est associé à un stress sévère du RS, avec activation des voies UPR

IRE1 α et ATF6 particulièrement, entraînant l'activation de facteurs lipogéniques SREBP1c/SREBP2, mais également une désorganisation du RS et par conséquent de la mitochondrie via ses sites de contact avec le RS. En conséquence, un dysfonctionnement du métabolisme lipidique est dû à une altération de la synthèse des acides gras et de leur β -oxydation, ainsi que sur un défaut de l'élongation et de la désaturation de leur chaîne acyl. Ainsi, l'utilisation de la protéine chaperonne *Tauroursodeoxycholic acid* (TUDCA), aidant à la fonction de repliement des protéines par le RS, et du bezafibrate, activateur de la β oxydation des acides gras, est capable de réverser le phénotype musculaire observé dans le modèle déficient en lipin-1. Ceci renforce l'implication du stress du RE, tirant sous origine d'une altération du métabolisme lipidique, dans la physiopathologie du déficit en lipin-1 (Figure 5).

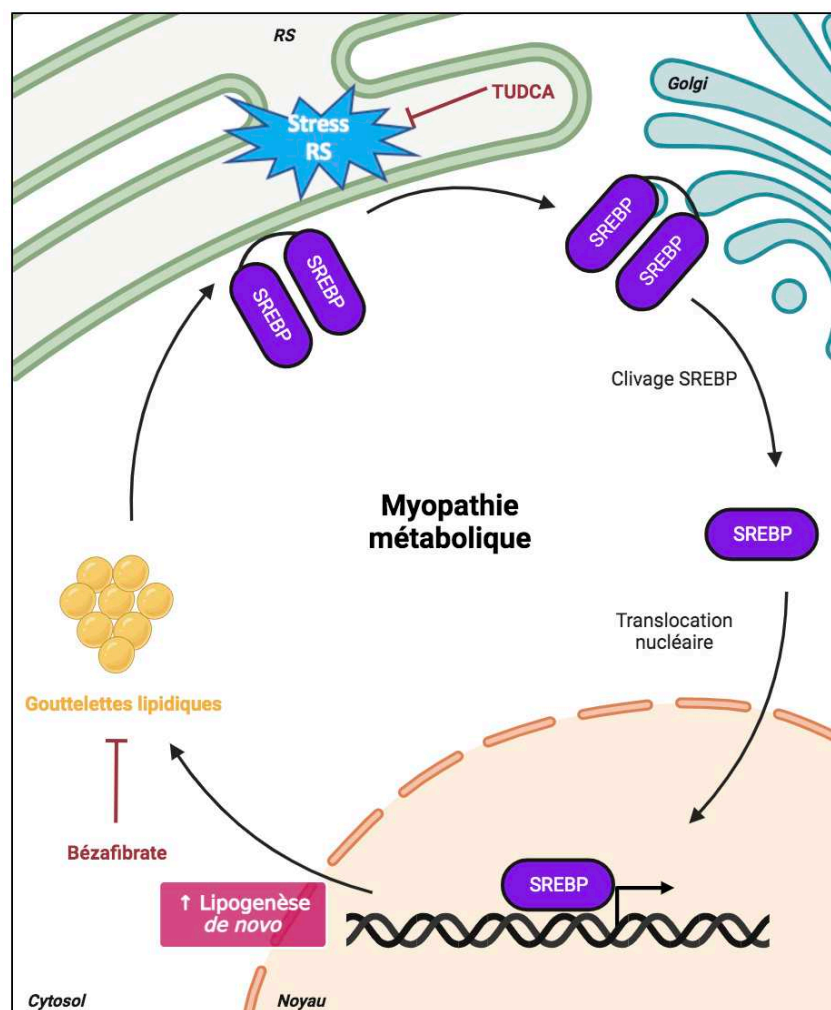


Figure 5 : Implication de lipin-1 dans le stress du RS. Le déficit en lipin-1 entraîne un stress du RE dans le muscle squelettique. Ce stress va déclencher l'activation du facteur de transcription SREBP, facteur clé dans la régulation de la lipogenèse de novo entraînant une accumulation de lipides neutres sous forme de gouttelettes lipidiques dans le tissu musculaire. Le traitement par TUDCA et Bézafibrate, permettant de réduire le stress du RS et la biosynthèse du cholestérol et des acides gras respectivement, améliorer l'histologie et la force musculaire, ce qui suggère que le stress du RS et l'accumulation de lipides induite par le stress du RS sont des facteurs contribuant à la myopathie métabolique. Créée avec BioRender.com.

3) Inflammation

Dans la littérature scientifique, le lien entre la protéine lipin-1 et l'inflammation apparaît dépendant du type cellulaire. La protéine lipin-1 a été décrite comme un important modulateur des réponses inflammatoires de par son expression au sein de cellules du système immunitaire inné tels que les macrophages. Dans ces cellules, il a été montré que l'activité enzymatique PAP-1 de la protéine lipin-1 contribue à la signalisation intracellulaire médiée par les récepteurs de l'immunité inné, dont principalement le TLR4, mais aussi à l'activation de la phospholipase cytosolique A2 α responsable de la synthèse d'eicosanoïdes impliqués dans l'initiation et la résolution de l'inflammation. Ainsi, le déficit en lipin-1 dans un modèle fld permet de diminuer l'inflammation dans différents contextes pathologiques tels que l'inflammation systémique, la colite et le cancer du côlon associé à une colite. Des modèles murins présentant un déficit en lipin-1 spécifique des cellules myéloïdes montrent également une réduction de l'inflammation au cours de l'athérosclérose ou de la stéatose hépatique par exemple. En revanche, un déficit en lipin-1 spécifique des hépatocytes entraîne une exacerbation de la stéatose hépatique alcoolique (Balboa *et al.*, 2019(89)). Nous avons également décrit précédemment que la protéine lipin-1 réprime l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NFATc4 dans des adipocytes, inhibant la sécrétion de facteurs inflammatoires par ces derniers (Csaki et Reue, 2013(27) ; Chen *et al.*, 2014(28) ; Zhang et Reue, 2017(29)).

Dans le cas des RM, la biopsie musculaire de modèles murins atteints d'un déficit de lipin-1 spécifique du muscle a révélé une infiltration de cellules immunitaires, notamment des macrophages (Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)), associée à l'augmentation de l'expression de gènes proinflammatoires comme TNF- α , IL 6 et IL-1 β (Schweitzer *et al.*, 2019(65)). Cependant, il est important de rappeler que la biopsie musculaire des patients présentant un déficit en lipin-1 ne montre pas d'infiltrat immunitaire (Bergounioux *et al.*, 2012(62)). Dans des myoblastes primaires de patients présentant un déficit en lipin-1, il a été montré que le défaut de mitophagie, peut entraîner une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation *in vitro* en condition de stress immunométabolique. En effet, l'accumulation de mitochondries altérées est associée à une augmentation de ROS et d'ADN mitochondrial, un ligand endogène du récepteur de l'immunité innée TLR9. Le défaut d'autophagie entraîne la séquestration de TLR9 et de l'ADN mitochondrial dans des structures endolysosomales, et l'activation de TLR9 à l'origine de la production de cytokines proinflammatoires dont l'IL-6. L'hyperactivation de TLR9 est également responsable de l'altération du flux calcique et de la mort cellulaire des myoblastes des patients (Figure 6). Chez les patients, le caractère inflammatoire du déficit en lipin-1 a également été confirmée par la présence d'une signature interféron dans les cellules mononuclées sanguines périphériques et la détection de

cytokines proinflammatoires sériques (IL-8, *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) et *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), en particulier lors des crises de RM. Enfin, le traitement des myoblastes primaires des patients par un anti-TLR9, la chloroquine (CQ), ou par un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone, a permis de réduire l'inflammation et de prévenir la mort cellulaire. L'utilisation *in vitro* d'un d'antagoniste de TLR9 a aussi entraîné une amélioration du flux calcique. L'administration de dexaméthasone chez les patients a également réduit les taux circulants de CPK et leur douleur musculaire (Hamel *et al.*, 2021(81) ; Annexe 1) (Figure 6).

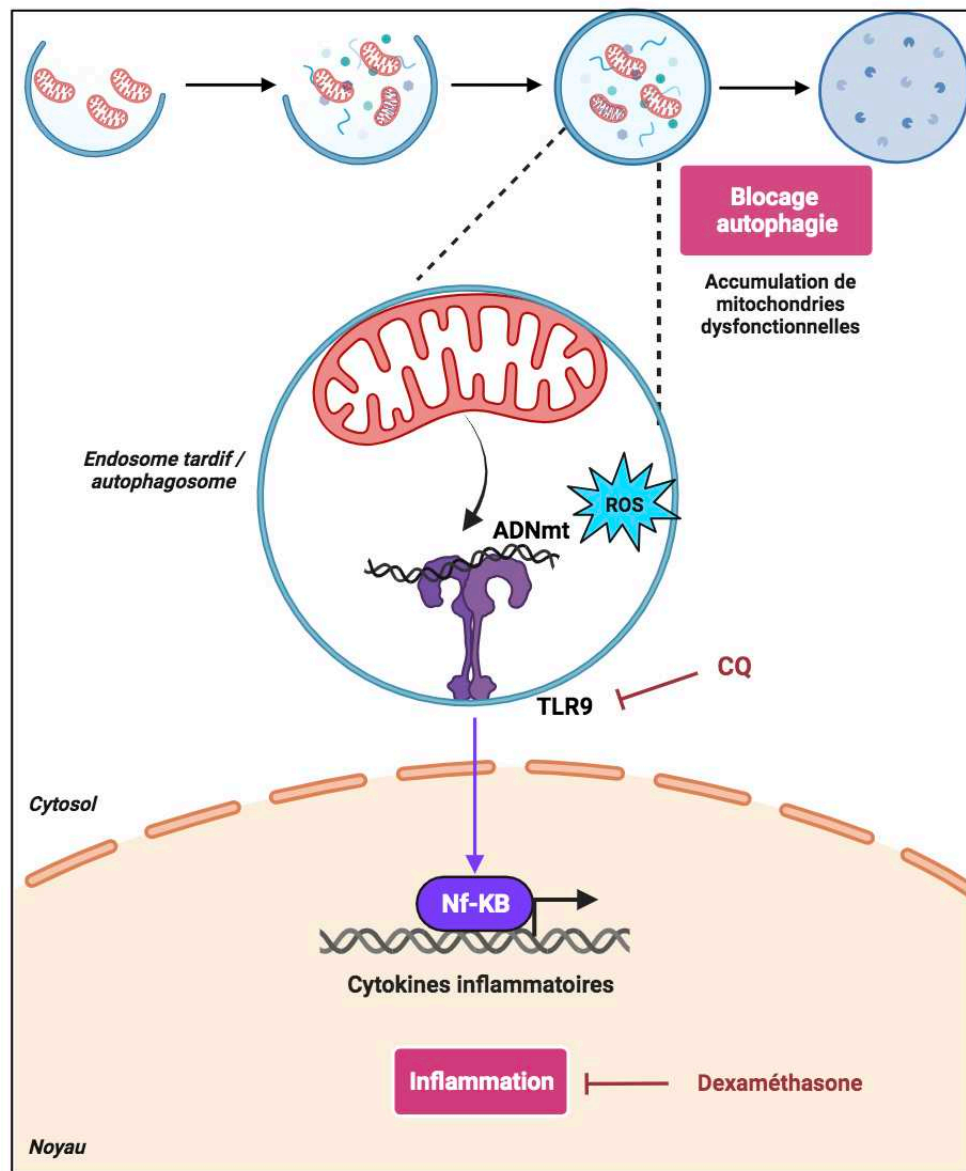


Figure 6 : Implication de lipin-1 dans l'inflammation. Le déficit en lipin-1 présente un défaut d'autophagie dans les myoblastes de patients, associé à une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles, à l'origine d'un stress oxydatif et de l'activation de la voie de signalisation inflammatoire médiée par TLR9 à la suite de sa liaison avec son ligand endogène, l'ADNmt. L'utilisation de la CQ, une molécule « anti-TLR9 » permet de réduire cette inflammation. Créée avec BioRender.com.

D. Prise en charge du déficit en lipin-1

En cas de suspicion d'un épisode aigu de RM chez les patients présentant un déficit en lipin-1, la prise en charge symptomatique repose sur l'utilisation d'un protocole standardisé et commun à l'ensemble des RM quel qu'en soit leur cause dans le service d'urgence puis de soins intensifs. Il consiste en une expansion volémique (NaCl 0.9%), suivie d'une hyperhydratation intraveineuse contrôlée (glucose 30%, bicarbonates 1,4% et NaCl 0.9%), afin de lutter contre l'hypovolémie et l'hypotension, ainsi que de compenser les troubles hydroélectrolytiques respectivement. Le potassium est au départ proscrit des perfusions et des médicaments hypokaliémisants peuvent être nécessaires. L'hémodialyse doit être envisagée en cas d'hyperkaliémie non contrôlée par les traitements médicamenteux et/ou entraînant des anomalies à l'électrocardiogramme, ainsi qu'en cas de complications rénales et/ou cardiaques menaçant le pronostic vital du patient. Ce dernier étant engagé à chaque épisode, la survie du patient dépend de la rapidité d'action (Pichler *et al.*, 2015(90)).

Devant l'implication d'une composante inflammatoire dans la physiopathologie du déficit en lipin-1, la mise en place d'un traitement par corticoïdes a été instaurée en complément du protocole décrit précédemment depuis 2015. Si possible et avec autorisation téléphonique d'un médecin, le traitement débute par une première prise orale de prednisone à domicile (1 à 2 mg/kg), relayé par une administration intraveineuse de méthylprednisolone (1 à 2 mg/kg/jour) dès l'arrivée à l'hôpital et prolongée sur trois jours. Une étude clinique rétrospective a été mise en place afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité de cette nouvelle prise en charge (Tuchmann-Durand *et al.*, 2023(91) ; Annexe 2). D'une part, cette étude a montré une absence d'effet indésirable imputable à la corticothérapie. D'autre part, la corticothérapie a été associée à une plus grande survie des patients soulignée par l'absence de décès des patients traités par corticoïdes malgré une sévérité plus élevée des RM observées chez ces patients. De par également sa facilité d'accès, la corticothérapie a donc été ajoutée au protocole de réanimation des patients présentant un déficit en lipin-1.

Ainsi, tous les patients présentant un déficit en lipin-1 possèdent un protocole d'urgence récapitulant les points suivants : le bilan et le traitement d'urgence à mettre en place dès l'arrivée du patient aux urgences, les signes de gravité privilégiant l'admission du patient en réanimation, et enfin les éléments de physiopathologie expliquant les circonstances à risque de décompensation, les signes cliniques de décompensation et les contre-indications médicamenteuses (Annexe 3).

Cependant, hormis la corticothérapie en phase aigüe de RM, la prise en charge des RM reste symptomatique, indépendante de l'étiologie sous-jacente. La découverte de l'implication du récepteur de l'immunité innée TLR9 dans la physiopathologie du déficit en lipin-1 en a fait une cible thérapeutique de choix. Parmi les médicaments sur le marché, seuls la CQ et son dérivé

l'hydroxychloroquine (HCQ) sont décrites comme possédant une activité « anti-TLR9 ». Aussi, l'HCQ, moins toxique que la CQ, a été considérée comme une option thérapeutique pour les patients, administrée de façon chronique afin d'éviter et/ou d'atténuer les symptômes aigus (RM) et/ou chroniques (fatigabilité et douleurs musculaires notamment).

CHAPITRE 3 : HYDROXYCHLOROQUINE

A. Présentation générale de l'hydroxychloroquine

1) Histoire de la découverte

L'histoire des antipaludéens, dont fait partie l'HCQ, repose sur la découverte de l'utilisation ancestrale de l'écorce de l'arbre *Cinchona* par les populations indigènes d'Amérique du Sud pour ces vertus antipyrétiques. Après son importation en Europe dès le 17^{ème} siècle par les jésuites, le principe actif de l'écorce, la quinine, est extraite et isolée pour la première fois par deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, en 1820. Cependant, la première synthèse chimique n'est réalisée qu'en 1944. Entre temps, due à la raréfaction et la mainmise sur les stocks de matières premières pendant la Seconde Guerre mondiale, l'objectif a été de mettre au point des antipaludéens plus faciles à fabriquer, plus efficaces et moins toxiques. La substance la plus prometteuse est la CQ, synthétisée par laboratoire Bayer en 1934. Cependant, de par ses nombreux effets indésirables, la CQ a été jugée trop toxique et a donné lieu aux développements d'autres antipaludéens de synthèse par pharmacomodulations successives, dont l'HCQ en 1950 (Monneret, 2020(92)).

Durant la Seconde Guerre mondiale, il a été décrit une efficacité des antipaludéens sur la réduction de la sévérité des lésions et des symptômes de l'arthrite chez les soldats du front pacifique utilisant ces molécules en prophylaxie. Cela conduit à de nouvelles recherches sur l'efficacité et l'application des antipaludéens de synthèse pour le traitement des maladies rhumatismales auto-immunes, avec des premières autorisations de mise sur le marché dans ce sens à partir de 1949 pour la CQ et de 1955 pour l'HCQ. Suite à la survenue de résistance des parasites aux antipaludéens de synthèse dès les années 1960, des études ont permis une meilleure connaissance des mécanismes d'action biologiques de ces molécules et leur repositionnement dans d'autres indications comme dans les viroses ou en oncologie par exemple (Monneret, 2020(92)). Ainsi, cette histoire des antipaludéens illustre le développement des sciences pharmaceutiques actuelles.

2) Classification, structure et propriétés chimiques

L'HCQ et la CQ, font partie des agents antipaludéens de synthèse de la classe des 4-aminoquinolines. Cette dernière regroupe des molécules possédant un noyau quinoléine (deux cycles aromatiques fusionnés ayant des doubles liaisons conjuguées) hérité de la quinine (Kucharski *et al.*, 2022(93)). Des études de relation structure-activité (Kaur *et al.*, 2010(94) ; Agnello *et al.*, 2019(95)) ont montré l'existence d'un pharmacophore au sein de la CQ et de ses dérivés. Ce dernier repose sur le

noyau 7-Cl-4-aminoquinoline, avec un substituant chlore (C) en position 7 et un azote (N) dans le noyau quinoléine formant des liaisons avec les structures hémiques impliquées dans le mécanisme d'action antipaludéen. Le branchement d'une chaîne latérale diaminoalkyle en position 4 du noyau quinoléine, et notamment l'amine tertiaire, confère à l'HCQ et à la CQ leur propriété basique, avec des constantes d'ionisation de 9,7 et 10,2 pour l'HCQ et la CQ respectivement. Ces groupements basiques s'ajoutent à celui du groupement azote du noyau quinoléine, avec des constantes d'ionisation de 8,3 et 8,1 pour l'HCQ et la CQ respectivement. Ainsi, l'HCQ et la CQ sont des bases faibles amphiphiles capables de traverser les membranes cellulaires au pH physiologique de 7,4 sous forme non protonée. En revanche, une diminution de pH peut entraîner une modification de la forme de ces deux molécules, mono ou bi-protonée, et ralentir, voire inhiber, leur passage transmembranaire (Martin *et al.*, 2009(96) ; Solomon and Lee., 2009(97)), capital pour l'action de l'HCQ et de la CQ. En plus de l'amine secondaire du branchement latéral commun à la CQ, l'HCQ possède un deuxième groupement donneur d'hydrogène au niveau du groupement hydroxyl, augmentant sa capacité à se lier aux acides nucléiques (Wenzel *et al.*, 2010(98) ; Sarkar *et al.*, 2021(99)). Ce groupement hydroxyle permet également de diminuer les effets indésirables de la CQ et d'améliorer ainsi le profil de sécurité de l'HCQ. Enfin, l'HCQ et la CQ possèdent un centre chiral au sein de la chaîne latérale diaminoalkyle à l'origine de deux formes énantiomères R(-) et S(+) de l'HCQ et la CQ. Bien qu'il existe une stéréosélectivité de ces molécules sur leurs paramètres pharmacocinétiques, aucune différence d'efficacité ni de toxicité *in vitro* entre les deux énantiomères n'a été démontrée à ce jour (Brocks et Mehvar, 2003(100)) (Figure 7).

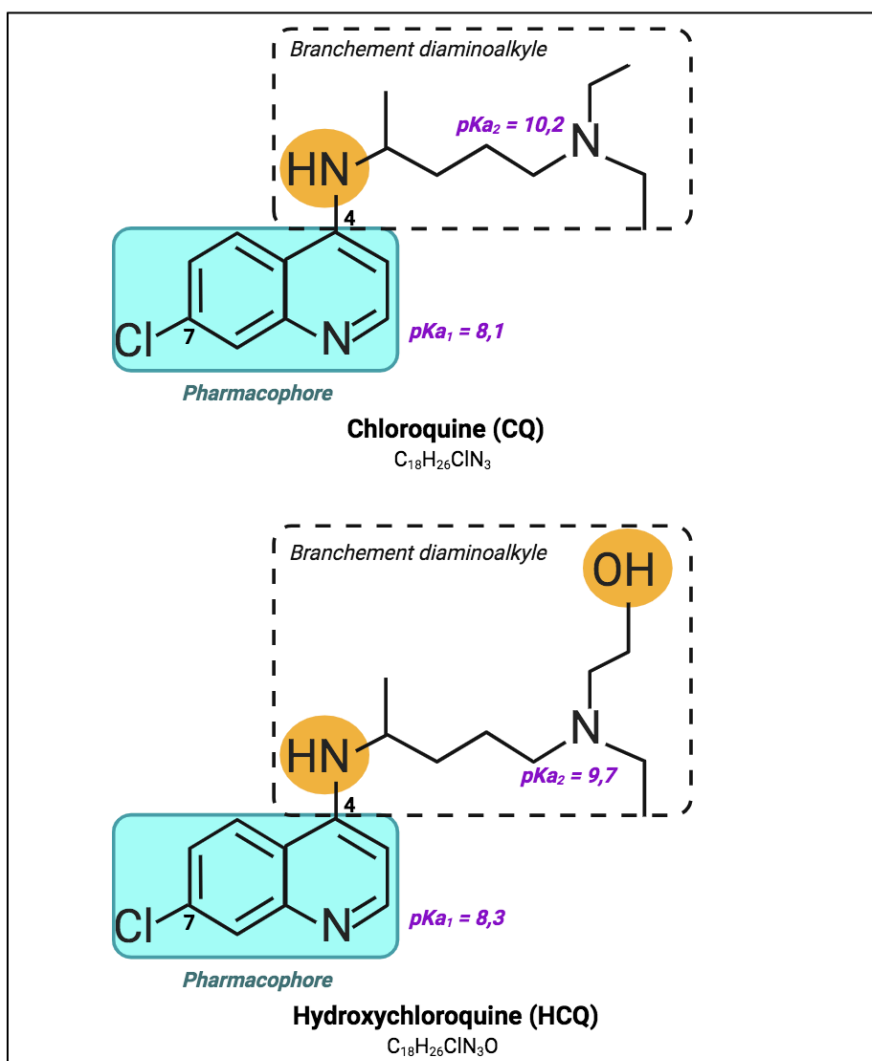


Figure 7 : Structure moléculaire de l'HCQ et de la CQ. L'HCQ et la CQ présentent une homologie de structure centrée sur la présence d'un pharmacophore. Leurs principales différences résident dans : 1) la composition de leur branchement diaminoalkyle avec l'ajout d'un groupement hydroxyl pour l'HCQ ; et le nombre de groupements donneurs d'hydrogènes (orange) ; 3) les valeurs de leurs constantes d'ionisation reflétées par les pKa. Créée avec BioRender.com.

De par leur homologie de structure, l'HCQ et la CQ partagent des propriétés physico-chimiques similaires, permettant d'extrapoler les résultats concernant les mécanismes d'action de la CQ, plus largement fournis dans la littérature scientifique, à l'HCQ. Cependant, l'ajout du groupement hydroxyle rend l'HCQ plus polaire, plus soluble et moins lipophile que la CQ (Browning et al., 2014). Cette modification structurale entraîne une diminution relative de la perméabilité de l'HCQ à travers les membranes (Ferrari et Cutler, 1991(101) ; Lamphier et al., 2014(102)) et impacterait donc son accumulation dans les compartiments intracellulaires (non démontré à ce jour).

B. Pharmacocinétique de l'hydroxychloroquine

1) Profil ADME (Absorption – Distribution – Métabolisation – Élimination)

Les connaissances sur la pharmacocinétique des antipaludéens de synthèse sont encore actuellement incomplètes et controversées. Les divergences des résultats, notamment sur le profil ADME (absorption, distribution, métabolisation et distribution), peuvent s'expliquer par le mode d'administration du médicament, les caractéristiques des populations étudiées (sexe, âge et comorbidités), mais également par les méthodes analytiques et l'origine de l'échantillon (sanguin ou plasmatique) (Nicol *et al.*, 2020(103)). Les principaux paramètres pharmacocinétiques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Absorption	Quasi-complète et rapide au niveau du tractus digestif (pic maximal d'absorption en 3-5 heures) Biodisponibilité : 0,7-0,8	Tett <i>et al.</i> , 1989(104) McLachlan <i>et al.</i> , 1994(105)
Distribution	Liaison aux protéines plasmatiques modérée (50 %) Liaison de forte affinité avec la mélatonine Grand volume de distribution plasmatique (~ 40 000 litres) Passage de la barrière placentaire et dans le lait maternel	Tett <i>et al.</i> , 1989(106) ; McLachlan <i>et al.</i> , 1993(107) ; Furst <i>et al.</i> , 1996(108) ; Ostensen <i>et al.</i> , 1985(109) ; Costedoat-Chalumeau <i>et al.</i> , 2002(106)
Métabolisation	Biotransformation hépatique par CYP 3A4 et 2D6 (2C8) 3 métabolites : déséthylhydroxychloroquine, déséthylchloroquine et didéséthylchloroquine	Qu <i>et al.</i> , 2015(110) ; Paludetto <i>et al.</i> , 2022(111)
Élimination	Excrétion rénale sous forme inchangée majoritairement Possibilité d'excrétion dans les selles et par la peau Demi-vie d'élimination terminale très longue (40-50 jours)	Tett <i>et al.</i> , 1989(104) McLachlan <i>et al.</i> , 1994(105)

Tableau 1 : Principaux paramètres pharmacocinétiques de l'hydroxychloroquine

La biodisponibilité orale de l'HCQ justifie sa prise per os. La liaison de l'HCQ à la mélatonine explique son accumulation au niveau des yeux et donc le risque de toxicité oculaire de cette molécule. Il a également été reporté une accumulation relativement élevée de l'HCQ au niveau de la peau, des poumons, des reins, du foie et de la rate, ainsi que de façon moindre dans le cœur et les muscles.

Malgré le passage de la barrière placentaire et dans le lait maternel, il n'a pas été démontré de foetotoxicité ni d'iatrogénie médicamenteuse due à l'HCQ chez l'enfant (Ostensen *et al.*, 1985(109) ; Costedoat-Chalumeau *et al.*, 2002(106) ; Clowse *et al.*, 2006(112)). Plusieurs polymorphismes nucléotidiques au niveau des gènes codant des enzymes du cytochrome P450 (CYP) peuvent affecter les concentrations sanguines d'HCQ et de ses métabolites, impactant ainsi leurs effets thérapeutiques et toxiques. Leur génotypage peut ainsi être associé au suivi des concentrations sanguine d'HCQ dans le cadre d'une prise en charge personnalisée des patients (Lee *et al.*, 2016(113) ; Gao *et al.*, 2022(114)). Le grand volume de distribution et la longue demi-vie d'élimination terminale permettent d'expliquer un début d'action graduel de l'HCQ présentant une efficacité prolongée même après arrêt de traitement. Des similitudes pharmacocinétiques entre la CQ et l'HCQ représentent un argument supplémentaire en faveur de l'extrapolation des résultats pharmacodynamiques de la CQ à l'HCQ, dont la pharmacocinétique complexe est à prendre en compte lors de la prise en charge des patients.

2) Interactions médicamenteuses

La co-administration de l'HCQ avec d'autres substances médicamenteuses peut entraîner des interactions à l'origine de modifications pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de l'HCQ et/ou des autres médicaments coadministrés. Par principe de précaution, le risque d'interactions médicamenteuses identifiées avec la CQ sont également transposées à l'HCQ de par leurs similitudes pharmacocinétiques.

A titre d'exemple, les inhibiteurs de pompe à protons modifient le pH gastrique entraînant une modification de l'ionisation de l'HCQ et, par conséquent, une diminution de son absorption et de sa biodisponibilité orale (Namazi, 2009(115)). La cimétidine, un pan-inhibiteur du CYP, est aussi responsable d'une diminution de la métabolisation de la CQ et donc d'une augmentation de son exposition (Ette *et al.*, 1987(116)). La ciclosporine, par sa toxicité rénale, engendre également une diminution de la clairance rénale de la CQ (van den Borne *et al.*, 1998(117)). A l'inverse, l'HCQ est capable de modifier la pharmacocinétique d'autres médicaments. Par exemple, par des changements de pH locaux, l'HCQ peut réduire l'absorption gastro-intestinale, et donc la biodisponibilité du méthotrexate (Carmichael *et al.*, 2002(118)). L'HCQ inhibe aussi, par compétition, le métabolisme du métoprolol en inhibant sa biotransformation par le CYP 2D6 (Somer *et al.* 2000(119)). En inhibant l'activité de la glycoprotéine P, un transporteur de médicament, la CQ augmente également les concentrations plasmatiques de la digoxine, et donc son risque de cardiotoxicité (McElnay *et al.*, 1985(120)). De façon générale, des associations sont déconseillées avec des médicaments susceptibles d'induire une arythmie cardiaque, voire contre-indiquées pour certaines molécules (citalopram,

escitalopram, hydroxyzine, dompéridone et pipéraquline). Enfin, il a été montré un risque accru de toxicité oculaire avec l'association de la CQ au tamoxifène (Toimela *et al.*, 1995(121)).

Il est à noter que des études plus récentes n'ont montré aucune interaction médicamenteuse entre l'HCQ et les antiacides ou les inhibiteurs ou inducteurs des enzymes CYP (Jallouli *et al.*, 2015(122)). Cependant, les interactions médicamenteuses précédemment citées font l'objet d'un renforcement du suivi thérapeutique, notamment des dosages plasmatiques des molécules impliquées et du suivi de la survenue d'effets indésirables potentiels.

C. Deux mécanismes d'action principaux de l'hydroxychloroquine

Browning *et al.*, 2014 ont répertorié une vingtaine d'effets bénéfiques transverses de l'HCQ et de la CQ. Une question importante est de savoir si ces différents effets partagent un mode d'action commun ou résultent d'une variété de processus distincts dépendants du modèle étudié. Ainsi, nous présenterons ci-dessous deux mécanismes majeurs de cette molécule : 1) impact sur les compartiments intracellulaires et le flux autophagique ; 2) interaction avec les acides nucléiques.

1) Impact sur l'autophagie et les structures endolysosomales

a. Lysosomotropisme de la molécule

De par sa propriété de base faible diprotique, l'HCQ peut être présente sous deux formes au niveau de l'organisme, protonée et non protonée. Sous forme non protonée, l'HCQ peut diffuser de façon passive et libre à travers les membranes, plasmique et des organelles. Une fois protonée dans un milieu acide, l'HCQ reste trappée au niveau de structures subcellulaires acides (Martin *et al.*, 2009(96) ; Solomon *et al.*, 2009(97)). L'accumulation de l'HCQ au niveau de ces structures est donc dépendante du gradient des ions hydrogène au sein de ces mêmes structures (de Duve *et al.*, 1974(123) ; Roos *et al.*, 1981(124)). Ainsi, l'HCQ s'accumule préférentiellement au niveau des organites intracellulaires acides comme l'appareil de Golgi (Rivinoja *et al.*, 2006(125) et 2009(126) ; Kellokumpu *et al.*, 2019(127)) et les structures endolysosomales (Homewood *et al.*, 1972(128) ; Ohkuma *et al.*, 1978(129) ; Schlesinger *et al.*, 1988(130) ; Morissette *et al.*, 2004(131) ; Marceau *et al.*, 2012(132) ; Dunmore *et al.*, 2013(133) ; Khan *et al.*, 2019(134)), définissant ainsi le lysosomotropisme. L'HCQ est par la suite capable d'alcaliniser ces structures (Schlesinger *et al.*, 1988(130) ; Khan *et al.*, 2019(134) ; Kellokumpu *et al.*, 2019(127)). Il a été également observé que, à l'inverse, la CQ est capable d'acidifier le cytosol ainsi que l'environnement proche extracellulaire (Xia *et al.*, 2018(135) ; Halcrow *et al.*, 2021(136)), propriété intéressante impliquée dans la tumorigenèse.

b. Inhibition de la fonction dégradative lysosomale et de la résolution autophagique

La dégradation ou recyclage du matériel biologique au niveau cellulaire peut se faire via deux voies principales, endolysosomale ou par autophagie, selon la nature exogène ou endogène du matériel biologique respectivement. Les dernières étapes de ces deux voies sont similaires, correspondant à la fusion entre les endosomes (précoces puis tardifs) ou les autophagosomes avec les lysosomes pour former des endolysosomes et des autolysosomes respectivement. Ces deux voies reposent sur l'intégrité de la structure et de la fonction dégradative des lysosomes (Klionsky *et al.*, 2014(137) ; Birgisdottir et Johansen, 2020(138)). Pour assurer leurs fonctions de dégradation, les lysosomes contiennent une cinquantaine d'hydrolases acides différentes dont l'activité enzymatique nécessite un pH relativement bas (4–5) (de Duve 2005(139)), régulé par des pompes à protons ATPases lysosomales (Mindell, 2012(140)). L'alcalinisation du pH par lysosomotropisme de l'HCQ peut ainsi réduire, voire inhiber, l'activité des enzymes présentes dans ces structures et par conséquent réduire, ou inhiber, la dégradation lysosomale (Homewood *et al.*, 1972(128) ; Wibo et Poole 1974(141) ; Seglen *et al.*, 1979(142)). C'est pourquoi, empiriquement, l'HCQ et la CQ sont utilisés *in vitro* comme contrôles positifs du blocage du flux autophagique, et plus particulièrement de la résolution autophagique (Mizushima *et al.*, 2010(74) ; Pasquier, 2016(75) ; Klionsky *et al.*, 2021(76)).

Cependant, la modification de l'acidité lysosomale par la CQ et de ses dérivés est controversée. Mauthe *et al.*, 2018(143) a démontré *in vitro* et *in vivo* que la CQ n'entraîne pas nécessairement une alcalinisation lysosomale comme décrite précédemment. En effet, les auteurs ont montré que l'action inhibitrice de la CQ et de l'HCQ sur la résolution autophagique est liée au défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes de façon indépendante du pH. Plus précisément, la CQ entraîne une absence d'interaction entre les protéines SNARE autophagosomales syntaxine 17 et *Synaptosome Associated Protein 29* (SNAP29) d'une part, et les protéines SNARE lysosomales *Vesicle Associated Membrane Protein* (VAMP) 7 et 8 d'autre part, nécessaire à la fusion entre autophagosomes et lysosomes (Itakura *et al.*, 2012(144) ; Tian *et al.*, 2021(145)), par défaut de recrutement de SNAP29 au niveau de la syntaxine 17.

c. Perméabilisation de la membrane lysosomale

L'impact de la CQ et de ses analogues structuraux sur les lysosomes ne se résume pas uniquement à l'inhibition de la fonction dégradative du lysosome et de la résolution du flux autophagique comme décrit précédemment. En effet, ces molécules peuvent adopter une propriété de type détergent au sein des lysosomes, responsable de la perméabilisation de la membrane lysosomale (*Lysosomal membrane permeabilization* ou LMP) (Boya et Kroemer, 2008(146) ; Enzenmüller *et al.*, 2013(147) ; Circu *et al.*, 2017(148) ; Sironi *et al.*, 2019(149)). Cette LMP est définie

comme tout dommage à la membrane lysosomale entraînant le relargage du contenu lysosomal dans le cytosol, notamment les cathepsines et autres enzymes hydrolytiques (Boya et Kroemer, 2008(146) ; Wang *et al.*, 2018(150)). La LMP est impliquée par la suite dans différents types de mort cellulaire selon l'importance du relargage du contenu lysosomal et le contexte cellulaire (Wang *et al.*, 2018(150)), dont notamment l'apoptose médiée par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale avec activation de caspases (Boya *et al.*, 2003(151)) ou la nécrose (Kroemer et Jäättelä, 2005(152) ; Boya et Kroemer, 2008(146)). Il est intéressant de noter que ce double rôle de la CQ et de ses dérivés, à la fois inhibiteur de l'autophagie et inducteur de la LMP, repose sur un effet dose-dépendant décrit *in vitro* par Park et al, 2014. Les auteurs ont ainsi découvert qu'à plus faibles doses (10 à 20 μM), la CQ agit comme un inhibiteur de l'autophagie tandis qu'à des concentrations plus élevées (40 à 160 μM), la CQ déclenche la LMP grâce à ses propriétés de type détergent (Park et Lee, 2014(153)).

d. Autres impacts au niveau des lysosomes et de l'appareil de Golgi

Au-delà du lysosomotropisme de l'HCQ, des cibles moléculaires directes de l'HCQ dans le lysosome ont été identifiées, dont la palmitoyl-protéine thioestérase 1 (PPT1). Il s'agit d'une glycoprotéine lysosomale soluble impliquée dans le catabolisme lysosomal de protéines acylées. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que l'HCQ diminue l'activité de PPT1 à l'origine d'une altération de la localisation lysosomale des sous-unités des pompes à protons ATPases vacuolaires et donc d'une alcalinisation du pH lysosomal (Bagh *et al.*, 2017(154) ; Rebecca *et al.*, 2019(155)).

L'HCQ et la CQ sont également capables de s'accumuler au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétrices associées, entraînant des modifications morphologiques et fonctionnelles de ces structures (Kellokumpu *et al.*, 2019(127)). Par exemple, il a été montré que la CQ permet d'affecter la glycosylation des protéines (Rivinoja *et al.*, 2006(125) et 2009(126)) et l'exocytose des vésicules sécrétrices (Kokkonen *et al.*, 2004(156)). La CQ a également été décrite comme responsable d'une altération de la distribution des récepteurs mannose-6-phosphate et, par conséquent, de la diminution du recrutement des enzymes lysosomales dans le lysosome (Brown *et al.*, 1984(157) ; Mauthe *et al.*, 2018(143)), ce qui expliquerait une autre façon de bloquer la résolution autophagique.

2) Impact sur les voies de signalisation médiées par des acides nucléiques

a. Interaction directe entre l'hydroxychloroquine et l'ADN

Très précocement dans l'étude du mécanisme d'action des 4-aminoquinolines, une interaction directe entre ces molécules et l'ADN a été montrée *in vitro* par différentes techniques depuis la fin des

années 1940 (Wenzel *et al.*, 2010(98) ; Punihaole *et al.*, 2018(158)). Dans un premier temps, la nature de cette interaction avec l'ADN reposait sur deux hypothèses controversées, l'intercalation ou la liaison électrostatique ou ionique entre le cycle quinoléique protoné et les groupes phosphate anioniques de l'ADN (Parker et Irvin, 1952(159) ; Cohen et Yielding., 1965(160) ; O'Brien *et al.*, 1966(161) ; Wilson et Jones, 1981(162) ; Kwakye-Berko et Meshnick, 1989(163)). La liaison ionique étant relativement faible et très rapide, cette hypothèse a été supplantée par la découverte de liaisons hydrogènes entre les deux groupes donneurs d'hydrogène de l'HCQ (hydroxyle et amine du noyau quinoléine) et les bases nucléosidiques, avec une plus grande affinité au niveau de séquences riches en motifs guanine-cytosine (Feigon *et al.*, 1984(164) ; Sarkar *et al.*, 2021(99)). Enfin, il a été montré une relation entre la dose d'HCQ utilisé *in vitro* et la nature de la liaison entre cette molécule et l'ADN : des liaisons hydrogènes à faibles doses (inférieure à 5 µM) et un phénomène d'intercalation à plus fortes doses (supérieure à 5µM) (Bazoni *et al.*, 2020(165)). Ces différents types d'interaction de la CQ et de ses dérivés avec l'ADN sont par la suite responsables de l'inhibition de sa réplication et de sa transcription (Wenzel *et al.*, 2010(98) ; Punihaole *et al.*, 2018(158)).

b. Inhibition de la voie de signalisation des TLRs

Un autre mécanisme d'action de l'HCQ et de la CQ décrit dans la littérature repose sur leur capacité à interférer avec les voies de signalisation proinflammatoires médiées par les TLRs endosomaux, TLR3, TLR7 et TLR9 (Leadbetter *et al.*, 2002(166) ; Lee *et al.*, 2003(167) ; Brentano *et al.*, 2005(168) ; Lau *et al.*, 2005(169) ; Vollmer *et al.*, 2005(170) ; Sacre *et al.*, 2012(171)).

Les dix TLRs identifiés chez l'Homme font partie des *Pattern recognition receptor* (PRR) qui permettent de reconnaître des signaux de danger pour la cellule, *Damage-associated molecular patterns* (DAMP) (ligands pathogènes ou *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) et endogènes associés à des dommages cellulaires), et mettre en place des réponses immunitaires et inflammatoires appropriées. Par la suite, nous nous focaliserons uniquement sur le TLR9 présents au niveau de structures endolysosomales. Brièvement, TLR9 reconnaît spécifiquement l'ADN double brin riche en motifs Cytosine-phosphate-guanine (CpG) non méthylés (Hemmi *et al.*, 2000(172)), présents très largement au sein de l'ADN bactérien et viral, mais également au niveau de l'ADN mitochondrial de l'hôte. La liaison du ligand à son récepteur entraîne un signal de transduction dont l'initiation est dépendante du recrutement de la protéine adaptatrice *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) au niveau de TLR9 (Lin *et al.*, 2010(173)). Le clivage de TLR9 grâce à différentes protéases endolysosomales actives à pH acide est essentiel pour son interaction avec MyD88 (Ewald *et al.*, 2008(174) ; Park *et al.*, 2008(175)). Par la suite, différentes voies de signalisation permettent l'activation des facteurs de transcription *Interferon regulatory factor* (IRF), NF-κB et *Activator protein*

1 (AP-1) induisant la transcription de gènes codant des protéines proinflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et IL-12 (Medzhitov *et al.*, 1997(176), Blasius et Beutler, 2010(177) ; Kawasaki et Kawai, 2014(178)). Une autre voie de signalisation dépendante de MyD88 est également décrite impliquant le facteur de transcription IRF7 et permettant une production abondante d'interférons (IFN) de type I (Honda *et al.*, 2005(179) ; Blasius et Beutler, 2010(177) ; Kawasaki et Kawai, 2014(178)).

D'une part, comme décrit précédemment, l'HCQ peut modifier localement le pH intra-endosomal, ce qui inhibe l'activation des TLRs endosomaux (Yi *et al.*, 1998(180) ; Häcker *et al.*, 1998(181) ; Macfarlane et Manzel, 1998(182) ; Lafyatis *et al.*, 2006(183)), cette activation étant dépendante du clivage des TLRs par des protéases endosomales à pH acide (Ewald *et al.*, 2008(174) ; Park *et al.*, 2008(175)). Étant donné le maintien de l'interférence de la CQ sur la signalisation médiée par TLR9 à des concentrations bien inférieures à celles nécessaires pour la modification du pH (Macfarlane et Manzel, 1998(182)), un mécanisme d'action différent a été envisagé. En effet, Rutz *et al.*, 2004 a montré que la CQ pouvait exercer son effet inhibiteur de TLR9 par interférence directe avec la liaison ligand-récepteur. Cette interférence n'ayant pas été retrouvée avec la bafilomycine, un inhibiteur de l'autophagie par son action inhibitrice des pompes à protons ATPases vacuolaires, l'action de la CQ sur la liaison ligand-récepteur de TLR9 est indépendante du pH (Rutz *et al.*, 2004(184)). Pour aller plus loin, Kuznik *et al.*, 2011 a démontré que la CQ et l'HCQ étaient capable d'interagir, non pas avec TLR9, mais avec son ligand, l'ADN double brin mitochondrial. Cette interaction de la CQ et de l'HCQ avec les acides nucléiques a entraîné la modification de la structure secondaire des séquences nucléotidiques de l'ADN et un encombrement stérique, responsable d'un défaut d'activation de TLR9 par absence de liaison ligand-récepteur, indépendamment de toute modification du pH endosomal (Kuznik *et al.*, 2011(185)). Ce mécanisme d'action de la CQ et de ses dérivés semble être commun à d'autres TLRs tels que TLR3 et TLR7 (Kuznik *et al.*, 2011(185) ; Lamphier *et al.*, 2014(102)).

c. Inhibition de la voie de signalisation de c-GAS-STING

Un autre mode d'action potentiel de l'HCQ et de la CQ est l'interférence de ces dernières avec la voie de signalisation *Stimulator of interferon genes* (STING). En résumé, cette voie de signalisation cellulaire repose avant tout sur la reconnaissance de l'ADN, anormalement accumulé au niveau cytosolique, par l'enzyme *cyclic guanosine monophosphate (GMP)-AMP synthase* (cGAS) (Rotem *et al.*, 1963(186) ; Stetson et Medzhitov, 2006(187) ; Sun *et al.*, 2013(188)). La liaison de l'ADN sur cette enzyme entraîne son activation et la production du second messager *cyclic GMP-AMP* (cGAMP). Ce dernier est ensuite détecté par STING au niveau du RE. La liaison du cGAMP sur STING induit un changement de conformation de STING, sa relocalisation au niveau de l'appareil de Golgi et son activation. L'activation de STING permet à son tour le recrutement et l'activation de deux kinases

TANK-binding kinase 1 (TKB1) et *IκB kinase* (IKK). Les phosphorylations successives induites par ces deux kinases permettent la translocation activatrice de deux facteurs de transcription, IRF3 et NF-κB respectivement. Ces derniers activés permettent l'expression de gènes codant des cytokines proinflammatoires (TNF-α et IL-6) pour NF-κB et des IFN de type I (IFNβ) pour IRF3 (Hopfner et Hornung, 2020(189)).

Afin d'inhiber la voie de signalisation STING, plusieurs étapes de cette voie peuvent être ciblées par des thérapeutiques. Grâce à un criblage de médicaments *in silico*, il a été prédit, puis validé *in vitro*, que plusieurs antipaludéens de synthèse, dont l'HCQ, sont capables d'inhiber l'activité de cGAS et de la production de l'IFNβ (An *et al.*, 2015(190)). Pour expliquer ces effets, des études de modélisation moléculaire ont prédit une liaison stable entre les antipaludéens et le complexe cGAS-ADN, à proximité de plusieurs résidus de liaison à l'ADN cruciaux sur cGAS (An *et al.*, 2017(191)). L'affinité de cette liaison étant en corrélation avec la puissance d'inhibition des antipaludéens, l'hypothèse d'un complexe tripartite catalytiquement inactif a été posée (An *et al.*, 2017(191)).

D. Implications cliniques de l'hydroxychloroquine

1) Indication dans les maladies rhumatismales auto-immunes

Les principales indications actuelles de l'HCQ et de la CQ sont les maladies rhumatismales auto-immunes, tels que le lupus érythémateux systémique (LES) et la polyarthrite rhumatoïde (PR). Ces pathologies sont définies par une perte de tolérance immunologique vis-à-vis des composants du soi, associée à une rupture de l'équilibre des réponses effectrices et régulatrices du système immunitaire, mettant en jeu à la fois l'immunité innée et adaptative, à l'origine de lésions cellulaires et tissulaires localisées ou systémiques (Tsokos *et al.*, 2016(192) ; Firestein et McInnes, 2017(193)). L'HCQ et la CQ régulent négativement de nombreux aspects de ces réponses immunitaires innées et adaptatives par leurs effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires (Nirk *et al.*, 2020(194) ; Schrezenmeier et Dörner, 2020(195)) (Figure 8).

a. Diminution de la production et de la sécrétion de cytokines inflammatoires

La réponse immunitaire innée est initiée par la reconnaissance par les cellules immunitaires de débris cellulaires accumulés dans la circulation sanguine en condition pathologique, contenant notamment des acides nucléiques (ADN et ARN) isolés ou sous forme de complexes immuns, constituant des DAMPs (Tsokos *et al.*, 2016(192) ; Firestein et McInnes, 2017(193)). L'HCQ et la CQ sont capables de diminuer la sécrétion de cytokines produites par les cellules mononucléaires périphériques sanguines via l'inhibition de différentes voies de signalisation déclenchées par ces

DAMPs, notamment celles médiées par les TLRs endosomaux (Leadbetter *et al.*, 2002(166) ; Lee *et al.*, 2003(167) ; Brentano *et al.*, 2005(168) ; Lau *et al.*, 2005(169) ; Vollmer *et al.*, 2005(170) ; Sacre *et al.*, 2012(171)) et STING (An *et al.*, 2015(190)) (Figure 8).

b. Inhibition de la présentation antigénique

En plus de son implication dans le système immunitaire inné, l'activation des TLRs au niveau de cellules présentatrices d'antigènes permet également l'activation du système immunitaire adaptatif initiée par la présentation antigénique médiée par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Watts *et al.*, 2010(196)). L'HCQ et la CQ peuvent inhiber cette présentation antigénique médiée par le CMH-II spécifiquement à plusieurs niveaux. En effet, de par l'augmentation du pH dans les structures endolysosomales, l'HCQ interfère avec la dégradation lysosomale des antigènes en peptides, mais également avec le clivage de la chaîne invariante du CMH-II permettant le chargement du peptide et donc la formation du complexe CMH-II/peptide (Ziegler et Unanue, 1985(197) ; Fox et Kang, 1993(198)) (Figure 8).

c. Autres mécanismes d'action

Torigoe *et al.*, 2018 a également démontré que l'HCQ, via l'inhibition de TLR9 au niveau des cellules B, altère la production d'anticorps spécifiques par les plasmocytes en inhibant la différenciation des cellules B mémoires en plasmablastes. L'HCQ est également responsable de l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires par chaque sous-type de cellules B exprimant TLR9 à leur surface (Torigoe *et al.*, 2018(199)). En plus des modifications de pH et des voies de signalisation médiée par des acides nucléiques, d'autres mécanismes d'action de l'HCQ et de la CQ ont également été décrits dans la littérature. Par exemple, l'HCQ et la CQ peuvent entraîner l'inhibition de la phospholipase A2 ou l'altération de l'activation de l'inflammasome potassium-dépendante pour inhiber la production de cytokines inflammatoires (Bondeson et Sundler, 1998(200) ; Schroeder *et al.*, 2017(201)). La différenciation et l'activation des lymphocytes T et B ont également été diminuées par la CQ et l'HCQ via l'inhibition du facteur de transcription NFAT (Feske, 2007(202) ; Wu *et al.*, 2017(203)).

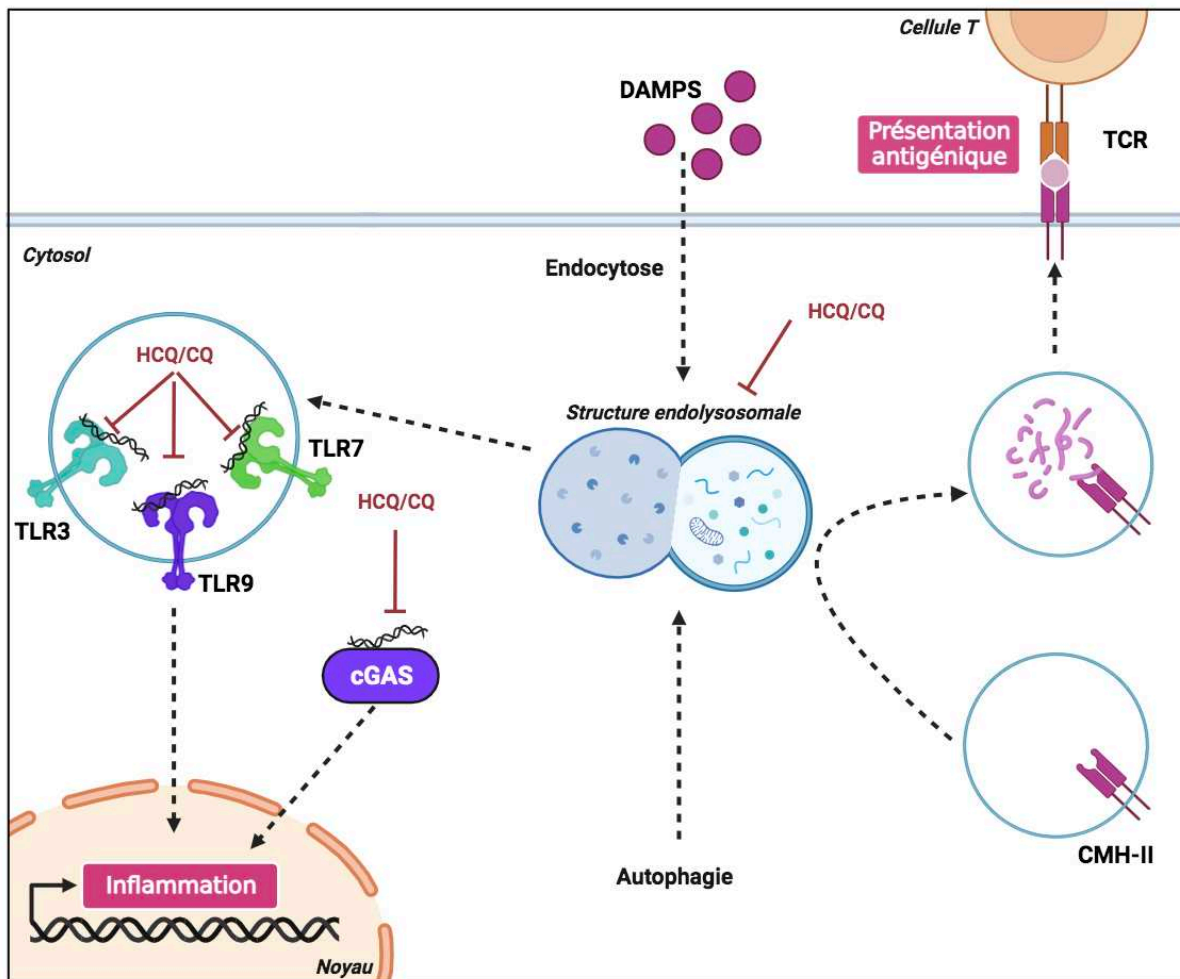


Figure 8 : Implication de l'HCQ et de la CQ dans l'activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice des maladies auto-immunes. Dans les cellules immunitaires, l'HCQ et la CQ possèdent des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires grâce à deux mécanismes principaux : la diminution de la production de cytokines inflammatoires via l'inhibition des voies de signalisation inflammatoires médiées par les TLRs endosomaux et cGAS ; 2) inhibition de la présentation antigénique. Créée avec BioRender.com.

2) Indication empirique dans le paludisme

Le paludisme est une pathologie infectieuse dont l'agent pathogène est un parasite protozoaire unicellulaire du genre *Plasmodium* inoculé à l'Homme par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Chez l'Homme, le cycle de vie asexué du parasite est principalement divisé en deux phases, une phase dite pré-érythrocytaire au niveau des hépatocytes suivie d'une phase érythrocytaire (Sato *et al.*, 2021(204)). L'HCQ et la CQ interviennent principalement au niveau du développement érythrocytaire du parasite, en limitant son apport énergétique et son système de détoxification, mais également au niveau des cellules immunitaires de l'hôte par leurs propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices (Coban, 2020(205)).

a. Actions sur le stade érythrocytaire du parasite

Altération de l'apport énergétique du parasite et son système de détoxification de l'hème libre

Au cours du cycle de vie du parasite dans les érythrocytes, l'hémoglobine de l'hôte est dégradée successivement par des protéases parasitaires, dont les plasmepsines et falcipaines, pour les propres besoins du parasite en acides aminés (Goldberg *et al.*, 1990(206) ; Nasamu *et al.*, 2020(207)). La protéolyse de l'hémoglobine entraîne également la formation d'hème libre toxique pour le parasite (Kumar et Bandyopadhyay, 2005(208)). Le système parasitaire de détoxification de l'hème libre repose sur son oxydation en hémine puis la formation de cristaux pigmentaires insolubles, appelés cristaux d'hémozoïne (Egan, 2008(209)). Les étapes de la protéolyse de l'hémoglobine à la formation des cristaux d'hémozoïne se réalisent au niveau de la vacuole digestive du parasite, compartiment parasitaire acide présentant des propriétés semblables aux structures lysosomales de l'hôte (Matz, 2022(210)).

La CQ, par augmentation du pH de la vacuole digestive comme par lysosomotropisme, inhibe la dégradation protéique dans les érythrocytes infectés par le parasite (Homewood *et al.*, 1972(128) ; Krogstad *et al.*, 1985(211) ; Goldberg *et al.*, 1990(206)). Comme dans le cas de la perméabilisation des membranes lysosomales décrits précédemment, la CQ est également capable de déstabiliser la membrane des vacuoles digestives entraînant une extrusion de leurs protéases (Ch'Ng *et al.*, 2011(212)). Par conséquent, cette altération du compartiment digestif parasitaire ne permet plus des apports énergétiques suffisant au parasite entraînant son élimination. L'implication de l'alcalinisation du pH de la vacuole digestive par la CQ reste controversée due aux fortes doses nécessaires. En effet, la diminution de l'activité des protéases de la vacuole digestive parasitaire apparait davantage corrélée à l'inhibition de la formation de cristaux d'hémozoïne par la CQ (Gluzman *et al.*, 1994(213) ; Herraiz *et al.*, 2019(214)). Cette inhibition repose sur la formation de complexes entre la CQ et l'hème (Chou *et al.*, 1980(215) ; Egan 2006(216) ; Gorka *et al.*, 2013(217)), mais également par la fixation de la CQ directement sur les cristaux d'hémozoïne déjà formés (Sullivan et Meshnick, 1996(218) ; Olafson *et al.*, 2017(219)). Il a également été montré que la CQ inhibe l'hème polymérase, une des enzymes nécessaires à l'extension des cristaux formés (Slater et Cerami, 1992(220)). De par sa propriété de base faible, la CQ a également été décrite comme inhibant la stabilité d'hémozoïne pH-dépendante (Ursos *et al.*, 2001(221)).

Interaction directe de l'HCQ et la CQ avec les acides nucléiques du parasite

Comme développé précédemment dans ce mémoire, l'HCQ et la CQ sont capables d'interagir directement avec l'ADN. Cependant, le génome du parasite du genre *Plasmodium* est davantage composé de motifs adénine-thymine que de motifs guanine-cytosine (Gardner *et al.*, 2002(222)), sur

lesquels se lie préférentiellement l'HCQ et la CQ. Ainsi, leurs doses utilisées pour obtenir cet effet *in vitro* au niveau des acides nucléiques du parasite sont très élevées, voire toxiques, pour la croissance des cellules de l'hôte, et bien supérieures à celles requises *in vivo* pour la clairance du parasite (Kwakye-Berko and Meshnick, 1989(163)). C'est pour cela que la recherche tend à développer des analogues de ces molécules afin d'améliorer leur spécificité d'action vis-à-vis des motifs A-T et ainsi augmenter leur efficacité thérapeutique antipaludéenne avec des effets cytotoxiques moindres (Wenzel *et al.*, 2010(98) ; Punihaole *et al.*, 2018(158)).

b. Actions sur le système immunitaire de l'hôte

L'issue de l'infection palustre repose essentiellement sur l'équilibre entre la réponse immunitaire de l'hôte et les mécanismes de virulence du parasite. Des déséquilibres caractérisés par une croissance excessive du parasite, une exacerbation des réactions immunitaires de l'hôte ou une combinaison des deux sont responsables de la survenue des complications cliniques sévères (neuropaludisme, anémie sévère palustre, syndrome de détresse respiratoire aiguë par exemple) voire le décès des patients (Schofield et Grau, 2005(223) ; Deroost *et al.*, 2016(224)). L'immunopathogenèse du paludisme repose sur une sécrétion accrue de cytokines proinflammatoires lors de la réponse immunitaire innée de l'hôte au détriment de cytokines anti-inflammatoires. Cette surcharge cytokinique est le résultat de différentes voies de signalisation médiées par différents couples PAMPs-PRRs, dont TLR9 et cGAS pouvant être activés par l'ADN et l'hémozoïne (Gowda et Wu, 2018(225)). Ainsi, la CQ a été décrite comme limitant la réponse inflammatoire de l'hôte à l'infection en inhibant la cascade de signalisation proinflammatoire médiée par TLR9 (Coban *et al.*, 2005(226) ; Zhu *et al.*, 2012(227)).

Cependant, une résistance des parasites à l'HCQ et à la CQ a émergé dès les années 1960, amenant les prescripteurs à se tourner vers d'autres thérapeutiques, notamment des combinaisons à base d'artémisinine, et plus récemment vers de nouvelles stratégies préventives chez les enfants avec le vaccin recombinant antipaludéen RTS, S (Mosquirix®).

3) Indication antivirale

L'action antivirale de l'HCQ est illustrée ici à travers l'exemple du virus *Severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV) -2, virus responsable du *Coronavirus disease 2019* (Covid-19). De par leur impact sur le fonctionnement des structures endolysosomales, l'autophagie et l'appareil de Golgi, notamment par alcalinisation de ces structures, l'HCQ et la CQ peuvent inhiber ces différentes étapes de cycle de vie du virus dans la cellule hôte depuis sa fusion jusqu'à la formation de particules virales infectieuses *de novo* (Savarino *et al.*, 2003(228) ; Liu and al., 2020(229) ; Yang et Shen,

2020(230) ; Cheng et Geiger, 2020(231)) (Figure 9). Une cible thérapeutique majeure a été identifiée, le récepteur membranaire de la cellule hôte *Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) (Hoffmann *et al.*, 2020 a(232) et b(233)). L'affinité de ce récepteur pour la glycoprotéine virale *spike* a d'abord été démontrée dans le cas du SAS-CoV (Li *et al.*, 2003(234)), puis reportée dans le contexte du SARS-CoV-2 par homologie de structure des domaines de liaison aux récepteurs membranaires chez les deux virus (Xu *et al.*, 2020(235)). Il a été montré que la CQ peut impacter la fonctionnalité de ACE2 par altération de sa glycosylation au niveau de l'appareil de Golgi, diminuant ainsi son affinité pour la glycoprotéine *spike* du SARS-CoV (Vincent *et al.*, 2005(236)) (Figure 9). Par ailleurs, dans l'immunopathogenèse des cas sévères de la Covid-19, le choc cytokinique aggrave les dommages liés à l'infection virale et est corrélé positivement à la sévérité de la pathologie (Huang *et al.*, 2020(237)). Ainsi, par repositionnement des mécanismes d'action anti-inflammatoires de la CQ et de l'HCQ explorés dans les maladies auto-immunes, il a été envisagé que ces deux molécules pourraient réduire le choc cytokinique (Oscanoa *et al.*, 2020(238) ; Devaux *et al.*, 2021(239)) (Figure 9).

Le spectre d'activité antivirale *in vitro* de l'HCQ et de la CQ est relativement large avec une efficacité sur de multiples virus à ADN et à ARN répertoriés dans la revue de la littérature de Devaux *et al.*, 2020. Ce dernier repose sur des mécanismes cités ci-dessus dans l'exemple du SARS-CoV-2. Par exemple, la CQ peut inhiber les modifications post-traductionnelles au niveau de l'appareil de Golgi : inhibition de la glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Savarino et Shytaj, 2015(240)), absence de clivage de la protéine prM pour le virus de la dengue (Randolph *et al.*, 1990(241)) et formation de particules non infectieuses pour le virus de l'herpès simplexe s'accumulant dans le trans-Golgi (Harley *et al.*, 2001(242)). Tout ceci sans compter que les virus, parasites intracellulaires obligatoires, utilisent généralement le système endolysosomal pour leur infection et réplique (Robinson *et al.*, 2018(243)).

Les propriétés antivirales de l'HCQ et de la CQ décrites *in vitro* sont rarement reproduites dans les modèles animaux ou les essais cliniques. En effet, par exemple, la concentration d'HCQ ou de CQ requise pour entraîner l'alcalinisation des compartiments intracellulaires reste élevée (Al-Bari, 2017(244)), ce qui implique l'apparition d'effets indésirables observés à fortes concentrations. Ces molécules ne sont donc pas recommandées comme un traitement antiviral.

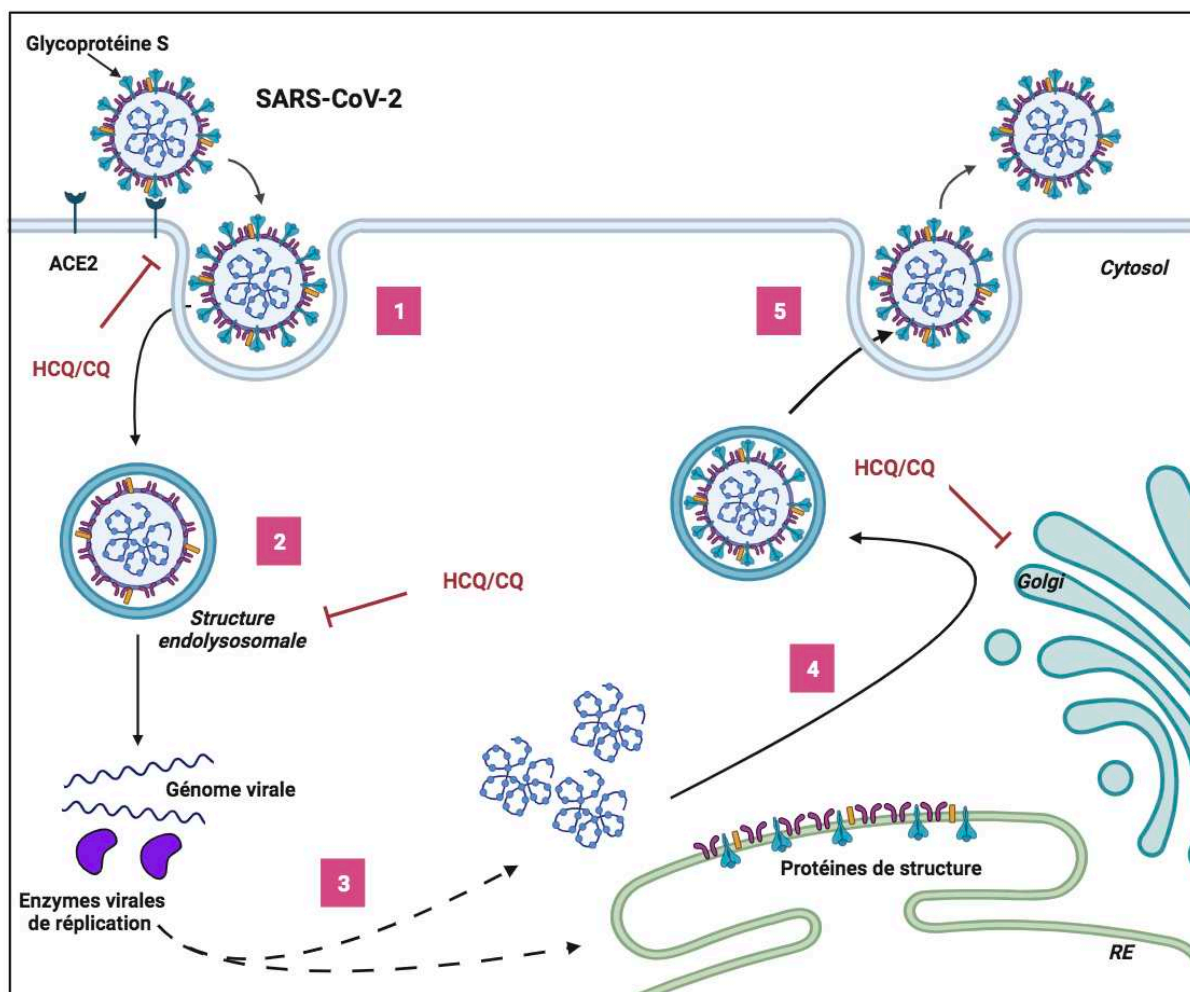


Figure 9 : Implication de l'HCQ et de la CQ dans l'activité antivirale : exemple du SARS-CoV-2. L'HCQ et la CQ sont capables d'inhiber plusieurs étapes de cycle de vie du virus SARS-CoV-2 : son entrée cellulaire par liaison de sa glycoprotéine S au récepteur membranaire de la cellule hôte ACE2 (1); le relargage de son génome virale et d'enzymes de réplication après digestion de son enveloppe dans les structures endolysosomales (2) et donc sa réplication virale ainsi que la synthèse de protéines virales (3) ; la formation de nouveaux virions après modifications post-traductionnelles et assemblage des protéines de structure (4) qui sont par la suite exocytés (5). Créée avec BioRender.com.

4) Indications anticancéreuses

Plusieurs revues de la littérature, dont celles de Manic *et al.*, 2014 et Verbaanderd *et al.*, 2017, ont répertorié l'efficacité antinéoplasique *in vitro* et *in vivo* de l'HCQ et de la CQ utilisées en monothérapie ou comme adjuvant de thérapies anticancéreuses.

Le principal mécanisme anticancéreux étudié des antipaludéens de synthèse repose sur leur capacité à inhiber l'autophagie non seulement au niveau des cellules tumorales mais aussi dans les

autres cellules composant leur microenvironnement (Mulcahy Levy *et al.*, 2017(245)). Cependant, l'emploi de traitement ciblant l'autophagie reste complexe de par l'ambivalence de son rôle lors du processus tumorale. En effet, à un stade précoce, l'autophagie permet d'inhiber l'initiation tumorale par élimination des différents dommages intracellulaires. *A contrario*, une fois la tumeur installée, une augmentation du flux autophagique est nécessaire pour la survie et la croissance des cellules tumorales pour répondre à leur besoin énergétique, mais également comme mécanisme d'échappement tumoral aux thérapeutiques cytotoxiques (White, 2012(246)). Ainsi, l'utilisation d'inducteurs ou d'inhibiteurs d'autophagie est contexte-dépendant. L'efficacité antitumorale de l'HCQ et la CQ a aussi été décrite comme dépendante de l'induction de LMP à l'origine de la mort des cellules tumorales (Enzenmüller *et al.*, 2013(147) ; Circu *et al.*, 2017(148) ; Sironi *et al.*, 2019(149)). Des effets bénéfiques de la CQ ont également été décrits via l'inhibition de la voie de signalisation médiée par TLR9 *in vitro* dans différents types de cancer, tels que le cancer de la prostate, de l'œsophage, de l'estomac ou le cholangiocarcinome (Ilvesaro *et al.*, 2007(247) ; Zhang *et al.*, 2014(248) et 2015(249) ; Mohamed *et al.*, 2022(250)). Cependant, l'implication anticancéreuse de TLR9 reste complexe, entre association à la progression et l'invasion tumorale, et à l'immunité anticancéreuse (Alzahrani *et al.*, 2020(251)).

L'HCQ et la CQ possèdent également des effets anticancéreux indirects sur la vascularisation tumorale. En limitant l'hypoxie au cours du développement tumoral, la CQ a été décrite comme prévenant l'angiogenèse anarchique de néovaisseaux tumoraux dont la grande perméabilité participe à l'intravasation tumorale et la dissémination métastatique, mais également à la réduction de l'efficacité des thérapeutiques cytotoxiques (Maes *et al.*, 2014(252)). Il a été démontré que cet effet bénéfique de la CQ repose sur une diminution de la sensibilité des cellules endothéliales à la voie de signalisation pro-angiogénique médiée par *Vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR2) de par une altération du trafic endolysosomal (Schaaf *et al.*, 2019(253)).

5) Autres impacts cliniques

Des études suggèrent que l'HCQ et la CQ peuvent retarder ou prévenir la résorption osseuse notamment chez les patients souffrant d'une maladie rhumatismale auto-immune (Lakshminarayanan *et al.*, 2001(254) ; Mok *et al.*, 2005(255) ; Akhavan *et al.*, 2013(256)). La CQ a été décrite comme bloquant l'autophagie médiée par le *Receptor activator of NF-κB ligand* (RANKL), cette dernière étant nécessaire à la différenciation, la maturation et à la survie ostéoclastique pour la résorption osseuse (Lin *et al.*, 2016(257) ; Sun *et al.*, 2021(258)). Par lysosomotropisme, la CQ permet également de prévenir la dégradation lysosomale de facteurs inhibant la résorption osseuses (Voronov *et al.*, 2013(259) ; Xiu *et al.*, 2014(260) ; Yao *et al.*, 2017(261)). De façon intéressante, il a été montré que la

fonction anti-TLR9 de la CQ permet à cette dernière de prévenir le relargage de RANKL au niveau des ostéoblastes (Zou *et al.*, 2003(262)). Une étude suggère également que l'HCQ est responsable d'une LMP au niveau des ostéoclastes entraînant le relargage d'enzymes lysosomales et de protons au niveau intra-ostéoclastique et non dans la lacune de résorption osseuse diminuant ainsi la résorption osseuse. Enfin, l'inhibition de la fonction dégradative lysosomale par la CQ permet également d'inhiber le clivage de la pro-cathepsine K en cathepsine K mature, enzyme protéolytique nécessaire à la résorption osseuse après son relargage au niveau de la lacune de résorption (Rieman *et al.*, 2001(263)). Cependant, la prévention et la réduction de l'ostéoporose et des douleurs associées avec le traitement par l'HCQ reste controversée (Kingsbury *et al.*, 2018(264) ; Lee *et al.*, 2018(265)).

L'HCQ et la CQ ont également été décrites comme possédant des effets protecteurs vasculaires à long terme, notamment chez les personnes prédisposées comme celles présentant une maladie rhumatoïdale auto-immune. En effet, ces molécules ont montré leur capacité à réduire la survenue d'événements cardiovasculaires à la fois par des propriétés antiagrégants plaquettaires, anticoagulantes et anti-thrombotiques, mais également par leur impact sur le métabolisme glucidique et lipidique (Rempenault *et al.*, 2018(266) ; Liu *et al.*, 2018(267)). Cependant, selon ces auteurs des études cliniques plus larges sont nécessaires pour quantifier le profil bénéfice-risque de l'HCQ dans la prévention des complications cardiovasculaires chez les patients atteints de maladies rhumatismales et d'autres cohortes non rhumatologiques.

E. Effets indésirables de l'hydroxychloroquine

Les principaux effets indésirables de l'HCQ et de la CQ peuvent être classés en deux grandes catégories. La première regroupe les effets gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhée et inconfort abdominal) et les manifestations cutanées (prurit, hyper ou dépigmentation), non rares mais disparaissant généralement après adaptation posologique sans nécessité d'arrêt de traitement. La deuxième catégorie rassemble diverses combinaisons plus rares de manifestations oculaires, cardiaques et neuromusculaires, dont la survenue dépendrait de la dose journalière utilisée et de la durée de traitement. Ces complications sont potentiellement plus sévères nécessitant généralement un arrêt de traitement avec résolution lente voire incomplète des symptômes (Costedoat-Chalumeau *et al.*, 2014(268)). Le profil de sécurité de l'HCQ et de la CQ fait état d'une innocuité globale de ces médicaments, avec un profil potentiellement plus favorable pour l'HCQ (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010(269) ; Eljaaly *et al.*, 2020(270)). Par la suite, nous nous intéressons aux mécanismes sous-jacents des effets indésirables du second groupe.

1) Rétinopathies

Parmi les troubles ophtalmiques, l'atteinte rétinienne est à la fois la plus fréquente et la plus sévères. L'HCQ présente une forte concentration au niveau du tissu oculaire, due à sa liaison de forte affinité avec la mélanine, un composant abondant dans la rétine. La rétinopathie sous traitement par HCQ se caractérise par une dégénérescence périfovéolaire progressive des photorécepteurs au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), pouvant aboutir à une maculopathie en œil de bœuf voire la cécité (Melles et Marmor, 2014(271)). L'HCQ a été décrite comme responsable d'une atteinte fonctionnelle de l'EPR en augmentant sa perméabilité et en y inhibant la dégradation lysosomale des segments externes des cellules photoréceptrices apicales (Sundelin et Terman, 2002(272) ; Yoon *et al.*, 2010(273) ; Korthagen *et al.*, 2015(274)). Ces altérations lysosomales sont également responsables de l'accumulation de lipofuscine, un pigment lipidique formé à partir des débris cellulaires. Certains composants de la lipofuscine, dont le N-rétinylidène-N-rétinyléthanolamine (A2E), renforcent l'altération de la dégradation lysosomale par inhibition des pompes à protons lysosomales (Bergmann *et al.*, 2004(275) ; Yoon *et al.*, 2010(273)). De par sa propriété de base faible, l'HCQ inhibe aussi l'activité pH-dépendante du *Organic anion transporting polypeptide 1A2* (OATP1A2). Cette inhibition empêche le recyclage du tout-trans-rétinol au niveau des cellules de l'EPR, dont l'accumulation conduit également à l'accumulation de lipofuscine (Xu *et al.*, 2016(276)).

2) Cardiomyopathie

La cardiotoxicité sous traitement par HCQ comprend principalement des cardiomyopathies ainsi que des troubles du rythme et de la conduction cardiaque (Chatre *et al.*, 2018(277)). Le mécanisme sous-jacent des cardiomyopathies est basé sur lysosomotropisme de l'HCQ au niveau des myocytes, responsable de l'accumulation notamment de glycogène et de phospholipides dans ces derniers (Frustaci *et al.*, 2012(278) ; Tönnemann *et al.*, 2013(279)). Cette accumulation est à l'origine du développement d'une maladie de surcharge lysosomale acquise, conduisant à une désorganisation myofibrillaire, une atrophie et une fibrose pouvant conduire à une cardiomyopathie (Yogasundaram *et al.*, 2014(280) ; Nadeem *et al.*, 2020(281)). Des effets pro-arythmiques de l'HCQ ont été décrits, moins fréquents que pour la CQ, par blocage de canaux potassiques et calciques voltage-dépendants dans les cellules myocardiques (Delaunois *et al.*, 2021(282)).

3) Neuromyopathies

L'HCQ peut être à l'origine d'une neuromyopathie caractérisée par une apparition progressive d'une myasthénie avec diminution des réflexes principalement au niveau des muscles proximaux des

membres inférieurs pouvant être associée à une neuropathie périphérique (Stein *et al.*, 2000(283) ; Biguetti *et al.*, 2021(284)). Le mécanisme sous-jacent principal de ces myopathies induites par l'HCQ semble être similaire à celui des cardiomyopathies décrit précédemment. En effet, il a été montré que le lysosomotropisme de l'HCQ est responsable d'accumulation de phospholipides et de glycogène dans les rhabdomyocytes, à l'origine d'une myopathie vacuolaire à corps curvilignes et d'une atrophie des fibres musculaires caractéristiques à la biopsie musculaire (Lee *et al.*, 2012(285) ; Stein *et al.*, 2000(283) ; Biguetti *et al.*, 2021(284)).

CHAPITRE 4 : STRESS OXYDATIF, UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE DE L’HYDROXYCHLOROQUINE ?

A. Présentation générale du stress oxydatif

L’oxygène est essentiel pour la survie de l’organisme aérobique, notamment par son implication dans la production d’énergie, lors de laquelle des produits secondaires sont également générés physiologiquement par l’organisme, les ROS. Parmi les ROS, sont retrouvés notamment deux espèces radicalaires, le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyl (HO^{\cdot}), et une espèce non radicalaire, le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres sont définis comme des entités moléculaires, capables d’existence indépendante, qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbite externe atomique, et caractérisés par leur instabilité, leur courte durée de vie et leur haute réactivité. Les espèces radicalaires sont plus réactives que les espèces non radicalaires et leur réactivité est directement corrélée aux potentiels dommages sur les molécules biologiques. Cependant, le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2), liposoluble, peut diffuser à travers la membrane cellulaire et être converti en radical hydroxyl (HO^{\cdot}) par fission homolytique, induite par les UV ou par l’interaction avec des ions de métaux de transition (réaction de Fenton) (Phaniendra *et al.*, 2015(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)).

À des niveaux faibles ou modérés, les ROS peuvent être impliqués dans diverses fonctions physiologiques, comme notamment la défense immunitaire contre les pathogènes environnementaux au sein des cellules phagocytaires, mais également de nombreuses voies de signalisation intracellulaires dans d’autres types cellulaires (Valko *et al.*, 2007(288)). En revanche, lors d’un déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes cellulaires, des dommages cellulaires et tissulaires peuvent survenir, regroupés sous le terme de stress oxydatif. De nombreuses pathologies ont pour origine un stress oxydatif, notamment les diabètes, des pathologies inflammatoires et auto-immunes, des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires ainsi que certains cancers et le vieillissement (Phaniendra *et al.*, 2015(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)).

Plus précisément, les processus oxydatifs impliquant les ROS sont des réactions à l’origine du transfert d’un ou plusieurs électrons d’un donneur d’électrons (agent réducteur) à un accepteur d’électrons (agent oxydant). Les ROS peuvent ainsi oxyder les acides nucléiques, notamment l’ADN mitochondrial du fait de sa proximité avec les sources de ROS, à l’origine de leur fragmentation, de mutations et d’une altération de l’expression des gènes. Les ROS entraînent également la peroxydation des lipides, notamment des phospholipides, des acides gras polyinsaturés et du cholestérol, principaux constituants des membranes cellulaires, entraînant par conséquent une perturbation de la stabilité,

de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Enfin, l'oxydation des protéines par les ROS peut conduire à leur dénaturation ou leur perte de fonction (Phaniendra *et al.*, 2015(286) ; Martemucci *et al.*, 2022).

B. Sources endogènes des ROS

Il existe de nombreuses sources exogènes à l'origine des radicaux libres : polluants environnementaux, métaux lourds et de transition, irradiations ultra-violetes ou γ , certains médicaments et leurs métabolites par exemple. Ici, nous nous intéresserons uniquement aux sources endogènes de ROS : le métabolisme cellulaire incluant la mitochondrie, le RE et le peroxysome (Phaniendra *et al.*, 2015(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)).

1) Mitochondrie

La mitochondrie est le siège de la phosphorylation oxydative, mécanisme aérobie permettant de produire de l'énergie nécessaire à l'homéostasie cellulaire sous forme d'ATP. Au cours de la phosphorylation oxydative mitochondriale, le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à IV) est à l'origine de réactions d'oxydoréduction successives permettant de créer un gradient électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale utilisée par la suite par l'ATP synthase du complexe V. Chez les eucaryotes, une grande partie des ROS sont produits par la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale lors de la respiration, notamment au niveau des complexes I et III (Zorov *et al.*, 2014(289) ; Forrester *et al.*, 2018(290)). En plus de ces complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'autres enzymes, comme l' α -cétoglutarate déshydrogénase, le pyruvate déshydrogénase et le complexe de la déshydrogénase des α -cétoacides ramifiés, sont responsables de la génération de ROS dans la matrice mitochondriale. Il est à noter également la présence du complexe nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX) 4 (description détaillée plus bas) au niveau de la membrane externe mitochondriale, permettant de produire des ROS (Forrester *et al.*, 2018(290)).

2) Réticulum endoplasmique

Au sein du RE, la fonction de repliement des protéines est très sensible au statut redox intraluminal. Réciproquement, la dérégulation du repliement protéique en réponse au stress du RE, notamment la formation de liaisons disulfures, augmente le stress oxydatif intraluminal, entraînant une altération des fonctions du RE (Forrester *et al.*, 2018(290)). L'une des voies les plus décrites pour expliquer le lien entre la fonction de repliement protéique et le stress oxydatif dans le RE est celle

impliquant la protéine disulfure isomérase (PDI) et l'oxydoréductase-1 du RE (*Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1* ou ERO1). PDI introduit des liaisons disulfures par oxydation du groupement thiol au sein des protéines en cours de repliement, à l'origine de sa réduction. La régénération de PDI sous sa forme oxydée, nécessaire à sa fonction, est assurée par ERO1, dont la réduction est également responsable de la production d' H_2O_2 (Cao et Kaufman, 2014(291)). Il est à noter que les facteurs de transcription ATF4 et CHOP induisent l'expression de l'isoforme ERO1 α en cas de stress RE (Forrester *et al.*, 2018(290)). En plus de la voie médiée par PDI et ERO1, des ROS peuvent également être produits par le cytochrome p450, la cytochrome b5 réductase et le complexe NOX4 présents au niveau de la membrane du RE (Forrester *et al.*, 2018(290) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)).

3) Peroxisome

Les ROS issus du peroxysome sont produits lors de diverses réactions enzymatiques telles que la β -oxydation des acides gras, la synthèse de polyamines, la désamination des acides aminés et l'oxydation de l'hypoxanthine. Le peroxysome possède également une chaîne respiratoire non couplée à la production d'ATP mais dont le transfert séquentiel d'électrons peut être à l'origine de ROS. Il est à noter que cet organite semble produire plus largement de l' H_2O_2 de réactivité moindre que les radicaux libres (Forrester *et al.*, 2018(290)).

4) Autres sources de ROS, exemple des complexes NOX

D'autres activités enzymatiques présentes au sein de ces différents organites peuvent être également à l'origine de ROS intracellulaires au niveau du cytosol ou de la membrane plasmique, à l'exemple des complexes NOX.

La famille des complexes NOX est considérée comme une source majeure de ROS dans les cellules eucaryotes. Il s'agit de complexes enzymatiques multiprotéiques transmembranaires exprimés notamment au niveau de la membrane plasmique, du RE, du noyau et des mitochondries. Les différents isoformes de cette famille partagent une homologie de structure basée sur un noyau catalytique commun, historiquement décrit pour NOX2. Ce noyau est constitué principalement de deux sous-unités catalytiques constitutivement exprimées au niveau de la membrane plasmique (gp91^{phox} et p22^{phox}), formant le complexe transmembranaire initial flavocytochrome b₅₅₈, et d'autres sous-unités régulatrices cytosoliques solubles, dont gp47^{phox} notamment pour le complexe NOX2 (Vermot *et al.*, 2021(292)). Ces diverses sous-unités sont généralement maintenues physiquement dissociées dans un état inactif en l'absence de stimuli. Lors d'une stimulation, les sous-unités régulatrices migrent au niveau membranaire, où leur assemblage avec les sous-unités catalytiques

permet l'activation du complexe NOX (Clark *et al.*, 1990(293)). Ce dernier permet le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire pour générer des ions superoxydes (Bromberg et Pick, 1984(294)). D'abord découverte au niveau des cellules phagocytaires (Bromberg et Pick, 1984(294)), l'expression de NOX a été observée également au niveau d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales par exemple (Griendling *et al.*, 2000(295)). Même si les fonctions physiologiques de NOX dans le système immunitaire et la régulation de la pression sanguine sont les plus documentées, sa distribution élargie dans différents tissus cellulaires explique des effets pléiotropiques de ce complexe (Bedard et Krause., 2007(296) ; Vermot *et al.*, 2021(292)).

C. Système antioxydant cellulaire

1) Présentation générale du système anti-oxydatif

Afin de contrebalancer cette production physiologique de ROS, il existe différentes sources exogènes et endogènes d'antioxydants. Les sources exogènes sont issues essentiellement de l'alimentation, notamment les vitamines C et E, les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse) ainsi que des éléments phytochimiques comme les polyphénols. Les sources endogènes antioxydantes sont principalement basées sur des systèmes enzymatiques tels que les superoxyde dismutases (SOD), les catalases (CAT), les glutathion peroxydases (GPX), les glutarédoxines (GRX) et les peroxyrédoxines (PRDX). Ces différents systèmes antioxydants requièrent également des enzymes permettant leur synthèse, leur réduction et la régénération de leurs cofacteurs. La mitochondrie, le RE et le peroxysome possèdent ces différents systèmes enzymatiques antioxydants. D'autres sources endogènes non enzymatiques sont également présentes regroupant des métabolites antioxydants (acide lipoïque, glutathion (GSH), L-arginine, acide urique, bilirubine) (Phaniendra *et al.*, 2014(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)).

2) Focus sur la voie de signalisation médiée par Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2, découvert en 1994 par Moi *et al.*, est impliqué dans de multiples processus biologiques de survie cellulaire en réponse à différentes sources de stress, permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire (Ma, 2013(297) ; Cuadrado *et al.*, 2019(298)). Dans des conditions homéostatiques, le facteur de transcription Nrf2 est liée à *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), une protéine adaptatrice de l'ubiquitine ligase de type E3, *cullin 3* (Cul3), responsable de son ubiquitination et de sa dégradation continue par le protéasome. En réponse au stress oxydatif, des modifications des résidus cystéine de Keap1 entraînent des changements

conformationnels à l'origine de la dissociation de Keap1 avec Nrf2. La stabilisation de Nrf2 est suivie de sa translocation nucléaire où il forme un complexe hétérodimérique avec des membres de la famille des protéines *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) afin de se fixer dans la région promotrice, sur une séquence spécifique *Antioxidant element response* (ARE). Ainsi, Nrf2 permet la transcription de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydatif et xénobiotique. En effet, Nrf2 régule la transcription de composants des systèmes antioxydants du GSH et de la thiorédoxine, ainsi que des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS et des xénobiotiques (exemple de la *NADPH dehydrogenase quinone 1* (Nqo1)), dans le métabolisme de l'hème (exemple de l'hème oxygénase 1 (Hmox1)) et dans la régénération du NADPH (cofacteur obligatoire du système antioxydant Nqo1) et de détoxification des médicaments (CYP). Le facteur de transcription Nrf2 est également responsable de sa propre expression par la présence de séquences ARE-like au niveau de la région promotrice de son gène éponyme *NFE2L2* (Tonelli *et al.*, 2018(299) ; Figure 10). Par la suite, pour une question de simplification, nous parlerons de gènes ARE pour désigner des gènes cibles de Nrf2 dont la régulation implique la séquence spécifique ARE.

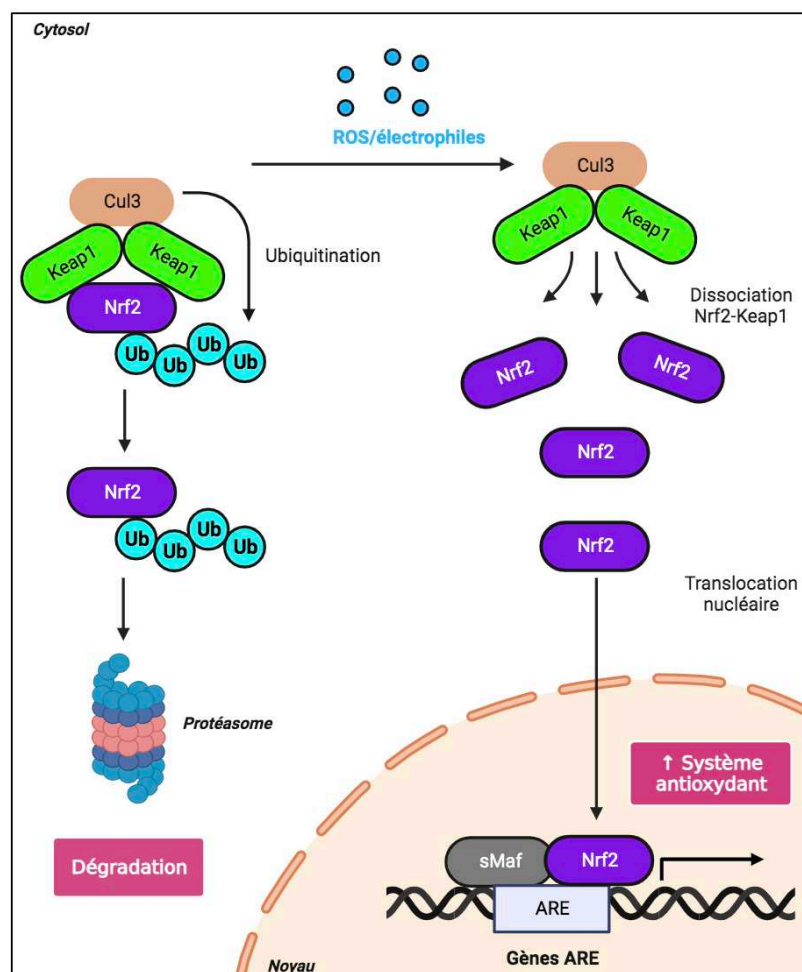


Figure 10 : Schéma global de la voie de signalisation canonic médiee par Nrf2. En condition de stress, la dissociation du complexe Nrf2-Keap1 prévient l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de Nrf2, permettant sa translocation nucléaire et l'expression de gènes antioxydants. Créée avec BioRender.com.

En plus de son rôle dans l'homéostasie redox cellulaire, la voie de signalisation Nrf2-Keap1 est également impliquée dans l'homéostasie protéique. En effet, Nrf2 participe à la clairance de protéines altérées par autophagie car le gène *Sequestosome 1 (SQSTM1)*, codant la protéine cargo autophagosomale p62, est un gène cible de Nrf2, tout comme de nombreux autres gènes autophagiques possédant une séquence consensus ARE dans leur région promotrice (Pajares *et al.*, 2016(300)). Réciproquement, p62 se lie à Keap1 avec une grande affinité de façon à dissocier le complexe Nrf2-Keap1 et permettre ainsi l'activité transcriptionnelle de Nrf2 (Jain *et al.*, 2010(301) ; Lau *et al.*, 2010(302)). L'implication de Nrf2 dans la protéostase en condition oxydative repose aussi sur sa phosphorylation activatrice par PERK lors de la réponse UPR (Cullinan *et al.*, 2003(303)), ainsi que sur sa capacité à réguler l'expression des sous-unités du protéasome (Kwak *et al.*, 2003(304)). Enfin, Nrf2 participe également à la résolution de l'inflammation notamment par inhibition de la voie de signalisation médiée par le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Ma, 2013(297) ; Cuadrado *et al.*, 2019(298)).

D. Hydroxychloroquine, molécule oxydante ou antioxydante intracellulaire ?

1) Stress oxydatif induit par l'hydroxychloroquine

La génération d'un stress oxydatif par l'HCQ et la CQ est un des mécanismes sous-jacents à l'action antipaludéenne de ces molécules (Sugioka *et al.*, 1987(305) ; Lehane *et al.*, 2012(306)). En effet, en plus des deux mécanismes précédemment décrits (modifications de la dégradation lysosomale et de la résolution autophagique, ainsi que de la liaison aux acides nucléiques), le complexe formé par la CQ et l'hème a été décrit *in vitro* comme responsable d'une exacerbation de la peroxydation des lipides membranaires lors du cycle intra-érythrocytaire du parasite, permettant son élimination (Sugioka *et al.*, 1987(305)). Il a également montré une diminution de la détoxification de l'hème libre dépendante du GSH par la CQ dans les érythrocytes infectés par le parasite (Ginsburg *et al.*, 1998(307)). Par ailleurs, il a été observé *in vivo* qu'un traitement par CQ provoque un stress oxydatif chez l'hôte et cet effet est exacerbé chez les patients infectés par *Plasmodium falciparum* auxquels le médicament est administré : réduction de l'activité d'enzymes antioxydantes (CAT et GPX) dans les érythrocytes et diminution des concentrations plasmatiques d'autres antioxydants non enzymatiques (vitamines A et C, GSH et β -carotène) parallèlement à une augmentation des ROS (Farombi *et al.*, 2003(308)).

L'implication de l'HCQ et de la CQ dans le stress oxydatif a également été montré dans plusieurs modèles animaux *in vivo*, notamment par une augmentation de la quantité de ROS et une diminution d'enzymes antioxydantes, CAT et GPX principalement, au niveau de différents tissus

(Bhattacharyya *et al.*, 1983(309) ; Magwera *et al.*, 1997(310) ; Ogunbayo *et al.*, 2006(311) ; Uzar *et al.*, 2012(312) ; Giovannella *et al.*, 2015(313)). L'augmentation par l'HCQ et la CQ du stress oxydatif dans la rétine (Bhattacharyya *et al.*, 1983(309)) ainsi qu'au niveau du nerf sciatique chez le rat (Uzar *et al.*, 2012(312)) pourraient également expliquer la survenue de rétinopathie et de neuropathie comme effets iatrogènes de ces molécules chez l'Homme.

Plus récemment, il a été suggéré une contribution du stress oxydatif systémique induit par l'HCQ et la CQ dans la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë et d'hypoxie, causes principales de décès des patients atteints de la Covid-19 (Klouda et Stone, 2020(314)).

2) Complexes NOX, cible thérapeutique de l'hydroxychloroquine ?

D'autres études ont cependant mise en avant une activité antioxydante de l'HCQ. Il a été montré que le traitement par l'HCQ et la CQ permettait d'améliorer les effets pro-inflammatoires et cardiovasculaires, observés *in vitro* et *in vivo* dans des cas de LES (Gómez-Guzmán *et al.*, 2014(315)), de syndrome des anticorps antiphospholipides (Müller-Calleja *et al.*, 2017(316) ; Miranda *et al.*, 2019(317)) et de tubulopathie rénale d'origine diabétique (Kang *et al.*, 2020(318)), via une diminution de l'activité des complexes NOX.

Dans un contexte d'hypertension artérielle pulmonaire résistante du nouveau-né, Teng *et al.*, 2012 ont montré *in vitro* que la CQ diminue l'activité du complexe NOX2, et donc la quantité intracellulaire de ROS, prévenant ainsi l'altération de l'angiogenèse dans les cellules endothéliales. Il a été démontré que cet effet résulte à la fois d'une diminution de l'expression de la sous-unité p47^{phox} et de son association avec la sous-unité gp91^{phox} du complexe NOX2 (Teng *et al.*, 2012(319)). Ce défaut d'assemblage des différentes sous-unités du complexe NOX2 a également été repris comme mécanisme d'action de l'HCQ dans un contexte de syndrome des anticorps antiphospholipides au sein de cellules immunitaires. En effet, Müller-Calleja *et al.*, 2017 ont observé que l'HCQ prévient la translocation de la sous unité catalytique gp91^{phox} du complexe NOX2 au niveau de l'endosome, cette sous-unité étant induite en condition de stress dans ce modèle afin d'initier la cascade de signalisation proinflammatoire du complexe NOX2.

L'activité du complexe NOX2 présente un pH optimal relativement neutre compris entre 6,5 et 8,0 (Morgan *et al.*, 2005(320)). De plus, il a été démontré que ce complexe contribue lui-même à limiter l'acidification des endosomes précoces dans les cellules dendritiques (Mantegazza *et al.*, 2008(321)). Enfin, dans la démonstration réalisée par Müller-Calleja *et al.*, 2017, il n'a pas été montré de variations de pH. Ainsi, l'activité endosomale de NOX2 ne dépend pas de la capacité de l'HCQ à augmenter le pH dans les structures endolysosomales. Par contre, une implication de l'inhibition de l'autophagie dans

l'inhibition de l'activité de NOX2 par la CQ a été démontrée par des résultats similaires avec la bafilomycine (Teng *et al.*, 2012(319)).

3) Implication de l'hydroxychloroquine sur la voie de signalisation Nrf2

Plusieurs articles ont démontré l'implication de l'HCQ et de la CQ dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Cependant, les mécanismes sous-jacents à cet effet sont différents selon le contexte pathologique étudié et les conséquences peuvent être délétères ou bénéfiques.

Dans un contexte de trouble pulmonaire induit par le paraquat dans un modèle murin, Shen *et al.*, 2017 ont montré *in vivo* que la CQ à forte dose permet de réverser l'inflammation et la fibrose pulmonaire observées dans ce modèle ainsi qu'une diminution de la quantité de ROS au niveau du tissu pulmonaire. Il a été démontré que cet effet antioxydant repose sur une exacerbation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 en condition de stress comme en témoigne une augmentation de l'expression génique et protéique de Hmox1 et Nqo1 ainsi qu'une augmentation de l'activité de SOD (Shen *et al.*, 2017(322)).

Une sur-activation de la voie de signalisation médiée par Nrf2 a également été décrite dans un contexte de myopathie vacuolaire autophagique. Sur biopsie musculaire de patients atteints de cette pathologie, Duleh *et al.*, 2016 ont observé une séquestration de Keap1 dans des agrégats protéiques positifs à p62, accompagnée d'une augmentation des niveaux d'ARN messagers et de protéines de gènes cibles de Nrf2, dont *HMOX1* et *NQO1*. De même, le traitement de myotubes murins C2C12 par la CQ a entraîné une augmentation protéique de Nrf2 nucléaire et de l'expression de gènes régulés par ce dernier. Tout comme le blocage de la résolution autophagique, les effets de la CQ sur l'activation de la voie Nrf2 augmentent en fonction du temps de traitement et de la concentration de la molécule (Duleh *et al.*, 2016(323)). Cette activation prolongée non canonique de la voie Nrf2, par inhibition compétitive du complexe Nrf2-Keap1 par p62, avait préalablement été décrite comme étant également responsable d'une toxicité hépatique *in vitro* (Komatsu *et al.*, 2010(324)). Ces résultats *in vitro* soulignent qu'une activation prolongée de Nrf2 peut s'avérer aussi délétère que le stress oxydatif par dérégulation de l'homéostasie redox cellulaire, abordant la notion de stress réducteur (Bellezza *et al.*, 2020(325)).

Enfin, dans plusieurs lignées cancéreuses *in vitro*, Peng *et al.*, 2021 ont également démontré une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 indépendante du blocage de l'autophagie par l'HCQ, mais reposant sur une accumulation au cours du temps de ROS intracellulaires par ce traitement. Dans cet article, l'HCQ est décrite comme une molécule pro-oxydative, dont l'accumulation de ROS intracellulaire entraîne une réponse réflexe de la cellule par activation de la

voie antioxydante Nrf2, relançant le débat sur la fonction anti ou pro-oxydante de l'HCQ (Peng *et al.*, 2021(326)).

PROBLÉMATIQUE

La protéine lipin-1 possède deux fonctions moléculaires (Csaki et Reue, 2013(27) ; Chen *et al.*, 2014(28) ; Zhang et Reue, 2017(29) ; Lutkewitte et Finck, 2020(30)) : une activité enzymatique PAP-1, permettant la production de diacylglycérol à partir d'acide phosphatique (Han *et al.*, 2006(32) ; Donkor *et al.*, 2007(31)), ainsi qu'une activité transcriptionnelle lui conférant un rôle dans la régulation de la lipolyse et de la lipogenèse, chacune finement régulée (Finck *et al.*, 2006(33)). L'étude physiopathologique du déficit en lipin-1 dans différents modèles humains et murins a montré qu'un défaut enzymatique de cette protéine était responsable à la fois d'un défaut d'autophagie (Ugrankar *et al.*, 2011(80) ; Zhang *et al.*, 2014(67) ; Schweitzer *et al.*, 2019(60) ; Rashid *et al.*, 2019 ; Hamel *et al.*, 2021) et d'une perte de la dynamique mitochondriale (Baba *et al.*, 2014(83) ; Kameoka *et al.*, 2018(84)), exacerbée par une diminution de la mitophagie (Alshudukhi *et al.*, 2018(85) ; Lin *et al.*, 2022(86)) et à l'origine de l'activation de la voie de signalisation proinflammatoire médiée par TLR9 (Hamel *et al.*, 2021(81)), mais également d'un stress du RE (Rashid *et al.*, 2019). Ces altérations biologiques sont en partie responsables de la survenue d'épisodes de RM aigus chez des patients atteints d'un déficit en lipin-1, engageant le pronostic vital de ces derniers (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19) ; Kanderi *et al.*, 2022(53)). Le traitement actuel est non spécifique et uniquement basé sur une prise en charge symptomatique d'urgence. Ainsi, il existe une réelle urgence à trouver de nouvelles thérapeutiques spécifiques du lipin-1 permettant de prévenir les accès de RM notamment.

L'HCQ est une molécule développée en 1950 empiriquement comme antipaludéen de synthèse par pharmacomodulation de la CQ. L'HCQ et la CQ possèdent une homologie de structure et un profil pharmacocinétique commun permettant de confondre leurs effets pharmacodynamiques (Kaur *et al.*, 2010(94) ; Agnello *et al.*, 2019(95)). Leur large spectre d'action (Browning *et al.*, 2014(328)) est basé principalement sur deux mécanismes d'action majeurs sous-jacents : le lysosomotropisme, responsable notamment de l'inhibition de la fonction dégradative lysosomale et de la résolution autophagique (Homewood *et al.*, 1972(128) ; Wibo et Poole 1974(141) ; Seglen *et al.*, 1979(142)), ainsi qu'une interaction avec les acides aminés (Wenzel *et al.*, 2010(98) ; Punihaole *et al.*, 2018(158)), à l'origine de l'inhibition des voies de signalisation proinflammatoires intracellulaires médiées principalement par TLR9 (Macfarlane et Manzel, 1998(182) ; Rutz *et al.*, 2004(184) ; Kuznik *et al.*, 2011(185) ; Lamphier *et al.*, 2014(102)) et STING (An *et al.*, 2015(190)). Ces mécanismes d'action permettent à l'HCQ et à la CQ de s'inscrire dans différentes stratégies thérapeutiques antipaludéennes (Coban, 2020(205)), mais aussi anti-inflammatoires et immunomodulatrices (Nirk *et al.*, 2020(194) ; Schrezenmeier et Dörner, 2020(195)), antivirales (Al-Bari *et al.*, 2017(244)) et anticancéreuses (Manic

et al., 2014(329) ; Verbaanderd *et al.*, 2017(330)) par repositionnement. Il est à noter, cependant, que le lysosomotropisme de ces molécules est également responsable de la survenue d'effets indésirables sous traitement : rétinopathie (Sundelin et Terman, 2002(272) ; Bergmann *et al.*, 2004(275) ; Yoon *et al.*, 2010(273) ; Korthagen *et al.*, 2015(274)), cardiomyopathie (Frustaci *et al.*, 2012(278) ; Tönnemann *et al.*, 2013(279)) et neuropathie (Stein *et al.*, 2000(283) ; Lee *et al.*, 2012(285) ; Biguetti *et al.*, 2021(284)).

Ainsi, l'activité anti-inflammatoire de l'HCQ par inhibition de la voie de signalisation médiée par le récepteur TLR9, identifié dans la physiopathologie du déficit en lipin-1 comme une cible thérapeutique, nous a incité à mettre en place un traitement de fond par HCQ chez les patients atteints d'un déficit en lipin-1, afin de prévenir les épisodes aigus de RM et de traiter les symptômes chroniques présents chez certains patients (fatigabilité et douleurs musculaires, cardiomyopathie). La posologie initiale a été basée sur la dose recommandée dans les principales indications antirhumatismales de l'HCQ (dose journalière de 6,5 milligrammes par kilogramme). En parallèle, un traitement par corticostéroïdes a été instauré chez l'ensemble des patients, traités ou non par HCQ, au moment des épisodes aigus de RM, sur une courte durée, afin de limiter l'« orage » inflammatoire de ces épisodes (Tuchmann-Durand *et al.*, 2023(91)).

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'efficacité et la toxicité du traitement par HCQ chez des patients présentant un déficit en lipin-1. En parallèle, nous avons mis en place une étude *in vitro* sur des myoblastes primaires de patients afin de comprendre l'efficacité thérapeutique de l'HCQ, en dépit de l'effet empirique de cette molécule sur la résolution de l'autophagie déjà altérée chez les patients traités. Nous avons donc voulu évaluer la balance bénéfico-risque du traitement par HCQ *in vivo* et *in vitro*. Afin d'évaluer l'efficacité de la molécule *in vitro*, nous avons choisi d'étudier le stress oxydatif. En effet, dans la littérature, il a été montré une implication de la mitochondrie et du RE dans le déficit en lipin-1, deux organelles décrits comme des sources endogènes majeures de ROS intracellulaires (Forrester *et al.*, 2018(290) ; Phaniendra *et al.*, 2014(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)). Or, plus récemment, un troisième mécanisme d'action plus controversée de l'HCQ a été décrit : la réduction du stress oxydatif avec une inhibition de l'activité des complexes oxydatifs NOX (Teng *et al.*, 2012(319) ; Müller-Calleja *et al.*, 2017(316)) et/ou une augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur anti-oxydatif Nrf2 (Duleh *et al.*, 2016(323) ; Shen *et al.*, 2017(322)). Ainsi, la question d'un effet anti-oxydatif de l'HCQ dans les myoblastes des patients atteints d'un déficit en lipin-1 s'est posée, afin d'élucider les mécanismes d'action sous-jacents de cette molécule.

RÉSULTATS

CHAPITRE 1 : ÉTUDE *IN VITRO* DES EFFETS DE L'HYDROXYCHLOROQUINE DANS LES MYOBLASTES PRIMAIRES DE PATIENTS PRÉSENTANT UN DÉFICIT EN LIPIN-1

A. Article : « Hydroxychloroquine sulfate: A novel treatment for lipin-1 deficiency? »

Le déficit en lipin-1 est une maladie rare caractérisée par la survenue de RM sévères engageant le pronostic vital des patients. Jusqu'à récemment, leur prise en charge restait limitée à un traitement symptomatique d'urgence en service de réanimation.

Des travaux précédents ont montré l'implication du récepteur de l'immunité innée TLR9 dans la physiopathologie du déficit en lipin-1 à partir de myoblastes primaires de patients, faisant de ce récepteur une cible thérapeutique (Hamel *et al.*, 2021(81) ; Annexe 1). De plus, le traitement *in vitro* de myoblastes primaires de patients par la CQ, molécule décrite comme ayant des propriétés anti-TLR9, a permis de réverser des marqueurs de l'inflammation et de mort cellulaire. Ainsi, devant l'urgence à traiter les patients, l'efficacité *in vitro* de la CQ et l'absence de modèle animal mimant fidèlement le phénotype de RM aiguë chez l'Homme, une prescription hors autorisation de mise sur le marché de l'HCQ en usage compassionnel a été instaurée chez les patients atteints d'un déficit en lipin-1. Cette nouvelle stratégie thérapeutique s'ajoute à l'instauration récente d'un traitement par corticoïdes au moment des épisodes de RM aiguës depuis 2015, dont la collecte de résultats a permis de mettre en évidence une réduction de la mortalité lors des RM liées au déficit en lipin-1 par ce traitement (Tuchmann-Durand *et al.*, 2023(91) ; Annexe 2).

Dans l'article Renard *et al.*, 2023, nous avons observé une amélioration sous traitement *per os* par HCQ des symptômes chroniques des patients tels que la douleur et la faiblesse musculaire, ainsi que l'intolérance à l'effort. La fonction cardiaque s'est aussi améliorée chez un patient souffrant d'une insuffisance cardiaque. Les patients présentaient également une diminution des cytokines inflammatoires plasmatiques IL-8 et MCP-1. Bien qu'ayant obtenu des résultats cliniques et biologiques encourageants chez ces patients, certains d'entre eux ont présenté des accès de RM sous traitement. Nous avons montré que ces derniers avaient une concentration plasmatique élevée d'HCQ par rapport aux patients davantage répondeurs au traitement, suggérant une potentielle efficacité et toxicité dose-dépendante de l'HCQ, ou des variations inter-patients. Une étude pharmacogénétique

des cytochromes et la mesure de l'incorporation cellulaire d'HCQ dans les myoblastes primaires issus de patients ont mise en évidence une absence de variabilité inter-patient. Nous avons ensuite montré *in vitro* qu'une concentration élevée d'HCQ (10 μ M) induisait un blocage de l'autophagie en modifiant le pH endolysosomal, effets non observés à des doses plus faibles (0,1 et 1 μ M). Par ailleurs, nous avons montré une accumulation de ROS, et par conséquent d'ADN oxydé, en condition de jeûne dans les myoblastes. Cette accumulation a été prévenue par une faible concentration d'HCQ (1 μ M). Ainsi, nous avons montré *in vitro* que l'HCQ agit de façon dose-dépendante, renforçant le blocage de l'autophagie à forte dose, et réduisant « l'oxydation cellulaire » à plus faible dose. Ces résultats pourraient expliquer que des concentrations élevées d'HCQ entraînent la survenue d'épisodes aigus de RM chez les patients atteints d'un déficit en lipin-1, et que des effets bénéfiques soient observés à de plus faibles concentrations.



Hydroxychloroquine sulfate: A novel treatment for lipin-1 deficiency?

Perrine Renard^a, Laure Caccavelli^{a,b}, Antoine Legendre^{c,1}, Caroline Tuchmann-Durand^{b,d,1}, David Balakirouchenane^e, Benoit Blanchet^{e,f}, Céline Narjoz^g, Marjolène Straube^{a,b}, Arnaud Hubas^h, Alexa Garrosⁱ, Karine Mention^j, Nathalie Bednarek^k, Nicolas Goudin^l, Christine Broissand^m, Joel Schlatter^m, Salvatore Cisternino^{m,n}, Nicolas Cagnard^o, Peter van Endert^{a,p}, Julien Diana^a, Hortense de Calbiac^{a,b}, Pascale de Lonlay^{a,b,*}

^a Université Paris Cité, INSERM, CNRS, Institut Necker Enfants Malades, F-75015 Paris, France

^b Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Institut Imagine, Filière G2M, MetabERN, F-75015 Paris, France

^c Centre de référence Malformations Cardiaques Congénitales Complexes M3C - Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75015 Paris, France

^d Institut Imagine, Centre d'Investigation Clinique pour les Thérapies innovantes, Département de Biothérapie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75015 Paris, France

^e Département de pharmacocinétique et pharmacochimie, Centre Hospitalier Universitaire Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), CARPEM, F-75014 Paris, France

^f Université Paris Cité, PRES Sorbonne Paris Cité, CARPEM, Faculté de Pharmacie, INSERM U-1268 / CNRS UMR-8038, FR-750006 Paris, France

^g Service de Biochimie, Hôpital Universitaire Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75015 Paris, France

^h Service de biochimie et Génétique Moléculaire, Laboratoire de culture cellulaire, Hôpital Universitaire Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75014 Paris, France

ⁱ Centre de compétence des maladies héréditaires du métabolisme, Hôpital Universitaire Grenoble Alpes, Filière G2M, Grenoble, France

^j Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme, Hôpital Universitaire Jeanne de Flandre, Filière G2M, MetabERN, Lille, France

^k Centre de compétence des maladies héréditaires du métabolisme, Hôpital Universitaire, Filière G2M, Reims, France

^l Cell Imaging & Flow Cytometry Core Facilities, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris, France

^m Service de Pharmacie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75015 Paris, France

ⁿ Université Paris Cité, Optimisation Thérapeutique en Neuropsychopharmacologie, INSERM UMRS-1144, F-75006 Paris, France

^o Université Paris Cité, Bioinformatiques, SFR Necker, INSERM US-24 / CNRS UAR-3633, F-75015 Paris, France

^p Service Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, F-75015 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

LPIN1
Hydroxychloroquine
Autophagy
Oxidative stress
Treatment

ABSTRACT

Background: Lipin-1 deficiency is a life-threatening disease that causes severe rhabdomyolysis (RM) and chronic symptoms associated with oxidative stress. In the absence of treatment, Hydroxychloroquine sulfate (HCQ) was administered to patients off label use on a compassionate basis in order to improve their physical conditions.

Methods: Eleven patients with *LPIN1* mutations were treated with HCQ. Clinical and biological efficacy and tolerance were assessed, including pain and quality of life, physical capacities, cardiopulmonary parameters, creatine kinase levels and plasma proinflammatory cytokines. To explore a dose-dependent effect of HCQ, primary myoblasts from 4 patients were incubated with various HCQ concentrations in growth medium (GM) or during starvation (EBSS medium) to investigate autophagy and oxidative stress.

Findings: Under HCQ treatment, patient physical capacities improved. Abnormal cardiac function and peripheral muscle adaptation to exercise were normalized. However, two patients who had the highest mean blood HCQ concentrations experienced RM. We hypothesized that HCQ exerts deleterious effects at high concentrations by blocking autophagy, and beneficial effects on oxidative stress at low concentrations. We confirmed in primary myoblasts from 4 patients that high *in vitro* HCQ concentration (10 μ M) but not low concentration (1 μ M and 0.1 μ M) induced autophagy blockage by modifying endolysosomal pH. Low HCQ concentration (1 μ M) prevented reactive oxygen species (ROS) and oxidized DNA accumulation in myoblasts during starvation.

* Correspondence to: Inserm U1151, Institut Necker Enfants-Malades, 160 rue de Vaugirard, Paris, France.

E-mail address: pascale.delonlay@aphp.fr (P. de Lonlay).

¹ These authors contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.114813>

Received 9 March 2023; Received in revised form 26 April 2023; Accepted 30 April 2023

Available online 5 May 2023

0753-3322/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Interpretation: HCQ improves the condition of patients with lipin-1 deficiency, but at low concentrations. *In vitro*, 1 μ M HCQ decreases oxidative stress in myoblasts whereas higher concentrations have a deleterious effect by blocking autophagy.

1. Introduction

LPIN1 mutations cause recurrent episodes of severe rhabdomyolysis (RM) triggered by febrile illness, fasting or exercise [1–3]. Episodes of RM usually occur in infancy and rarely in adulthood [4,5]. The poor prognosis is due to complications, including renal failure, hyperkalemia and arrhythmia that occur despite the use of aggressive management in intensive care units [6,7]. Between RM episodes, patients have normal or subnormal creatine kinase (CK) levels but can experience muscle pain and weakness, and cardiomyopathy [5,8]. Cardiac dysfunction contributes to the poor prognosis [6,8], and lipin-1 has specific roles in cardiac lipid metabolism [9,10]. There is no treatment for this severe disease where a third of the patients die during RM crisis [2,6,11]. Corticosteroids is the only short-term treatment which could be proposed at the time of RM to decrease the inflammatory burst [12]. Altogether, there is a crucial need to identify a treatment.

Lipin-1 is abundantly expressed in adipocytes and skeletal muscle and plays several roles [13]. In the cytoplasm, lipin-1 functions as a phosphatidic acid phosphatase (PAP1, EC 3.1.3.4) that dephosphorylates phosphatidic acid to diacylglycerol (DAG), contributing to triacylglycerol and membrane phospholipid biosynthesis [14]. Alternatively, under fasting conditions, lipin-1 translocates to the nucleus and is responsible for the regulation of genes involved in the mitochondrial β -oxidation pathway to ensure adequate fuel for metabolism [15]. Consequently, lipin-1-deficient animal models present with abnormal triglyceride levels, lipodystrophy [16] and abnormal expression of various transcription factors [15], with early death in a fly model under starvation conditions [17]. However, patients with lipin-1 deficiency display neither lipodystrophy nor decreased expression patterns of PGC-1 α , PPARs and SREBP1 in adipocytes [18] and in skeletal muscle [19]. The key mechanism of RM results in defects in autophagy and mitophagy, processes particularly crucial for skeletal muscle during fasting and exercise [20], in both animal models and humans [21,22]. These defects arise from abnormal phospholipid synthesis, notably a decrease in phosphatidylinositol 3-kinase (PKD)-Vps34 and its product phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) [21,22]. In myoblasts from our patients, we have previously reported that the decreased PI3P levels at the membrane of late endosomes alters the Armus GTPase activating protein that binds to PI3P, and consequently Ras-related protein 7 in brain (Rab7) activity, which has a major role in autophagy and mitophagy [22].

A defect in autophagy, in particular mitophagy, can lead to increased oxidative stress and inflammation in myoblasts of patients with lipin-1 deficiency under stress conditions [22]. Indeed, altered mitochondria accumulate and increase both reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial DNA (mtDNA), a natural ligand of Toll-like receptor 9 (TLR9). Inflammation, related to the hyperactivation of TLR9, has been also confirmed in patients' sera with high levels of pro-inflammatory cytokines especially during flares. Thus, lipin-1 deficiency is an emerging inflammatory metabolic disease, with acute episodes recently being treated with corticosteroids [12]. Hydroxychloroquine sulfate (HCQ) is well known to decrease TLR9 activity, essential property in the indication of immune-mediated inflammatory disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE). Moreover, in the past decade, antioxidative activities of HCQ have emerged [23,24]. Here, we treated eleven patients with HCQ, starting with the doses proposed for SLE and showed that patients improved their physical capacities. Despite the clinical benefit observed in patients, two patients with high blood HCQ concentrations (1000 μ g/L, concentrations recommended in SLE) had recurrence of RM. Then, we postulated that HCQ could have a dual effect in patients

depending on its blood concentration, improving chronic symptoms below 700 μ g/L and be deleterious at 1000 μ g/L. To test this hypothesis, primary myoblasts were incubated with various HCQ concentrations in feeding or in fasting conditions. *In vitro*, we showed that 10 μ M of HCQ exacerbated autophagy blockage in patients' myoblasts, while low concentrations (1 μ M) did not and reduced oxidative stress (ROS and oxidized DNA levels).

2. Methods

2.1. *In vivo* study: action of HCQ on patients' physical capacities

Patients with lipin-1 deficiency harbored two *LPIN1* variants found by PCR analysis of DNA from blood [2] or next-generation sequencing with an HiSeq (Illumina) using Agilent technologies probes. This disease was suspected in young children with severe and recurrent RM triggered by fasting. In the absence of biological markers, genetic study was directly performed.

In the absence of treatment for this life-threatening disease, we obtained the approval of the local Ethics Committee (Committee for the Protection of Persons (CPP) Ile de France II) to treat patients with HCQ off label use on a compassionate basis (CPP reference 2015–09–12). Each patient or legal representative was informed of the benefits and risks associated with HCQ. We collected consent forms from patients or parents/legal representatives. This paper describes clinical and biological data collected from medical records issued from this retrospective and observational study off label use.

The efficacy and safety of HCQ in patients were assessed by clinical and biological evaluations performed at baseline (before HCQ treatment) and at regular intervals after the initiation of HCQ treatment when patients were routinely examined. The evaluation of the tolerance of HCQ included examinations for allergies and abdominal pain, ophthalmoscopy and retinography at 0, 12, and 24 months after HCQ treatment initiation.

The clinical parameters encompassed the number of RM episodes and several parameters of heart and muscle function based on age.

The VAS questionnaire was completed by patients and their parents to evaluate muscle pain, with responses of 4 (not painful) to 40 (very painful). Two quality-of-life assessments (PedsQL™), adapted to the age of the patient, were completed by either the patients or parents. The score ranged from 4 (very good quality of life) to 92 (very poor quality of life). VAS and PedsQL™ scores were not administered to P2, P5 and P7 because they suffered from other diseases (see above).

The 6MWT and 3MST [25] were performed in the subgroup of patients > 6 years old. The objectives were to walk and climb steps as far as possible for 6 and 3 min, respectively. These tests were not administered to P7 (intellectual disability).

Systolic cardiac function was evaluated using heart ultrasounds using a Vivid 9 system (General Electric Vingmed Ultrasound, Horten, Norway) [8,26]. The LVEF was measured by biplane left ventricular end-diastolic and end-systolic cavity volumes calculated using Simpson's rule from paired apical four-chamber and two-chamber echocardiographic images [26].

Patients \geq 6 years old except one (P7, intellectual disability), underwent CPETs to assess their maximal exercise capacity using a cycle ergometer with cardiac output assessment using a thoracic bioelectrical impedance device as previously described [8]. We calculated the slope of the relationship between cardiac output (L/min) (Q) and oxygen utilization (L/min) (VO₂) during exercise (dQ/dVO₂ slope) using measurements of Q and VO₂ at rest as well as during submaximal and

maximal exercise. Normally, cardiac output increases by 5–6 liters per liter of supplementary oxygen utilized (dQ/dVO₂ slope at 5), even when the subject is deconditioned. In contrast, a high dQ/dVO₂ slope (>> 5) is observed when the oxidative phosphorylation of exercising skeletal muscles is impaired including patients with lipin-1 deficiency [27,28]. This parameter was not relevant in P3, who had impaired cardiac function that affected the cardiac output response to exercise.

The biological parameters measured in blood or plasma were CK levels, HCQ concentrations, and inflammatory cytokine levels. A molecular study of genes encoding drug metabolism enzymes was performed.

Blood samples were collected in 5 mL EDTA tubes, then stored at +4 °C until HCQ assay. After protein precipitation, HCQ concentration was assayed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Pharmacology/Toxicology Department of the University Hospitals Cochin and La Pitié-Salpêtrière) [29]. HCQ concentrations in lysed myoblasts were also measured by HPLC-FD.

Cytokine concentrations were measured in plasma using a ten-plex Cytometric Bead Assay (CBA) kit from BD Biosciences according to the manufacturer's instructions and then analyzed by flow cytometry (ARIA II; BD Biosciences) with CBA Analysis Software (FCAP Array version 3.0; Soft Flow, St Louis Park, Minnesota). The results were expressed in picograms per milliliter.

CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8 and CYP2D6 genotyping was performed in the Biochemistry Laboratory of European Georges-Pompidou University Hospital. DNA was extracted from whole blood using the Maxwell_16 LEV Blood DNA kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions. CYP3A4 * 22, CYP3A5 * 3, CYP2C8 * 3 and CYP2C8 * 4 were detected by allelic discrimination real-time PCR using Taq Man Drug Metabolism Genotyping Assays (C_59013445_10, C_26201809_30; C_25625782_20, C_25761568_20; Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, France). The 9 exons of the CYP2D6 gene and the 5 bp of exon flanking regions were sequenced using next-generation sequencing (Ion AmpliSeq™ Custom IAD71386_241, Life Technologies™, Carlsbad, CA). Complete deletion (CYP2D6 *5) and gene duplication (CYP2D6 *2xN) were detected by quantitative PCR using TaqMan allelic discrimination.

Table 1
Clinical characteristics of eleven patients suffering from lipin-1 deficiency.

Patient	Sex	Number of rhabdomyolysis episodes (CK > 6 000 U/L)	Chronic symptoms	Variants	Amino acid change
P1	M	6	Muscle pain Fatigability	c.0.1162 C>T/c.0.1162 C>T	p.Arg388X p.Arg388X
P2	M	5	Muscle pain Fatigability Crohn's disease#	c.0.1162 C>T/c.0.1162 C>T	p.Arg388X p.Arg388X
P3	M	1	Muscle pain Fatigability Cardiac failure at age 17 years	c.1441 + 2 T > C c.2295-866_2410-30del	p.Asn417LysfsX22 p.Glu766_Ser838del
P4	M	3	Muscle pain Fatigability	c.1441 + 2 T > C c.2295-866_2410-30del	p.Asn417LysfsX22 p.Glu766_Ser838del
P5	F	3	Muscle pain Fatigability Psychiatric symptoms #	c.1441 + 2 T > C c.2295-866_2410-30del	p.Asn417LysfsX22 p.Glu766_Ser838del
P6	F	2	No	c.1642del c.1642del	p.Ser548Profs* 45 p.Ser548Profs* 45
P7	F	2	Syndromic intellectual disability #	c.0.181 C>T c.0.181 C>T	p.Arg61X p.Arg61X
P8	F	0	No	c.1642del c.1642del	p.Ser548Profs* 45 p.Ser548Profs* 45
P9	M	4	No	c.2295-863_2410-27del c.2295-863_2410-27del	p.Glu766_Ser838del p.Glu766_Ser838del
P10	M	3	Muscle pain Fatigability	c.377_380dup c.2295-863_2410-27del	p.Met128GlnfsX45 p.Glu766_Ser838del
P11	M	4	Muscle pain Fatigability	c.0.2041 G>A c.2295-863_2410-27del	p.Gly681Arg p.Glu766_Ser838del

Clinical characteristics of the lipin-1-deficient patients, including sex, the number of rhabdomyolysis episodes before treatment with hydroxychloroquine (HCQ) sulfate, chronic symptoms and mutations. P1 and P2 are brothers; P3, P4 and P5 are siblings; P6 and P8 are sisters. M, male; F, female; CK, creatine kinase; #, not linked to lipin-1 deficiency.

2.2. In vitro study: HCQ effect on autophagy and oxidative stress

Because high blood concentrations of HCQ were associated with RM in patients, *in vitro* studies of HCQ dose-effect were performed on primary myoblasts (M1 to M4) from the skeletal muscle (deltoid) biopsy samples of 4 patients (P1, P4, P6 (Table 1) and another untreated patient harboring the same homozygous deletion as P6, although unrelated). Myoblasts were isolated and grown as previously described [19]. The biopsy collection was declared to the *Ministère de la Santé*, and the study was approved by the CPP. No protein expression could be detected in myoblasts from patients by Western blot analysis (data not shown) [19]. To mimic environmental stress, GM was replaced by EBSS medium (ref: 24010043, ThermoFisher Scientific) with or without the TLR9 agonist CpGA (ODN2216, ref: tlr1-2216-5, InvivoGen). These primary myoblasts were incubated with various HCQ concentrations (0.1 µM, 1 µM, 10 µM) in growth medium (GM) or in stress conditions. HCQ was incubated overnight and maintained during myoblasts' culture with and without stress. We investigated autophagy (LC3II levels), lysosomal pH, ROS levels (CellROX®) and DNA alterations (8-OHdG detection).

2.3. Concentration of HCQ in patients' myoblasts

Patient myoblasts were incubated with 1 µM HCQ for 16 h and then lysed with 500 µL RIPA buffer. HCQ concentrations were measured with a method adapted from a previously published HPLC method (Pharmacology/Toxicology Department of the University Cochin Hospital) [29]. HCQ concentrations were normalized to the protein concentration of each lysate, as determined by the classic bicinchoninic acid (BCA) assay.

2.4. Reactive oxygen species (ROS) quantification

Intracellular ROS were measured using 10 µM CellROX™ deep red reagent (ref: C10422, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Specificity was assessed by incubating myoblasts with tert-butyl hydroperoxide (TBHP, ref: C10491, Invitrogen) to induce

chemical oxidative stress with or without N-acetyl cysteine (NAC, ref: C10491, InvitroGen) as an antioxidant (Fig. S3A). Fluorescence was detected within 2 h with a confocal microscope (spinning disk, Zeiss) using a 63x (NA 1,4) oil immersion objective. The total level of cellular fluorescence was quantified with FIJI software (v 2.3.0/1.53f51) and expressed as the corrected total cell fluorescence (CTCF) = integrated density – (area of selected cell X mean fluorescence of background readings) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

2.5. Immunofluorescence (IF) staining for LC3 and 8-OHdG

LC3 and oxidized DNA levels in myoblasts were assessed by IF after staining with rabbit-anti-LC3B (1:100, clone 4E12, MBL International) or mouse-anti-8-OHdG (1:100, sc-66036, Santa Cruz Biotechnology), respectively. The incubation of myoblasts with TBHP induced oxidized DNA, which was detected by the mouse-anti-8-OHdG antibody (Fig. S3B). Fluorescence was detected by confocal fluorescence microscopy on a spinning disk microscope (Zeiss) using a 63x (NA 1.4) oil immersion objective. Quantification was performed by analyzing cells using Ilastik (v1.3.3 post3) and Icy software (v 1.9.5.1 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) as previously described [22]. Figures were made with a FIJI plugin: FigureJ (v 1.36).

2.6. Western blot analysis for LC3 and lysosomal pH studies

Autophagy induced by starvation was analyzed by the accumulation of LC3-II (1:1000, clone 4E12, MBL International), and quantification was performed by standardization to the β -actin level (1/1000, ref: sc-81178, Santa Cruz Biotechnology). Lysosomal pH was assessed with cathepsin D maturation (mouse anti cathepsin D dil 1:1000, ref sc-377299, Santa Cruz Biotechnology), as previously described [22].

2.7. RNAseq data analysis from the literature data

To compare modifications of gene expression by different Chloroquine (CQ) concentrations in myoblasts, we analyzed published data from transcriptomic study on myotonic dystrophy type 1 (DMT1) myoblasts. The raw data and the raw count tables of a previous study stated that “increased muscleblind levels by CQ treatment improves myotonic dystrophy type 1 phenotypes *in vitro* and *in vivo* models” [30], and these data are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository under the ID GSE128844. Read count normalizations and group comparisons were performed by three independent and complementary statistical methods: Deseq2, edgeR, and LimmaVoom. Flags were computed from counts normalized to the mean coverage. All normalized counts < 20 were considered background (flag 0), and those ≥ 20 were considered signal (flag=1). P50 lists were used for the statistical analysis to regroup the genes showing flag= 1 for at least half of the compared samples. The results of the three methods were filtered at a p value ≥ 0.05 and fold changes of 1.2, 1.5, and 2 were compared and grouped by Venn diagram. Statistical computing and functional analyses were carried out using R project (<http://www.ingenuity.com>) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, <http://www.r-project.org>), respectively.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software using a two-tailed, paired Wilcoxon rank test for clinical data and Kruskal–Wallis or Mann–Whitney tests for *in vitro* data.

2.9. Role of funders

The role of the funders was to allow *in vitro* studies on patients' myoblasts.

3. Results

In the absence of treatment for lipin-1 deficiency apart from short-term corticoids during RM [12], eleven patients with lipin-1 deficiency, 9 children and 2 adults born from 7 families, were enrolled for open-label use as a compassionate treatment (Table 1). The patients reported severe episodes of RM defined as creatine kinase (CK) levels > 6 000 U/L (normal < 160 U/L) triggered by viral illness, fasting or prolonged exercise, except one (P8, the sibling of P6) who was less than two years old. This last patient was treated without waiting for a RM because her brother died of RM and her sister had several severe RM. Seven patients (P1 to P5, P10, P11) presented with chronic symptoms such as muscle pain, fatigability, exercise intolerance, or more rarely, cardiac features that developed at 17 years (P3) [31] (Table 1). P2 also presented with Crohn's disease, P5 with psychosis and P7 with distinct syndromic intellectual disability.

The 11 patients were treated with oral HCQ during a mean [min-max] period of 33 [6–53] months (Table 2) and we retrospectively collected clinical and biological data. The first patients (P1 to P7) were treated with HCQ at an initial dose of 6.5 mg/kg/day in one intake (the dose indicated for SLE), not exceeding 400 mg/day. Tablets (200 mg) were administered to patients over 6 years old, and soluble forms were administered to patients under 6 years old [32]. Because of the possible deleterious effect of HCQ at high concentration (autophagic flux blockage, see below), the dosage was adjusted according to whole blood HCQ concentrations during the treatment period for P6 and from the beginning of their treatment for the next treated patients, P8 to P11, to achieve a therapeutic concentration between 200 and 700 μ g/L.

3.1. *In vivo* study - Clinical and biological effects of HCQ in lipin-1 deficient patients

Neither allergy symptoms nor retinopathy were observed. Side effects associated with HCQ were abdominal pain in 5 patients (P1 to P5).

3.1.1. Clinical physical performances, cardiac function and hemodynamic response to exertion

Under HCQ treatment, we observed a general improvement in physical condition for all the patients, especially the 7 patients experiencing chronic muscle or cardiac symptoms.

The assessment of pain using a visual analog scale (VAS) questionnaire completed by the patients and their parents showed an improvement in 5 tested patients (median score: 12 before treatment with HCQ; 7 under treatment; $p = 0.058$) and no difference in the 2 patients who had no pain during their RM crises (Fig. 1A).

Before treatment, quality-of-life assessment (Pediatric Quality of Life Inventory (PedsQL™)) revealed an elevated median score of 26 in the 7 patients, suggesting a poor quality of life. Under treatment, the quality of life perceived by the children and their parents was significantly improved (median score of 14, $p = 0.016$) (Fig. 1B).

The distance walked during the 6-minute walk test (6MWT) increased following treatment compared to results obtained prior to HCQ treatment in all patients except one ($p = 0.055$) (Fig. 1C). Similarly, under HCQ treatment, patients significantly climbed a higher number of steps during the 3-minute step test (3MST) ($p = 0.013$) (Fig. 1D), confirming that HCQ treatment improved their physical performance.

All patients but one (P3) displayed normal resting cardiac function before and under treatment, as determined by echocardiography. P3 exhibited slight left ventricular dysfunction at rest (left ventricular ejection fraction (LVEF) at 50% then 45%) and a lack of increased stroke left ventricular volume during cycle ramp exercise [8]. The patient's LVEF improved from 45% to 62% 3 months after HCQ initiation, which remained stable at 63% in the subsequent evaluations. Afterward, he stopped HCQ after 12 months of treatment (noncompliance), and his cardiac dysfunction worsened, with an LVEF of 55% at 18 months.

Table 2
Follow-up of eleven patients suffering from lipin-1 deficiency and treated with HCQ.

Patient	Age at the beginning of treatment (years)	Treatment duration (months)	Number of severe RM episodes (CK > 6 000 U/L) during treatment	Plasma HCQ ($\mu\text{g}/\text{L}$) mean (median)	HCQ dosage ($\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) mean (median)
P1	7	39	0	318 (325)	5.99 (6.06)
P2	12	37	0	116 (116)	3.43 (3.43)
P3	17	12	0	724 (854)	6.93 (6.93)
P4	11	12	0	627 (597)	5.49 (5.49)
P5	7	12	1	1048 (955)	6.81 (6.81)
P6	4	12	2	1040 (1092)	6.35 (6.25)
P7	9	53	0	541 (420)	3.60 (3.46)
Adjusted doses					
P6	4	19	0	599 (516)	3.92 (4.02)
P8	2	6	1	290 (263)	2.63 (2.68)
P9	4	33	0	634 (332)	3.77 (3.84)
P10	20	35	0	630 (516)	2.28 (2.27)
P11	24	10	0	253 (253)	2.86 (2.86)

Rhabdomyolysis (RM) characteristics for lipin-1-deficient patients with age at the beginning of treatment, treatment duration, number of severe rhabdomyolyses under HCQ treatment, whole blood HCQ concentration and posology. P6, P8, P9, P10 and P11 received adjusted doses.

Five out of six patients had an abnormally high dQ/dVO_2 slope (ranging from 7 to 9.1) during cardiopulmonary exercise tests (CPETs) (Fig. 1E), a marker of altered oxidative phosphorylation of skeletal muscle during exercise. P10 developed an acute episode of RM (max. CK levels 75 000 U/L) following the baseline test. Under HCQ treatment, no patient experienced RM after an exertion test. The muscle performance of the five patients improved under HCQ treatment, as demonstrated by the decrease in their dQ/dVO_2 slope (Fig. 1E), in favor of an improvement of the oxidative phosphorylation of exercising skeletal muscles. When they stopped HCQ treatment, submaximal exercise test performance worsened for P1, P2 and P5, with a dramatic increase in the dQ/dVO_2 slope over the range of normal values for P2 and P5 (Fig. 1E).

All these data show that HCQ treatment improves exercise skeletal muscle performance parameters and/or resting cardiac function.

3.1.2. Number of RM episodes related to blood HCQ concentration

A summary of the number of RM episodes prior to and under HCQ treatment is shown in Tables 1 and 2, respectively. The number of RM episodes before treatment was 33 for all 11 patients. Under treatment, 8 patients did not experience any acute RM episode, but P5, P6 and P8 experienced one, two and four RM episodes, respectively. These latter occurred in the context of gastroenteritis or viral infection (Table 2). Measurements of whole blood HCQ levels showed that 2 of the patients who experienced RM episodes (P5, P6) presented with the highest HCQ concentrations, with mean concentrations of 1048 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 1040 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectively (Table 2). Because of the possible deleterious effect of HCQ at a high concentration (autophagic flux blockage, see below) [33], we decided to reduce HCQ doses. The goal was to achieve target concentrations between 200 and 700 $\mu\text{g}/\text{L}$ in these patients. Afterward, none of the patients with dose optimization (P6, P9, P10 and P11) experienced a RM episode except P8; their median whole blood HCQ level ranged from 253 to 634 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Table 2). P8 (the sibling of P6) continued to experience severe RM episodes despite lower whole blood HCQ concentrations (< 700 $\mu\text{g}/\text{L}$); HCQ treatment was therefore discontinued.

Because P8 experienced RM despite HCQ dose adjustment based on the whole blood HCQ concentration, we could not exclude the existence of a patient-dependent effect as described for SLE patients. In SLE patients, variation in whole blood HCQ concentrations has been associated with polymorphisms of the drug metabolism enzyme CYP450 [34]. The main enzymes involved in HCQ metabolism (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8 and CYP2D6) were genotyped in all included patients. No difference in the pharmacogenetics results of P8 and that of other patients was found (table S1).

3.1.3. Plasma levels of inflammatory cytokines on HCQ treatment

As patients with lipin-1 deficiency presented with high inflammatory states during RM flares [22], we measured circulating levels of inflammatory cytokines in plasma from patients before and during HCQ treatment. Plasma levels of Interleukine 8 (IL-8) (Fig. 1F) and Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Fig. 1G) were decreased during HCQ treatment in all patients tested.

3.2. In vitro study - HCQ impacts autophagy and oxidative stress in primary myoblasts

As the two patients who experienced RM under treatment had high blood HCQ concentrations and as HCQ is known to block autophagy, we suspected that high HCQ concentration could be deleterious in patients with lipin-1 deficiency. We tested this hypothesis in primary myoblasts (M1-M4) obtained from 4 patients with lipin-1 deficiency [22], incubated with different HCQ concentrations in GM or in stress conditions. Autophagy and oxidative stress were studied. Because autophagy is blocked by HCQ at 10 μM [35–37], we tested whether lower HCQ concentrations (1 μM and 0.1 μM) also modulate it.

3.2.1. HCQ incorporation in the myoblasts of the different patients

In order to confirm that there is no difference in HCQ cellular metabolism between patients, we compared HCQ incorporation in the 4 patients' myoblasts by HPLC. Our results showed that HCQ uptake was equally effective in all primary myoblasts, with a median HCQ concentration of 0.094 A.U. (0.057–0.1333) (Fig. S1). Because no significant differences in HCQ incorporation were observed among the myoblasts of the 4 patients, we excluded the fact that HCQ may be differentially incorporated into myoblasts.

3.2.2. Autophagy and pH modification in patients' myoblasts incubated with different concentrations of HCQ

As autophagy blockage is a well-known mechanism of action of HCQ in various models [33], we hypothesized that depending on its concentration, HCQ could worsen the autophagy defect in lipin-1-deficient myoblasts when subjected to starvation (EBSS minimal medium) with or without a TLR9 agonist (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CpGA). This hypothesis was assessed by measuring LC3-II accumulation by immunofluorescence (Fig. 2A) and western blot (Fig. 2B). Both studies show that immunometabolic stress induced the formation of LC3-positive vacuoles indicating autophagy induction. Moreover, HCQ induced LC3 accumulation in a dose-dependent manner, with a drastic effect at 10 μM and a smaller or no effect at lower concentrations (Fig. 2A). Western blot analysis indicated that 10 μM HCQ increased LC3-II levels by a factor of 10.

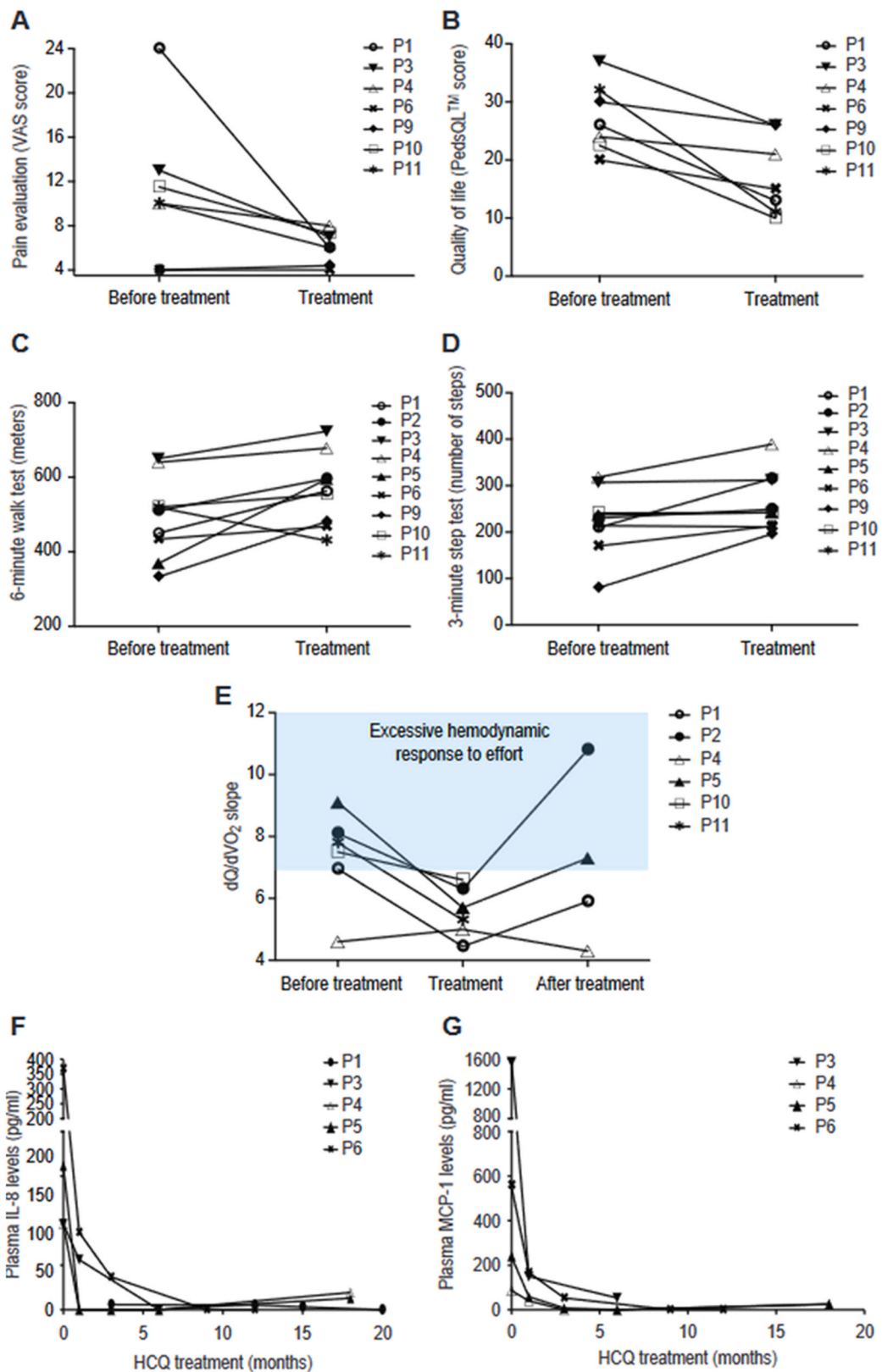


Fig. 1. Improvements in chronic symptoms under hydroxychloroquine (HCQ) treatment in eleven patients suffering from lipin-1 deficiency. Clinical evaluation of lipin-1-deficient patients prior to and following treatment with hydroxychloroquine (HCQ) based on the assessment of A) pain with a visual analog scale (VAS); B) quality-of-life with the Pediatric Quality of Life Inventory™ (PedsQL™) adapted to age for children and their parents; C) the 6-minute walk test (6MWT) distance; D) the 3-minute step test (3MST) number of steps; and E) cardiac output and oxygen uptake relationship upon exertion (dQ/dVO_2 slope). (F,G) Inflammatory cytokine (IL-8 and MCP-1) levels in the plasma of lipin-1-deficient patients were also measured prior to and following treatment with HCQ.

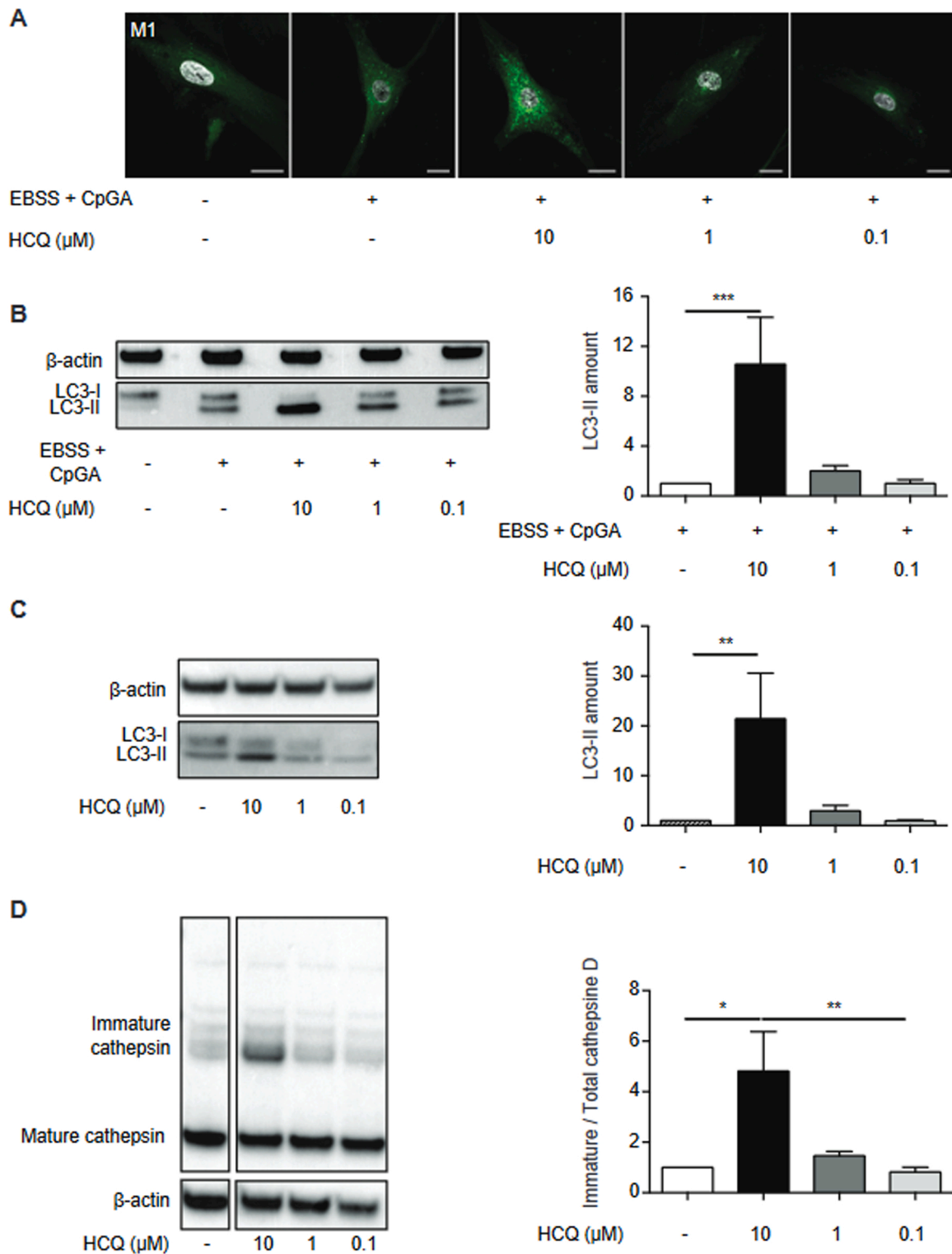


Fig. 2. High HCQ concentration potentiates the accumulation of autophagosomes observed under stress conditions and increases lysosomal pH at steady state. (A-C) Total amount of LC3 (light chain 3) II measured after the incubation of patient primary myoblasts in basal conditions (GM) or nutrient-poor medium (EBSS) with the TLR9 agonist CpGA (EBSS+CpGA), both alone or with the addition of HCQ at different concentrations (0.1, 1 or 10 μM). A) LC3 staining by immunofluorescence of patient primary myoblasts (scale=20 μm). B, C) Representative immunoblots of LC3 and their quantification after treatment with different HCQ concentrations under stress conditions (B) or steady-state conditions (C). D) Representative immunoblots of cathepsin D (a pH-dependent protease) cleavage and their quantification after treatment with different HCQ concentrations at steady state. Data = mean ± standard error of the mean (SEM); 4 independent patient's myoblasts; expression by fold change in comparison to EBSS+CpGA (B) or GM (C and D); Mann-Whitney test between GM and EBSS+CpGA, Kruskal-Wallis test between GM or EBSS+CpGA and different HCQ concentrations (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

However, lower concentrations were less deleterious, with a 2-fold LC3-II increase at 1 μM and no effect at 0.1 μM (Fig. 2B). Similar results were observed under basal conditions: 10 μM HCQ increased basal LC3-II levels (21-fold), whereas 1 μM HCQ increased LC3-II levels by a factor of 2.9, and 0.1 μM HCQ had no effect on LC3-II (Fig. 2C).

As previously described [33], we postulated that autophagy blockage results from pH alkalization. We analyzed pH modification by assessing cathepsin D maturation, which requires low pH. We showed that cathepsin D maturation was decreased with a high concentration of 10 μM HCQ but not with 1 μM or 0.1 μM , indicating that these concentrations do not modify lysosomal pH (Fig. 2D). These data suggest that *via* its effect on pH, a high concentration of HCQ potentiates autophagy blockage in lipin-1-deficient myoblasts which is deleterious for patients, while low concentrations of HCQ do not exert this deleterious action.

We previously described an accumulation of ROS and oxidized DNA in myoblasts from lipin-1-deficient patients [22]. Thus, we determined whether HCQ could modulate these two parameters to explain the clinical protective effect of HCQ at low concentrations.

3.2.3. ROS production in patients' myoblasts incubated with different concentrations of HCQ

As previously described, starvation induced a rapid and substantial accumulation of ROS (7.6- to 23.4-fold) in lipin-1-deficient myoblasts (Fig. 3). Since HCQ has been described with anti-oxidative actions [23, 24], we tested this function in patients' myoblasts. In all patient's cells, the ROS accumulation was reduced by HCQ treatment in a dose-dependent manner (Fig. 3). Altogether, the strongest effect was observed at 1 μM HCQ, with a significant mean fold reduction (from 1.5 to 3.4) compared to the starvation condition ($p = 0.011$). The 0.1 μM HCQ concentration led to a similar decrease (1.1–3.6). In contrast, with a 10 μM HCQ concentration, ROS levels were decreased only in myoblasts from one patient (M3, 1.5-fold) (Fig. 3). These *in vitro* results confirm that low concentrations of HCQ have beneficial effects on cellular oxidative stress.

3.2.4. Oxidized DNA in patients' myoblasts incubated with different concentrations of HCQ

One consequence of high intracellular ROS is DNA damage, leading to increased levels of oxidized DNA, as previously shown in lipin-1-deficient myoblasts [22]. As expected, immunofluorescence with an anti-8-OHdG antibody revealed an accumulation of oxidized DNA upon starvation compared to basal conditions (from 1.7- to 8.1-fold) (Fig. 4). In all myoblasts, except those from one patient (M2), HCQ (1 μM and 0.1 μM) induced a reduction in 8-OHdG ranging from 1.7 to 60-fold when compared to starvation conditions (Fig. 4). At 10 μM HCQ, 8-OHdG levels were variable among patients' myoblasts (Fig. 4).

3.2.5. Re-analysis of a transcriptomic analysis published in the literature using myoblasts incubated with different concentrations of Chloroquine

To understand which mechanisms of action could explain the action of HCQ on oxidative stress in myoblasts, we analyzed transcriptomic data from the immortalized-derived myoblasts of patients suffering from myotonic dystrophy type 1 (DM1) treated with 2 concentrations (0.1 or 10 μM) of Chloroquine (CQ) [30]. Our new analysis of the raw count tables showed a total enrichment of 9 642 genes with treatment by CQ 0.1 μM and CQ 10 μM compared to untreated cells (fold induction of 1.2 for this analysis) (Fig. S2A). The transcript expression profile of the samples treated with CQ 0.1 μM was similar to that of untreated samples (489 modulated genes), whereas we observed strong differential expression in transcripts between samples treated with CQ 10 μM and untreated samples (9 493 genes modulated, Fig. S2B). This suggests a more specific action of CQ at low concentrations and a wide range of nonspecific actions at high concentrations. As an example, we explored the enrichment of genes related to autophagy (a list of 875 genes generated by Ingenuity Pathway Analysis software). There was an

enrichment of more than 50% of autophagy-related genes under CQ treatment at 10 μM (522 genes) and less than 5% under CQ treatment at 0.1 μM (19 genes) (Fig. S2B). These results confirm the strong dose-dependent impact of CQ/HCQ on autophagy.

4. Discussion

The present study provides the first *in vivo* and *in vitro* data on HCQ in lipin-1-deficient patients who experience acute life-threatening RM episodes, associated in some patients with chronic symptoms comprising fatigability, muscle pain, impaired peripheral skeletal muscle adaptation to exertion and, more rarely, cardiac damage [8]. Patients were treated under compassionate use in the absence of any other treatment. The data were retrospectively collected from medical records. The overall condition of muscles in treated patients improved, including muscle pain, walking, climbing capacities and submaximal exercise tests along with their quality of life. The cardiac symptoms of the patient who had cardiac dysfunction improved but then worsened after treatment disruption. The first treated patients did not experience any RM episode under HCQ treatment, and in addition to the improvement in their clinical parameters, their plasma inflammatory profiles were normalized. Based on these preliminary data, we obtained the Orphan Drug Designation from the European Medicines Agency for HCQ (EMA/OD/177/17) in January 2018.

However, the following two treated patients (P5 and P6) presented 1 and 2 RM episodes, respectively, in the context of gastroenteritis. Because both patients had the highest whole blood HCQ concentrations (>1000 $\mu\text{g/L}$), we suspected that high blood concentrations could have deleterious effects and we went back to an *in vitro* study on patients' myoblasts to investigate this hypothesis. We have assumed that HCQ can differentially act depending on its *in vitro* concentration on autophagy and oxidative stress. In line with this, although less toxic than CQ, severe long-term and dose-dependent complications of HCQ have been reported, including cardiomyopathy [38] and vacuolar myopathy. These complications are due to the lysosomotropic effect of the drug and the disruption of autophagosome-lysosome fusion, extensively described in the literature [33], including transcriptomic studies [30] (Fig. S2). Thus, we postulated that blocking autophagy with high concentrations of HCQ can be dangerous in patients, notably patients with comorbidities in whom autophagy blockage preexists, e.g., patients with lipin-1 deficiency in the present study but also patients with coronavirus disease (COVID-19) [39], often elderly, in whom autophagy is already impaired [40].

Our *in vitro* results on lipin-1-deficient myoblasts validate the hypothesis of the dose-dependent effect of HCQ on autophagy. Stress conditions induced LC3-II accumulation, which drastically increased when myoblasts received a high concentration of HCQ (10 μM) whereas low concentrations (0.1, 1 μM) were less effective. As described in other models [33], we showed that autophagy blockage in myoblasts results from the effect of HCQ on pH alkalization. Interestingly, in our study, autophagy blockage and pH alkalization were restricted to high concentrations of HCQ, as they were not observed at lower concentrations of HCQ (1 μM or 0.1 μM). Altogether, these results advise caution when using this drug and the importance of whole blood monitoring of HCQ over the treatment course [39] despite the fact that no direct relationship could be made between *in vitro* and *in vivo* HCQ concentrations. Interestingly, therapeutic doses of HCQ vary accordingly to the disease. In inflammatory auto-immune diseases, as SLE for example, whole blood HCQ concentrations ranging from 750 to 1000 $\mu\text{g/L}$ are necessary to improve refractory symptoms [41] by blocking autophagy and altering lysosomal pH in overactivated immune cells [23,24]. In lipin-1 disease, these high concentrations appeared to be deleterious by blocking autophagy.

We next investigated which intracellular mechanisms may explain the beneficial action of HCQ at low concentrations (below 700 $\mu\text{g/L}$) on lipin-1-related chronic symptoms. As previously shown, lipin-1-deficient

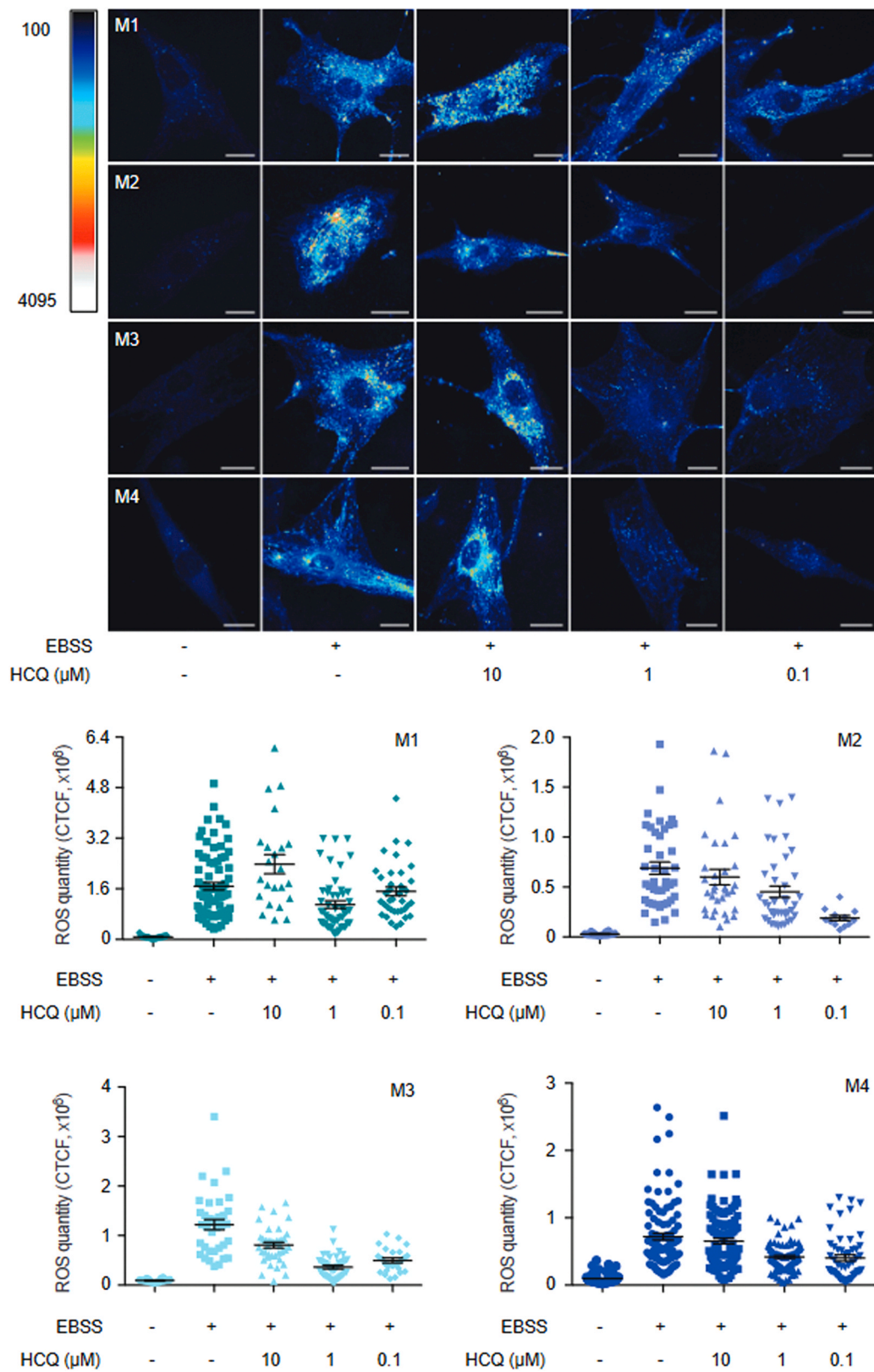


Fig. 3. Low concentration hydroxychloroquine (HCO) at 1 μM decreases intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation under stress conditions. Intracellular ROS quantity measured after the incubation of patient primary myoblasts in basal conditions (GM) or nutrient-poor medium (EBSS), alone or with the addition of HCO at different concentrations (0.1, 1 or 10 μM). CellROX® staining by fluorescence (intensity indicated by royal Lookup Tables (LUT); scale= 20 μM) and the quantification of the corrected total cell fluorescence (CTCF) for each patient cells. Data = mean ± standard error of the mean (SEM); 4 independent patient myoblasts.

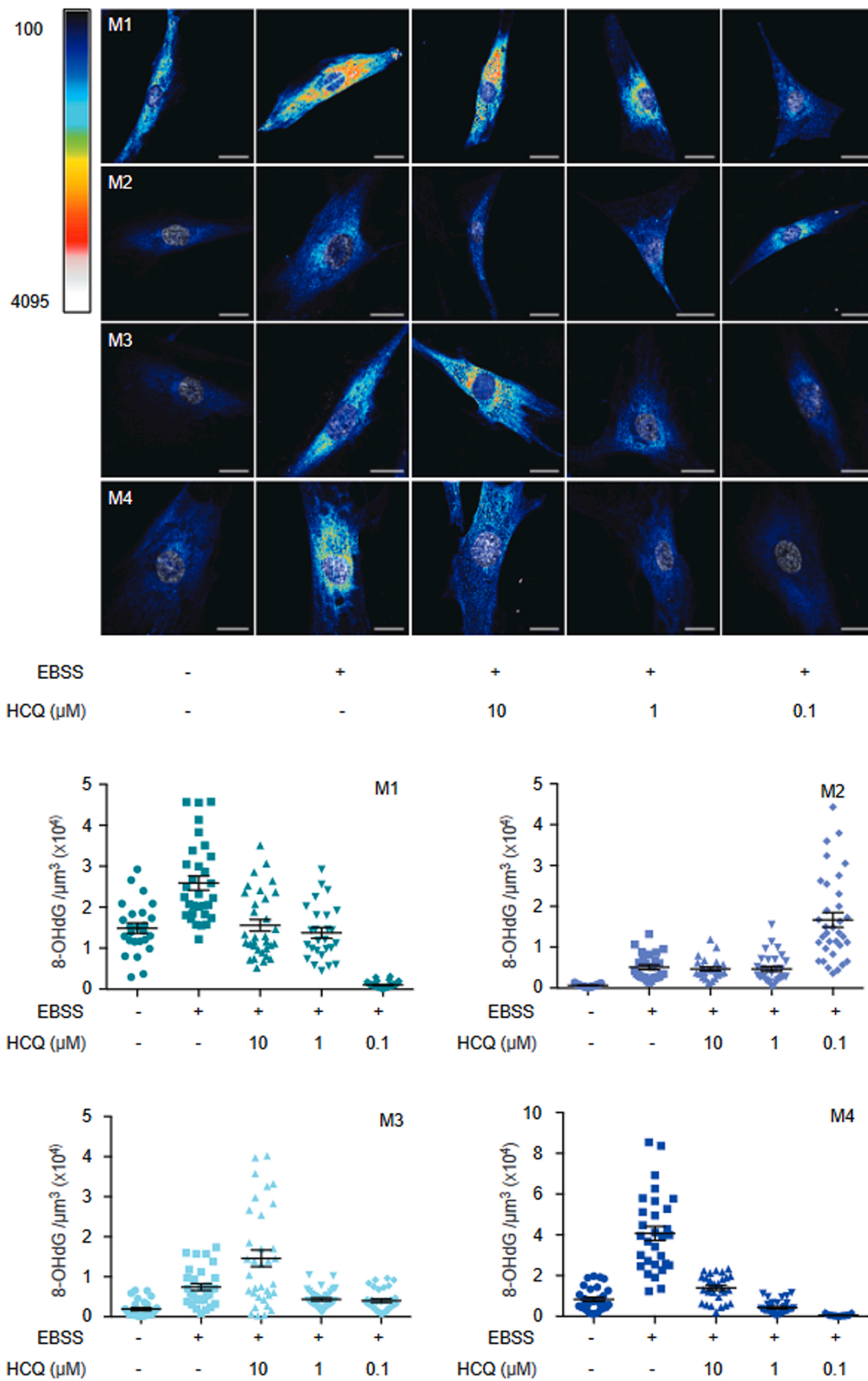


Fig. 4. Low concentration hydroxychloroquine (HCQ) at 1 μM decreases oxidized DNA accumulation under stress conditions. Oxidized DNA quantity measured the after incubation of patient primary myoblasts in basal conditions (GM) or nutrient-poor medium (EBSS), alone or with the addition of HCQ at different concentrations (0.1, 1 or 10 μM). 8-OHdG staining by immunofluorescence (intensity indicated by royal LUT; scale=20 μM) and the quantification of fluorescence intensity for each patient cells. Data = mean \pm standard error of the mean (SEM); 4 independent patient myoblasts.

myoblasts respond to metabolic stress by an increased accumulation of ROS, leading to a subsequent increase in DNA alteration. CQ has been previously described to be able to decrease ROS levels by impacting both ROS production and degradation. HCQ and CQ have been shown to decrease ROS levels *via* a decrease of NOX complexes activity in both *in vitro* and *in vivo* models, e.g. in cases of SLE [42] and other models [43–46]. CQ can improve the antioxidant system by increasing the activity of the transcription factor Nrf2, leading to expression of antioxidant genes both *in vitro* and *in vivo* [47,48]. Interestingly, our results showed that HCQ was able to reduce starvation-induced ROS and oxidized DNA accumulation and that the optimal concentration to obtain beneficial action was 1 μ M, while HCQ at 10 μ M was less effective. Future work should focus on the exact mechanism by which HCQ reduces oxidative stress. Thus, the effects of HCQ at high concentrations on autophagy blockage and its antioxidant effects at lower concentrations may have significant implications in patient populations and requires concentration monitoring for their safety [39]. Thus, we continued to offer this treatment at low doses to our lipin-1 deficient patients, with whole blood HCQ monitoring to achieve target concentrations between 200 and 700 μ g/L.

Despite the improvements in the chronic symptoms in our patients treated with low concentrations of HCQ, the youngest patient (P8) displayed RM regardless of the HCQ concentration. The pharmacokinetics of HCQ is known to be largely variable between patients treated for SLE [49]. Some clinical and biological characteristics such as Body Mass Index, renal function and cytochrome P450 (CYP) polymorphism have been identified as determinants of this variability [34,50]. In the present study, we did not find any influence of CYP polymorphisms on neither whole blood HCQ exposure nor HCQ myoblast incorporation.

During RM, we recommend the discontinuation of HCQ because the patients are at risk of renal failure, and HCQ is eliminated through the kidneys. We also propose a short course of systemic corticosteroids following emergency admission for RM or for situations at risk of RM, in association with supportive treatment (hydration and close monitoring of complications) [12].

In conclusion, HCQ at a low concentration improves the physical capacities of patients with lipin-1 deficiency (whole blood HCQ < 700 μ g/L) and decreases oxidative stress in patients' myoblasts (*in vitro* HCQ concentration 1 μ M). This treatment could be given in the baseline condition of patients with chronic symptoms associated with corticosteroids during episodes of acute RM.

Funding

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV1-0020-01), the Association Française contre les Myopathies (grant numbers 13988, 15947), the Fondation Bettencourt (2012), the Fondation de l'Avenir (grant number 09071), the Fondation Lejeune (grant 2014), the Fondation Maladies Rares, the Université Paris Cité (prix Sauvons la vie), the University Hospital Necker Enfants Malades (prix thérapeutique) and patient associations (Nos Anges, AMMI, association OPPH, No Myolyse, des ailes pour L).

Author contributions

Conceptualization: PR, LC, HDC, PDL. Methodology: PR, LC, AL, NC, HDC, PDL. Investigation: all. Resources: HDC, PDL. Writing – Original Draft: PR, LC, HDC, PDL. Supervision: LC, HDC, PDL. Funding Acquisition: PDL.

Funding

ANR, AFM, No Myolyse, University Paris Cité.

Declaration of Competing Interest

PVE and PDL have filed PCT (WO/2017/085115; EP3377095; PCT/EP2016/077843) and US patent applications (US20180325890). PVE and PDL have filed PCT (WO/2019/020732; PCT/EP2018/070256) patent applications. The remaining authors have no competing interests.

Data Availability

Raw data and materials are available.

Acknowledgments

The authors thank Fatima Djouadi for technical assistance in isolating human myoblasts from donors and Brigitte Bader-Meunier and Pierre Quartier for technical assistance in treating patients with HCQ.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.biopha.2023.114813.

References

- [1] A. Zeharia, A. Shaag, R.H. Houtkooper, T. Hindi, P. de Lonlay, G. Erez, L. Hubert, A. Saada, Y. de Keyzer, G. Eshel, F.M. Vaz, O. Pines, O. Elpeleg, Mutations in LPIN1 cause recurrent acute myoglobinuria in childhood, *Am. J. Hum. Genet* 83 (2008) 489–494.
- [2] C. Michot, L. Hubert, M. Brivet, L. De Meirleir, V. Valayannopoulos, W. Muller-Felber, R. Venkateswaran, H. Ogier, I. Desguerre, C. Altuzarra, E. Thompson, M. Smitka, A. Huebner, M. Husson, R. Horvath, P. Chinnery, F.M. Vaz, A. Munnich, O. Elpeleg, A. Delahodde, Y. de Keyzer, P. de Lonlay, LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood, *Hum. Mutat.* 31 (2010) E1564–E1573.
- [3] G.G. Schweitzer, S.L. Collier, Z. Chen, J.M. Eaton, A.M. Connolly, R.C. Bucelli, A. Pestronk, T.E. Harris, B.N. Finck, Rhabdomyolysis-associated mutations in human LPIN1 lead to loss of phosphatidic acid phosphohydrolase activity, *JIMD Rep.* (2015).
- [4] T. Minton, N. Forrester, S.A. Baba, K. Urankar, S. Brady, A rare case of adult onset LPIN1 associated rhabdomyolysis, *Neuromuscul. Disord.* (2020).
- [5] K.M. Stepien, W.M. Schmidt, R.E. Bittner, O. O'Toole, B. McNamara, E.P. Treacy, Long-term outcomes in a 25-year-old female affected with lipin-1 deficiency, *JIMD Rep.* 46 (2019) 4–10.
- [6] J. Bergounioux, A. Brassier, C. Rambaud, O. Bustarret, C. Michot, L. Hubert, J. B. Arnoux, A. Laquerriere, S. Bekri, S. Galene-Gomez, D. Bonnet, P. Hubert, P. de Lonlay, Fatal rhabdomyolysis in 2 children with LPIN1 mutations, *J. Pediatr* 160 (2012) 1052–1054.
- [7] J.P. Knochel, Mechanisms of rhabdomyolysis, *Curr. Opin. Rheuma* 5 (1993) 725–731.
- [8] A. Legendre, D. Khraiche, P. Ou, F.X. Mauvais, M. Madrange, A.S. Guemann, J. P. Jais, D. Bonnet, Y. Hamel, P. de Lonlay, Cardiac function and exercise adaptation in 8 children with LPIN1 mutations, *Mol. Genet Metab.* 123 (2018) 375–381.
- [9] B.P. Kok, D.N. Brindley, Myocardial fatty acid metabolism and lipotoxicity in the setting of insulin resistance, *Heart Fail Clin.* 8 (2012) 643–661.
- [10] K.T. Chambers, M.A. Cooper, A.R. Swearingen, R.T. Brookheart, G.G. Schweitzer, C.J. Weinheimer, A. Kovacs, T.R. Koves, D.M. Muoio, K.S. McCommis, B.N. Finck, Myocardial Lipin 1 knockout in mice approximates cardiac effects of human LPIN1 mutations, *JCI Insight* 6 (2021).
- [11] C. Michot, L. Hubert, N.B. Romero, A. Gouda, A. Mamoune, S. Mathew, E. Kirk, L. Viollet, S. Rahman, S. Bekri, H. Peters, J. McGill, E. Glamuzina, M. Farrar, M. von der Hagen, I.E. Alexander, B. Kirmse, M. Barth, P. Laforet, P. Benlian, A. Munnich, M. Jeanpierre, O. Elpeleg, O. Pines, A. Delahodde, Y. de Keyzer, P. de Lonlay, Study of LPIN1, LPIN2 and LPIN3 in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2012).
- [12] C. Tuchmann-Durand, C. Roda, P. Renard, G. Mortamet, C.M. Berat, L. Altenburger, M.H. de Larauz, E. Thevenet, C.H. Cottart, F. Moulin, J. Bouchereau, A. Brassier, J.B. Arnoux, M. Schiff, N. Bednarek, D. Lamireau, A. Garros, K. Menton, A. Cano, L. Finger, M. Pelosi, C.S. Brochet, L. Caccavelli, J. H. Raphalen, S. Renolleau, M. Oualha, P. de Lonlay, Systemic corticosteroids for the treatment of acute episodes of rhabdomyolysis in lipin-1-deficient patients, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2023).
- [13] T.E. Harris, B.N. Finck, Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 226–233.
- [14] M.S. Mitra, Z. Chen, H. Ren, T.E. Harris, K.T. Chambers, A.M. Hall, K. Nadra, S. Klein, R. Chrast, X. Su, A.J. Morris, B.N. Finck, Mice with an adipocyte-specific lipin 1 separation-of-function allele reveal unexpected roles for phosphatidic acid in metabolic regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2012).

- [15] B.N. Finck, M.C. Gropler, Z. Chen, T.C. Leone, M.A. Croce, T.E. Harris, J. C. Lawrence Jr., D.P. Kelly, Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway, *Cell Metab.* 4 (2006) 199–210.
- [16] M. Pterfery, J. Phan, P. Xu, K. Reue, Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin, *Nat. Genet.* 27 (2001) 121–124.
- [17] S.E. Hood, X.V. Kofler, Q. Chen, J. Scott, J. Ortega, M. Lehmann, Nuclear translocation ability of Lipin differentially affects gene expression and survival in fed and fasting *Drosophila*, *J. Lipid Res.* (2020).
- [18] M. Pelosi, E. Testet, S. Le Lay, I. Dugail, X. Tang, G. Mabileau, Y. Hamel, M. Madrange, T. Blanc, T. Odent, T.P.W. McMullen, M. Alfo, D.N. Brindley, P. de Lonlay, Normal human adipose tissue functions and differentiation in patients with biallelic LPIN1 inactivating mutations, *J. Lipid Res.* (2017).
- [19] C. Michot, A. Mamoune, J. Vamecq, M.T. Viou, L.S. Hsieh, E. Testet, J. Laine, L. Hubert, A.F. Dessein, M. Fontaine, C. Ottolenghi, L. Fouillen, K. Nadra, E. Blanc, J. Bastin, S. Candon, M. Pende, A. Munnich, A. Smahi, F. Djouadi, G.M. Carman, N. Romero, Y. de Keyser, P. de Lonlay, Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts, *Biochim Biophys. Acta* 1832 (2013) 2103–2114.
- [20] E. Masiero, L. Agatea, C. Mammucari, B. Blaauw, E. Loro, M. Komatsu, D. Metzger, C. Reggiani, S. Schiaffino, M. Sandri, Autophagy is required to maintain muscle mass, *Cell Metab.* 10 (2009) 507–515.
- [21] P. Zhang, M.A. Verity, K. Reue, Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle, *Cell Metab.* (2014).
- [22] Y. Hamel, F.X. Mauvais, M. Madrange, P. Renard, C. Lebreton, I. Nemazany, O. Pelle, N. Goudin, X. Tang, M.P. Rodero, C. Tuchmann-Durand, P. Nusbaum, D. N. Brindley, P. van Endert, P. de Lonlay, Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis, *Cell Rep. Med.* 2 (2021), 100370.
- [23] E.L. Nirk, F. Reggiani, M. Mauthe, Hydroxychloroquine in rheumatic autoimmune disorders and beyond, *EMBO Mol. Med.* 12 (2020), e12476.
- [24] E. Schrezenmeier, T. Dorner, Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology, *Nat. Rev. Rheuma* 16 (2020) 155–166.
- [25] K. Węgrzynowska-Teodorczyk, D. Mozdżanowska, K. Josiak, A. Siennicka, K. Nowakowska, W. Banasiak, E.A. Jankowska, P. Ponikowski, M. Wozniowski, Could the two-minute step test be an alternative to the six-minute walk test for patients with systolic heart failure? *Eur. J. Prev. Cardiol.* 23 (2016) 1307–1313.
- [26] N.B. Schiller, P.M. Shah, M. Crawford, A. DeMaria, R. Devereux, H. Feigenbaum, H. Gutgesell, N. Reichek, D. Sahn, I. Schnittger, et al., Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2 (1989) 358–367.
- [27] R.G. Haller, Oxygen utilization and delivery in metabolic myopathies, *Ann. Neurol.* 36 (1994) 811–813.
- [28] T. Taiwassalo, T.D. Jensen, N. Kennaway, S. DiMauro, J. Vissing, R.G. Haller, The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: a study of 40 patients, *Brain* 126 (2003) 413–423.
- [29] Y. Qu, G. Noe, A.R. Breaud, M. Vidal, W.A. Clarke, N. Zahr, T. Dervieux, N. Costedoat-Chalumeau, B. Blanchet, Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood, *Future Sci. OA* 1 (2015) FSO26.
- [30] A. Bargiela, M. Sabater-Arcis, J. Espinosa-Espinosa, M. Zulaica, A. Lopez de Munain, R. Artero, Increased muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in vitro and in vivo models, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116 (2019) 25203–25213.
- [31] S.C. Johnson, F. Martinez, A. Bitto, B. Gonzalez, C. Tazaerslan, C. Cohen, L. Delaval, J. Timsit, B. Knebelmann, F. Terzi, T. Mahal, Y. Zhu, P.G. Morgan, M. M. Sedensky, M. Kaerberlein, C. Legendre, Y. Suh, G. Canaud, mTOR inhibitors may benefit kidney transplant recipients with mitochondrial diseases, *Kidney Int* 95 (2019) 455–466.
- [32] S. El Mershati, A. Thouvenin, P.H. Secretan, P. De Lonlay, C. Tuchmann-Durand, S. Gisternino, J. Schlatter, Formulation and stability study of hydroxychloroquine sulfate oral suspensions, *Pharm. Dev. Technol.* 26 (2021) 328–334.
- [33] W.T. Stauber, A.M. Hedge, J.J. Trout, B.A. Schottelius, Inhibition of lysosomal function in red and white skeletal muscles by chloroquine, *Exp. Neurol.* 71 (1981) 295–306.
- [34] J.Y. Lee, N. Vinayagamoorthy, K. Han, S.K. Kwok, J.H. Ju, K.S. Park, S.H. Jung, S. W. Park, Y.J. Chung, S.H. Park, Association of polymorphisms of cytochrome P450 2D6 with blood hydroxychloroquine levels in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheuma* 68 (2016) 184–190.
- [35] P.O. Seglen, B. Grinde, A.E. Solheim, Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin, *Eur. J. Biochem.* 95 (1979) 215–225.
- [36] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in mammalian autophagy research, *Cell* 140 (2010) 313–326.
- [37] D.J. Klionsky, A.K. Abdel-Aziz, S. Abdelfatah, M. Abdellatif, A. Abdoli, S. Abel, H. Abeliovich, M.H. Abildgaard, Y.P. Abuduo, A. Acevedo-Arozena, I. E. Adamopoulos, K. Adeli, T.E. Adolph, A. Adornetto, E. Aflaki, G. Agam, A. Agarwal, B.B. Aggarwal, M. Agnello, P. Agostinis, J.N. Agrewala, A. Agrotis, P. V. Aguilar, S.T. Ahmad, Z.M. Ahmed, U. Ahumada-Castro, S. Aits, S. Aizawa, Y. Akkoc, T. Akoumianaki, H.A. Akpınar, A.M. Al-Abd, L. Al-Akra, A. Al-Gharaibeh, M.A. Alaoui-Jamali, S. Alberti, E. Alcocer-Gomez, C. Alessandri, M. Ali, M.A. Alim Al-Bari, S. Aliwaini, J. Alizadeh, E. Almacellas, A. Almasan, A. Alonso, G.D. Alonso, N. Altan-Bonnet, D.C. Altieri, E.M.C. Alvarez, S. Alves, C. Alves da Costa, M. M. Alzaharna, M. Amadio, C. Amantini, C. Amaral, S. Ambrosio, A.O. Amer, V. Ammanathan, Z. An, S.U. Andersen, S.A. Andrabi, M. Andrade-Silva, A. M. Andres, S. Angelini, D. Ann, U.C. Anozie, M.Y. Ansari, P. Antas, A. Antebi, Z. Anton, T. Anwar, L. Apetoh, N. Apostolova, T. Araki, Y. Araki, K. Arasaki, W. L. Araujo, J. Araya, C. Arden, M.A. Arevalo, S. Arguelles, E. Arias, J. Arikath, H. Arimoto, A.R. Ariosa, D. Armstrong-James, L. Arnaune-Pelloquin, A. Aroca, D. S. Arroyo, I. Arsov, R. Artero, D.M.L. Asaro, M. Aschner, M. Ashrafzadeh, O. Ashur-Fabian, A.G. Atanasov, A.K. Au, P. Auberger, H.W. Auner, L. Aureliano, R. Autelli, L. Avagliano, Y. Avalos, S. Aveic, C.A. Aveleira, T. Avin-Wittenberg, Y. Aydin, S. Ayton, S. Ayyadevara, M. Azzopardi, M. Baba, J.M. Backer, S. K. Backues, D.H. Bae, O.N. Bae, S.H. Bae, E.H. Baehrecke, A. Baek, S.H. Baek, S. H. Baek, G. Bagetta, A. Bagniewska-Zadworna, H. Bai, J. Bai, X. Bai, Y. Bai, N. Bairagi, S. Baksi, T. Balbi, C.T. Baldari, W. Balduini, A. Ballabio, M. Ballester, S. Balazadeh, R. Balzan, R. Bandopadhyay, S. Banerjee, S. Banerjee, A. Banreti, Y. Bao, M.S. Baptista, A. Baracca, C. Barbati, A. Bargiela, D. Barila, P.G. Barlow, S. J. Barmada, E. Barreiro, G.E. Barreto, J. Bartek, B. Bartel, A. Bartolome, G.R. Barve, S.H. Basagoudanavar, D.C. Bassham, R.C. Bast, Jr, A. Basu, H. Batoko, I. Batten, E. E. Baulieu, B.L. Baumgarner, J. Bayry, R. Beale, I. Beau, F. Beaumatin, L.R. G. Bechara, G.R. Beck, Jr, M.F. Beers, J. Begun, C. Behrends, G.M.N. Behrens, R. Bei, E. Bejarano, S. Bel, C. Behl, A. Belaid, N. Belgareh-Touze, C. Bellarosa, F. Belleudi, M. Bello Perez, R. Bello-Morales, J.S.O. Beltran, S. Beltran, D. M. Benbrook, M. Bendorius, B.A. Benitez, I. Benito-Cuesta, J. Bensalem, M. W. Berezowska, D. Bergamaschi, M. Bergami, A. Bergmann, L. Berliocchi, C. Berlioz-Torrent, A. Bernard, L. Berthou, C.G. Besirli, S. Besteiro, V.M. Betin, R. Beyaert, J.S. Bezbradica, K. Bhaskar, I. Bhatia-Kissova, R. Bhattacharya, S. Bhattacharya, S. Bhattacharyya, M.S. Bhuiyan, S.K. Bhatia, L. Bi, X. Bi, T.J. Biden, K. Bijian, V.A. Billes, N. Binart, C. Bincetto, A. B. Birgisdottir, G. Bjorkoy, G. Blanco, A. Blas-Garcia, J. Blasiak, R. Blomgran, K. Blomgren, J.S. Blum, E. Boada-Romero, M. Boban, C. Boesze-Battaglia, P. Boeuf, B. Boland, P. Bomont, P. Bonaldo, S.R. Bonam, L. Bonfilii, J.S. Bonifacino, B. A. Boone, M.D. Bootman, M. Bordi, C. Borner, B.C. Bornhauser, G. Borthakur, J. Bosch, S. Bose, L.M. Botana, J. Botas, C.M. Boulanger, M.E. Boulton, M. Bourdenx, B. Bourgeois, N.M. Bourke, G. Bousquet, P. Boya, P.V. Bozhkov, L.H. M. Bozi, T.O. Bozkurt, D.E. Brackney, C.H. Brands, R.J. Braun, G.H. Braus, R. Bravo-Sagua, J.M. Bravo-San Pedro, P. Brest, M.A. Bringer, A. Briones-Herrera, V.C. Broaddus, P. Brodersen, J.L. Brodsky, S.L. Brody, P.G. Bronson, J. M. Brunstein, C.N. Brown, R.E. Brown, P.C. Brum, J.H. Brumell, N. Brunetti-Pierri, D. Bruno, R.J. Bryson-Richardson, C. Bucci, C. Buchrieser, M. Bueno, L.E. Buitrago-Molina, S. Buraschi, S. Buch, J.R. Buchan, E.M. Buckingham, H. Budak, M. Budini, G. Bultynck, F. Burada, J.R. Burgoyne, M.I. Buron, V. Bustos, S. Buttner, E. Butturini, A. Byrd, I. Cabas, S. Cabrera-Benitez, K. Cadwell, J. Cai, L. Cai, Q. Cai, M. Cairo, J.A. Calbet, G.A. Caldwell, K.A. Caldwell, J.A. Call, R. Calvani, A. C. Calvo, M. Calvo-Rubio Barrera, N.O. Camara, J.H. Camonis, N. Camougrand, M. Campanella, E.M. Campbell, F.X. Campbell-Valois, S. Campello, I. Campesi, J. C. Campos, O. Camuzard, J. Cancino, D. Candido de Almeida, L. Canesi, I. Caniggia, B. Canonico, C. Canti, B. Cao, M. Caraglia, B. Carames, E.H. Carchman, E. Cardenal-Munoz, C. Cardenas, L. Cardenas, S.M. Cardoso, J.S. Carew, G.F. Carle, G. Carleton, S. Carloni, D. Carmona-Gutierrez, L.A. Carneiro, O. Carnevali, J. M. Carosi, S. Carra, A. Carrier, L. Carrier, B. Carroll, A.B. Carter, A.N. Carvalho, M. Casanova, C. Casas, J. Casas, C. Cassioli, E.F. Castillo, K. Castillo, S. Castillo-Lluya, F. Castoldi, M. Castori, A.F. Castro, M. Castro-Caldas, J. Castro-Hernandez, S. Castro-Oregon, S.D. Catz, C. Cavadas, F. Cavaliere, G. Cavallini, M. Cavinato, M.L. Cayuela, P. Cebollada Rica, V. Cecarini, F. Cecconi, M. Cechowska-Pasko, S. Cenci, V. Ceperuelo-Mallafre, J.J. Cerqueira, J.M. Cerutti, D. Cervia, V. B. Cetintas, S. Cetruolo, H.J. Chae, A.S. Chagin, C.Y. Chai, G. Chakrabarti, O. Chakrabarti, T. Chakraborty, T. Chakraborty, M. Chami, G. Chamilos, D. W. Chan, E.Y.W. Chan, E.D. Chan, H.Y.E. Chan, H.H. Chan, H. Chan, M.T.V. Chan, Y.S. Chan, P.K. Chandra, C.P. Chang, C. Chang, H.C. Chang, K. Chang, J. Chao, T. Chapman, N. Charlet-Berguerand, S. Chatterjee, S.K. Chaube, A. Chaudhary, S. Chauhan, E. Chaum, F. Checler, M.E. Cheetham, C.S. Chen, G.C. Chen, J.F. Chen, L.L. Chen, L. Chen, L. Chen, M. Chen, M.K. Chen, N. Chen, Q. Chen, R.H. Chen, S. Chen, W. Chen, W. Chen, X.M. Chen, X.W. Chen, X. Chen, Y. Chen, Y.G. Chen, Y. Chen, Y. Chen, Y.J. Chen, Y.Q. Chen, Z.S. Chen, Z. Chen, Z.H. Chen, Z.J. Chen, Z. Chen, H. Cheng, J. Cheng, S.Y. Cheng, W. Cheng, X. Cheng, X.T. Cheng, Y. Cheng, Z. Cheng, Z. Chen, H. Cheong, J.K. Cheong, B.V. Chernyak, S. Cherry, C. F.R. Cheung, C.H.A. Cheung, K.H. Cheung, E. Chevet, R.J. Chi, A.K.S. Chiang, F. Chiaradonna, R. Chiarelli, M. Chiariello, N. Chica, S. Chiozza, M. Chiong, S. H. Chiou, A.I. Chiramel, V. Chiurchiu, D.H. Cho, S.K. Choe, A.M.K. Choi, M.E. Choi, K.R. Choudhury, N.S. Chow, C.T. Chu, J.P. Chua, J.J.E. Chua, H. Chung, K. P. Chung, S. Chung, S.H. Chung, Y.L. Chung, V. Gianfaneli, I.A. Ciechomska, M. Cifuentes, L. Cinque, S. Cirak, M. Cirone, M.J. Clague, R. Clarke, E. Clementi, E. M. Coccia, P. Codogno, E. Cohen, M.M. Cohen, T. Colasanti, F. Colasuonno, R. A. Colbert, A. Colell, M. Colic, N.S. Coll, M.O. Collins, M.I. Colombo, D.A. Colon-Ramos, L. Combaret, S. Comincini, M.R. Cominetti, A. Consiglio, A. Conte, F. Conti, V.R. Contu, M.R. Cookson, K.M. Coombs, I. Coppens, M.T. Corasaniti, D.P. Corkery, N. Cordes, K. Cortese, M.D.C. Costa, S. Costantino, P. Costelli, A. Coto-Montes, P. J. Crack, J.L. Crespo, A. Criollo, V. Crippa, R. Cristofani, T. Csizmadia, A. Cuadrado, B. Cui, J. Cui, Y. Cui, Y. Cui, E. Culetto, A.C. Cumino, A.V. Cybulsky, M.J. Czajka, S.J. Czuczwar, S. D'Adamo, M. D'Amelio, D. D'Arcangelo, A. C. D'Lugos, G. D'Orazi, J.A. da Silva, H.S. Dafsari, R.K. Dagda, Y. Dagdas, M. Daglia, X. Dai, Y. Dai, Y. Dai, J. Dal Col, P. Dalhaimer, L. Dalla Valle, T. Dallenga, G. Dalmaso, M. Damme, I. Dando, N.P. Dantuma, A.L. Darling, H. Das, S. Dasarthy, S.K. Dasari, S. Dash, O. Daumke, A.N. Dauphinee, J.S. Davies, V.A. Davila, R.J. Davis, T. Davis, S. Dayalan Naidu, F. De Amicis, K. De Bosscher, F. De Felice, L. De Franceschi, C. De Leonibus, M.G. De Mattos Barbosa, G.R.Y. De Meyer, A. De Milito, C. De Nunzio, C. De Palma, M. De Santi, C. De Virgilio, D. De Zio, J. Debnath, B.J. DeBosch, J.P. Decuyper, M.A. Deehan, G. Deflorian,

- D. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, H.L. Zhang, J. Zhang, J. Zhang, J.P. Zhang, K.Y.B. Zhang, L.W. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, M. Zhang, P. Zhang, S. Zhang, W. Zhang, X. Zhang, X. W. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, X.D. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhang, Y.D. Zhang, Y. Zhang, Y.Y. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang, Z. Zhang, Z. Zhang, Z. Zhang, Z. Zhang, H. Zhao, L. Zhao, S. Zhao, T. Zhao, X. F. Zhao, Y. Zhao, Y. Zhao, Y. Zhao, Y. Zhao, G. Zheng, K. Zheng, L. Zheng, S. Zheng, X.L. Zheng, Y. Zheng, Z.G. Zheng, B. Zhivotovsky, Q. Zhong, A. Zhou, B. Zhou, C. Zhou, G. Zhou, H. Zhou, H. Zhou, H. Zhou, J. Zhou, J. Zhou, J. Zhou, J. Zhou, K. Zhou, R. Zhou, X.J. Zhou, Y. Zhou, Y. Zhou, Y. Zhou, Z.Y. Zhou, Z. Zhou, B. Zhu, C. Zhu, G.Q. Zhu, H. Zhu, H. Zhu, H. Zhu, W.G. Zhu, Y. Zhu, Y. Zhu, H. Zhuang, X. Zhuang, K. Zientara-Rytter, C.M. Zimmermann, E. Ziviani, T. Zoladek, W. X. Zong, D.B. Zorov, A. Zorzano, W. Zou, Z. Zou, Z. Zou, S. Zuryin, W. Zwerschke, B. Brand-Saberi, X.C. Dong, C.S. Kenchappa, Z. Li, Y. Lin, S. Oshima, Y. Rong, J. C. Sluimer, C.L. Stallings, C.K. Tong, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1), *Autophagy* 17 (2021) 1–382.
- [38] N.B. Ratliff, M.L. Estes, J.L. Myles, E.K. Shirey, J.T. McMahon, Diagnosis of chloroquine cardiomyopathy by endomyocardial biopsy, *N. Engl. J. Med* 316 (1987) 191–193.
- [39] A. Besaratinia, A.W. Caliri, S. Tommasi, Hydroxychloroquine induces oxidative DNA damage and mutation in mammalian cells, *DNA Repair (Amst.)* 106 (2021), 103180.
- [40] S. Kaushik, I. Tasset, E. Arias, O. Pampliega, E. Wong, M. Martinez-Vicente, A. M. Cuervo, Autophagy and the hallmarks of aging, *Ageing Res Rev.* 72 (2021), 101468.
- [41] F. Chasset, C. Frances, Current concepts and future approaches in the treatment of cutaneous lupus erythematosus: a comprehensive review, *Drugs* 79 (2019) 1199–1215.
- [42] M. Gomez-Guzman, R. Jimenez, M. Romero, M. Sanchez, M.J. Zarzuelo, M. Gomez-Morales, F. O'Valle, A.J. Lopez-Farre, F. Algieri, J. Galvez, F. Perez-Vizcaino, J. M. Sabio, J. Duarte, Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus, *Hypertension* 64 (2014) 330–337.
- [43] R.J. Teng, J. Du, S. Welak, T. Guan, A. Eis, Y. Shi, G.G. Konduri, Cross talk between NADPH oxidase and autophagy in pulmonary artery endothelial cells with intrauterine persistent pulmonary hypertension, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 302 (2012) L651–L663.
- [44] N. Muller-Calleja, D. Manukyan, A. Canisius, D. Strand, K.J. Lackner, Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase, *Ann. Rheum. Dis.* 76 (2017) 891–897.
- [45] S. Miranda, P. Billoir, L. Damian, P.A. Thiebaut, D. Schapman, M. Le Besnerais, F. Jouen, L. Galas, H. Levesque, V. Le Cam-Duchez, R. Joannides, V. Richard, Y. Benhamou, Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced inflammation and endothelial dysfunction, *PLoS One* 14 (2019), e0212614.
- [46] J.M. Kang, H.S. Lee, J. Kim, D.H. Yang, H.Y. Jeong, Y.H. Lee, D.J. Kim, S.H. Park, M. Sung, J. Kim, H.J. An, S.H. Lee, S.Y. Lee, Beneficial effect of chloroquine and amodiaquine on type 1 diabetic tubulopathy by attenuating mitochondrial Nox4 and endoplasmic reticulum stress, *J. Korean Med Sci.* 35 (2020), e305.
- [47] S. Duleh, X. Wang, A. Komirenko, M. Margeta, Activation of the Keap1/Nrf2 stress response pathway in autophagic vacuolar myopathies, *Acta Neuropathol. Commun.* 4 (2016) 115.
- [48] H. Shen, N. Wu, Y. Wang, H. Zhao, L. Zhang, T. Li, M. Zhao, Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis, *Int Immunopharmacol.* 46 (2017) 16–22.
- [49] N. Costedoat-Chalumeau, F. Tamirou, V. Le Guern, B. Blanchet, C. Deligny, J. C. Piette, Blood concentration of hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus care: usefulness and limits, *Rev. Med Interne* 38 (2017) 77–80.
- [50] M. Jallouli, L. Galicier, N. Zahr, O. Aumaitre, C. Frances, V. Le Guern, F. Liote, A. Smail, N. Limal, L. Perard, H. Desmurs-Clavel, D. Le Thi Huong, B. Asli, J. E. Kahn, J. Pourrat, L. Sailler, F. Ackermann, T. Papo, K. Sacre, O. Fain, J. Stirnemann, P. Cacoub, G. Leroux, J. Cohen-Bittan, J. Sellam, X. Mariette, B. Blanchet, J.S. Hulot, Z. Amoura, J.C. Piette, N. Costedoat-Chalumeau, G. Plaquenil Lupus Systemic Study, Determinants of hydroxychloroquine blood concentration variations in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheuma* 67 (2015) 2176–2184.

List of Supplementary Materials

Figs. S1, S2, S3: 3

Tables S: 1

Figure S1. Primary myoblasts from different patients show an absence of hydroxychloroquine (HCQ) cellular incorporation in vitro. HCQ dosage measured by liquid chromatography associated with fluorescence detection (HPLC-FD), in cell lysate of patient's primary myoblasts after their incubation of sixteen hours with HCQ at 1 μ M. Data = mean + standard error of the mean (SEM), 4 independent patient myoblasts (n = 3 for each patient).

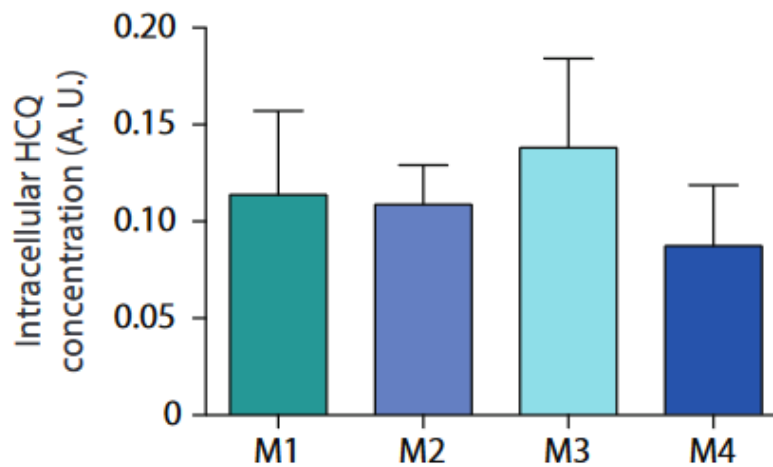


Figure S2. Effect of chloroquine (CQ) on RNA expression of autophagy-related genes. A) Heatmap representing transcript expression of 875 genes related to autophagy under CQ treatment (0.1 or 10 μ M) compared to no treatment condition. B) Venn diagram showing the number of modulated autophagy-related genes compared to the number of total modulated genes under CQ treatment (0.1 and/or 10 μ M).

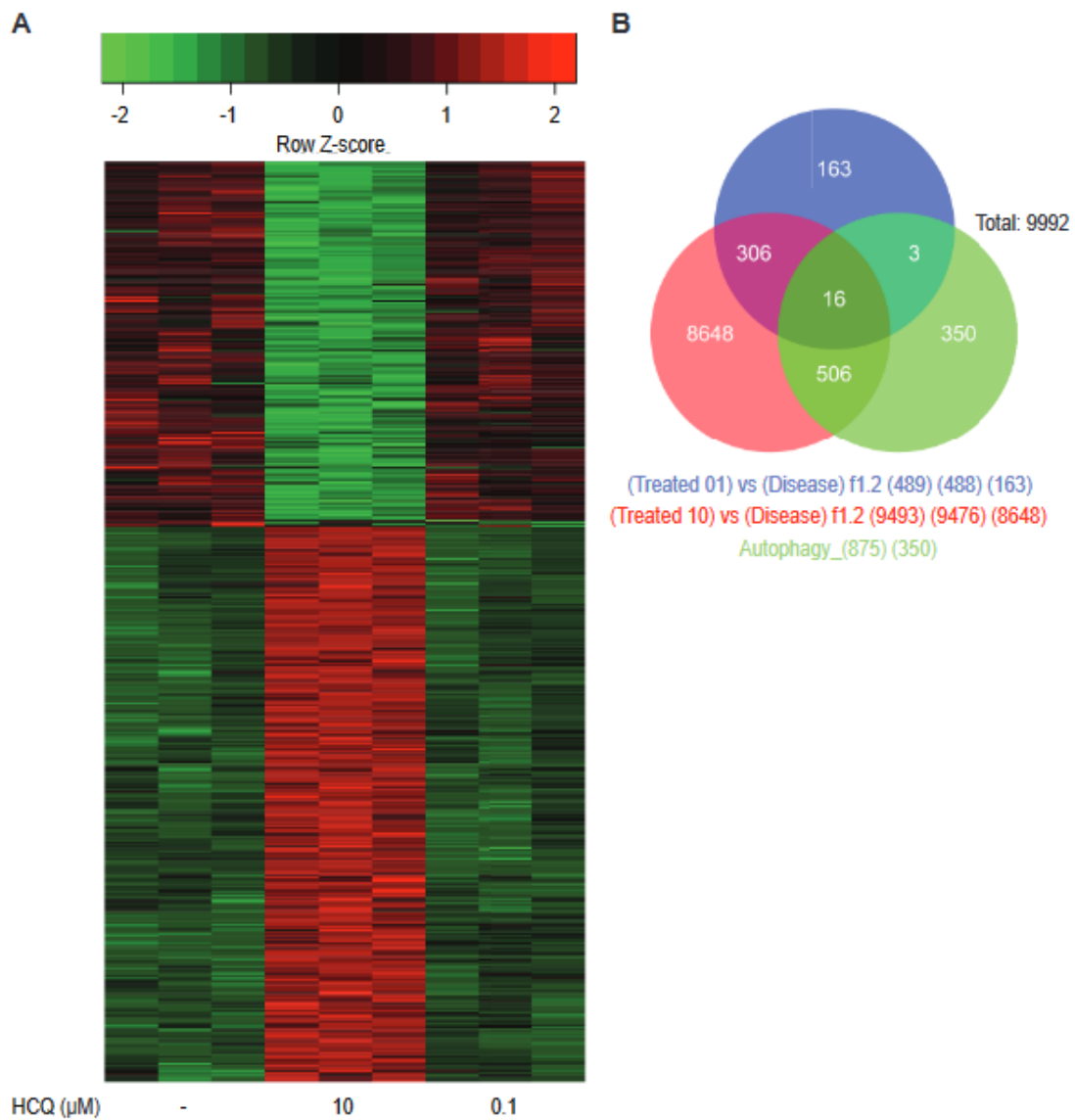


Figure S3. Reactive oxygen species (ROS) and 8-OHdG signals by microscopy are specific of oxidative stress. A) Intracellular ROS quantity measured after the incubation of patient primary myoblasts in basal conditions (GM), alone or with the addition of tert-butyl hydroperoxide (TBHP) during 45 minutes, with or without pre-treatment with N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour, or NAC alone. CellROX® staining by fluorescence (intensity indicated by royal LUT; scale=20 μ M). B) Oxidized DNA quantity measured after the incubation of patient primary myoblasts in basal conditions (GM), alone or with the addition of TBHP during 45 minutes. 8-OHdG staining by immunofluorescence (intensity indicated by royal LUT; scale=20 μ M).

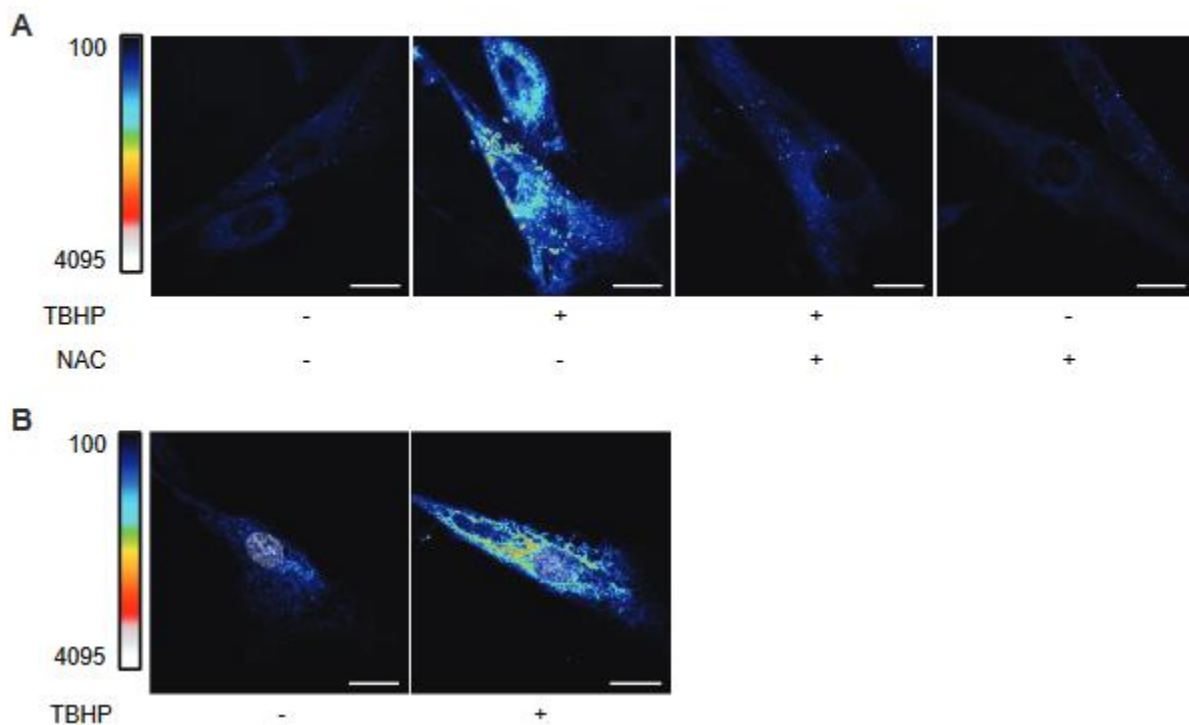


Table S1. Hydroxychloroquine (HCQ) pharmacogenetic study of eleven patients suffered from lipin-1 deficiency. Polymorphism analysis of drug metabolism enzymes CYP450 (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8 and CYP2D6) with the copy number variant and the activity score of CYP2D6 for eleven patients suffered from lipin-1 deficiency and treated by HCQ. Each allele of these enzymes noted *1 for wild allele and the others for mutant allele; a copy variant number and an activity score of CYPD6 equal to 2 are considered as normal; VUS = variation of uncertain significance.

Patient	CYP3A4	CYP3A5	CYP2C8	CYP2D6	CYP2D6 Copy Number Variant	CYP2D6 Activity score
P1	*1*1	*3*3	*1*1	*1*41 + VUS	2	1,5
P2	*1*1	*3*3	*1*1	*1*41 + VUS	2	1,5
P3	*1*1	*1*1	*1*1	*1*1	2	2
P4	*1*1	*3*3	*1*1	*1*1	2	2
P5	*1*1	*3*3	*1*1	*1*1	2	2
P6	*1*1	*3*3	*1*1	*1*1	2	2
P7	*1*1	*3*3	*1*1	*2*2	2	2
P8	*1*1	*3*3	*1*1	*1*1	2	2
P9	*1*1	*3*3	*1*1	*1*35	2	2
P10	*1*1	*3*3	*1*1	*1*35	2	2
P11	*1*1	*3*3	*1*1	*2*2	2	2

B. Caractérisation de l'ADN oxydé

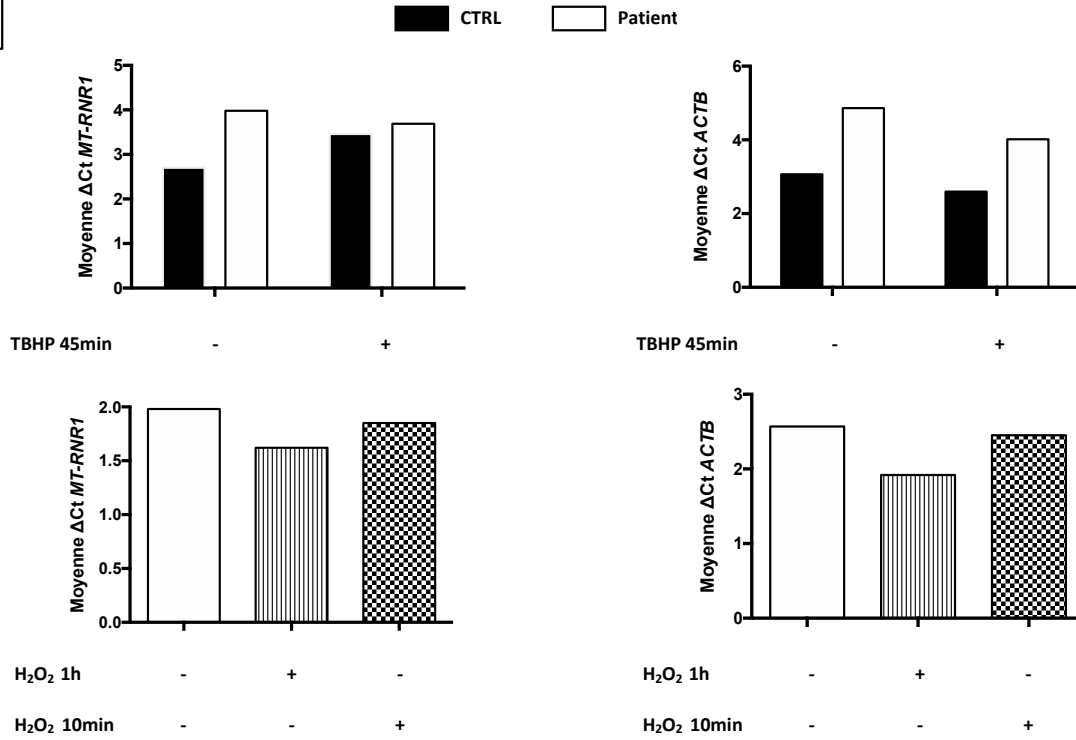
En condition de jeûne, nous avons précédemment observé une augmentation de la quantité d'ADN oxydé, induite par une accumulation intracellulaire de ROS, dans les myoblastes primaires des patients atteints d'un déficit en lipin-1 (Renard *et al.*, 2023(331)). L'introduction d'un traitement par HCQ à la dose de 1 μ M a permis de prévenir cette augmentation d'ADN oxydé (Renard *et al.*, 2023(331)). Par la suite, nous avons donc cherché à caractériser la nature de cet ADN oxydé afin de mieux comprendre les dommages cellulaires du stress oxydatif et les mécanismes sous-jacents de l'effet antioxydant de l'HCQ dans ce contexte pathologique. Du fait de la proximité de l'ADN mitochondrial avec la source principale endogène des ROS, la mitochondrie (Forrester *et al.*, 2018(290)), et l'efficacité moindre de son système de réparation par rapport à celui de l'ADN nucléaire, notre hypothèse est une origine mitochondriale des ROS à l'origine de l'oxydation de l'ADN mitochondrial préférentiellement.

La stratégie utilisée afin de quantifier l'ADN oxydé et d'en déterminer sa nature repose sur des différences d'efficacité d'amplification de gènes d'intérêt mitochondriaux en fonction de leur degré d'oxydation. Pour cela, nous avons utilisé l'enzyme *formamidopyrimidine DNA glycosylase* (FPG), enzyme issue d'*E. coli* et orthologue de l'enzyme humaine *human oxoguanine glycosylase 1* (hOGG1). Cette dernière possède une double fonction glycosylase et lyase qui permet de reconnaître et d'exciser des sites endommagés de l'ADN, dont les motifs 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), bloquant ainsi l'élongation par la polymérase lors d'une *Polymerase chain reaction* (PCR). Ainsi, la différence d'efficacité d'amplification entre la condition traitée et la condition non traitée par l'enzyme FPG, permet de quantifier l'ADN oxydé (Movassaghi *et al.*, 2019(332)). Afin de déterminer la nature de l'ADN oxydé, nous avons utilisé des couples d'amorces amplifiant le gène *MT-RNR1* (12S) pour l'ADN mitochondrial et *ACTB* (β -actine) pour l'ADN nucléaire. Pour la mise au point de cette technique, nous avons utilisé deux composés induisant l'oxydation cellulaire : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à la dose de 1 mM pendant 10 minutes ou 1 heure et le *tert-butyl hydroperoxide* (TBHP) à la dose de 100 μ M sur 45 minutes. Dans des myoblastes primaires, aucune de ces deux molécules ne modifie l'efficacité d'amplification de l'ADN mitochondrial ou nucléaire (Figure 11A), alors que le TBHP augmente la quantité de ROS intracellulaires dans les myoblastes de patients (Renard *et al.*, 2023(331) ; Figure S3). Nous avons fait l'hypothèse que l'absence d'identification d'ADN oxydé par cette technique était due à la petite taille des amplicons (211 et 295 paires de base pour les gènes du 12S et de la β -actine respectivement), qui présentaient une probabilité faible de contenir des nucléotides endommagés comme discuté par Lin *et al.*, 2003(333) et Lin *et al.*, 2008(334)).

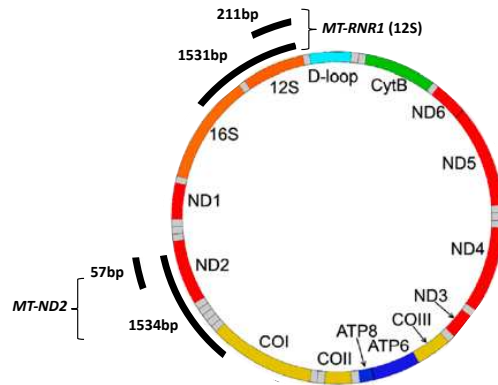
Par la suite, nous avons donc augmenté la taille des amplicons afin d'augmenter la probabilité de modification de l'ADN mitochondrial (1531 et 1534 paires de base pour les gènes *MT-RNR1* et de *MT-ND2* (*NADH dehydrogenase subunit 2*) respectivement). Pour quantifier une éventuelle altération, nous avons normalisé les résultats d'amplification de ces fragments longs sur celle de fragments plus courts du même gène (Figure 11B). L'utilisation du TBHP, dans les conditions oxydantes précédemment décrites, ne montre pas de modification de l'intensité des bandes après PCR. Ce résultat suggère que la présence de motifs 8-OHdG n'est pas suffisante pour inhiber l'ADN polymérase. Afin d'augmenter l'effet de l'oxydation de l'ADN sur l'efficacité d'amplification de la PCR, il a été montré que l'association de l'oxydation à l'action d'une ADN glycosylase, comme l'enzyme FPG, permet de générer une cassure du brin d'ADN bloquant efficacement la polymérase (Vartanian *et al.*, 2017(335) ; Gureev *et al.*, 2017(336)). S'il serait intéressant de réaliser cette étude dans notre modèle, nous avons préféré orienter notre projet vers d'autres stratégies. En effet, un autre marqueur de RM est l'accumulation cytosolique de calcium, paramètre pour lequel nous avons recherché un effet de l'HCQ dans les myoblastes des patients.

Figure 11 : Mise au point de la caractérisation de l'ADN oxydé. Oxydation de l'ADN mesurée après incubation des myoblastes primaires de patients et de contrôles en condition basale avec ou sans traitement par TBHP à 100 μ M ou H_2O_2 à 1 mM. A) Quantification de l'ADN oxydé par mesure de la différence d'efficacité d'amplification (Δ Ct) en PCR des gènes *MT-RNR1* et *ACTB* dans les myoblastes primaires d'un contrôle et d'un patient après traitement par TBHP 45 minutes, et d'un contrôle après traitement par H_2O_2 10 minutes et 1 heure; B) Schéma représentatif de la taille des amplicons pour les amorces *MT-RNR1* et *MT-ND2* utilisées en (C) ; C) Gel représentatif de l'expression des gènes *MT-RNR1* et *MT-ND2* (amplicons longs et courts) après PCR dans les myoblastes primaires d'un patient (P) et d'un contrôle (C) après traitement par TBHP 45 minutes en condition basale.

A



B



C

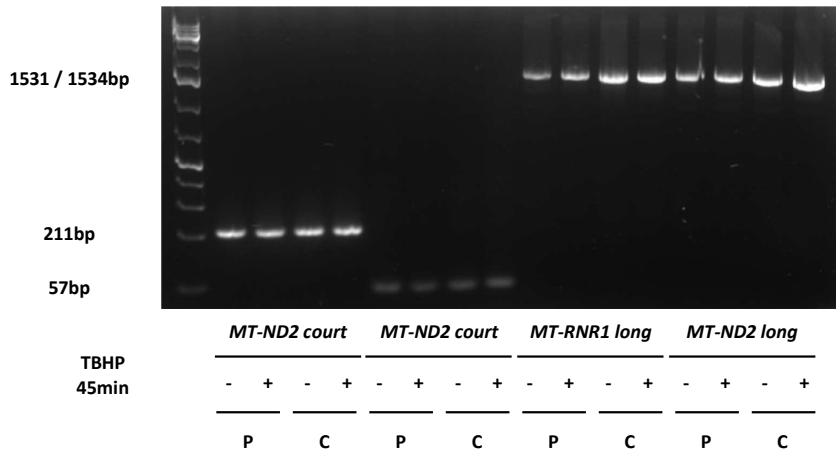
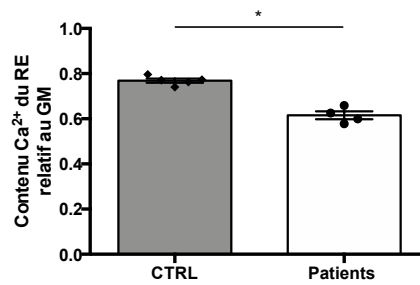


Figure 11 (légende sur la page précédente)

C. Étude du flux calcique dans les myoblastes primaires

L'accumulation de calcium cytosolique dans les fibres musculaires est un point clé dans la physiopathologie de la RM (Giannoglou *et al.*, 2007(9) ; Chavez *et al.*, 2016(11)). Or, le RE est le principal réservoir de calcium intracellulaire, et les échanges calciques avec le cytosol y sont finement régulés (Rossi *et al.*, 2019(7) ; Hyatt et Powers, 2020(8)). De plus, la protéine lipin-1 est localisée au niveau de membranes cellulaires riches en acide phosphatidique comme le RE (Zhang et Reue, 2017(29)) et il a été montré précédemment que son déficit peut entraîner un stress du RE (Rashid *et al.*, 2019(66)). Nous avons donc étudié la régulation du contenu en calcium (Ca^{2+}) du RE dans des myoblastes primaires de patients présentant un déficit en lipin-1 (Figure 12). Nous avons constaté que le jeûne induit une diminution du contenu calcique du RE par rapport à l'état basal dans les myoblastes primaires de patients et de contrôles (diminution moyenne de 38% et 23% respectivement). L'effet du jeûne sur le contenu calcique du RE a été exacerbé significativement chez les patients par rapport aux contrôles ($p = 0,0159$) (Figure 12A). Ce résultat suggère que les myoblastes primaires de patients ont une capacité réduite à remplir le RE ou une capacité augmentée de sortie du calcium du RE en condition de stress métabolique, dont les mécanismes sous-jacents restent à élucider. Par la suite, nous avons montré que le traitement par HCQ aux doses de 10 et 1 μM dans les myoblastes primaires de patients ne permet pas de restaurer l'appauvrissement en calcium du RE en condition de stress métabolique (Figure 12B), suggérant que l'effet bénéfique observé de l'HCQ dans les myoblastes primaires de patients est indépendant de la régulation du calcium au niveau du RE. Dans la suite de notre projet, nous nous sommes donc concentrés sur l'étude de l'HCQ sur le stress oxydatif.

A



B

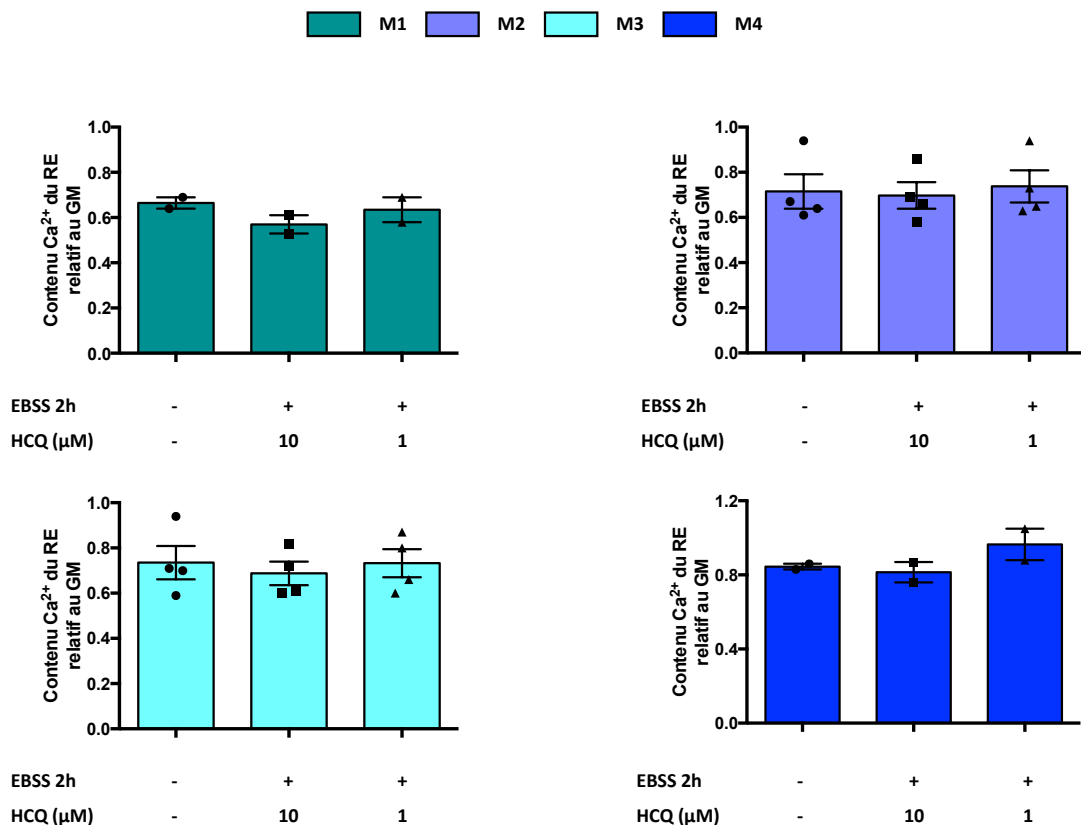


Figure 12 : Le jeûne exacerbe la fuite de calcium du réticulum endoplasmique dans les myoblastes primaires des patients, non inversée par l'HCQ. Contenu calcique (Ca^{2+}) du RE mesuré après incubation des myoblastes primaires de patients et de contrôles en condition basale ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à différentes doses (1 ou 10 μ M). Quantification du contenu Ca^{2+} du RE en condition de stress entre les myoblastes des contrôles et des patients (A) ou dans les myoblastes de chaque patient (M1 à M4) après traitement par différentes doses d'HCQ en condition de stress (B). Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne ; chaque point représentant la moyenne des données obtenues de myoblastes primaires issus de 5 contrôles et 4 patients indépendants (A) ou une expérience pour (B) ; expression en ratio par rapport au GM (A et B) ; test de Mann-Whitney pour (A), test ANOVA 1 facteur / test post hoc de Friedman pour (B) (* $p < 0,05$).

CHAPITRE 2 : ÉTUDE DES MÉCANISMES ANTI-OXYDATIFS DE L'HYDROXYCHLOROQUINE DANS DES MYOBLASTES IMMORTALISÉS DE PATIENTS ET DE CONTRÔLES

A. Caractérisation des myoblastes immortalisés de patients

1) Expression génique et protéique de lipin-1

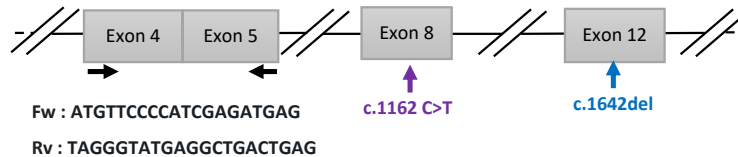
De façon générale, plusieurs inconvénients sont à considérer lors de l'utilisation des myoblastes primaires de patients *in vitro*. En effet, la capacité proliférative des myoblastes primaires est limitée et associée à une variation de leur phénotype lors de l'amplification *in vitro* (Mamchaoui *et al.*, 2011(337)). Une immortalisation des myoblastes primaires des patients a donc été réalisée par une équipe de l'Institut de Myologie (Paris) afin de proposer un modèle augmentant la capacité de prolifération des myoblastes primaires tout en maintenant leur phénotype myogénique (cf. partie matériel et méthode). Avant l'utilisation des myoblastes immortalisés, l'étape préalable a été leur caractérisation grâce à l'étude de l'expression génique et protéique de lipin-1. Les myoblastes immortalisés de patients (notés IMEA et IMFA) sont issus de l'immortalisation des myoblastes primaires de patients présentant un déficit en lipin-1 (notés M2 et M3 dans Renard *et al.*, 2023(331)) dont les mutations géniques sont rappelées dans le tableau de la Figure 13A. Il s'agit de mutations nulles basées sur la génération précoce de codons stop, soit directement après une substitution (M2), soit après une délétion responsable d'un décalage du cadre de lecture (M3), codant des protéines tronquées non fonctionnelles rapidement dégradées (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19) ; Schweitzer *et al.*, 2015(60)). Les myoblastes immortalisés de contrôles fournis par l'Institut de Myologie seront notés par la suite IMAB et IMKM.

La diminution de l'expression génique de *LPIN1* a été confirmée par PCR quantitative dans les myoblastes immortalisés de patients par rapport à celle des myoblastes immortalisés de contrôles, de façon similaire aux myoblastes primaires (Figure 13C). L'absence de protéine lipin-1 a également été confirmée par Western Blot dans les myoblastes immortalisés de patients, comme dans les myoblastes primaires dont ils sont issus (Figure 13D). Ainsi, nous avons vérifié que l'immortalisation des myoblastes primaires n'a pas modifié l'expression génique et protéique de lipin-1, validant l'utilisation de ces cellules pour étudier le déficit en lipin-1.

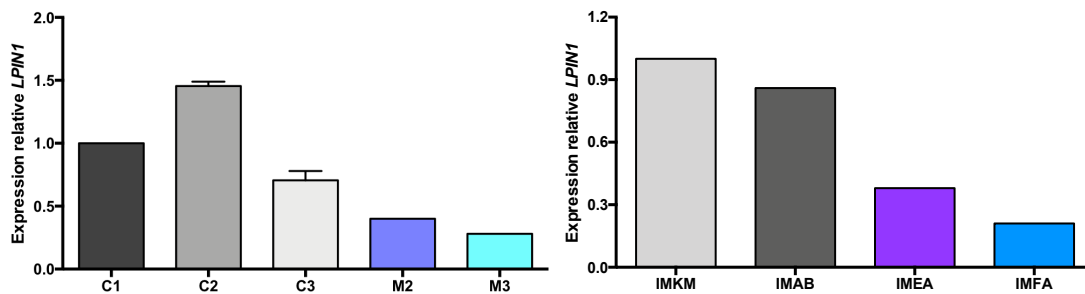
A

Patient	Variants génétiques	Changement d'acides aminés
M2	c.1162 C>T / c.1162 C>T	p.Arg388X / p.Arg388X
M3	c.1642del / c.1642del	p.Ser548Profs* 45 / p.Ser548Profs* 45

B



C



D

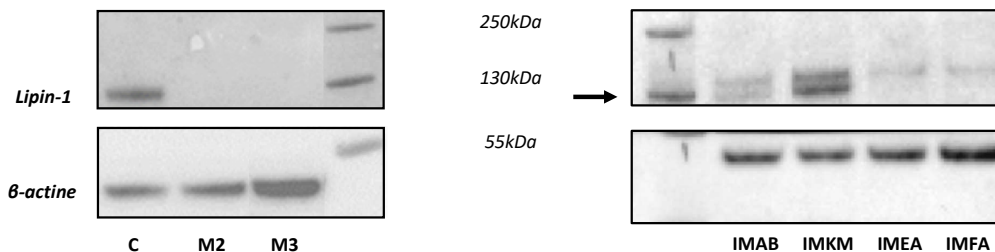


Figure 13 : L'immortalisation des myoblastes primaires ne modifie pas l'expression génique et protéique de lipin-1. A) Tableau récapitulatif des variants génétiques et des changements d'acides aminés des patients présentant un déficit en lipin-1 et pour lesquels les myoblastes ont été utilisés ; B) Schéma représentatif du positionnement du couple d'amorces sur la séquence du gène LPIN1 par rapport aux mutations des patients ; C) Quantification de l'expression relative du gène LPIN1 mesurée en RT-qPCR dans les myoblastes primaires de contrôles (Cx) et de patients (Mx) (à gauche) et dans les myoblastes immortalisés de contrôles (IMKM et IMAB) et de patients (IMEA et IMFA) (à droite) ; D) Expression protéique de lipin-1 mesurée par Western Blot dans les myoblastes primaires de contrôles (Cx) et de patients (Mx) (à gauche) et dans les myoblastes immortalisés de contrôles (IMAB et IMKM) et de patients (IMEA et IMFA) (à droite). Pour C (à gauche), données = moyenne +/- erreur type de la moyenne (n = 2 dans les myoblastes primaires de 3 contrôles et 2 patients).

2) Stress oxydatif

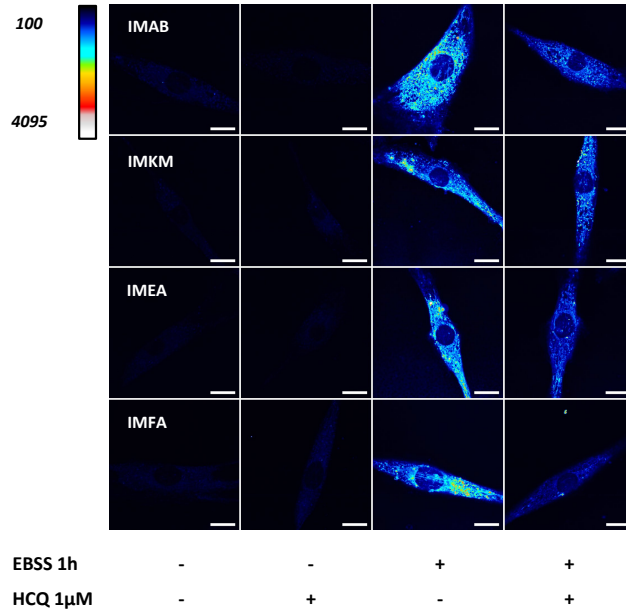
Les myoblastes immortalisés ont été utilisés afin de comprendre les mécanismes d'action anti-oxydatifs de l'HCQ. Une étape de validation des myoblastes immortalisés a donc été réalisée préalablement afin de reproduire la réduction du stress oxydatif par l'HCQ à la dose de 1 μ M.

Dans un premier temps, comme dans les myoblastes primaires, nous avons quantifié les ROS intracellulaires grâce à la détection en microscopie du signal de fluorescence émis par la sonde CellROX[®] oxydée (Figure 14A). A l'état basal, une quantité très faible de ROS intracellulaires a été détectée dans les myoblastes immortalisés des patients et des contrôles, non modifiée par l'ajout d'HCQ à la dose de 1 μ M. En revanche, une augmentation importante des ROS intracellulaires, similaire entre les myoblastes immortalisés des patients et des contrôles, a été observée lors d'un stress par le jeûne (*Earle's Balanced Salt Solution* ou EBSS). Par la suite, nous avons montré que l'HCQ à la dose de 1 μ M diminue la quantité de ROS intracellulaires en condition de stress dans ces cellules (Figure 14A).

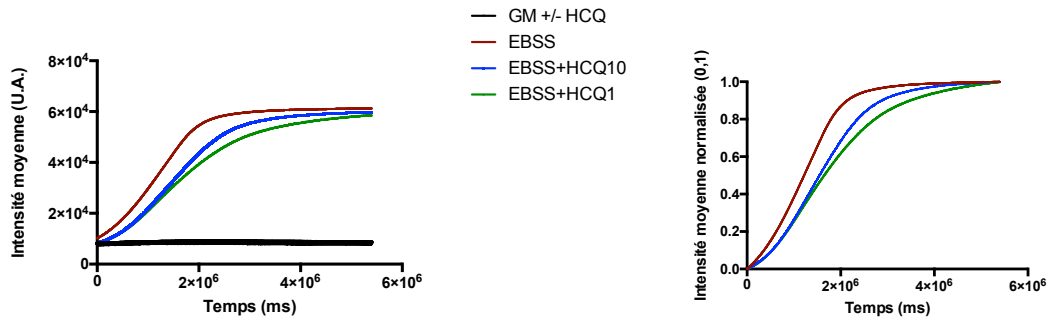
Par la suite, nous avons validé ces résultats avec une autre méthode de quantification des ROS, reposant sur la détection d'un signal de fluorescence émis par la sonde *Chloromethyl dichlorodihydrofluorescein diacetate* (CM-H₂DCFDA) une fois oxydée, qui est plus facilement quantifiable. Pour cela nous avons utilisé un lecteur de microplaque capable de détecter simultanément l'intensité du signal de fluorescence dans l'ensemble des conditions expérimentales. Comme pour la technique précédente, aucun signal n'a été mesuré en condition basale dans les myoblastes immortalisés des patients et des contrôles, indiquant une quantité indétectable de ROS intracellulaires dans ces cellules (Figure 14B). Par la suite, la condition de stress EBSS a entraîné une augmentation quasi instantanée de la quantité de ROS intracellulaires (Figure 14B), avec une vitesse maximale similaire dans les myoblastes immortalisés des patients et des contrôles (vitesse moyenne de 4,5 U.A et 4,2 U.A respectivement avec $p = 0,6667$). Le traitement par HCQ à la dose de 1 μ M en condition de stress EBSS a permis de diminuer cette vitesse d'accumulation des ROS intracellulaires de façon significative dans les myoblastes immortalisés des deux patients (diminution moyenne de 32% et 21% chez IMEA et IMFA respectivement avec $p = 0,0286$) et du contrôle IMKM (diminution moyenne de 30% avec $p = 0,0286$) (Figure 14C). Enfin, l'HCQ à une dose plus forte de 10 μ M n'a pas eu d'effet significatif sur la vitesse d'accumulation des ROS intracellulaires, confirmant l'effet dose-dépendant de l'HCQ observée dans les myoblastes primaires de patients.

Ces modifications de la quantité de ROS intracellulaires, en condition de stress et en présence d'HCQ, dans les myoblastes immortalisés de patients reproduisent celles observées dans les myoblastes primaires dont ils sont issus (Renard *et al.*, 2023(331) ; Figure 3), permettant l'utilisation des myoblastes immortalisés pour étudier les mécanismes antioxydants de l'HCQ.

A



B



C

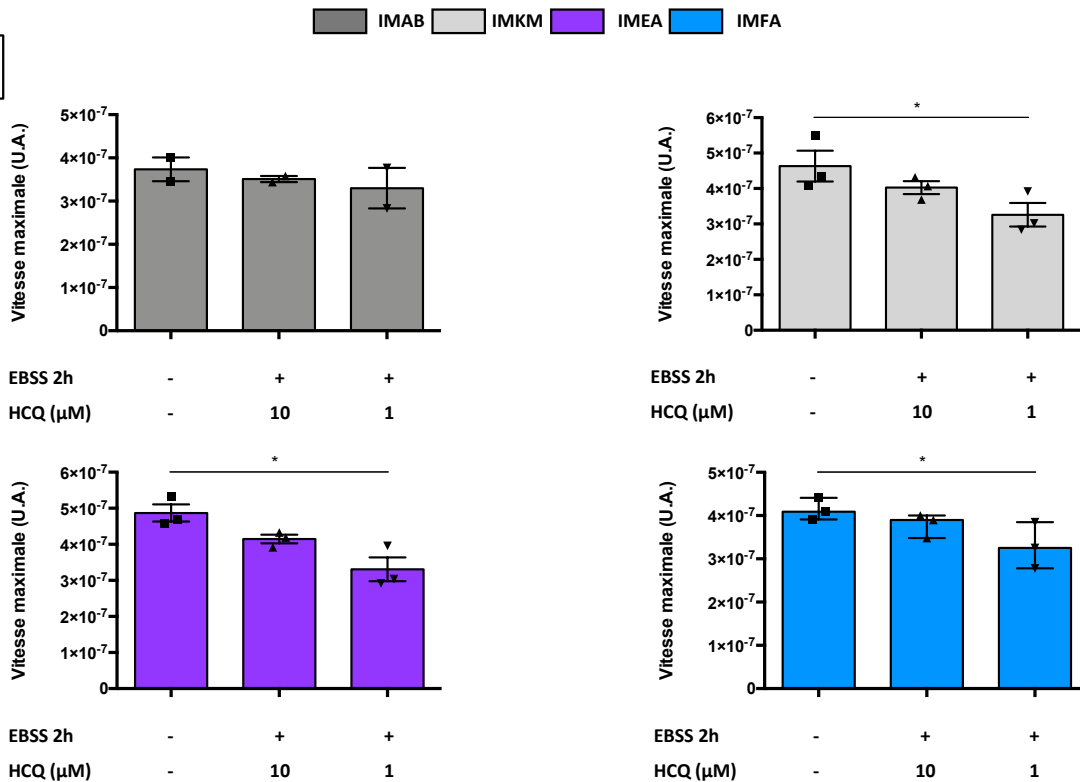


Figure 14 (légende sur la page suivante)

Figure 14 : Le jeûne induit un stress oxydatif dans les myoblastes immortalisés, réduit par un effet antioxydant de l'HCQ. Quantification des ROS intracellulaires mesurée après incubation des myoblastes immortalisés de patients et de contrôles en condition basale (GM) ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à différentes doses (1 ou 10 μ M). A) Marquage CellROX[®] par fluorescence (intensité du signal indiquée sur une échelle royale Lookup Table (LUT) ; échelle = 20 μ m) dans les myoblastes immortalisés de contrôles (IMAB et IMKM) et de patients (IMEA et IMFA) ; B) et C) Marquage H₂DCFDA par fluorescence et sa quantification dans les myoblastes immortalisés de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) ; B) Graphes représentatifs du suivi de l'intensité du signal au cours du temps (gauche) et sa normalisation (droite) ; C) Quantification de la vitesse maximale de montée du signal dans les myoblastes immortalisés de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) après traitement à l'HCQ en condition de stress. Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne ; chaque point représentant une expérience ; test ANOVA 1 facteur / test post hoc de Friedman pour (C) (*p < 0,05).

B. Étude de la dégradation des ROS intracellulaires

Afin d'expliquer la diminution de la quantité de ROS intracellulaires par l'HCQ, nous nous sommes demandé si cette molécule modulait la production et/ou la dégradation des ROS.

1) Exploration transcriptomique

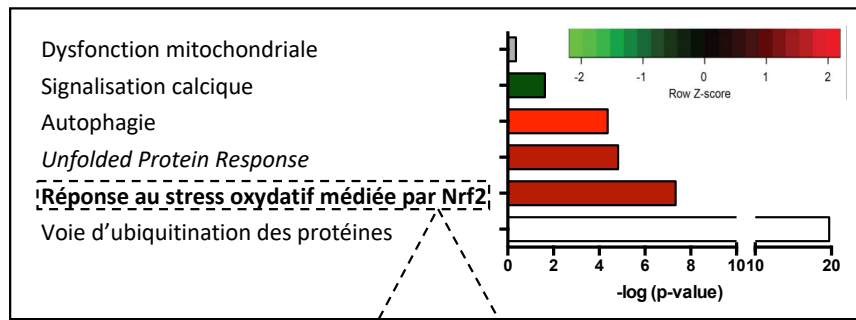
Nous avons étudié deux transcriptomes issus de la littérature. Le premier transcriptome a comparé l'expression de gènes de myotubes dérivés de myoblastes primaires de contrôles et de patients présentant un déficit en lipin-1 en condition de base (Michot *et al.*, 2013(63)). Le second transcriptome a été réalisé sur des myotubes issus de la différenciation de myoblastes immortalisés à partir de myoblastes primaires de patients atteints de dystrophie myotonique de type 1 (DMT1), traités ou non par la CQ à la dose de 0,1 ou 10 μ M (Bargiela *et al.*, 2019(338)). Ce dernier transcriptome nous a semblé pertinent car il repose à la fois sur une myopathie génétique, tout comme notre pathologie d'intérêt (déficit en lipin-1), et le traitement par la CQ à différentes doses, molécule dont est dérivé l'HCQ utilisée dans ce projet de thèse. Dans ce transcriptome, il a été précédemment observé que le profil d'expression génique issus des échantillons traités avec CQ 0,1 μ M est similaire à celui des échantillons non traités (489 gènes modulés), alors qu'il existe une forte expression différentielle entre les échantillons traités avec CQ 10 μ M et les échantillons non traités (9 493 gènes modulés) (Renard *et al.*, 2023(331) ; Figure S2B). La dose de 0,1 μ M de CQ n'ayant ainsi que peu d'impact sur l'expression génique dans ce dernier transcriptome, nous nous sommes donc concentrés sur le traitement de CQ à la dose de 10 μ M par la suite.

Nous avons analysé le transcriptome utilisant la CQ 10 μ M et mis en évidence la modification d'expression de gènes intervenant dans plusieurs voies canoniques, répertoriés dans le logiciel d'analyse transcriptomique QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis, impactant potentiellement la

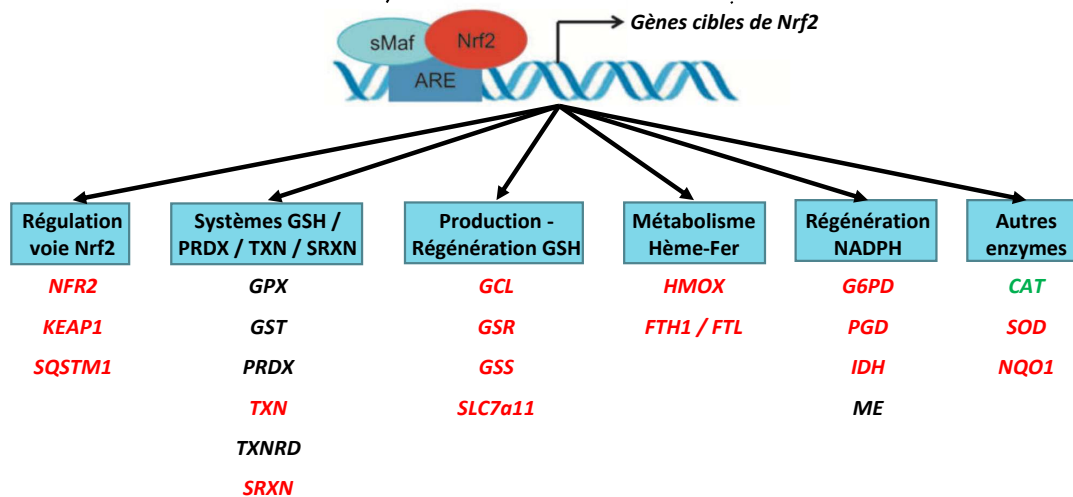
quantité de ROS intracellulaires. Comme attendu, nous avons observé un impact de la CQ 10 μ M sur l'autophagie (facteur d'induction de 4,37 et z-score de 3,064). Nous avons également relevé que ce traitement permet de réguler à la hausse à la fois la voie de signalisation médiée par le facteur de transcription Nrf2 (facteur d'induction de 7,34 et z-score de 1,180), mais également la voie de réponse UPR (facteur d'induction de 4,82 et z-score de 1,147). Le traitement par la CQ à la dose de 10 μ M a également entraîné une diminution de la voie de signalisation intracellulaire médiée par le calcium dans une moindre mesure (facteur d'induction de 1,62 et z-score de 0,507). Il a aussi été noté ici une absence d'effet de la CQ à la dose de 10 μ M sur l'expression génique relative à la dysfonction mitochondriale (regroupant essentiellement l'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale (facteur d'induction de 0,354) (Figure 15A). Nous avons donc recherché si ces différentes voies modulées par la CQ 10 μ M, et non à la dose de 0,1 μ M, étaient affectées par l'HCQ à la dose d'intérêt de 1 μ M.

A la vue de l'effet majeur de la CQ à la dose de 10 μ M sur la voie de signalisation médiée par le facteur de transcription Nrf2, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à cette voie-ci dans un premier temps. En effet, ce traitement a impacté plusieurs groupes de gènes antioxydants ARE pouvant être régulés par Nrf2, dont par exemple des gènes codant des protéines impliquées dans les systèmes anti-oxydatifs médiés par le GSH, les perorédoxines ou les thiorédoxines, dans le métabolisme du fer et de l'hème (hème oxygénase ou ferroydases) ou dans la régulation de Nrf2 (Keap1 et p62 en autres), ainsi que d'autres enzymes antioxydantes (CAT, SOD ou Nqo1 par exemple) (Figure 15B). Plus précisément, nous nous sommes concentrés par la suite sur quatre gènes qui sont le plus décrits dans la littérature lors de l'étude de la voie de signalisation médiée par le facteur de transcription Nrf2 : *NFE2L2*, *HMOX1*, *NQO1*, *SQSTM1*. Il est à noter que l'expression de deux gènes, *HMOX1* et *NQO1*, avait été décrite comme diminuée dans les myotubes de patients présentant un déficit en lipin-1 par rapport à des myotubes en condition de base (Michot *et al.*, 2013(63)) (Figure 15C).

A



B



C

■ Régulation à la hausse ■ Régulation à la baisse ■ Régulation indéterminée

Gènes	Transcriptome Patients DMT1 traités vs Non Traités (Facteur de régulation)	Transcriptome Patients LPIN1 vs CTRL (Facteur de régulation)
<i>NRF2</i>	1,21	-
<i>HMOX1</i>	13,47	-1,33
<i>NQO1</i>	2,81	-1,85
<i>SQSTM1</i>	17,16	-

Figure 15 : La CQ régule l'expression de gènes impliqués dans des voies de signalisation du stress oxydatif. Analyse transcriptomique de données issues de Bargelia et al., 2019. A) Schéma représentatif de voies canoniques impliquées dans le stress oxydatif et impactées par la CQ à 10 μ M dans des myotubes de patients présentant une DMT1 ; 2) Schéma représentatif de la régulation par la CQ 10 μ M des gènes ARE dont l'expression est médiée par le facteur de transcription Nrf2 ; C) Tableau récapitulatif de l'expression de 4 gènes ARE au sein des deux transcriptomes présentés dans le mémoire.

2) Implication de la voie Nrf2 dans la dégradation des ROS

A la suite de l'étude transcriptomique, nous avons posé l'hypothèse qu'un des mécanismes d'action possibles de l'HCQ était une modification de l'expression de gènes ARE via leur régulation par le facteur de transcription Nrf2. Pour cela, nous avons mesuré à la fois l'expression des gènes ARE, mais aussi l'activité protéique de Nrf2.

Tout d'abord, par *Reverse transcription* (RT)-PCR quantitative (PCRq), nous avons mesuré l'expression des gènes ARE pour lesquels la CQ 10 μ M avait un impact significatif dans le modèle de l'étude transcriptomique explorée ci-dessus (*NFE2L2*, *HMOX1*, *NQO1*, *SQSTM1*) (Bargiela *et al.*, 2019(338)). A l'état basal, l'expression de ces quatre gènes n'est pas modifiée significativement dans les myoblastes immortalisés des patients déficients en lipin-1 et des contrôles (Figure 16A). Nous n'avons donc pas reproduit de différence d'expression des gènes *HMOX1* et *NQO1* dans les myoblastes immortalisés des patients et des contrôles, comme décrit précédemment (Michot *et al.*, 2013(63)). Cette différence de résultats pourrait refléter l'état de différenciation cellulaire puisque notre étude est réalisée dans des myoblastes non différenciés en myotubes. Par la suite, l'expression des quatre gènes ARE a également été inchangée en condition EBSS 1h par rapport à l'état basal (Figure 16B), suggérant que l'expression de ces gènes n'est pas impliquée dans l'accumulation des ROS intracellulaires en condition de stress. Enfin, le traitement par HCQ à la dose de 1 μ M n'a pas non plus modifié l'expression des gènes ARE dans les myoblastes des patients et des contrôles, ni à l'état basal ni en condition EBSS 1h, suggérant que cet effet n'est observé qu'à forte dose (10 μ M) et que la régulation de l'expression des gènes ARE ne constitue pas un mécanisme d'action antioxydant de l'HCQ à la dose de 1 μ M (Figure 16B). De plus, nous avons étudié la translocation nucléaire de la forme phosphorylée active du facteur de transcription Nrf2 permettant la régulation de l'expression des gènes ARE (Figure 17). Des résultats préliminaires en immunofluorescence ont montré que le stress EBSS (1h) augmentait le pourcentage de cellules présentant une translocation nucléaire de la forme phosphorylée active de Nrf2. En revanche, l'HCQ à la dose de 1 μ M ne semble pas modifier cette translocation ni en condition basale et ni en condition de stress, suggérant que l'HCQ à la dose de 1 μ M ne modifie pas l'activité transcriptionnelle de Nrf2.

L'absence de modification d'expression des gènes ARE et de la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de Nrf2 suggèrent que l'effet antioxydant de l'HCQ 1 μ M dans les myoblastes ne repose pas sur une modification de l'expression de gènes ARE via leur régulation par le facteur de transcription Nrf2. Ainsi, l'HCQ ne semblant pas être impliquée dans la dégradation des ROS intracellulaires, nous nous sommes intéressés à son rôle dans la production de ces derniers au sein des myoblastes immortalisés.

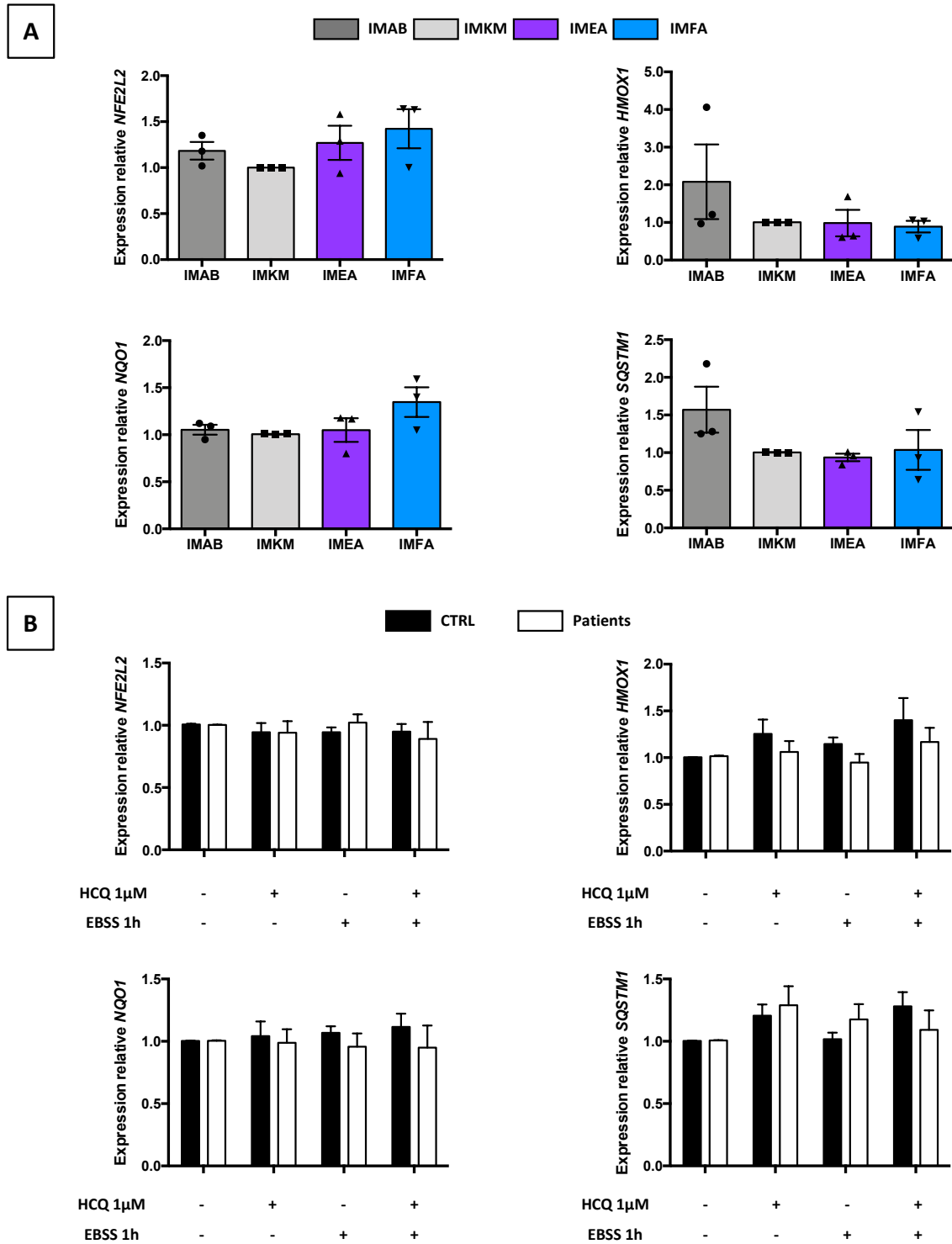


Figure 16 : L'HCQ ne modifie pas l'expression de gènes ARE. Analyse de l'expression relative de 4 gènes ARE (*NFE2L2*, *HMOX1*, *NQO1*, *SQSTM1*) mesurée par RT-qPCR après incubation des myoblastes immortalisés de patients et de contrôles en condition basale ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à la dose de 1 μ M. Expression relative des 4 gènes dans les myoblastes de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) en condition basale (A) ou dans les myoblastes de contrôles et de patients après traitement par HCQ à 1 μ M en condition de stress (B). Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne (n = 3 dans les myoblastes immortalisés de 2 contrôles et de 2 patients indépendants) ; chaque point représentant une expérience pour (A) ; test ANOVA 1 facteur / test post hoc de Friedman pour (A) ; test ANOVA 2 facteurs / test post hoc de Tukey pour (B).

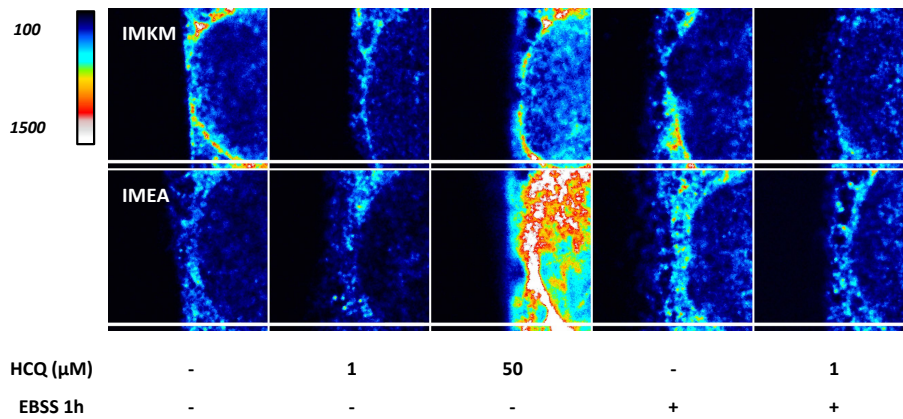
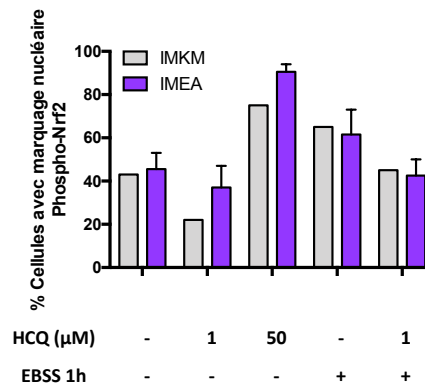
A**B**

Figure 17 : L'HCQ ne modifie pas la translocation nucléaire de Nrf2 à la dose de 1 μM . Translocation nucléaire de Nrf2 mesurée après incubation des myoblastes immortalisés d'un patient et d'un contrôle en condition basale ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à différentes doses (1 ou 50 μM). A) Observation du marquage de la forme phosphorylée de Nrf2 (Phospho-Nrf2) en immunofluorescence (intensité du signal indiquée sur une échelle royale Lookup Table (LUT) ; échelle = 20 μm) dans les myoblastes immortalisés d'un contrôle (IMKM) et d'un patient (IMEA) ; B) Quantification du nombre de cellules avec un marquage nucléaire de Phospho-Nrf2 dans les myoblastes immortalisés d'un contrôle (IMKM) et d'un patient (IMEA). Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne (n = 2 dans les myoblastes immortalisés du patient IMEA) ; test ANOVA 2 facteurs / test post hoc de Tukey.

C. Étude de la production de ROS intracellulaires

1) Implication du stress du RE dans la production de ROS

Le RE peut être une source de production de ROS, notamment au cours du stress RE (Cao et Kaufman, 2014(291) ; Forester *et al.*, 2018(290)). Nous sommes donc intéressés aux effets du jeûne sur le stress du RE dans les myoblastes immortalisés de patients et de contrôles et si l'HCQ à la dose de 1 μM pouvait inverser cet effet. Pour cela, nous avons étudié le stress du RE à travers des marqueurs recouvrant les trois voies de signalisation impliquées dans la réponse UPR : l'épissage de *XBP1* en PCR et l'expression des gènes *BIP* et *CHOP* en RT-PCRq.

Dans les myoblastes immortalisés à l'état basal, nous n'avons pas observé de clivage de *XBP1* ni de différence d'expression des gènes *CHOP* et *BIP* entre les patients et les contrôles, suggérant que la réponse UPR n'est pas activée différemment entre les patients et les contrôles (Figure 18 A, B). En condition EBSS 1h, laps de temps suffisant pour entraîner une accumulation significative de ROS, aucun clivage de *XBP1* n'a été observé dans les myoblastes des patients ou des contrôles, contrairement au clivage obtenu avec le traitement par la thapsigargine (contrôle positif) (Figure 18 A). Dans cette même condition de stress EBSS 1h, l'expression de *BIP* n'a pas également été augmentée que ce soit dans les myoblastes des patients ou des contrôles (Figure 18 C). Une augmentation de la durée du stress EBSS 2h30 n'a pas entraîné non plus de clivage de *XBP1*. En revanche, l'expression de *CHOP* a été augmentée en condition EBSS 1h de façon significative dans les myoblastes des patients (facteur 1,8 avec $p = 0,0332$) (Figure 18 D). Ces résultats suggèrent l'apparition d'un stress du RE au sein des myoblastes des patients par une voie non canonique autre que celle médiée par IRE1, en l'absence de clivage de *XBP1*, potentiellement davantage par les voies de signalisation médiées par PERK ou ATF6, qui pourraient être impliquées dans l'augmentation des ROS intracellulaires. L'ajout d'HCQ à la dose de 1 μM n'a pas permis d'inverser cette augmentation de l'expression de *CHOP* en condition de stress EBSS (Figure 18 D), suggérant l'implication d'un autre mécanisme protecteur de l'HCQ. En l'absence d'effet de l'HCQ 1 μM sur le stress du RE, nous avons donc étudié son implication au niveau de la mitochondrie, une autre source endogène de ROS.

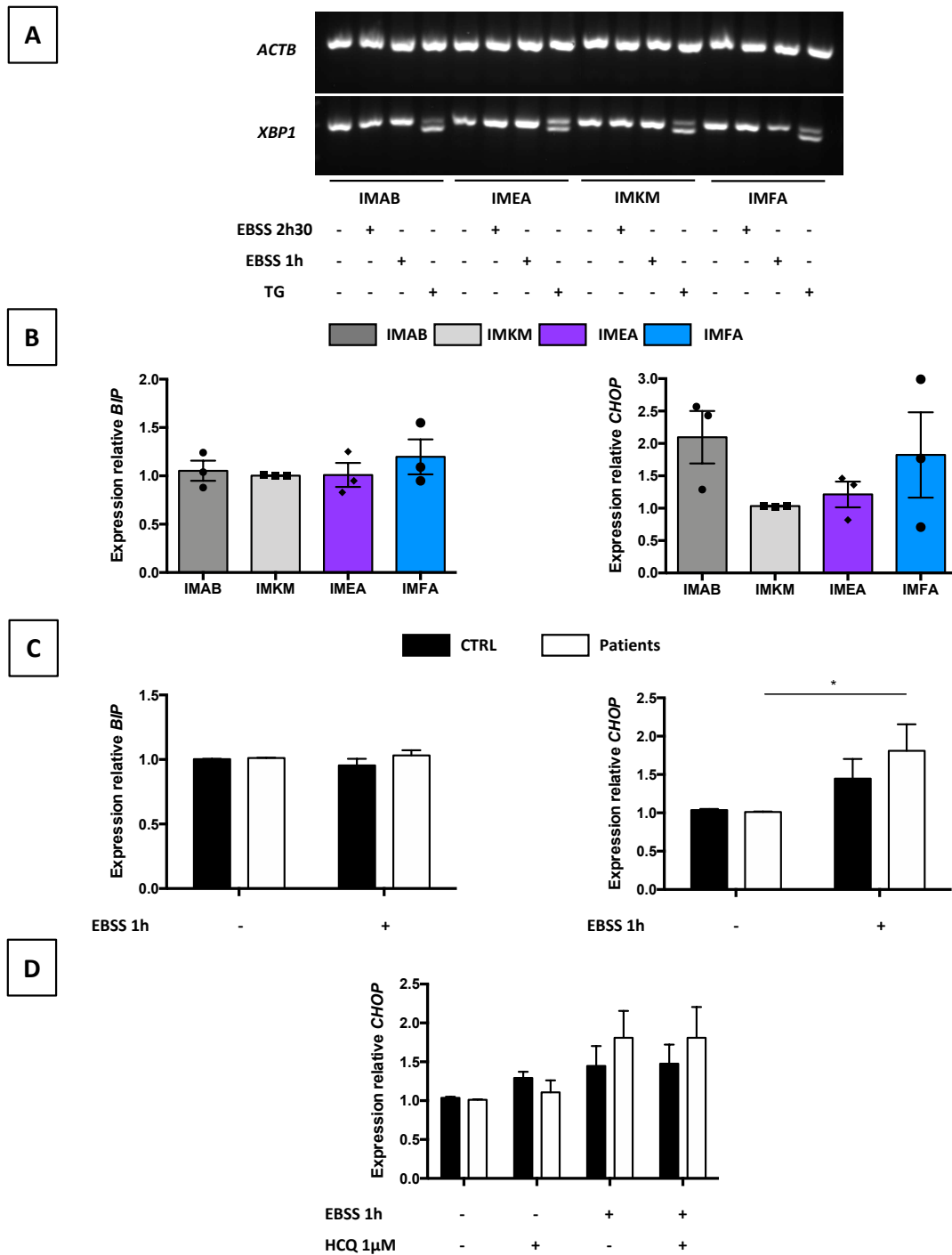


Figure 18 : Le jeûne induit un stress du réticulum endoplasmique dans les myoblastes immortalisés, non inversé par l'hydroxychloroquine. Stress du RE mesuré après incubation des myoblastes immortalisés de patients et de contrôles en condition basale ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à la dose de 1 μ M. A) Observation du clivage du transcrit XBP1 dans les myoblastes de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) en condition de stress ; Expression relative des gènes BIP et CHOP mesurée par RT-qPCR dans les myoblastes de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) en condition basale (B) ou dans les myoblastes de contrôles et de patients en condition de stress (C) ; D) Expression relative du gène CHOP mesurée par RT-qPCR dans les myoblastes de contrôles et de patients après traitement par HCQ à 1 μ M en condition de stress. Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne (n = 3 dans les myoblastes immortalisés de 2 contrôles et de 2 patients indépendants) ; chaque point représentant une expérience pour (B) ; test ANOVA 1 facteur / test post hoc de Friedman pour (B) ; test ANOVA 2 facteurs / test post hoc de Sidak pour (C) et (D) (*p < 0,05).

2) Implication de la mitochondrie dans la production de ROS

La mitochondrie est une source principale de ROS intracellulaires, notamment par la phosphorylation oxydative mitochondriale mettant en jeu le transfert d'électrons au niveau de sa chaîne respiratoire (Zorov *et al.*, 2014(289) ; Forrester *et al.*, 2018(290)). L'hypothèse émise repose donc sur un effet anti-oxydatif de l'HCQ par la prévention ou la réversion de l'altération de la phosphorylation oxydative à l'origine d'une production excessive de ROS en condition de jeûne. Ainsi, afin d'étudier le fonctionnement de la chaîne respiratoire, nous avons évalué la modification du potentiel de membrane interne de la mitochondrie à travers la détection du signal de fluorescence émis par la sonde cationique *tetramethylrhodamine, ethyl ester* (TMRE) (Figure 19).

Il n'a pas été détecté de différence significative du potentiel de membrane interne de la mitochondrie entre les myoblastes des patients et des contrôles, ni à l'état basal ni en condition EBSS 1h, contrairement à la diminution obtenue avec le traitement par le *Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon* (FCCP) (contrôle positif). Un temps plus long d'EBSS de 2h30 a également été utilisé afin de coïncider avec le temps pour lequel il avait été observé un défaut du flux calcique dans les myoblastes primaires de patients. Cet allongement du temps du stress EBSS a entraîné une altération significative du potentiel de membrane interne de la mitochondrie dans les myoblastes des deux contrôles (diminution moyenne de 19% ($p = 0,0094$) et 13% ($p = 0,0267$) chez IMAB et IMKM respectivement), et une altération non significative dans les myoblastes des deux patients (diminution moyenne de 15% avec $p = 0,0678$ chez IMEA et de 17% avec $p = 0,1542$ chez IMFA) (Figure 19 A). Des résultats préliminaires sur le traitement par HCQ à la dose de 1 μ M des myoblastes immortalisés en condition de stress ne permettent pas pour l'instant de conclure sur l'effet de ce traitement sur le potentiel de membrane interne, et donc sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 19 B).

Afin de confirmer l'implication de la mitochondrie dans le stress oxydatif et *a fortiori* les effets de l'HCQ sur ce dernier, il serait intéressant d'étudier directement le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par le Seahorse[®], mais la mise au point sur les myoblastes immortalisés s'est avérée non concluante pour le moment.

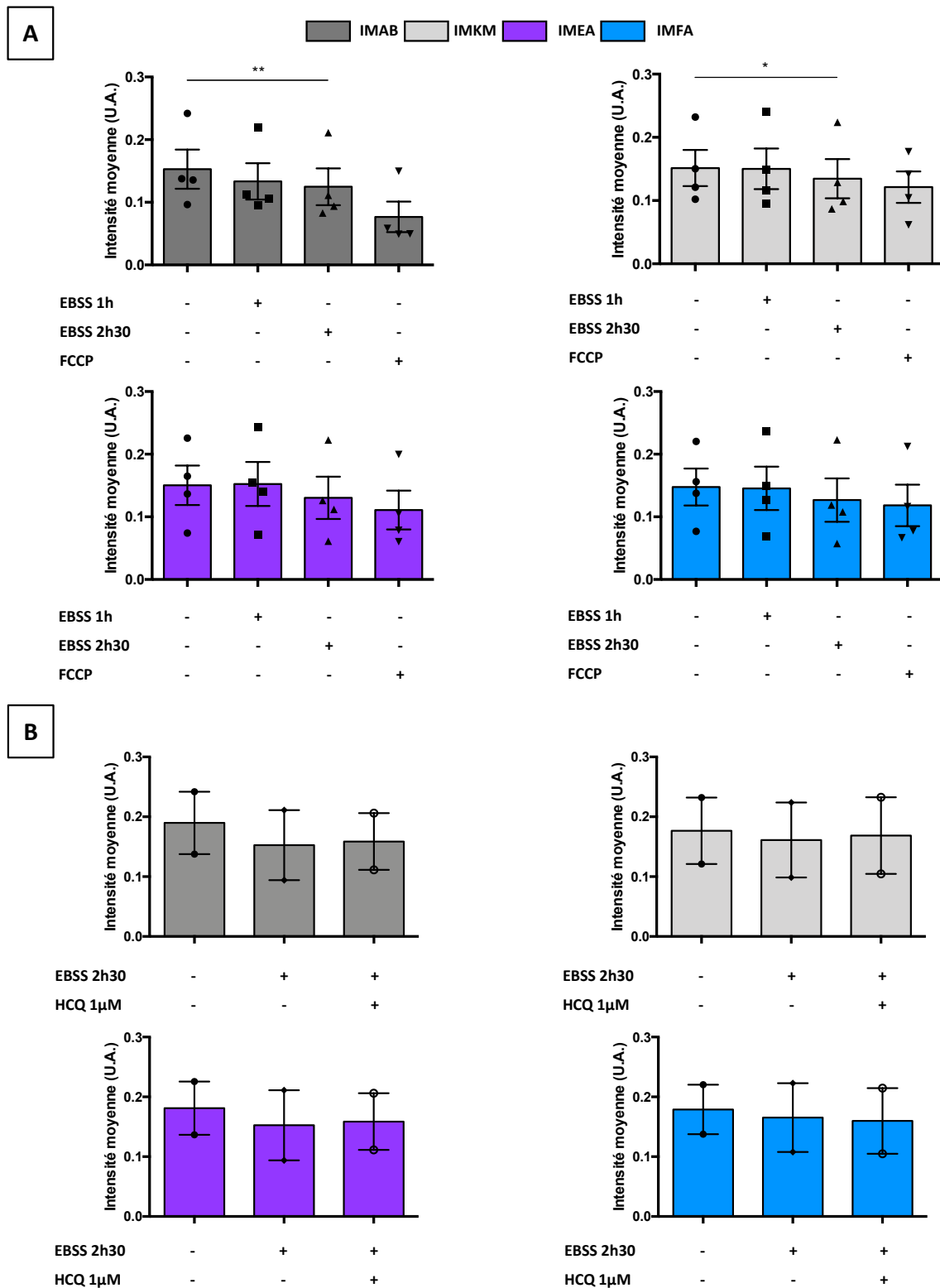


Figure 19 : Le jeûne induit une altération fonctionnelle de la mitochondrie dans les myoblastes immortalisés. Analyse du fonctionnement mitochondrial mesuré après incubation des myoblastes immortalisés de patients et de contrôles en condition basale ou en milieu pauvre en nutriments (EBSS), avec ou sans traitement par HCQ à la dose de 1 µM. Quantification du marquage TMRE par fluorescence dans les myoblastes de chaque contrôle (IMAB et IMKM) et patient (IMEA et IMFA) en condition de stress (A) ou après traitement l'HCQ à 1 µM en condition de stress (B). Données = moyenne +/- erreur type de la moyenne ; chaque point représentant une expérience ; test ANOVA 1 facteur / test post hoc de Friedman (* $p < 0,05$) ; ** $p < 0,01$).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique : myoblastes primaires et immortalisés humains

Les myoblastes primaires humains sont issus de biopsies du muscle squelettique réalisées à l'Hôpital Necker Enfants Malades (Paris) sur 4 patients présentant un déficit en lipin-1 (dont les variations géniques et protéiques sont décrites dans l'article princeps, Tableau 1) et de contrôles. Les cellules ont été isolées et conservées par le Centre de Ressources Biologiques Cochin après déclaration auprès du Ministère de la Santé et autorisation d'un Comité de protection des personnes de leur utilisation à des fins diagnostiques et de recherche. Les myoblastes immortalisés ont été obtenus après transduction de myoblastes primaires de patients et de contrôles des vecteurs *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) et *cyclin-dependent kinase-4* (Cdk-4) par l'équipe Thérapie des maladies du muscle strié (Institut de Myologie, Paris) (Mamchaoui *et al.*, 2011(337)), soumise également aux autorisations éthiques et réglementaires nécessaires.

Culture cellulaire des myoblastes et traitements

Les myoblastes primaires ont été cultivés dans du F-10 Nut Mix 1X + GlutaMAX (réf. 41550-021, Life Technologies) supplémenté avec 20% de sérum bovin fœtal (*Foetal Bovine Serum* ou FBS South Africa, réf.1300, Biowest). Les myoblastes immortalisés ont été cultivés dans du Skeletal Muscle Cell Growth Medium Kit (réf. C-23160, PromoCell). Les milieux sont également supplémentés avec de la pénicilline-streptomycine (Pen Strep, 100X, réf. 15140-122, Life Technologies) et de l'amphotéricine B (Fungizone, 0,25 µg/L, réf. 15290-026, Life Technologies). Les cellules ont été cultivées à 37°C, 5% de CO₂, dans des flasques de type T75 ou T25, préalablement gélatinées selon le protocole du laboratoire (Gelatin from porcine skin, réf. G1890-100G, Sigma Aldrich) pour les myoblastes primaires. Une confluence cellulaire estimée de 80 % est recherchée pour débiter les différentes expériences.

Afin de reproduire la RM *in vitro*, les myoblastes primaires et immortalisés ont été cultivés dans un milieu pauvre en nutriments (EBSS, réf. 24010-043, Thermo Fisher Scientific). Pour étudier les effets *in vitro* de l'HCQ, ces myoblastes ont été incubés avec différentes concentrations d'HCQ (PLAQUENIL, Cip : 3400936441460, Sanofi-Adventis) selon les expériences (0,1, 1 ou 10 µM) dans leur milieu de croissance (*Growth medium* ou GM) ou en condition de stress EBSS. L'HCQ a été incubée la nuit ou 24 h et maintenue le lendemain pendant la stimulation des myoblastes. Différents contrôles positifs ont été utilisés lors des expériences : le découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale FCCP (FCCP Tocris Bioscience, réf. 04-531-0, Fisher Scientific) à 10 µM ; les molécules oxydatives peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, réf. H1009, Sigma Aldrich) et (TBHP (réf. C10491, Invitrogen) à 1 mM et 100 µM

respectivement ; l'inhibiteur des pompes *Sarco-endoplasmic Reticulum Calcium ATPase* (SERCA) thasigargine (réf. T-650, Alomone Labs) à 1 μ M.

Étude génomique et transcriptionnelle

Extraction ADN génomique

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de culots cellulaires lysés dans le tampon suivant : protéinase K 0,2 mg/ml (réf. 70663, Sigma Aldrich), sodium dodecyl sulfate 0,2 % (SDS, 3 M, ph 5,2, réf.71196, Sigma Aldrich), éthylènediaminetétraacétique 0,5 mM (EDTA, réf. A5097, AppliChem) et *Phosphate buffered saline* (PBS 1X, réf. 10010023, Gibco). Après incubation 1 h à 50 °C au bain Marie de la suspension, l'ADN a été précipité par ajout de sodium acétate (3M, ph 5,2, réf. 567422, Sigma Aldrich) et d'isopropanol incubés pendant au moins 20 min à -20 °C. Après centrifugation à 16 000 g, 30 min à 4 °C, le culot a été lavé avec de l'éthanol 70 %. Un deuxième lavage a été réalisé après centrifugation à 16 000 g, 5 min à température ambiante. A la suite de l'évaporation de l'éthanol, l'ADN extrait a été resuspendu dans de l'eau désionisée et dosé par spectrophotométrie (NanoDrop 2000/2000c, Fisher Scientific).

Utilisation de l'enzyme FPG

Afin de quantifier l'ADN oxydé, l'enzyme FPG (réf. M0240S, New England BioLab) a été utilisé à raison de 3 unités d'enzyme par 50 ng d'ADN et selon les indications fournies par le fabricant. Une préparation d'échantillon d'ADN sans enzyme FPG a également été réalisé dans les mêmes conditions comme contrôle négatif. Pour assurer le fonctionnement optimal de l'enzyme puis son inactivation, les différentes préparations ont été incubées 1 h à 37 °C et 10 min à 60 °C respectivement.

Extraction ARN et rétrotranscription inverse

L'extraction d'ARN a été réalisée à partir de culots cellulaires avec le kit NucleoSpin RNA XS (réf. 740902250, Macherey –Nagel,Germany), en utilisant le protocole fourni. Une fois purifié et resuspendu dans de l'eau dépourvu d'ARNase, la concentration en ARN a été mesurée par spectrophotométrie (NanoDrop 2000/2000c, Fisher Scientific). Par la suite, l'ADN complémentaire a été obtenu après une étape de rétrotranscription inverse à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (réf. 4368814, Thermo Fischer), en respectant le protocole fourni.

PCR quantitative et PCR

L'ADN est quantifié PCRq dans un thermocycleur (CFX96 Touch Real-Time PCR qPCR system, Bio-Rad) grâce à une sonde fluorescente (Power SYBR Green PCR Master Mix, réf. 4367659, Thermo Fisher Scientific) en présence d'oligonucléotides à la concentration finale de 500nM (dont les séquences sont présentées dans le tableau ci-dessus) en respectant le cycle de températures présenté ci-après. Les données ont été analysées dans le logiciel associé à la machine (CFX Maestro, réf.12004128, Bio-rad) en fixant le seuil à 100 pour déterminer les différentes valeurs de *cycle threshold* (CT). La méthode de quantification des données est relative (méthode $\Delta\Delta$ Ct) et analysée sous Excel (Microsoft Office Standard 2016, Etats-Unis).



Figure 20 : : Cycle de température commun aux PCR quantitatives

L'ADN génomique (gènes *MT-RNR1* ou *MT-ND2*) ou complémentaire (gène *XBP1*) est amplifié dans un thermocycleur (Biometra PCR Thermal Cycler, analytik jena) par la polymérase LongAmp Taq 2X Master MIX (réf. M0287, New England BioLab), selon les instructions données par le fournisseur, en présence d'oligonucléotides à la concentration finale de 500nM (dont les séquences sont présentées dans le tableau ci-dessus) et selon les cycles de température donnés ci-dessous. Après amplification des échantillons, ces derniers ont migré dans un gel d'agarose 2% (gènes *MT-RNR1* ou *MT-ND2*) ou 3% (gène *XBP1*), supplémenté avec une sonde fluorescente marquant les acides nucléiques (GelRed Nucleic Acid Stain, réf. 41003, Biotum), pendant environ 1 h 30 à 100 V. Après migration, les données sont obtenues par lecture du gel (Uvidoc HD6, Uvitec).

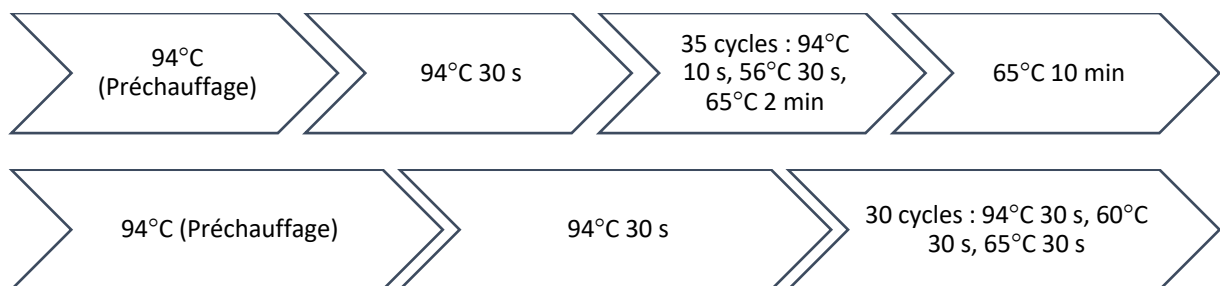


Figure 21 : Cycle de température des PCR. Gènes *MT-RNR1* et *MT-ND2* (haut) ; gène *XBP1* (bas)

Gène Cible	Technique	Séquence (5'-3')
<i>NFE2L2</i>	PCRq	Forward : CAC ATC CAG TCA GAA ACC AGT Reverse : GGA ATG TCT GCG CCA AAA GC
<i>HMOX1</i>	PCRq	Forward : AGG GTG ATA GAA GAG GCC AAG ACT Reverse : TCC TGC AAC TCC TCA AAG AGC
<i>NQO1</i>	PCRq	Forward : AAT GAA GGG ATT GGA CCG AG Reverse : CCC AGC CGT CAG CTA TTG T
<i>SQSTM1</i>	PCRq	Forward : GAA GCT GCC TTG TAC CCA CA Reverse : CAG CCG CCT TCA TCA GAG AA
<i>ACTB</i>	PCRq	Forward : CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G Reverse : TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A
<i>CHOP</i>	PCRq	Forward : GAA CCA GGA AAC GGA AACA Reverse : ATT CAC CAT TCG GTC AAT CA
<i>BIP</i>	PCRq	Forward : CAT CAC GCC GTC CTA TGT CG Reverse : CGT CAA AGA CCG TGT TCT CG
<i>XBP1</i>	PCR	Forward : CTG GTT GCT GAA GAG GAG G Reverse : GCT GGT AAG GAA CTG GGT C
<i>MT-RNR1</i>	PCR	Forward : TAG CCC TAA ACC TCA ACA GT Reverse : – Amplicon court : ATG AAG GCT ACA AAG TAA GCG CA – Amplicon long : GGT CCC TAT TTA AGG AAC AA
<i>MT-ND2</i>	PCR	Forward : CTA TCT CGC ACC TGA AAC Reverse : – Amplicon court : TTA ATT CCA TCC ACC CTC – Amplicon long : CGG AGT AGT AAG TTA CAA TAT

Tableau 2 : Liste des couples d'amorces pour PCRq et PCR

Mesure du flux calcique

Les myoblastes primaires ont étéensemencés à 10 000 cellules par puits dans une microplaque 96 puits pour fluorescence (réf. 655090, Greiner Bio-one). Après stimulation, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorogénique sensible au calcium Cal-520 AM (réf. 21130, AAT Bioquest) à la concentration finale de 4 µM dans du milieu de croissance (GM) pendant 45 min à 37°C. Après deux lavages dans un milieu d'enregistrement sans calcium, le signal de fluorescence (Excitation 490 nm /

Émission 515 nm) a été enregistrée simultanément dans les 96 puits à 1 Hz pendant 20 min à 37°C grâce au lecteur de microplaque *Functional drug screening system* (FDSS μ CELL C13299, Hamamatsu Photonics).

Au cours de l'acquisition, les trois premières minutes d'enregistrement ont permis de déterminer le niveau de base du signal de fluorescence, représentant ici la concentration cytosolique de calcium dans nos conditions expérimentales. L'ajout de thapsigargine 1 μ M, simultanément dans l'ensemble des 96 puits, a induit une libération rapide du calcium réticulaire détectée par la sonde au niveau cytosolique. Par la suite, une lente décroissance du signal de fluorescence de la sonde a été obtenue grâce à la sortie extracellulaire du calcium par l'intermédiaire des pompes calciques *Plasma membrane Ca²⁺ ATPases* (PMCA) situées au niveau de la membrane plasmique. L'absence de calcium dans le milieu d'enregistrement a permis de s'affranchir d'un influx calcique qui prolongerait la durée du signal de fluorescence. Enfin, le signal de fluorescence a été normalisé sur le signal de fluorescence maximal obtenu après ajout d'une solution de digitonine (D-5628, Sigma Aldrich) en présence de calcium aux concentrations finales respectives de 50 μ M et 6mM. Ainsi, cette méthode a permis de déterminer une aire sous la courbe approximant le contenu en calcium du RE (Bergling *et al.*, 1998(339)), analysée à l'aide du logiciel Origin (version 2018, OriginLab).

Mesure de la quantité de ROS intracellulaires

Afin de mesurer la quantité de ROS intracellulaires, deux techniques ont été mises en place basées sur la détection d'un signal de fluorescence.

Pour la première technique, les myoblastes immortalisés ont étéensemencés dans une lamelle en verre compartimentée (μ -Slide 8 Well Glass Bottom, réf. 80827, ibibi) à raison de 5 000 cellules par puits. Au cours de la stimulation, la sonde fluorogénique CellROX™ deep red reagent (réf. C10422, Invitrogen) a été directement ajoutée au milieu d'intérêt (GM ou EBSS) à la concentration finale de 10 μ M pendant 30 min à 37 °C. Après lavages au PBS 1X, l'état cellulaire a été fixé avec de la paraformaldéhyde 4 % (Fixative solution 4 %, réf. FB0024, Invitrogen) pendant 15 min à température ambiante, suivi de lavages en PBS 1X. L'oxydation de la sonde en présence de ROS intracellulaires a permis la détection d'un signal de fluorescence (longueur d'onde d'émission : 665nm). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal Spinning Disk (Zeiss) (objectif x63, ouverture numérique 1.4). Les figures d'immunofluorescence ont été réalisées grâce au module FigureJ (version 1,36) du logiciel Fiji (version 2.3.0/1.53f51).

Pour la deuxième technique, les myoblastes immortalisés ont étéensemencés à 10 000 cellules par puits dans une microplaque 96 puits pour fluorescence (réf. 655090, Greiner Bio-one). Les cellules ont été chargées avec la sonde fluorogénique CM-H₂DCFDA (réf. C6827, Invitrogen) à la concentration

finale de 5 μ M dans du milieu de croissance (GM) pendant 45 min à 37 °C. Après lavage dans le milieu d'intérêt (GM ou EBSS), les cellules ont été incubées dans ce même milieu dans un lecteur de microplaque FDSS μ CELL. L'oxydation de la sonde en présence de ROS intracellulaires a permis la détection d'un signal de fluorescence (longueur d'onde d'émission : 517–527 nm). Le signal de fluorescence a été enregistré simultanément dans les 96 puits à 0,5 Hz pendant 90 min à 37 °C. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Origin (version 2018, OriginLab). Les données ont été normalisées à la phase de plateau atteinte pendant la durée de nos enregistrements afin de déterminer et de comparer la vitesse de montée du signal de fluorescence au sein de nos différentes conditions expérimentales.

Analyse transcriptomique

Les données faisant l'objet d'une nouvelle analyse transcriptomique sont issues d'une précédente étude (Bargelia *et al.*, 2019) et disponibles sur la plateforme GEO (Gene Expression Omnibus) avec le numéro d'identification ID GSE128844. Le traitement de ces données brutes a été effectué par trois méthodes statistiques indépendantes et complémentaires : Deseq2, edgeR et LimmaVoom. Les flags ont été calculés à partir de données normalisées par rapport à la couverture moyenne. Tous les comptages normalisés inférieurs à 20 ont été considérés comme du bruit de fond (*flag* = 0) et ceux supérieurs ou égaux à 20 comme du signal (*flag* = 1). Les listes P50 utilisées pour l'analyse statistique ont regroupés les gènes ayant un *flag* = 1 pour au moins la moitié des échantillons comparés. A l'issue des trois méthodes citées ci-dessus, les résultats ont été considérés comme significativement relevant avec une valeur de p-value supérieure à 0,05 et des facteurs de changement de 1.2, 1.5 ou 2, et regroupés par diagramme de Venn. Les calculs statistiques et les analyses fonctionnelles ont été effectués à l'aide des logiciels R project (<http://www.r-project.org>) et Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, <http://www.ingenuity.com>) respectivement.

Mesure de la translocation nucléaire de Nrf2

Les myoblastes immortalisés ont étéensemencés sur des lamelles en verre (réf. 100040, Dutscher) à raison de 10 000 cellules par puits. Après stimulation, les cellules ont été lavées au PBS 1X puis fixées avec de la paraformaldéhyde 4 % pendant 15 min à température ambiante. Après fixation, les cellules ont de nouveau été lavées au PBS 1X. La perméabilisation et le blocage ont été réalisés dans une solution de saponine 0,2 % (réf. A18820.14, Thermo Scientific) et d'albumine de sérum bovin 0,2 % (*Bovine Serum Albumin* ou BSA, réf. A7906-100G, Sigma Aldrich) pendant au minimum 1 h à température ambiante. Le marquage primaire (Tableau 2) a été réalisé en chambre humide à 4 °C sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées et incubées 45 min à température ambiante avec les

anticorps secondaires (Tableau 2), puis de nouveau lavées et incubées 15 min à température ambiante avec le DAPI à l'abri de la lumière. Enfin, après lavages, les lamelles ont été montées sur des lames porte objet avec du milieu de montage (Fluoromount-G, réf. 00-4958-02, Invitrogen). La dilution des anticorps primaires, secondaires et du DAPI ainsi que les différents lavages ont été réalisés avec la solution de perméabilisation et de blocage décrite ci-dessus. Les images d'immunofluorescence sur lame ont été acquises grâce à un microscope confocal Spinning Disk (Zeiss) (objectif x63, ouverture numérique 1.4). Les figures d'immunofluorescence ont été réalisées grâce au module FigureJ du logiciel Fiji.

Cible	Nature	Dilution	Fournisseur (Référence)
Phospho-Nrf2	IgG Rabbit (polyclonal)	1/100	Invitrogen (PA5-67520)
Rabbit, Alexa fluor 488	IgG goat (polyclonal)	1/250	Invitrogen (A11008)
DAPI	-	1/1 000	Sigma Aldrich (D9542-5MG)

Tableau 3 : Liste des réactifs utilisés en immunofluorescence

Mesure du potentiel de membrane interne mitochondrial

Les myoblastes immortalisés ont étéensemencés à 10 000 cellules par puits dans une microplaque 96 puits pour fluorescence (réf. 655090, Greiner Bio-one). Après stimulation des cellules, ces dernières sont incubées avec la sonde fluorescente Tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE, réf. T669, Invitrogen) à la concentration finale de 50 nM dans le milieu de croissance (GM) pendant 15 min à 37 °C. Après trois lavages en milieu de croissance (GM), le signal de fluorescence de la sonde TMRE a été lu au lecteur de plaque (Incucyte S3 Live-Cell Analysis System, Sartorius), permettant ainsi de mesurer toute modification du potentiel de la membrane interne mitochondriale. Les données ont été analysées sur le logiciel associé (Incucyte 2022B Rev2).

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées sous GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software, États-Unis). Les tests statistiques utilisés étaient le test de Mann-Whitney pour les comparaisons simples entre deux groupes, le test ANOVA un facteur pour les comparaisons des différents traitements (condition de stress EBSS avec ou sans traitement par HCQ) au sein d'un patient ou d'un contrôle séparément, et le test ANOVA deux facteurs en cas de comparaisons multiples des patients et des contrôles selon ces mêmes différents traitements (observation de l'effet du génotype et du traitement, ainsi que de l'interaction possible entre ces deux facteurs). Les données représentées sont exprimées en moyenne plus ou moins erreur standard de la moyenne.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

L'HCQ a été décrite précédemment comme possédant deux mécanismes d'action majeurs, liés à son lysosomotropisme et ses interactions avec les acides nucléiques, lui permettant d'exercer une activité antipaludéenne ainsi que des activités immunomodulatrices et anti-inflammatoires en autres. Au cours de cette thèse, nous avons mis en lumière une nouvelle indication possible de cette molécule dans le déficit en lipin1, médiée par une action anti-oxydative de l'HCQ de façon dose-dépendante.

EFFICACITÉ DOSE-DÉPENDANTE DE L'HYDROXYCHLOROQUINE DANS LE DÉFICIT EN LIPIN-1

A. Nouvelle indication possible de l'hydroxychloroquine : le déficit en lipin-1

Lors de cette thèse, nous avons fourni les premières données *in vivo* de l'HCQ chez des patients atteints d'un déficit en lipin-1 (Renard *et al.*, 2023(331)) présentant des épisodes aigus de RM potentiellement fatales, pouvant être associés à des symptômes chroniques comprenant fatigabilité et douleurs musculaires, et des atteintes cardiaques plus rarement. En l'absence de traitement spécifique du déficit en lipin-1, les patients ont été traités par HCQ à titre compassionnel avec une posologie initiale basée sur celle du LES (6,5 mg/kg/j). Grâce à une étude rétrospective basée sur les dossiers médicaux d'un premier groupe de patients, nous avons observé une amélioration des symptômes chroniques de ces derniers, comprenant une amélioration de la qualité de vie, de la douleur musculaire et de l'adaptation de leur capacité musculaire à l'effort. Les symptômes cardiaques d'un patient présentant un dysfonctionnement cardiaque se sont également améliorés, puis se sont de nouveau aggravés après l'interruption du traitement. Les premiers patients traités n'ont présenté aucun épisode de RM sous traitement par HCQ et, outre l'amélioration de leurs paramètres cliniques, leurs profils inflammatoires plasmatiques se sont normalisés. Ces données préliminaires rapportant l'efficacité du traitement par HCQ avaient permis d'obtenir la désignation de médicament orphelin pour l'HCQ par l'Agence européenne des médicaments (EMA/OD/177/17) en janvier 2018, argument de poids pour augmenter le nombre de patients traités par HCQ et implémenter les données de cette étude rétrospective. Par la suite, un deuxième groupe de patients a présenté les mêmes améliorations cliniques et biologiques présentées ci-dessus.

B. Hydroxychloroquine et autophagie

Au cours du traitement par HCQ, deux patients ont présenté un et deux épisodes aigus de RM dans un cadre infectieux de gastro-entérite. Étant donné que les deux patients présentaient les

concentrations d'HCQ dans le sang total les plus élevées, nous avons émis l'hypothèse de l'apparition d'une toxicité de l'HCQ à des concentrations sanguines élevées. En effet, bien que moins toxique que la CQ, des complications sévères dépendantes de la dose de l'HCQ ont déjà été rapportées, notamment des cas de rétinopathies (Costedoat-Chalumeau *et al.*, 2015(340)). Ces complications ont été décrites dans la littérature comme dépendantes du lysosomotropisme de l'HCQ associé à une altération de la fonction dégradative lysosomale (Sundelin et Terman, 2002(272) ; Yoon *et al.*, 2010(273) ; Frustaci *et al.*, 2012(278) ; Lee *et al.*, 2012(285)). Or, dans la physiopathologie du déficit en lipin-1, un blocage de l'autophagie, et plus particulièrement de la mitophagie, a été souligné dans différents modèles murins et humains (Ugrankar *et al.*, 2011(80) ; Zhang *et al.*, 2014(67) ; Alshudukhi *et al.*, 2018(85) ; Schweitzer *et al.*, 2019(60) ; Rashid *et al.*, 2019(66) ; Hamel *et al.*, 2021(81) ; Lin *et al.*, 2022(86)). Ainsi, nous avons postulé que le blocage de l'autophagie avec des concentrations élevées d'HCQ peut être davantage dangereux chez des patients présentant déjà un blocage de l'autophagie lié au déficit en lipin-1.

Nos résultats *in vitro* sur des myoblastes primaires de patients présentant un déficit en lipin-1 valident l'hypothèse de l'effet dose-dépendant de l'HCQ sur l'autophagie. En effet, les conditions de stress ont induit une accumulation d'autophagosomes, soulignant un blocage de la résolution autophagique, exacerbée en présence d'une concentration élevée d'HCQ (10 μ M). Comme décrit dans la littérature (Homewood *et al.*, 1972(128) ; Wibo et Poole 1974(141) ; Seglen *et al.*, 1979(142)), nous avons montré que le blocage de l'autophagie dans ces myoblastes résulte d'une alcalinisation du pH par l'HCQ. Il est important de noter que dans notre étude, le blocage de l'autophagie et l'alcalinisation du pH étaient limités à des concentrations élevées de HCQ (10 μ M), sans effet observé à des concentrations plus faibles d'HCQ (0,1 μ M ou 1 μ M).

C. Hydroxychloroquine et stress oxydatif

Les ROS sont des molécules hautement réactives pouvant entraîner à la fois l'oxydation de l'ADN, la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines (Phaniendra *et al.*, 2014(286) ; Martemucci *et al.*, 2022(287)). Nous avons montré *in vitro* que le déficit en lipin-1 n'est pas source d'un stress oxydatif, démontré par une faible quantité de ROS intracellulaires et d'ADN oxydé dans les myoblastes de patients à l'état basal. Ces observations confirment ainsi des résultats précédents sur un modèle murin du déficit en lipin-1 relevant une absence de carbonylation des protéines (Rashid *et al.*, 2019(66)). En revanche, une augmentation importante des ROS intracellulaires a été observée dans les myoblastes en condition de jeûne, reproduisant des résultats antérieurs sur le même modèle cellulaire (Hamel *et al.*, 2021(81)).

Malgré la controverse sur l'effet pro ou antioxydant de l'HCQ présenté en introduction, nos résultats *in vitro* ont montré que l'HCQ était capable de réduire l'accumulation de ROS et d'ADN oxydé induite par le jeûne de façon concentration-dépendante. En effet, l'effet maximal a été observé à 1 μM d'HCQ, tandis que l'HCQ à 10 μM était moins efficace.

D. Définition d'une fenêtre thérapeutique différente dans le déficit en lipin-1 basée sur l'effet dose-dépendant de l'HCQ

Malgré le fait qu'une relation directe ne peut être établie sans extrapolation entre les concentrations d'HCQ *in vitro* et *in vivo* (cellule isolée vs organisme entier), l'ensemble de ces résultats incitent à la prudence lors de l'utilisation de l'HCQ et à l'importance de la surveillance de cette molécule par dosages sur sang total au cours du traitement (Costedoat-Chalumeau *et al.*, 2017(341)). Il est à noter que les concentrations sanguines pour lesquelles les patients ont présenté des épisodes de RM aigus sous traitement par HCQ étaient d'environ 1000 $\mu\text{g/L}$. Or, dans les maladies auto-immunes rhumatismales, comme le LES ou la PR par exemple, des concentrations d'HCQ dans le sang total allant de 750 à 1 000 $\mu\text{g/L}$ sont nécessaires pour améliorer les symptômes réfractaires (Costedoat-Chalumeau *et al.*, 2007(342) et 2017(341) ; Chasset *et al.*, 2016(343)), notamment en bloquant l'autophagie et en modifiant le pH lysosomal dans les cellules immunitaires suractivées (Nirk *et al.*, 2020(194) ; Schrezenmeier et Dörner, 2020(195)). Dans le déficit en lipin-1, l'exacerbation du blocage de l'autophagie à fortes doses d'HCQ est délétère. En revanche, une dose plus faible d'HCQ (1 μM), n'ayant pas d'effet sur le blocage de l'autophagie, semble être bénéfique grâce à un effet antioxydatif. Ainsi, nous avons mise en place une adaptation posologique du traitement par HCQ avec un suivi par dosage sur sang total afin d'obtenir des concentrations cibles comprises entre 200 et 700 $\mu\text{g/L}$.

Après adaptation posologique, seule une patiente a déclaré des épisodes de RM quelle que soit la concentration sanguine d'HCQ. Certaines caractéristiques cliniques et biologiques telles que l'indice de masse corporelle, la fonction rénale et le polymorphisme du CYP ont été identifiées comme déterminant une variabilité inter-patient (Jallouli *et al.*, 2015(122) ; Paludetto *et al.*, 2022(111)). Dans la présente étude, nous n'avons trouvé aucune influence des polymorphismes du CYP sur l'exposition à l'HCQ dans le sang total. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence d'incorporation de l'HCQ dans les myoblastes des différents patients. Pendant la RM, nous recommandons l'arrêt de l'HCQ car les patients présentent un risque d'insuffisance rénale, l'excrétion rénale étant la voie d'élimination majoritaire de l'HCQ (Tett *et al.*, 1989(104) ; McLachlan *et al.*, 1994(105)).

ORIGINE DU STRESS OXYDATIF DU DÉFICIT EN LIPIN-1 ET MÉCANISMES D'ACTION ANTI-OXYDATIF DE L'HYDROXYCHLOROQUINE

La suite du projet s'est focalisée sur la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'effet antioxydant de l'HCQ. Cette étude nous a également permis d'approfondir nos connaissances sur la physiopathologie du déficit en lipin-1, notamment à travers une meilleure compréhension de l'origine du stress oxydatif cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé des myoblastes immortalisés de patients déficients en lipin-1 et de contrôles après avoir confirmé les niveaux d'expression génique et protéique de lipin-1 (Figure 13) et reproduit un stress oxydatif en condition de stress inversé par l'HCQ à la dose d'intérêt de 1 μ M (Figure 14). Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence dans l'augmentation de la quantité de ROS intracellulaires entre les myoblastes de patients et de contrôles en condition de stress (Figure 14), nous amenant à considérer que la différence entre ces deux groupes réside dans les conséquences à plus long terme des ROS et leur persistance dans le temps. En effet, les ROS sont indispensables à de nombreuses signalisations intracellulaires en condition physiologique (Valko *et al.*, 2007(288)), et c'est lors d'une rupture de la balance redox que ceux-ci peuvent constituer un signal de danger pour la cellule (Phaniendra *et al.*, 2014(286); Martemucci *et al.*, 2022(287)). Malheureusement, les techniques actuelles rendent difficiles l'étude à plus long terme de la quantité de ROS intracellulaires du fait de la saturation de la sonde qui est irréversible.

A. Hydroxychloroquine et dégradation des ROS intracellulaires

Grâce à une nouvelle analyse d'un transcriptome réalisé sur un modèle cellulaire DMT1 (Bargiela *et al.*, 2019(338)), nous avons observé un impact majeur de la CQ à 10 μ M sur la voie de signalisation médiée par le facteur de transcription anti-oxydatif Nrf2 (Figure 15). Nous avons émis l'hypothèse que des doses différentes d'HCQ pouvaient partager les mêmes mécanismes d'action, mais que de fortes doses d'HCQ contrebalançaient ses effets bénéfiques par le blocage de la résolution autophagique, expliquant ainsi une efficacité moindre voire délétère de la molécule à fortes doses dans le déficit en lipin-1. Cependant, nous avons montré *in vitro* que l'HCQ à la dose de 1 μ M n'entraîne pas de modification de l'expression de gènes ARE via leur régulation par le facteur de transcription Nrf2, en l'absence de modification d'expression des gènes ARE (Figure 16) et de la translocation nucléaire de Nrf2 (Figure 17) à cette dose à l'état basal et en condition de stress. En revanche, une dose beaucoup plus élevée de 50 μ M d'HCQ a permis une translocation nucléaire de Nrf2 (Figure 17), parallèlement à un blocage de l'autophagie (données non montrées). Ainsi, dans les myoblastes immortalisés, les résultats suggèrent que l'HCQ peut induire une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 à forte dose (50 μ M), effet dose-dépendant précédemment démontré *in*

vitro (Duleh *et al.*, 2016(323)) et *in vivo* (Shen *et al.*, 2017(322)). Cet effet semble également dépendant de l'autophagie, comme démontré *in vitro* par Duleh *et al.*, 2016. Ainsi, l'effet anti-oxydatif de l'HCQ à la dose de 1 μM dans les myoblastes des patients ne semble pas reposer sur l'activation du système antioxydant de Nrf2, notamment du fait de l'absence de blocage de la résolution autophagique à 1 μM démontrée précédemment (Renard *et al.*, 2023(331)). Il est à noter que nous ne pouvons pas exclure que la dose de 50 μM d'HCQ peut également activer la voie de signalisation médiée par Nrf2 par une augmentation de la quantité de ROS intracellulaires, comme souligner *in vitro* par Peng *et al.*, 2021.

De la même façon, l'absence de blocage de la résolution autophagique à la dose de 1 μM d'HCQ ne nous a pas incité à étudier l'action possible de cette molécule sur le complexe oxydatif NOX dont l'inhibition *in vitro* a été décrite précédemment dans la littérature comme passant par le blocage de l'autophagie (Teng *et al.*, 2012(319)). En revanche, pour aller plus loin, l'étude de l'activité enzymatique de protéines dont l'expression est régulée par Nrf2, comme les CAT ou les SOD, semble pertinente. En effet, il est intéressant de noter que dans les articles démontrant *in vivo* une activité oxydative de l'HCQ, une augmentation de l'activité des SOD a été décrite, justifiée par les auteurs par une réponse adaptative au stress oxydatif induit par l'HCQ sans démonstration expérimentale (Farombi *et al.*, 2003(308) ; Ogunbayo *et al.*, 2006(311)).

B. Hydroxychloroquine et production des ROS intracellulaires

Nous avons montré une suite d'événements biologiques pouvant expliquer la survenue d'un stress oxydatif en condition de jeûne auto-entretenu et persistant dans les myoblastes de patients présentant un déficit en lipin-1, en dépit d'un biais potentiel lié à la sensibilité des différentes techniques utilisées au cours de cette thèse : l'apparition d'un stress du RE, puis une altération du flux calcique, et enfin, un dysfonctionnement mitochondrial.

1) Stress du RE

Au cours de cette thèse, nous avons montré *in vitro* une augmentation de l'expression du gène *CHOP* en condition de jeûne dans les myoblastes immortalisés de patients (Figure 18), suggérant une possible implication du stress du RE en condition de stress dans le déficit en lipin-1. L'absence de clivage du facteur de transcription Xbp1, clé de la voie médiée par IRE1, et de l'activation de la signalisation de Nrf2, facteur phosphorylé et activé par la voie PERK, suggère davantage l'activation de la voie UPR médiée par ATF6. La présence d'un stress du RE avait été préalablement observé dans un modèle murin présentant un déficit en lipin-1 spécifique du muscle, avec une activation des voies UPR médiées par IRE1 et ATF6 dès l'état basal (Rashid *et al.*, 2019(66)). Cependant, une étude antérieure

sur des myoblastes de patients avec un déficit en lipin-1 avait souligner l'absence d'un stress du RE et d'atteinte morphologique de cet organelle en condition basale (Michot *et al.*, 2013(63)).

2) Stress du RE et altération du flux calcique

Un stress du RE peut conduire à la formation de ROS via la voie intraluminale PDI/ERO1 (Cao et Kaufman, 2014(291) ; Forrester *et al.*, 2018(290)). Il est à noter également qu'en réponse au stress du RE, CHOP peut augmenter l'expression de l'isoforme ERO1 α et donc la production de ROS par le RE (Forrester *et al.*, 2018(290)). Cette production de ROS entraîne une oxydation des canaux et pompes calciques, à l'origine d'une hyperactivation des canaux calciques dont les récepteurs à l'inositol triphosphate (*Inositol triphosphate receptor* ou IP3R) et les canaux Ryr, ainsi qu'une inhibition des pompes calciques SERCA (Görlach *et al.*, 2015(344)), entraînant alors une fuite de calcium du RE vers le cytosol.

De plus, dans les modèles humains et murins spécifiques du muscle, il n'a pas été montré de diminution de la quantité de diacylglycérol (Zeharia *et al.*, 2008(51) ; Michot *et al.*, 2010(18) et 2012(19) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)), produit issu notamment de l'activité PAP1 de lipin-1, suggérant ainsi la présence de phénomène compensatoire intracellulaire. L'hypothèse serait une augmentation de l'activité enzymatique de la phospholipase C, à l'origine non seulement de la production de diacylglycérol mais aussi d'inositol triphosphate (IP3), ligand des canaux calciques IP3R au niveau de la membrane du RE (Putney et Tomita, 2012(345)). Ainsi, le déficit en lipin-1 pourrait être responsable d'une augmentation de la quantité de ligand du récepteur IP3R, dont l'activité serait exacerbée en condition de stress par oxydation issue des ROS du RE. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la diminution du contenu calcique du RE que nous avons observée en condition de jeûne dans les myoblastes primaires de patients (Figure 12).

Dans cette thèse, nous avons également montré que l'HCQ à la dose de 1 μ M ne permet pas d'inverser cette altération du flux calcique en condition de jeûne (Figure 12). Ce résultat est en contradiction avec des études antérieures montrant une inhibition de la liaison ligand récepteur de l'IP3R par l'HCQ (Misra *et al.*, 1997(346) ; Xu *et al.*, 2015(347) ; Wu *et al.*, 2017(203)), expliquant ainsi l'altération du flux calcique à l'origine d'une inhibition de l'activation des lymphocytes T en aval de leur TCR *in vitro* dans un modèle de rejet de greffe (Goldman *et al.*, 2000(348)). Cette contraction pourrait être expliquée par les concentrations élevées d'HCQ utilisées dans ces articles en comparaison à notre dose d'intérêt de 1 μ M (Tableau 4).

3) Altération du flux calcique et dysfonctionnement mitochondriale

Ce travail a permis de suspecter une altération du potentiel de membrane en condition de jeûne dans les myoblastes immortalisés de patients (Figure 19). Cela peut être mise en regard de résultats précédents dans des modèles murins présentant un déficit en lipin-1 dans lesquels a été observée une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles en condition de jeûne (Zhang *et al.*, 2014(67) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65)). L'absence de significativité des résultats entre la condition basale et la condition de stress chez les myoblastes immortalisés de patients pourrait néanmoins s'expliquer par un dysfonctionnement primaire de la chaîne respiratoire mitochondriale, précédemment observé dans des myoblastes primaires de patients déficients en lipin-1 (Hamel *et al.*, 2021(81)). Cette hypothèse d'atteinte primaire a également été appuyée par l'implication de la protéine lipin-1 dans la dynamique mitochondriale (Baba *et al.*, 2014(83) ; Kameoka *et al.*, 2018(84)). Cependant, nos expériences *in vitro* ont montré une quantité de ROS intracellulaires indétectables dans les myoblastes primaires et immortalisés des patients en condition basale, ne reflétant pas un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative. Cette controverse a également été décrite dans un modèle murin d'un déficit en lipin-1 ne présentant pas de modification de la capacité respiratoire mitochondriale en condition basale associée à une absence de carbonylation des protéines et donc de stress oxydatif (Rashid *et al.*, 2019(66)). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour affirmer le caractère primaire ou secondaire du déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le déficit en lipin-1.

Une atteinte secondaire de la chaîne respiratoire mitochondriale peut subvenir lors d'une entrée massive de calcium intra-mitochondriale (Brookes *et al.*, 2004(349) ; Matuz-Mares *et al.*, 2022(350)). La fuite importante de calcium du RE démontrée dans ce travail (Figure 12) peut entraîner cette surcharge calcique mitochondriale par gradient électrochimique soit indirectement par augmentation calcique intracytosolique, soit directement au niveau de sites de contact entre la mitochondrie et le RE, ou *Mitochondria-Associated ER Membranes* (MAM) (Görlach *et al.*, 2015(344)). Cette entrée massive de calcium dans la mitochondrie peut ainsi altérer la phosphorylation oxydative mitochondriale par modification de son potentiel de membrane interne, responsable à son tour la génération de ROS et pouvant aussi induire un stress du RE. Ainsi, le jeûne induirait une boucle d'amplification du stress oxydatif auto-entretenu entre les différents organelles intracellulaires (mitochondrie et RE) qui serait délétère à long terme chez les patients présentant un déficit en lipin-1.

Notre hypothèse est un effet de l'HQC à la dose de 1 μ M en aval de la fuite calcique du RE, notamment au niveau de la mitochondrie, pour réduire la surcharge de calcium intra-mitochondrial et ainsi prévenir le stress oxydatif. Nos travaux actuels *in vitro* sur les myoblastes immortalisés des

patients ne nous permettent pas actuellement de conclure à un tel effet (Figure 19). Cependant, ceci constitue une piste prometteuse à mettre en regard de l'implication de HCQ sur le blocage de canaux calciques voltage-dépendants au niveau de cardiomyocytes, notamment responsable de ses effets indésirables de type arythmies cardiaques (Delaunois *et al.*, 2021(282)). Dans la littérature, il a également été montré que la CQ inhibe l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire dans les thymocytes murins CD4+ et les lymphocytes B en inhibant l'influx Ca^{2+} extracellulaire dans le cytosol et le RE médié par les canaux calciques *Transient receptor channel 3* (TRPC3) et/ou le complexe *Stromal interaction molecule* (STIM) / Orai respectivement (Zhang *et al.*, 2014(351) ; Xu *et al.*, 2015(347) ; Wu *et al.*, 2017(203)). Ainsi, la prévention d'un dysfonctionnement mitochondrial permettrait d'éviter un relargage de l'ADNmt dans le cytosol et donc l'activation des voies de signalisation proinflammatoires telles que STING ou TLR9, en amont de l'effet précédemment décrit de l'HCQ sur la liaison ligand-récepteur de TLR9 (Rutz *et al.*, 2004(184) ; Kuznik *et al.*, 2011(185) ; Lamphier *et al.*, 2014(102)).

4) Peroxisome, une autre source endogène de ROS

Il existe une remise en cause du paradigme selon lequel la mitochondrie est la source majeure de ROS intracellulaires (Brown et Borutaite, 2012(352) ; Zhang et Wong, 2021(353)), laissant émerger une part plus importante de l'implication d'autres organelles dans le stress oxydatif comme le RE et le peroxysome. Ce dernier est responsable de diverses fonctions biologiques, dont le métabolisme lipidique et celui du peroxyde d'hydrogène. La plupart des fonctions biologiques du peroxysome sont également associées à la production de ROS peroxysomales (Schrader et Fahimi, 2006(354) ; Fransen *et al.*, 2012(355) ; Forrester *et al.*, 2018(290)).

La biogenèse et les fonctions peroxysomales impliquent également une communication avec d'autres organelles (mitochondrie et RE) et compartiments intracellulaires (lysosomes et gouttelettes lipidiques) (Wanders *et al.*, 2016(356) ; He *et al.*, 2021(357)). Par exemple, en cas de besoin énergétique, les gouttelettes lipidiques peuvent être source d'acides gras à très longue chaîne dont la β -oxydation débute au niveau du peroxysome (Lodhi et Semenkovich, 2014(358)). Or, récemment, il a été montré *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme une corrélation entre la surcharge lipidique du muscle squelettique et l'augmentation de la biogenèse et l'activité du peroxysome (Huang *et al.*, 2019(359)). Il est alors intéressant de se demander si dans le cas du déficit en lipin-1, pour lequel une accumulation anormale de gouttelettes lipidiques a été observée dans le tissu musculaire chez l'Homme (Michot *et al.*, 2012(19) et 2013(63)) et dans les modèles animaux (Zhang *et al.*, 2014(67) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)), une augmentation des échanges lipidiques entre les gouttelettes lipidiques et le peroxysome peut être à l'origine d'une augmentation de la production de ROS par ce dernier en condition de stress métabolique. Par ailleurs, une étroite collaboration entre les

peroxysomes et les mitochondries dans la signalisation des ROS a été rapportée (Wang *et al.*, 2013(360)). Un déséquilibre rédox peroxysomal provoquerait plusieurs effets sur la mitochondrie pouvant aboutir à la mort cellulaire à long terme : 1) une réduction de l'activité enzymatique mitochondriale, notamment des enzymes du cycle de Krebs ; 2) une fragmentation mitochondriale accrue ; 3) une altération du potentiel de membrane interne mitochondriale à l'origine d'une réduction de la phosphorylation oxydative et un stress oxydatif (Schrader *et al.*, 2015(361) ; Deori *et al.*, 2018(362)). Enfin, il est à noter également que la mitochondrie et le peroxysome présentent le même facteur de fission Drp1 (Schrader *et al.*, 2016(363)), ce dernier étant régulé par l'activité enzymatique de la protéine lipin-1 (Baba *et al.*, 2014(83) ; Kameoka *et al.*, 2018(84)).

Ainsi, l'implication du peroxysome dans le stress métabolique et oxydatif du déficit en lipin-1 semble être une piste intéressante à investiguer au même titre que la fonction mitochondriale et le stress du RE.

5) Variabilité entre modèle humain et modèles murins

Afin d'identifier des cibles thérapeutiques anti-oxydatives de l'HCQ, il est important de mieux connaître la physiopathologie du stress oxydatif dans le déficit en lipin-1. Or, au cours de ce travail de thèse, nous avons souligné le morcellement des informations sur l'implication du stress oxydatif dans le déficit en lipin-1 et des différents organelles qui y sont impliqués, notamment la mitochondrie et le RE. Des contradictions ont émergé entre les différents modèles murins, mais également entre ces derniers et les études menées chez l'Homme. Ces différences de physiopathologie se rajoutent à des divergences plus générales de phénotype observées entre l'Homme et l'animal. En effet, les symptômes musculaires dans les modèles murins regroupent davantage des signes chroniques (diminution de la force musculaire et de la tolérance à l'exercice) (Schweitzer *et al.*, 2019(65) ; Rashid *et al.*, 2019(66)). Ces derniers peuvent être associés à des épisodes de RM aiguës dont la sévérité semble être moins importante que celle observée chez l'Homme (élévation des CPK inférieure à 5 000 UI/L en combinant différents stress tels que le jeûne, l'exercice musculaire et l'âge du modèle) (Zhang *et al.*, 2014(351) ; Schweitzer *et al.*, 2019(65)). Il est à noter que la survenue d'une RM aiguë sévère chez l'animal nécessite par exemple l'injection intramusculaire de glycérol, entraînant ainsi une élévation importante des CPK supérieure à 10 000 UI/L, ainsi qu'une insuffisance rénale aiguë (Moggio *et al.*, 2017(364), Song *et al.*, 2020(365)).

C. Aspect multifactoriel de l'hydroxychloroquine

Comme souligné en introduction, Browning *et al.*, 2014 ont montré un aspect multifactoriel de l'HCQ dans différents modèles d'étude. Par exemple, Jeong *et al.*, 2018 ont montré *in vitro* et *in vivo* que la CQ induit la biogenèse mitochondriale et rééquilibre la dynamique mitochondriale fusion/fission en condition de stress dans un modèle de néphropathie diabétique, en restaurant la phosphorylation et l'activité de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) et de PGC-1 α . Il est à noter dans ce modèle d'étude que la phosphorylation de l'AMPK par la CQ est associée à une diminution à la fois des ROS et de l'ADN oxydé, probablement par rétablissement de l'homéostasie mitochondriale (Jeong *et al.*, 2018(366)). La phosphorylation de l'AMPK par la CQ avait déjà été observée *in vitro* dans des myotubes murins C2C12 (Spears *et al.*, 2016(367)). L'AMPK est une kinase dont l'activité est impliquée à la fois dans la biogenèse mitochondriale, mais également dans le métabolisme lipidique et glucidique. Sa phosphorylation permet notamment d'augmenter la β -oxydation des acides gras aux dépens de leur synthèse (Herzig et Shaw, 2018(368)). Ainsi, l'AMPK semble être une cible thérapeutique prometteuse dans la prise en charge thérapeutique du déficit en lipin-1 par l'HCQ, pathologie dans laquelle une altération de l'expression des gènes de la β -oxydation des acides gras a été observée dans des modèles humains et murins (Phan et Reue, 2005(64) ; Michot *et al.*, 2013(63) ; Rashid *et al.*, 2019(66)) et un dysfonctionnement de la dynamique mitochondriale suspectée (Baba *et al.*, 2014(83) ; Kameoka *et al.*, 2018(84)).

Nous avons également vu en introduction que la phospholipase A2 peut être activée lors d'une élévation cytosolique calcique, entraînant une digestion des membranes cellulaires à l'origine à la fois d'une augmentation de leur perméabilité, notamment au calcium, mais également de la génération d'acides gras libres potentiellement toxiques pour la cellule (Giannoglou *et al.*, 2007(9)). Or, l'HCQ et la CQ ont été décrites comme des inhibiteurs non sélectifs de différentes isoformes de phospholipase A2, suggérant des effets bénéfiques dans différents contextes pathologiques comme une infection palustre, une myocardie ischémique, une PR ou une neurodégénération inflammatoire (Zidovetzki *et al.*, 1993(369), Hostetler et Jellison, 1989(370), Bondeson et Sundler, 1998(200) ; Farooqui *et al.*, 2004(371) et 2006(372)). Il est intéressant de noter que la CQ est capable d'inhiber l'activité enzymatique de la phospholipase A2 à des concentrations plus élevées, mais également d'induire une régulation négative de son expression protéique à des concentrations plus faibles (Farooqui *et al.*, 2004(371)).

Il est à prendre en considération que la majorité des cibles thérapeutiques de l'HCQ envisagées ici repose sur l'utilisation de doses élevées de cette molécule dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, incompatible avec notre recherche d'une diminution des concentrations en clinique (Tableau 4).

Cible envisagée	Modèle	Dose utilisée	Référence bibliographique
SOD	Infection palustre : Homme (<i>in vivo</i>)	25 mg/kg (3 j)	Farombi <i>et al.</i> , 2003(308)
	Lapin (<i>in vivo</i>)	10 mg /kg (1 j)	Ogunbayo <i>et al.</i> , 2006(311)
IP3R	ASMC (<i>in vitro</i>)	1 et 3 mM	Zhang <i>et al.</i> ; 2014(351)
	Thymocytes murins CD4+ (<i>in vitro</i>)	10 mM	Xu <i>et al.</i> , 2015(347)
	Lymphocytes B murins (<i>in vitro</i>)	10 mM	Wu <i>et al.</i> , 2017(203)
Phospholipase A2	Enzyme isolée cœur de rat (<i>in vitro</i>)	IC ₅₀ : 1-10 mM	Hostetler et Jellison., 1989(370)
	Infection palustre – Erythrocyte humain (<i>in vitro</i>)	IC ₅₀ : 1,3 mM	Zidovetzki <i>et al.</i> , 1993(369)
	Macrophages murins (<i>in vitro</i>)	5 et 20 µM	Bondeson et Sundler, 1998(200)
	Enzyme isolée cerveau bovin Hippocampe de rat (<i>in vitro</i>)	IC ₅₀ : 200 µM IC ₅₀ : 10 µM	Farooqui <i>et al.</i> , 2004(371)
AMPK	Myotubes murins C2C12 (<i>in vitro</i>)	250 et 500 µM	Spears <i>et al.</i> , 2016(367)
	Néphropathie diabétique : Souris (<i>in vivo</i>) Lignée HKC-8 (<i>in vitro</i>)	50 mg/ kg (14 j) 200 µM	Jeong <i>et al.</i> , 2018(366)

Tableau 4 : Cibles thérapeutiques potentielles d'HCQ et doses utilisées dans la littérature. ASMC : Aortic smooth mouse cell ; HKC-8 : human-derived renal proximal tubular cell line ; IC₅₀ : concentration d'une molécule nécessaire pour réduire de 50% la réponse maximale.

Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une nouvelle indication de l'HCQ dans le déficit en lipin-1. Nos travaux ont permis de souligner l'efficacité dose-dépendante de l'HCQ dans le déficit en lipin-1 *in vitro*, justifiant par extrapolation d'utiliser des doses plus faibles chez les patients présentant un déficit en lipin-1 par rapport aux autres indications de l'HCQ pour lesquelles des concentrations sanguines plus élevées de cette molécule sont recherchées. En effet, le blocage de l'autophagie obtenu à plus fortes doses constitue un des mécanismes thérapeutiques empiriques de l'HCQ, mais est délétère pour des patients chez qui cette altération biologique est préexistante. Ainsi, nous avons montré qu'à plus faible dose, l'HCQ permet de réverser un stress oxydatif observé en condition de stress dans le déficit en lipin-1 indépendamment d'un blocage de l'autophagie. Les divergences sur l'origine du stress oxydatif selon les modèles d'étude ainsi que l'utilisation de faibles doses rendent difficiles l'identification des mécanismes anti-oxydatifs sous-jacents de l'HCQ par simple repositionnement. Cependant, l'aspect multifactoriel de l'HCQ offre de nombreuses pistes de réflexions pour explorer ses propriétés bénéfiques dans le déficit en lipin-1.

REFERENCES

1. Warren JD, Blumbergs PC, Thompson PD. Rhabdomyolysis: A review. *Muscle & Nerve*. 2002;25(3):332-47.
2. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis – an overview for clinicians. *Crit Care*. 2005;9(2):158-69.
3. Vanholder R, Sever MSDD, Ereke E, Lameire N. Rhabdomyolysis. *Journal of the American Society of Nephrology*. août 2000;11(8):1553.
4. Cervellin G, Comelli I, Lippi G. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1 juin 2010;48(6):749-56.
5. Sauret JM, Marinides G, Wang GK. Rhabdomyolysis. *afp*. 1 mars 2002;65(5):907-13.
6. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: Complications and treatment. *European Journal of Internal Medicine*. déc 2008;19(8):568-74.
7. Rossi A, Pizzo P, Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 juill 2019;1866(7):1068-78.
8. Hyatt HW, Powers SK. Disturbances in Calcium Homeostasis Promotes Skeletal Muscle Atrophy: Lessons From Ventilator-Induced Diaphragm Wasting. *Front Physiol*. 17 déc 2020;11:615351.
9. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *European Journal of Internal Medicine*. 1 mars 2007;18(2):90-100.
10. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Ochsner J*. 2015;15(1):58-69.
11. Chavez LO, Leon M, Einav S, Varon J. Beyond muscle destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice. *Crit Care*. 2016;20:135.
12. Shapiro ML, Baldea A, Luchette FA. Rhabdomyolysis in the Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med*. 1 nov 2012;27(6):335-42.
13. Morava E, Rahman S, Peters V, Baumgartner MR, Patterson M, Zschocke J. Quo vadis: the re-definition of « inborn metabolic diseases ». *J Inherit Metab Dis*. nov 2015;38(6):1003-6.
14. Lamari F, Mochel F, Saudubray JM. An overview of inborn errors of complex lipid biosynthesis and remodelling. *J Inherit Metab Dis*. janv 2015;38(1):3-18.
15. Saudubray JM, Mochel F, Lamari F, Garcia-Cazorla A. Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: A practical guide for clinicians. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. juill 2019;42(4):706-27.
16. Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Wahlster L, Lu J, Byrne S, Hoffmann GF, et al. Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn errors of neuro-metabolism. *Brain*. févr 2016;139(Pt 2):317-37.

17. García-Cazorla A, Oyarzábal A, Saudubray JM, Martinelli D, Dionisi-Vici C. Genetic disorders of cellular trafficking. *Trends Genet.* juill 2022;38(7):724-51.
18. Michot C, Hubert L, Brivet M, De Meirleir L, Valayannopoulos V, Müller-Felber W, et al. LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. *Hum Mutat.* 17 mai 2010;31(7):E1564-73.
19. Michot C, Hubert L, Romero NB, Gouda A, Mamoune A, Mathew S, et al. Study of LPIN1, LPIN2 and LPIN3 in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia. *J Inherit Metab Dis.* nov 2012;35(6):1119-28.
20. Khan FY. Rhabdomyolysis: a review of the literature. *Neth J Med.* oct 2009;67(9):272-83.
21. Nance JR, Mammen AL. Diagnostic Evaluation of Rhabdomyolysis. *Muscle Nerve.* juin 2015;51(6):793-810.
22. Durigneux J, Gitiaux C, De Lonlay P. Élévation des enzymes musculaires chez l'enfant. *Perfectionnement en Pédiatrie.* mai 2023;6(2):S16-8.
23. Lilleker JB, Keh YS, Roncaroli F, Sharma R, Roberts M. Metabolic myopathies: a practical approach. *Practical Neurology.* 1 févr 2018;18(1):14-26.
24. Langner CA, Birkenmeier EH, Ben-Zeev O, Schotz MC, Sweet HO, Davisson MT, et al. The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J Biol Chem.* 15 mai 1989;264(14):7994-8003.
25. Reue K, Xu P, Wang XP, Slavin BG. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *Journal of Lipid Research.* 1 juill 2000;41(7):1067-76.
26. Péterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet.* janv 2001;27(1):121-4.
27. Csaki LS, Dwyer JR, Fong LG, Tontonoz P, Young SG, Reue K. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Prog Lipid Res.* juill 2013;52(3):305-16.
28. Chen Y, Rui BB, Tang LY, Hu CM. Lipin Family Proteins - Key Regulators in Lipid Metabolism. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 2 déc 2014;66(1):10-8.
29. Zhang P, Reue K. Lipin proteins and glycerolipid metabolism: roles at the ER membrane and beyond. *Biochim Biophys Acta.* sept 2017;1859(9 Pt B):1583-95.
30. Lutkewitte AJ, Finck BN. Regulation of Signaling and Metabolism by Lipin-mediated Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. *Biomolecules.* 29 sept 2020;10(10):1386.
31. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. Three Mammalian Lipins Act as Phosphatidate Phosphatases with Distinct Tissue Expression Patterns*. *Journal of Biological Chemistry.* 9 févr 2007;282(6):3450-7.
32. Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin Homolog Is a Mg²⁺-dependent Phosphatidate Phosphatase Enzyme*, ♦. *Journal of Biological Chemistry.* 7 avr 2006;281(14):9210-8.

33. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metabolism*. 1 sept 2006;4(3):199-210.
34. Ren H, Federico L, Huang H, Sunkara M, Drennan T, Frohman MA, et al. A Phosphatidic Acid Binding/Nuclear Localization Motif Determines Lipin1 Function in Lipid Metabolism and Adipogenesis. *Mol Biol Cell*. 15 sept 2010;21(18):3171-81.
35. Péterfy M, Phan J, Reue K. Alternatively Spliced Lipin Isoforms Exhibit Distinct Expression Pattern, Subcellular Localization, and Role in Adipogenesis*. *Journal of Biological Chemistry*. 23 sept 2005;280(38):32883-9.
36. Han GS, Carman GM. Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *J Biol Chem*. 7 mai 2010;285(19):14628-38.
37. Harris TE, Finck BN. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. juin 2011;22(6):226-33.
38. Reue K, Brindley DN. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res*. déc 2008;49(12):2493-503.
39. Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniosoglou S. Temporal and Spatial Regulation of the Phosphatidate Phosphatases Lipin 1 and 2. *J Biol Chem*. 24 oct 2008;283(43):29166-74.
40. Reue K, Wang H. Mammalian lipin phosphatidic acid phosphatases in lipid synthesis and beyond: metabolic and inflammatory disorders. *J Lipid Res*. avr 2019;60(4):728-33.
41. Liu GH, Gerace L. Sumoylation Regulates Nuclear Localization of Lipin-1 α in Neuronal Cells. *PLOS ONE*. 15 sept 2009;4(9):e7031.
42. Shimizu K, Fukushima H, Ogura K, Lien EC, Nihira NT, Zhang J, et al. The SCF β -TRCP E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. *Sci Signal*. 3 janv 2017;10(460):eaah4117.
43. Péterfy M, Harris TE, Fujita N, Reue K. Insulin-stimulated Interaction with 14-3-3 Promotes Cytoplasmic Localization of Lipin-1 in Adipocytes. *J Biol Chem*. 5 févr 2010;285(6):3857-64.
44. Kim Y, Gentry MS, Harris TE, Wiley SE, Lawrence JC, Dixon JE. A conserved phosphatase cascade that regulates nuclear membrane biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 avr 2007;104(16):6596-601.
45. Han S, Bahmanyar S, Zhang P, Grishin N, Oegema K, Crooke R, et al. Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1 (formerly TMEM188) is the metazoan Spo7p ortholog and functions in the lipin activation pathway. *J Biol Chem*. 27 janv 2012;287(5):3123-37.
46. Huffman TA, Mothe-Satney I, Lawrence JC. Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 janv 2002;99(2):1047-52.
47. Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, et al. Insulin Controls Subcellular Localization and Multisite Phosphorylation of the Phosphatidic Acid Phosphatase, Lipin 1*. *Journal of Biological Chemistry*. 5 janv 2007;282(1):277-86.

48. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 5 août 2011;146(3):408-20.
49. Eaton JM, Mullins GR, Brindley DN, Harris TE. Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association. *J Biol Chem*. 5 avr 2013;288(14):9933-45.
50. Liu GH, Qu J, Carmack AE, Kim HB, Chen C, Ren H, et al. Lipin proteins form homo- and hetero-oligomers. *Biochem J*. 15 nov 2010;432(1):65-76.
51. Zeharia A, Shaag A, Houtkooper RH, Hindi T, de Lonlay P, Erez G, et al. Mutations in LPIN1 Cause Recurrent Acute Myoglobinuria in Childhood. *The American Journal of Human Genetics*. oct 2008;83(4):489-94.
52. Meijer IA, Sasarman F, Maftai C, Rossignol E, Vanasse M, Major P, et al. LPIN1 deficiency with severe recurrent rhabdomyolysis and persistent elevation of creatine kinase levels due to chromosome 2 maternal isodisomy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. déc 2015;5:85-8.
53. Kanderi N, Kirmse B, Regier DS, Chapman KA. LPIN1 rhabdomyolysis: A single site cohort description and treatment recommendations. *Mol Genet Metab Rep*. 5 févr 2022;30:100844.
54. Legendre A, Khraiche D, Ou P, Mauvais FX, Madrange M, Guemann AS, et al. Cardiac function and exercise adaptation in 8 children with LPIN1 mutations. *Mol Genet Metab*. mars 2018;123(3):375-81.
55. Stepien KM, Schmidt WM, Bittner RE, O'Toole O, McNamara B, Treacy EP. Long-term outcomes in a 25-year-old female affected with lipin-1 deficiency. *JIMD Rep*. mars 2019;46(1):4-10.
56. Minton T, Forrester N, Baba SA, Urankar K, Brady S. A rare case of adult onset LPIN1 associated rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord*. mars 2020;30(3):241-5.
57. Indika NLR, Vidanapathirana DM, Jasinge E, Waduge R, Shyamali NLA, Perera PPR. Lipin-1 Deficiency-Associated Recurrent Rhabdomyolysis and Exercise-Induced Myalgia Persisting into Adulthood: A Case Report and Review of Literature. *Case Rep Med*. 27 mai 2020;2020:7904190.
58. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-Associated Myopathy. *JAMA*. 2 avr 2003;289(13):1681-90.
59. Temprano A, Sembongi H, Han GS, Sebastián D, Capellades J, Moreno C, et al. Redundant roles of the phosphatidate phosphatase family in triacylglycerol synthesis in human adipocytes. *Diabetologia*. 2016;59:1985-94.
60. Schweitzer GG, Collier SL, Chen Z, Eaton JM, Connolly AM, Bucelli RC, et al. Rhabdomyolysis-Associated Mutations in Human LPIN1 Lead to Loss of Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. *JIMD Rep*. 2015;23:113-22.
61. Lu S, Lyu Z, Wang Z, Kou Y, Liu C, Li S, et al. Lipin 1 deficiency causes adult-onset myasthenia with motor neuron dysfunction in humans and neuromuscular junction defects in zebrafish. *Theranostics*. 1 janv 2021;11(6):2788-805.
62. Bergounioux J, Brassier A, Rambaud C, Bustarret O, Michot C, Hubert L, et al. Fatal Rhabdomyolysis in 2 Children with LPIN1 Mutations. *The Journal of Pediatrics*. 1 juin 2012;160(6):1052-4.

63. Michot C, Mamoune A, Vamecq J, Viou MT, Hsieh LS, Testet E, et al. Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. déc 2013;1832(12):2103-14.
64. Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metabolism*. 1 janv 2005;1(1):73-83.
65. Schweitzer GG, Collier SL, Chen Z, McCommis KS, Pittman SK, Yoshino J, et al. Loss of lipin 1-mediated phosphatidic acid phosphohydrolase activity in muscle leads to skeletal myopathy in mice. *The FASEB Journal*. janv 2019;33(1):652-67.
66. Rashid T, Nemazanyy I, Paolini C, Tatsuta T, Crespín P, de Villeneuve D, et al. Lipin1 deficiency causes sarcoplasmic reticulum stress and chaperone-responsive myopathy. *EMBO J*. 3 janv 2019;38(1):e99576.
67. Zhang P, Verity MA, Reue K. Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle. *Cell Metab*. 5 août 2014;20(2):267-79.
68. Xu J, Lee WNP, Phan J, Saad MF, Reue K, Kurland IJ. Lipin Deficiency Impairs Diurnal Metabolic Fuel Switching. *Diabetes*. 1 déc 2006;55(12):3429-38.
69. Sellers RS, Mahmood SR, Perumal GS, Macaluso FP, Kurland IJ. Phenotypic Modulation of Skeletal Muscle Fibers in LPIN1-Deficient Lipodystrophic (fld) Mice. *Vet Pathol*. mars 2019;56(2):322-31.
70. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 11 janv 2008;132(1):27-42.
71. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 28 févr 2008;451(7182):1069-75.
72. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20 janv 2014;20(3):460-73.
73. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*. 3 juill 2017;36(13):1811-36.
74. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. févr 2010;140(3):313-26.
75. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci*. 1 mars 2016;73(5):985-1001.
76. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*. janv 2021;17(1):1-382.
77. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 2 avr 2010;584(7):1287-95.
78. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2 janv 2015;125(1):25-32.
79. Grumati P, Bonaldo P. Autophagy in Skeletal Muscle Homeostasis and in Muscular Dystrophies. *Cells*. 25 juill 2012;1(3):325-45.

80. Ugrankar R, Liu Y, Provaznik J, Schmitt S, Lehmann M. Lipin Is a Central Regulator of Adipose Tissue Development and Function in *Drosophila melanogaster* ▽ . *Mol Cell Biol.* avr 2011;31(8):1646-56.
81. Hamel Y, Mauvais FX, Madrange M, Renard P, Lebreton C, Nemazanyy I, et al. Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis. *Cell Rep Med.* 17 août 2021;2(8):100370.
82. Yoon MS, Rosenberger CL, Wu C, Truong N, Sweedler JV, Chen J. Rapid Mitogenic Regulation of the mTORC1 Inhibitor, DEPTOR, by Phosphatidic Acid. *Mol Cell.* 7 mai 2015;58(3):549-56.
83. Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, et al. Phosphatidic Acid (PA)-preferring Phospholipase A1 Regulates Mitochondrial Dynamics. *J Biol Chem.* 18 avr 2014;289(16):11497-511.
84. Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, Sesaki H. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol.* janv 2018;28(1):67-76.
85. Alshudukhi AA, Zhu J, Huang D, Jama A, Smith JD, Wang QJ, et al. Lipin-1 regulates Bnip3-mediated mitophagy in glycolytic muscle. *FASEB J.* déc 2018;32(12):6796-807.
86. Lin CC, Yan J, Kapur MD, Norris KL, Hsieh CW, Huang D, et al. Parkin coordinates mitochondrial lipid remodeling to execute mitophagy. *EMBO reports.* 6 déc 2022;23(12):e55191.
87. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2012;13(2):89-102.
88. Almanza A, Carlesso A, Chinthia C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal.* 2019;286(2):241-78.
89. Balboa MA, de Pablo N, Meana C, Balsinde J. The role of lipins in innate immunity and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* oct 2019;1864(10):1328-37.
90. Pichler K, Scholl-Buergi S, Birnbacher R, Freilinger M, Straub S, Brunner J, et al. A novel therapeutic approach for LPIN1 mutation-associated rhabdomyolysis--The Austrian experience. *Muscle Nerve.* sept 2015;52(3):437-9.
91. Tuchmann-Durand C, Roda C, Renard P, Mortamet G, Bérat CM, Altenburger L, et al. Systemic corticosteroids for the treatment of acute episodes of rhabdomyolysis in lipin-1-deficient patients. *J Inher Metab Dis.* juill 2023;46(4):649-61.
92. Monneret, Claude. La grande saga des antipaludiques – Société d’Histoire de la Pharmacie [Internet]. Société d’Histoire de la Pharmacie. 2020 [cité 29 janv 2023]. Disponible sur: <http://www.shp-asso.org/la-grande-saga-des-antipaludiques/>
93. Kucharski DJ, Jaszczak MK, Boratyński PJ. A Review of Modifications of Quinoline Antimalarials: Mefloquine and (hydroxy)Chloroquine. *Molecules.* 2 févr 2022;27(3):1003.
94. Kaur K, Jain M, Reddy RP, Jain R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 1 août 2010;45(8):3245-64.

95. Agnello S, Brand M, Chellat MF, Gazzola S, Riedl R. A Structural View on Medicinal Chemistry Strategies against Drug Resistance. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(11):3300-45.
96. Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI, Howitt SM, Bröer S, Kirk K. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*. 25 sept 2009;325(5948):1680-2.
97. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*. 25 déc 2009;625(1):220-33.
98. Wenzel NI, Chavain N, Wang Y, Friebolin W, Maes L, Pradines B, et al. Antimalarial versus Cytotoxic Properties of Dual Drugs Derived From 4-Aminoquinolines and Mannich Bases: Interaction with DNA. *J Med Chem*. 22 avr 2010;53(8):3214-26.
99. Sarkar S, Roy S, Singh PC. Groove Switching of Hydroxychloroquine Modulates the Efficacy of Binding and Induced Stability to DNA. *J Phys Chem B*. 1 juill 2021;125(25):6889-96.
100. Brocks DR, Mehvar R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs: Clinical Pharmacokinetics. 2003;42(15):1359-82.
101. Ferrari V, Cutler DJ. Kinetics and thermodynamics of chloroquine and hydroxychloroquine transport across the human erythrocyte membrane. *Biochemical Pharmacology*. 1 janv 1991;41(1):23-30.
102. Lamphier M, Zheng W, Latz E, Spyvee M, Hansen H, Rose J, et al. Novel Small Molecule Inhibitors of TLR7 and TLR9: Mechanism of Action and Efficacy In Vivo. *Molecular Pharmacology*. 23 janv 2014;85(3):429-40.
103. Nicol MR, Joshi A, Rizk ML, Sabato PE, Savic RM, Wesche D, et al. Pharmacokinetics and Pharmacological Properties of Chloroquine and Hydroxychloroquine in the Context of COVID-19 Infection. *Clin Pharmacol Ther*. déc 2020;108(6):1135-49.
104. Tett SE, Cutler DJ, Day RO, Brown KF. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. juin 1989;27(6):771-9.
105. McLachlan AJ, Tett SE, Cutler DJ, Day RO. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. mars 1994;33(3):235-9.
106. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Aymard G, Hong DLT, Wechsler B, Vauthier D, et al. Evidence of transplacental passage of hydroxychloroquine in humans. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(4):1123-4.
107. McLachlan AJ, Cutler DJ, Tett SE. Plasma protein binding of the enantiomers of hydroxychloroquine and metabolites. *Eur J Clin Pharmacol*. 1 juin 1993;44(5):481-4.
108. Furst DE. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus*. juin 1996;5 Suppl 1:S11-15.
109. Ostensen M, Brown ND, Chiang PK, Aarbakke J. Hydroxychloroquine in human breast milk. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28(3):357.

110. Qu Y, Noe G, Breaud AR, Vidal M, Clarke WA, Zahr N, et al. Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood. *Future Sci OA*. 1 nov 2015;1(3):FSO26.
111. Paludetto MN, Kurkela M, Kahma H, Backman JT, Niemi M, Filppula AM. Hydroxychloroquine is metabolized by CYP2D6, CYP3A4, and CYP2C8, and inhibits CYP2D6, while its metabolites also inhibit CYP3A *in vitro*. *Drug Metab Dispos*. 29 nov 2022;DMD-AR-2022-001018.
112. Clowse MEB, Magder L, Witter F, Petri M. Hydroxychloroquine in lupus pregnancy. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(11):3640-7.
113. Lee JY, Vinayagamoorthy N, Han K, Kwok SK, Ju JH, Park KS, et al. Association of Polymorphisms of Cytochrome P450 2D6 With Blood Hydroxychloroquine Levels in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. janv 2016;68(1):184-90.
114. Gao B, Tan T, Cao X, Pan M, Yang C, Wang J, et al. Relationship of cytochrome P450 gene polymorphisms with blood concentrations of hydroxychloroquine and its metabolites and adverse drug reactions. *BMC Med Genomics*. 8 févr 2022;15:23.
115. Namazi M. The potential negative impact of proton pump inhibitors on the immunopharmacologic effects of chloroquine and hydroxychloroquine. *Lupus*. 1 févr 2009;18(2):104-5.
116. Ette EI, Brown-Awala EA, Essien EE. Chloroquine Elimination in Humans: Effect of Low-Dose Cimetidine. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1987;27(10):813-6.
117. van den Borne BE, Landewé RB, Goei The HS, Rietveld JH, Zwinderman AH, Bruyn GA, et al. Combination therapy in recent onset rheumatoid arthritis: a randomized double blind trial of the addition of low dose cyclosporine to patients treated with low dose chloroquine. *J Rheumatol*. août 1998;25(8):1493-8.
118. Carmichael SJ, Beal J, Day RO, Tett SE. Combination therapy with methotrexate and hydroxychloroquine for rheumatoid arthritis increases exposure to methotrexate. *The Journal of Rheumatology*. 1 oct 2002;29(10):2077-83.
119. Somer M, Kallio J, Pesonen U, Pyykkö K, Huupponen R, Scheinin M. Influence of hydroxychloroquine on the bioavailability of oral metoprolol. *Br J Clin Pharmacol*. juin 2000;49(6):549-54.
120. McElnay JC, Sidahmed AM, D'Arcy PF, McQuade RD. Chloroquine-digoxin interaction. *International Journal of Pharmaceutics*. 1 oct 1985;26(3):267-74.
121. Toimela T, Tähti H, Salminen L. Retinal Pigment Epithelium Cell Culture as a Model for Evaluation of the Toxicity of Tamoxifen and Chloroquine. *ORE*. 1995;27(Suppl. 1):150-3.
122. Jallouli M, Galicier L, Zahr N, Aumaître O, Francès C, Le Guern V, et al. Determinants of hydroxychloroquine blood concentration variations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. mai 2015;67(8):2176-84.
123. de Duve C, de Barsey T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol*. 15 sept 1974;23(18):2495-531.
124. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev*. avr 1981;61(2):296-434.

125. Rivinoja A, Kokkonen N, Kellokumpu I, Kellokumpu S. Elevated Golgi pH in breast and colorectal cancer cells correlates with the expression of oncofetal carbohydrate T-antigen. *Journal of Cellular Physiology*. 2006;208(1):167-74.
126. Rivinoja A, Hassinen A, Kokkonen N, Kauppila A, Kellokumpu S. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;220(1):144-54.
127. Kellokumpu S. Golgi pH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter? *Front Cell Dev Biol*. 11 juin 2019;7:93.
128. Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC. Lysosomes, pH and the Anti-malarial Action of Chloroquine. *Nature*. janv 1972;235(5332):50-2.
129. Ohkuma S, Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1978;75(7):3327-31.
130. Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwaldt BL. Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 1988;32(6):793-8.
131. Morissette G, Moreau E, C.-Gaudreault R, Marceau F. Massive Cell Vacuolization Induced by Organic Amines Such as Procainamide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 juill 2004;310(1):395-406.
132. Marceau F, Bawolak MT, Lodge R, Bouthillier J, Gagné-Henley A, C.-Gaudreault R, et al. Cation trapping by cellular acidic compartments: Beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 févr 2012;259(1):1-12.
133. Dunmore BJ, Drake KM, Upton PD, Toshner MR, Aldred MA, Morrell NW. The lysosomal inhibitor, chloroquine, increases cell surface BMPR-II levels and restores BMP9 signalling in endothelial cells harbouring BMPR-II mutations. *Hum Mol Genet*. 15 sept 2013;22(18):3667-79.
134. Khan N, Lakpa KL, Halcrow PW, Afghah Z, Miller NM, Geiger JD, et al. BK channels regulate extracellular Tat-mediated HIV-1 LTR transactivation. *Sci Rep*. 22 août 2019;9(1):12285.
135. Xia MC, Cai L, Zhang S, Zhang X. A cell-penetrating ratiometric probe for simultaneous measurement of lysosomal and cytosolic pH change. *Talanta*. 1 févr 2018;178:355-61.
136. Halcrow PW, Geiger JD, Chen X. Overcoming Chemoresistance: Altering pH of Cellular Compartments by Chloroquine and Hydroxychloroquine. *Front Cell Dev Biol*. 9 févr 2021;9:627639.
137. Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy*. 1 avr 2014;10(4):549-51.
138. Birgisdóttir ÁB, Johansen T. Autophagy and endocytosis – interconnections and interdependencies. *Journal of Cell Science*. 22 mai 2020;133(10):jcs228114.
139. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol*. sept 2005;7(9):847-9.
140. Mindell JA. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:69-86.

141. Wibo M, Poole B. PROTEIN DEGRADATION IN CULTURED CELLS. *J Cell Biol.* 1 nov 1974;63(2):430-40.
142. Seglen PO, Grinde B, Solheim AE. Inhibition of the Lysosomal Pathway of Protein Degradation in Isolated Rat Hepatocytes by Ammonia, Methylamine, Chloroquine and Leupeptin. *European Journal of Biochemistry.* 1979;95(2):215-25.
143. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 3 août 2018;14(8):1435-55.
144. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell.* 7 déc 2012;151(6):1256-69.
145. Tian X, Teng J, Chen J. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2021;17(10):2680-8.
146. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* oct 2008;27(50):6434-51.
147. Enzenmüller S, Gonzalez P, Debatin KM, Fulda S. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. *Anti-Cancer Drugs.* janv 2013;24(1):14.
148. Circu M, Cardelli J, Barr M, O'Byrne K, Mills G, El-Osta H. Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells. *PLoS One.* 25 sept 2017;12(9):e0184922.
149. Sironi J, Aranda E, Nordstrøm LU, Schwartz EL. Lysosome Membrane Permeabilization and Disruption of the Molecular Target of Rapamycin (mTOR)-Lysosome Interaction Are Associated with the Inhibition of Lung Cancer Cell Proliferation by a Chloroquinoline Analog. *Mol Pharmacol.* janv 2019;95(1):127-38.
150. Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic.* 2018;19(12):918-31.
151. Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini JL, Metivier D, et al. Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *J Exp Med.* 19 mai 2003;197(10):1323-34.
152. Kroemer G, Jäätelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer.* nov 2005;5(11):886-97.
153. Park D, Lee Y. Biphasic Activity of Chloroquine in Human Colorectal Cancer Cells. *Dev Reprod.* déc 2014;18(4):225-31.
154. Bagh MB, Peng S, Chandra G, Zhang Z, Singh SP, Pattabiraman N, et al. Misrouting of v-ATPase subunit V0a1 dysregulates lysosomal acidification in a neurodegenerative lysosomal storage disease model. *Nat Commun.* 7 mars 2017;8:14612.
155. Rebecca VW, Nicastri MC, Fennelly C, Chude CI, Barber-Rotenberg JS, Ronghe A, et al. PPT1 promotes tumor growth and is the molecular target of chloroquine derivatives in cancer. *Cancer Discov.* févr 2019;9(2):220-9.

156. Kokkonen N, Rivinoja A, Kauppila A, Suokas M, Kellokumpu I, Kellokumpu S. Defective acidification of intracellular organelles results in aberrant secretion of cathepsin D in cancer cells. *J Biol Chem.* 17 sept 2004;279(38):39982-8.
157. Brown WJ, Constantinescu E, Farquhar MG. Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J Cell Biol.* juill 1984;99(1 Pt 1):320-6.
158. Punihaoale D, Workman RJ, Upadhyay S, Bruggen CV, Schmitz AJ, Reineke TM, et al. New Insights into Quinine–DNA Binding Using Raman Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B.* 1 nov 2018;122(43):9840-51.
159. Parker FS, Irvin JL. The Interaction of Chloroquine with Nucleic Acids and Nucleoproteins*. *Journal of Biological Chemistry.* 1 déc 1952;199(2):897-909.
160. Cohen SN, Yielding KL. Spectrophotometric Studies of the Interaction of Chloroquine with Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry.* 1 juill 1965;240(7):3123-31.
161. O'Brien RL, Olenick JG, Hahn FE. Reactions of quinine, chloroquine, and quinacrine with DNA and their effects on the DNA and RNA polymerase reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1966;55(6):1511-7.
162. Wilson WD, Jones RL. Intercalating Drugs: DNA Binding and Molecular Pharmacology. In: Garattini S, Goldin A, Hawking F, Kopin IJ, Schnitzer RJ, éditeurs. *Advances in Pharmacology* [Internet]. Academic Press; 1981 [cité 19 janv 2023]. p. 177-222. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1054358908602550>
163. Kwakye-Berko F, Meshnick SR. Binding of chloroquine to DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1 juin 1989;35(1):51-5.
164. Feigon J, Denny WA, Leupin W, Kearns DR. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: 1H NMR study of binding mode and kinetics. *J Med Chem.* avr 1984;27(4):450-65.
165. Bazoni RF, Moura TA, Rocha MS. Hydroxychloroquine Exhibits a Strong Complex Interaction with DNA: Unraveling the Mechanism of Action. *J Phys Chem Lett.* 19 nov 2020;11(22):9528-34.
166. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin–IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* avr 2002;416(6881):603-7.
167. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 mai 2003;100(11):6646-51.
168. Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via toll-like receptor 3. *Arthritis & Rheumatism.* 2005;52(9):2656-65.
169. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med.* 7 nov 2005;202(9):1171-7.

170. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*. 5 déc 2005;202(11):1575-85.
171. Sacre K, Criswell LA, McCune JM. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R155.
172. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. déc 2000;408(6813):740-5.
173. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. juin 2010;465(7300):885-90.
174. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 4 déc 2008;456(7222):658-62.
175. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for Toll-like receptor 9 activation. *Nat Immunol*. déc 2008;9(12):1407-14.
176. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 24 juill 1997;388(6640):394-7.
177. Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*. 26 mars 2010;32(3):305-15.
178. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2014 [cité 24 août 2023];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00461>
179. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. avr 2005;434(7034):772-7.
180. Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol*. 15 mai 1998;160(10):4755-61.
181. Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*. 2 nov 1998;17(21):6230-40.
182. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol*. 1 févr 1998;160(3):1122-31.
183. Lafyatis R, York M, Marshak-Rothstein A. Antimalarial agents: Closing the gate on toll-like receptors? *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(10):3068-70.
184. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology*. 2004;34(9):2541-50.

185. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*. 15 avr 2011;186(8):4794-804.
186. Rotem Z, Cox RA, Isaacs A. Inhibition of Virus Multiplication by Foreign Nucleic Acid. *Nature*. févr 1963;197(4867):564-6.
187. Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity*. 1 janv 2006;24(1):93-103.
188. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science*. 15 févr 2013;339(6121):10.1126/science.1232458.
189. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2020;21(9):501-21.
190. An J, Woodward JJ, Sasaki T, Minie M, Elkon KB. Cutting edge: Antimalarial drugs inhibit IFN- β production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction. *J Immunol*. 1 mai 2015;194(9):4089-93.
191. An J, Minie M, Sasaki T, Woodward JJ, Elkon KB. Antimalarial Drugs as Immune Modulators: New Mechanisms for Old Drugs. *Annu Rev Med*. 14 janv 2017;68:317-30.
192. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. déc 2016;12(12):716-30.
193. Firestein G, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*. 21 févr 2017;46(2):183-96.
194. Nirk EL, Reggiori F, Mauthe M. Hydroxychloroquine in rheumatic autoimmune disorders and beyond. *EMBO Mol Med*. 7 août 2020;12(8):e12476.
195. Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. mars 2020;16(3):155-66.
196. Watts C, West MA, Zaru R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 1 févr 2010;22(1):124-30.
197. Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. janv 1982;79(1):175-8.
198. Fox RI, Kang HI. Mechanism of action of antimalarial drugs: inhibition of antigen processing and presentation. *Lupus*. févr 1993;2 Suppl 1:S9-12.
199. Torigoe M, Sakata K, Ishii A, Iwata S, Nakayamada S, Tanaka Y. Hydroxychloroquine efficiently suppresses inflammatory responses of human class-switched memory B cells via Toll-like receptor 9 inhibition. *Clinical Immunology*. 1 oct 2018;195:1-7.
200. Bondeson J, Sundler R. Antimalarial Drugs Inhibit Phospholipase A2 Activation and Induction of Interleukin β and Tumor Necrosis Factor α in Macrophages: Implications for Their Mode of Action in Rheumatoid Arthritis. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1 mars 1998;30(3):357-66.

201. Eugenia Schroeder M, Russo S, Costa C, Hori J, Tiscornia I, Bollati-Fogolín M, et al. Pro-inflammatory Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are inhibited by hydroxychloroquine. *Sci Rep.* 15 mai 2017;7:1892.
202. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* sept 2007;7(9):690-702.
203. Wu SF, Chang CB, Hsu JM, Lu MC, Lai NS, Li C, et al. Hydroxychloroquine inhibits CD154 expression in CD4⁺ T lymphocytes of systemic lupus erythematosus through NFAT, but not STAT5, signaling. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:183.
204. Sato R, Imaizumi T, Aizawa T, Watanabe S, Tsugawa K, Kawaguchi S, et al. Inhibitory effect of anti-malarial agents on the expression of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 3 signaling in human glomerular endothelial cells. *Ren Fail.* 43(1):643-50.
205. Coban C. The host targeting effect of chloroquine in malaria. *Curr Opin Immunol.* oct 2020;66:98-107.
206. Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* avr 1990;87(8):2931-5.
207. Nasamu AS, Polino AJ, Istvan ES, Goldberg DE. Malaria parasite plasmepsins: More than just plain old degradative pepsins. *J Biol Chem.* 19 juin 2020;295(25):8425-41.
208. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters.* 4 juill 2005;157(3):175-88.
209. Egan TJ. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 1 mai 2008;102(5):1288-99.
210. Matz JM. *Plasmodium*'s bottomless pit: properties and functions of the malaria parasite's digestive vacuole. *Trends in Parasitology.* 1 juill 2022;38(7):525-43.
211. Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY. Chloroquine and acid vesicle function. *Prog Clin Biol Res.* 1989;313:53-9.
212. Ch'Ng JH, Liew K, Goh ASP, Sidhartha E, Tan KSW. Drug-induced permeabilization of parasite's digestive vacuole is a key trigger of programmed cell death in *Plasmodium falciparum*. *Cell Death Dis.* oct 2011;2(10):e216.
213. Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest.* avr 1994;93(4):1602-8.
214. Herraiz T, Guillén H, González-Peña D, Arán VJ. Antimalarial Quinoline Drugs Inhibit β -Hematin and Increase Free Hemin Catalyzing Peroxidative Reactions and Inhibition of Cysteine Proteases. *Sci Rep.* 28 oct 2019;9(1):15398.
215. Chou AC, Chevli R, Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry.* 15 avr 1980;19(8):1543-9.
216. Egan TJ. Interactions of quinoline antimalarials with hemozoin in solution. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 1 mai 2006;100(5):916-26.

217. Gorka AP, de Dios A, Roepe PD. Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytotoxic activities. *J Med Chem.* 11 juill 2013;56(13):5231-46.
218. Sullivan AD, Meshnick SR. Haemozoin: Identification and quantification. *Parasitology Today.* 1 avr 1996;12(4):161-3.
219. Olafson KN, Nguyen TQ, Rimer JD, Vekilov PG. Antimalarials inhibit hemozoin crystallization by unique drug-surface site interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 juill 2017;114(29):7531-6.
220. Slater AFG, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature.* janv 1992;355(6356):167-9.
221. Ursos LMB, DuBay KF, Roepe PD. Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 15 janv 2001;112(1):11-7.
222. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 3 oct 2002;419(6906):10.1038/nature01097.
223. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* sept 2005;5(9):722-35.
224. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiology Reviews.* 1 mars 2016;40(2):208-57.
225. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol.* 19 déc 2018;9:3006.
226. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 3 janv 2005;201(1):19-25.
227. Zhu X, Pan Y, Li Y, Jiang Y, Shang H, Gowda DC, et al. Targeting Toll-like receptors by chloroquine protects mice from experimental cerebral malaria. *International Immunopharmacology.* 1 août 2012;13(4):392-7.
228. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cuda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *Lancet Infect Dis.* nov 2003;3(11):722-7.
229. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 18 mars 2020;6:16.
230. Yang N, Shen HM. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. *Int J Biol Sci.* 15 mars 2020;16(10):1724-31.
231. Chen X, Geiger JD. Janus sword actions of chloroquine and hydroxychloroquine against COVID-19. *Cell Signal.* sept 2020;73:109706.
232. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 16 avr 2020;181(2):271-280.e8.

233. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell*. 21 mai 2020;78(4):779-784.e5.
234. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450-4.
235. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*. 2020;63(3):457-60.
236. Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S, Erickson BR, Rollin PE, Ksiazek TG, et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology*. 22 août 2005;2:69.
237. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
238. Oscanoa TJ, Romero-Ortuno R, Carvajal A, Savarino A. A pharmacological perspective of chloroquine in SARS-CoV-2 infection: An old drug for the fight against a new coronavirus? *Int J Antimicrob Agents*. sept 2020;56(3):106078.
239. Devaux CA, Rolain JM, Colson P, Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int J Antimicrob Agents*. mai 2020;55(5):105938.
240. Savarino A, Shytaj IL. Chloroquine and beyond: exploring anti-rheumatic drugs to reduce immune hyperactivation in HIV/AIDS. *Retrovirology* [Internet]. 2015 [cité 31 janv 2023];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC4472405/>
241. Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*. févr 1990;174(2):450-8.
242. Harley CA, Dasgupta A, Wilson DW. Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol*. févr 2001;75(3):1236-51.
243. Robinson M, Schor S, Barouch-Bentov R, Einav S. Viral journeys on the intracellular highways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(20):3693.
244. Al-Bari MAA. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol Res Perspect*. févr 2017;5(1):e00293.
245. Mulcahy Levy JM, Towers CG, Thorburn A. Targeting Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer*. sept 2017;17(9):528-42.
246. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. juin 2012;12(6):401-10.
247. Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, et al. Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *The Prostate*. 2007;67(7):774-81.
248. Zhang Y, Wang Q, Ma A, Li Y, Li R, Wang Y. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncology Reports*. 1 mai 2014;31(5):2298-304.

249. Zhang Y, Li Y, Li Y, Li R, Ma Y, Wang H, et al. Chloroquine inhibits MGC803 gastric cancer cell migration via the Toll-like receptor 9/nuclear factor kappa B signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 1 févr 2015;11(2):1366-71.
250. Mohamed FEZ, Jalan R, Minogue S, Andreola F, Habtesion A, Hall A, et al. Inhibition of TLR7 and TLR9 Reduces Human Cholangiocarcinoma Cell Proliferation and Tumor Development. *Dig Dis Sci*. mai 2022;67(5):1806-21.
251. Alzahrani B. The Biology of Toll-Like Receptor 9 and Its Role in Cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2020;30(5):457-74.
252. Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, et al. Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy. *Cancer Cell*. 11 août 2014;26(2):190-206.
253. Schaaf MB, Houbaert D, Meçe O, To SK, Ganne M, Maes H, et al. Lysosomal Pathways and Autophagy Distinctively Control Endothelial Cell Behavior to Affect Tumor Vasculature. *Front Oncol*. 20 mars 2019;9:171.
254. Lakshminarayanan S, Walsh S, Mohanraj M, Rothfield N. Factors associated with low bone mineral density in female patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*. 1 janv 2001;28(1):102-8.
255. Mok CC, Mak A, Ma KM. Bone mineral density in postmenopausal Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1 févr 2005;14(2):106-12.
256. Akhavan PS, Su J, Lou W, Gladman DD, Urowitz MB, Fortin PR. The Early Protective Effect of Hydroxychloroquine on the Risk of Cumulative Damage in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology*. 1 juin 2013;40(6):831-41.
257. Lin NY, Chen CW, Kagwiria R, Liang R, Beyer C, Distler A, et al. Inactivation of autophagy ameliorates glucocorticoid-induced and ovariectomy-induced bone loss. *Ann Rheum Dis*. juin 2016;75(6):1203-10.
258. Sun J, Chen W, Li S, Yang S, Zhang Y, Hu X, et al. Nox4 Promotes RANKL-Induced Autophagy and Osteoclastogenesis via Activating ROS/PERK/eIF-2 α /ATF4 Pathway. *Front Pharmacol*. 28 sept 2021;12:751845.
259. Voronov I, Ochotny N, Jaumouillé V, Owen C, Manolson MF, Aubin JE. The R740S mutation in the V-ATPase a3 subunit increases lysosomal pH, impairs NFATc1 translocation, and decreases in vitro osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. janv 2013;28(1):108-18.
260. Xiu Y, Xu H, Zhao C, Li J, Morita Y, Yao Z, et al. Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation. *J Clin Invest*. 2 janv 2014;124(1):297-310.
261. Yao Z, Lei W, Duan R, Li Y, Luo L, Boyce BF. RANKL cytokine enhances TNF-induced osteoclastogenesis independently of TNF receptor associated factor (TRAF) 6 by degrading TRAF3 in osteoclast precursors. *J Biol Chem*. 16 juin 2017;292(24):10169-79.
262. Zou W, Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. CpG Oligodeoxynucleotides Modulate the Osteoclastogenic Activity of Osteoblasts via Toll-like Receptor 9*. *Journal of Biological Chemistry*. 9 mai 2003;278(19):16732-40.

263. Rieman DJ, McClung HA, Dodds RA, Hwang SM, Holmes MWL, James IE, et al. Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts. *Bone*. 1 mars 2001;28(3):282-9.
264. Kingsbury SR, Tharmanathan P, Keding A, Ronaldson SJ, Grainger A, Wakefield RJ, et al. Hydroxychloroquine Effectiveness in Reducing Symptoms of Hand Osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 20 mars 2018;168(6):385-95.
265. Lee W, Ruijgrok L, Boxma-de Klerk B, Kok MR, Kloppenburg M, Gerards A, et al. Efficacy of Hydroxychloroquine in Hand Osteoarthritis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Care & Research*. 2018;70(9):1320-5.
266. Rempenault C, Combe B, Barnetche T, Gaujoux-Viala C, Lukas C, Morel J, et al. Metabolic and cardiovascular benefits of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1 janv 2018;77(1):98-103.
267. Liu D, Li X, Zhang Y, Kwong JSW, Li L, Zhang Y, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine are associated with reduced cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 11 juin 2018;12:1685-95.
268. Costedoat-Chalumeau N, Dunogué B, Morel N, Le Guern V, Guettrot-Imbert G. Hydroxychloroquine: A multifaceted treatment in lupus. *La Presse Médicale*. juin 2014;43(6):e167-80.
269. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1 janv 2010;69(01):20-8.
270. Eljaaly K, Alireza KH, Alshehri S, Al-Tawfiq JA. Hydroxychloroquine safety: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Travel Med Infect Dis*. 2020;36:101812.
271. Melles RB, Marmor MF. The Risk of Toxic Retinopathy in Patients on Long-term Hydroxychloroquine Therapy. *JAMA Ophthalmology*. 1 déc 2014;132(12):1453-60.
272. Sundelin SP, Terman A. Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS*. 2002;110(6):481-9.
273. Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee SJ, Choi JA, Koh JY. Induction of Lysosomal Dilatation, Arrested Autophagy, and Cell Death by Chloroquine in Cultured ARPE-19 Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1 nov 2010;51(11):6030-7.
274. Korthagen NM, Bastiaans J, van Meurs JC, van Bilsen K, van Hagen PM, Dik WA. Chloroquine and Hydroxychloroquine Increase Retinal Pigment Epithelial Layer Permeability. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2015;29(7):299-304.
275. Bergmann M, Schütt F, Holz F g., Kopitz J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *The FASEB Journal*. 2004;18(3):562-4.
276. Xu C, Zhu L, Chan T, Lu X, Shen W, Madigan MC, et al. Chloroquine and Hydroxychloroquine Are Novel Inhibitors of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2. *JPharmSci*. 1 févr 2016;105(2):884-90.

277. Chatre C, Roubille F, Vernhet H, Jorgensen C, Pers YM. Cardiac Complications Attributed to Chloroquine and Hydroxychloroquine: A Systematic Review of the Literature. *Drug Saf.* oct 2018;41(10):919-31.
278. Frustaci A, Morgante E, Antuzzi D, Russo MA, Chimenti C. Inhibition of cardiomyocyte lysosomal activity in hydroxychloroquine cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology.* 17 mai 2012;157(1):117-9.
279. Tönnesmann E, Kandolf R, Lewalter T. Chloroquine cardiomyopathy - a review of the literature. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* juin 2013;35(3):434-42.
280. Yogasundaram H, Putko BN, Tien J, Paterson DI, Cujec B, Ringrose J, et al. Hydroxychloroquine-Induced Cardiomyopathy: Case Report, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Canadian Journal of Cardiology.* 1 déc 2014;30(12):1706-15.
281. Nadeem U, Raafey M, Kim G, Treger J, Pytel P, N Husain A, et al. Chloroquine- and Hydroxychloroquine-Induced Cardiomyopathy: A Case Report and Brief Literature Review. *Am J Clin Pathol.* 14 déc 2020;aaa253.
282. Delaunois A, Abernathy M, Anderson WD, Beattie KA, Chaudhary KW, Coulot J, et al. Applying the CiPA approach to evaluate cardiac proarrhythmia risk of some antimalarials used off-label in the first wave of COVID-19. *Clin Transl Sci.* mai 2021;14(3):1133-46.
283. Stein M, Bell MJ, Ang LC. Hydroxychloroquine neuromyotoxicity. *J Rheumatol.* déc 2000;27(12):2927-31.
284. Biguetti CC, Junior JFS, Fiedler MW, Marrelli MT, Brotto M. The toxic effects of chloroquine and hydroxychloroquine on skeletal muscle: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 23 mars 2021;11:6589.
285. Lee HS, Daniels BH, Salas E, Bollen AW, Debnath J, Margeta M. Clinical Utility of LC3 and p62 Immunohistochemistry in Diagnosis of Drug-Induced Autophagic Vacuolar Myopathies: A Case-Control Study. *PLoS One.* 27 avr 2012;7(4):e36221.
286. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* janv 2015;30(1):11-26.
287. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, D'andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen.* juin 2022;2(2):48-78.
288. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1 janv 2007;39(1):44-84.
289. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* juill 2014;94(3):909-50.
290. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 16 mars 2018;122(6):877-902.
291. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxid Redox Signal.* 20 juill 2014;21(3):396-413.

292. Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*. 1 juin 2021;10(6):890.
293. Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest*. mars 1990;85(3):714-21.
294. Bromberg Y, Pick E. Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cellular Immunology*. 1 oct 1984;88(1):213-21.
295. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. oct 2000;20(10):2175-83.
296. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. janv 2007;87(1):245-313.
297. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26.
298. Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2019;18(4):295-317.
299. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*. 10 déc 2018;29(17):1727-45.
300. Pajares M, Jiménez-Moreno N, García-Yagüe AJ, Escoll M, de Ceballos ML, Van Leuven F, et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy*. 18 juill 2016;12(10):1902-16.
301. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Bowitz Larsen K, Atesoh Awuh J, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *J Biol Chem*. 16 juill 2010;285(29):22576-91.
302. Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, et al. A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol*. juill 2010;30(13):3275-85.
303. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol*. oct 2003;23(20):7198-209.
304. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*. déc 2003;23(23):8786-94.
305. Sugioka Y, Suzuki M, Sugioka K, Nakano M. A ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex promotes membrane phospholipid peroxidation. A possible mechanism for antimalarial action. *FEBS Lett*. 2 nov 1987;223(2):251-4.
306. Lehane AM, McDevitt CA, Kirk K, Fidock DA. Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium – Is the redox system involved? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 1 déc 2012;2:47-57.

307. Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical Pharmacology*. 15 nov 1998;56(10):1305-13.
308. Farombi EO, Shyntum YY, Emerole GO. Influence of chloroquine treatment and Plasmodium falciparum malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense indices in humans. *Drug Chem Toxicol*. févr 2003;26(1):59-71.
309. Bhattacharyya B, Chatterjee TK, Ghosh JJ. Effects of chloroquine on lysosomal enzymes, NADPH-induced lipid peroxidation, and antioxidant enzymes of rat retina. *Biochem Pharmacol*. 1 oct 1983;32(19):2965-8.
310. Magwere T, Naik YS, Hasler JA. Effects of Chloroquine Treatment on Antioxidant Enzymes in Rat Liver and Kidney. *Free Radical Biology and Medicine*. 1 janv 1997;22(1):321-7.
311. Ogunbayo OA, Adisa RA, Ademowo OG, Olorunsogo OO. International Journal of Pharmacology. [cité 15 août 2023]. Incidence of Chloroquine Induced Oxidative Stress in the Blood of Rabbit. Disponible sur: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2006.121.125>
312. Uzar E, Ozay R, Evliyaoglu O, Aktas A, Ulkay MB, Uyar ME, et al. Hydroxychloroquine-induced oxidative stress on sciatic nerve and muscle tissue of rats: a stereological and biochemical study. *Hum Exp Toxicol*. oct 2012;31(10):1066-73.
313. Giovanella F, Ferreira GK, de Prá SDT, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Scaini G, et al. Effects of primaquine and chloroquine on oxidative stress parameters in rats. *An Acad Bras Cienc*. août 2015;87(2 Suppl):1487-96.
314. Klouda CB, Stone WL. Oxidative Stress, Proton Fluxes, and Chloroquine/Hydroxychloroquine Treatment for COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 21 sept 2020;9(9):E894.
315. Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, et al. Chronic Hydroxychloroquine Improves Endothelial Dysfunction and Protects Kidney in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Hypertension*. août 2014;64(2):330-7.
316. Müller-Calleja N, Manukyan D, Canisius A, Strand D, Lackner KJ. Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase. *Ann Rheum Dis*. mai 2017;76(5):891-7.
317. Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One*. 14 mars 2019;14(3):e0212614.
318. Kang JM, Lee HS, Kim J, Yang DH, Jeong HY, Lee YH, et al. Beneficial Effect of Chloroquine and Amodiaquine on Type 1 Diabetic Tubulopathy by Attenuating Mitochondrial Nox4 and Endoplasmic Reticulum Stress. *J Korean Med Sci*. 18 août 2020;35(36):e305.
319. Teng RJ, Du J, Welak S, Guan T, Eis A, Shi Y, et al. Cross talk between NADPH oxidase and autophagy in pulmonary artery endothelial cells with intrauterine persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 avr 2012;302(7):L651-63.
320. Morgan D, Cherny VV, Murphy R, Katz BZ, DeCoursey TE. The pH dependence of NADPH oxidase in human eosinophils. *J Physiol*. 1 déc 2005;569(Pt 2):419-31.

321. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Pérez L, Geffner J, Hermine O, et al. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood*. 1 déc 2008;112(12):4712-22.
322. Shen H, Wu N, Wang Y, Zhao H, Zhang L, Li T, et al. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. *International Immunopharmacology*. 1 mai 2017;46:16-22.
323. Duleh S, Wang X, Komirenko A, Margeta M. Activation of the Keap1/Nrf2 stress response pathway in autophagic vacuolar myopathies. *Acta Neuropathol Commun*. 31 oct 2016;4:115.
324. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*. mars 2010;12(3):213-23.
325. Bellezza I, Riuzzi F, Chiappalupi S, Arcuri C, Giambanco I, Sorci G, et al. Reductive stress in striated muscle cells. *Cell Mol Life Sci*. 1 sept 2020;77(18):3547-65.
326. Peng X, Zhang S, Jiao W, Zhong Z, Yang Y, Claret FX, et al. Hydroxychloroquine synergizes with the PI3K inhibitor BKM120 to exhibit antitumor efficacy independent of autophagy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 29 nov 2021;40(1):374.
327. Hamel Y, Mauvais FX, Madrange M, Renard P, Lebreton C, Nemazanyy I, et al. Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis. *Cell Rep Med*. 17 août 2021;2(8):100370.
328. Browning DJ. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. 4 avr 2014;35-63.
329. Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*. 15 juill 2014;1(1):e29911.
330. Verbaanderd C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancelmedscience*. 23 nov 2017;11:781.
331. Renard P, Caccavelli L, Legendre A, Tuchmann-Durand C, Balakirouchenane D, Blanchet B, et al. Hydroxychloroquine sulfate: A novel treatment for lipin-1 deficiency? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 juill 2023;163:114813.
332. Movassaghi S, Jafari S, Falahati K, Ataei M, Sanati MH, Jadali Z. Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients with systemic sclerosis by a qPCR-based assay. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. mai 2020;95(3):314-9.
333. Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH. Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radical Biology and Medicine*. nov 2003;35(10):1310-8.
334. Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. 1 déc 2008;7(6):954-8.

335. Vartanian V, Tumova J, Dobrzyn P, Dobrzyn A, Nakabeppu Y, Lloyd RS, et al. 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency elicits coordinated changes in lipid and mitochondrial metabolism in muscle. *PLoS One*. 20 juill 2017;12(7):e0181687.
336. Gureev AP, Shaforostova EA, Starkov AA, Popov VN. Simplified qPCR method for detecting excessive mtDNA damage induced by exogenous factors. *Toxicology*. 1 mai 2017;382:67-74.
337. Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*. 1 nov 2011;1:34.
338. Bargiela A, Sabater-Arcis M, Espinosa-Espinosa J, Zulaica M, Lopez de Munain A, Artero R. Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in in vitro and in vivo models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 déc 2019;116(50):25203-13.
339. Bergling S, Dolmetsch R, Lewis RS, Keizer J. A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium*. avr 1998;23(4):251-9.
340. Costedoat-Chalumeau N, Dunogué B, Leroux G, Morel N, Jallouli M, Le Guern V, et al. A Critical Review of the Effects of Hydroxychloroquine and Chloroquine on the Eye. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 1 déc 2015;49(3):317-26.
341. Costedoat-Chalumeau N, Tamirou F, Le Guern V, Blanchet B, Deligny C, Piette JC. Dosage sanguin de l'hydroxychloroquine dans la prise en charge du lupus systémique : intérêts et limites. *La Revue de Médecine Interne*. 1 févr 2017;38(2):77-80.
342. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Aymard G, Leroux G, Marra D, et al. Very low blood hydroxychloroquine concentration as an objective marker of poor adherence to treatment of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. juin 2007;66(6):821-4.
343. Chasset F, Arnaud L, Costedoat-Chalumeau N, Zahr N, Bessis D, Francès C. The effect of increasing the dose of hydroxychloroquine (HCQ) in patients with refractory cutaneous lupus erythematosus (CLE): An open-label prospective pilot study. *J Am Acad Dermatol*. avr 2016;74(4):693-699.e3.
344. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*. 11 août 2015;6:260-71.
345. Putney JW, Tomita T. Phospholipase C Signaling and Calcium Influx. *Adv Biol Regul*. janv 2012;52(1):152-64.
346. Misra UK, Gawdi G, Pizzo SV. Chloroquine, quinine and quinidine inhibit calcium release from macrophage intracellular stores by blocking inositol 1,4,5-trisphosphate binding to its receptor. *J Cell Biochem*. févr 1997;64(2):225-32.
347. Xu JC, Peng YB, Wei MY, Wu YF, Guo D, Qin G, et al. Chloroquine Inhibits Ca²⁺ Signaling in Murine CD4⁺ Thymocytes. *CPB*. 2015;36(1):133-40.
348. Goldman FD, Gilman AL, Hollenback C, Kato RM, Premack BA, Rawlings DJ. Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Blood*. 1 juin 2000;95(11):3460-6.
349. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. oct 2004;287(4):C817-33.

350. Matuz-Mares D, González-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Meza H. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants (Basel)*. 20 avr 2022;11(5):801.
351. Zhang T, Luo XJ, Sai WB, Yu MF, Li WE, Ma YF, et al. Non-Selective Cation Channels Mediate Chloroquine-Induced Relaxation in Precontracted Mouse Airway Smooth Muscle. *PLoS One*. 3 juill 2014;9(7):e101578.
352. Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*. 1 janv 2012;12(1):1-4.
353. Zhang Y, Wong HS. Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells? *Journal of Experimental Biology*. 11 mars 2021;224(5):jeb221606.
354. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 déc 2006;1763(12):1755-66.
355. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1 sept 2012;1822(9):1363-73.
356. Wanders RJA, Waterham HR, Ferdinandusse S. Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol*. 28 janv 2016;3:83.
357. He A, Dean JM, Lodhi IJ. Peroxisomes as Cellular Adaptors to Metabolic and Environmental Stress. *Trends Cell Biol*. août 2021;31(8):656-70.
358. Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling. *Cell Metabolism*. mars 2014;19(3):380-92.
359. Huang TY, Zheng D, Hickner RC, Brault JJ, Cortright RN. Peroxisomal gene and protein expression increase in response to a high-lipid challenge in human skeletal muscle. *Metabolism*. 1 sept 2019;98:53-61.
360. Wang B, Van Veldhoven PP, Brees C, Rubio N, Nordgren M, Apanasets O, et al. Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1 déc 2013;65:882-94.
361. Schrader M, Costello J, Godinho LF, Islinger M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2015;38(4):681-702.
362. Deori NM, Kale A, Maurya PK, Nagotu S. Peroxisomes: role in cellular ageing and age related disorders. *Biogerontology*. 1 oct 2018;19(5):303-24.
363. Schrader M, Costello JL, Godinho LF, Azadi AS, Islinger M. Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochim Biophys Acta*. mai 2016;1863(5):971-83.
364. Moggio A, Geraci S, Boido A, Sticht C, Gretz N, Bussolati B. Assessment of acute kidney injury in rhabdomyolytic mice by transcutaneous measurement of sinistrin excretion. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1 juill 2017;32(7):1167-75.

365. Song SJ, Kim S mi, Lee S ho, Moon JY, Hwang HS, Kim JS, et al. Rhabdomyolysis-Induced AKI Was Ameliorated in NLRP3 KO Mice via Alleviation of Mitochondrial Lipid Peroxidation in Renal Tubular Cells. *Int J Mol Sci.* 13 nov 2020;21(22):8564.
366. Jeong HY, Kang JM, Jun HH, Kim DJ, Park SH, Sung MJ, et al. Chloroquine and amodiaquine enhance AMPK phosphorylation and improve mitochondrial fragmentation in diabetic tubulopathy. *Sci Rep.* 8 juin 2018;8(1):8774.
367. Spears LD, Tran AV, Qin CY, Hobbs SB, Liang Burns CA, Royer NK, et al. Chloroquine increases phosphorylation of AMPK and Akt in myotubes. *Heliyon.* mars 2016;2(3):e00083.
368. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2018;19(2):121-35.
369. Zidovetzki R, Sherman IW, O'Brien L. Inhibition of Plasmodium falciparum phospholipase A2 by chloroquine, quinine, and arteether. *J Parasitol.* août 1993;79(4):565-70.
370. Hostetler KY, Jellison EJ. Role of phospholipases in myocardial ischemia: effect of cardioprotective agents on the phospholipases A of heart cytosol and sarcoplasmic reticulum in vitro. *Mol Cell Biochem.* 27 juill 1989;88(1-2):77-82.
371. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Neuroprotection abilities of cytosolic phospholipase A2 inhibitors in kainic acid-induced neurodegeneration. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* mars 2004;4(1):85-96.
372. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev.* sept 2006;58(3):591-620.

ANNEXES

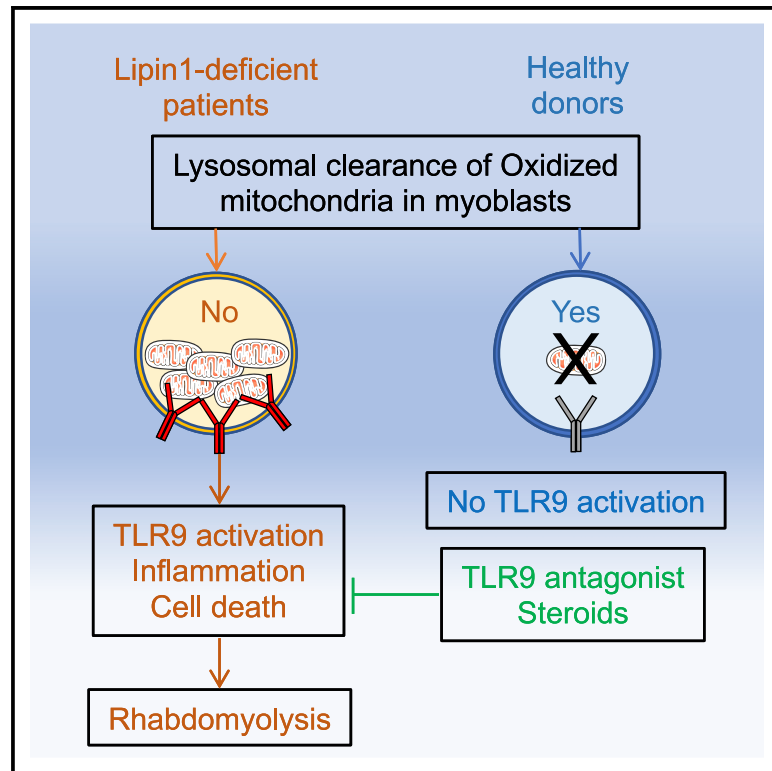
Annexe 1 : Hamel Y, Mauvais FX, Madrange M, Renard P, Lebreton C, Nemazanyy I, et al. Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis. *Cell Rep Med*. 17 août 2021;2(8):100370.

Annexe 2 : Tuchmann-Durand C, Roda C, Renard P, Mortamet G, Bérat CM, Altenburger L, et al. Systemic corticosteroids for the treatment of acute episodes of rhabdomyolysis in lipin-1-deficient patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2023;46(4):649-61.

Annexe 3 : Protocole d'urgence - Rhabdomyolyse par déficit en lipin-1 (LPIN1) [Internet]. [cité 15 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.filiere-g2m.fr/documentation/publication/181:protocole-d-urgence-rhabdomyolyse-rm-par-mutation-lpin1>

Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis

Graphical abstract



Authors

Yamina Hamel, François-Xavier Mauvais, Marine Madrange, ..., David N. Brindley, Peter van Endert, Pascale de Lonlay

Correspondence

yamina.hamel@inserm.fr

In brief

Hamel et al. investigate the mechanism underlying life-threatening rhabdomyolysis in human lipin1 deficiency. They find that endosomal accumulation of mitochondrial DNA in myoblasts induces inflammation and cell death mediated by TLR9 activation *in vitro*. Treatment of 6 patients with hydroxychloroquine sulfate suggests benefits in preventing rhabdomyolysis episodes.

Highlights

- Lipin1 deficiency causes mitophagosome and late endosome dysfunction in human myoblasts
- Damaged mitochondria trigger TLR9-mediated inflammation and myoblast death
- Mitochondrial DNA elimination or blockade of TLR9 activation prevent myoblast death
- Hydroxychloroquine sulfate treatment may prevent rhabdomyolysis episodes in patients



Article

Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis

Yamina Hamel,^{1,2,9,11,*} François-Xavier Mauvais,^{3,9} Marine Madrange,^{1,2} Perrine Renard,^{2,3} Corinne Lebreton,¹ Ivan Nemazany,⁴ Olivier Pellé,^{1,5} Nicolas Goudin,⁶ Xiaoyun Tang,⁷ Mathieu P. Rodero,¹ Caroline Tuchmann-Durand,^{1,2} Patrick Nusbaum,⁸ David N. Brindley,⁷ Peter van Endert,^{3,10} and Pascale de Lonlay^{1,2,10}

¹INSERM, UMR 1163, IMAGINE Institute, Faculté de Médecine, Université de Paris, Paris 75015, France

²Reference Center of Inherited Metabolic Diseases, Université de Paris, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, APHP, G2M Steam, metab ERN, Paris 75015, France

³INSERM, Unit 1151, CNRS, UMR 8253, Faculté de Médecine, Université de Paris, Paris 75015, France

⁴Platform for Metabolic Analyses, INSERM US24/CNRS UMS 3633, Paris 75015, France

⁵Cytometry Core Facility, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris 75015, France

⁶Imaging Core Facility, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris 75015, France

⁷Cancer Research Institute of Northern Alberta, Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

⁸Department of Biology and Molecular Genetics, Cochin Hospital, AP-HP, Paris 75014, France

⁹These authors contributed equally

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead contact

*Correspondence: yamina.hamel@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100370>

SUMMARY

***LPIN1* mutations are responsible for inherited recurrent rhabdomyolysis, a life-threatening condition with no efficient therapeutic intervention. Here, we conduct a bedside-to-bench-and-back investigation to study the pathophysiology of lipin1 deficiency. We find that lipin1-deficient myoblasts exhibit a reduction in phosphatidylinositol-3-phosphate close to autophagosomes and late endosomes that prevents the recruitment of the GTPase Arp2/3, locks Rab7 in the active state, inhibits vesicle clearance by fusion with lysosomes, and alters their positioning and function. Oxidized mitochondrial DNA accumulates in late endosomes, where it activates Toll-like receptor 9 (TLR9) and triggers inflammatory signaling and caspase-dependent myolysis. Hydroxychloroquine blocks TLR9 activation by mitochondrial DNA *in vitro* and may attenuate flares of rhabdomyolysis in 6 patients treated. We suggest a critical role for defective clearance of oxidized mitochondrial DNA that activates TLR9-restricted inflammation in lipin1-related rhabdomyolysis. Interventions blocking TLR9 activation or inflammation can improve patient care *in vivo*.**

INTRODUCTION

LPIN1 mutations are a common cause of severe and recurrent inherited rhabdomyolysis,¹ a disease with dramatic outcome^{2,3} for which no treatment is available. *LPIN1* encodes lipin1, an enzyme expressed in metabolically active tissues that regulates key metabolic pathways, such as adipocyte differentiation and lipid metabolism, nuclear envelope and mitochondrial dynamics, and vacuole fusion.^{4–7}

Although mouse models in which lipin1 is knocked out selectively in the skeletal muscle have been generated,^{8,9} important gaps remain in our understanding of the mechanisms linking human *LPIN1* mutations to acute rhabdomyolysis. These rodent models exhibit chronic myopathy mainly resulting from the loss of phosphatidate phosphatase-1 (PAP-1) activity and the subsequent remodeling in lipid composition and a defect in fatty acid oxidation, which cause endoplasmic reticulum (ER) stress triggered by lipostasis and the activation of the

unfolded protein response. Nonetheless, we found minor alterations in lipid composition and in the expression of key genes regulated by lipin1 in white adipose tissue and muscle from patients, despite a significant decrease in PAP-1 activity,^{10,11} suggesting that the lack of lipin1 co-transcriptional activity for genes involved in the regulation of adipogenesis and mitochondrial fatty acid oxidation^{12,13} plays a minor role in human disease.

Fasting and febrile illness are common triggers, suggesting that lipin1 may be involved in the regulation of autophagy and inflammation in humans. In line with this, mouse lipin1 deficiency leads to a reduction in diacylglycerol (DAG) levels and impaired activation of the protein kinase D (PKD)-Vps34 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) signaling cascade, perturbing the normal maturation of autolysosomes and degradation of damaged mitochondria.¹⁴ Contradictory information is available connecting lipin1 with inflammation. Silencing lipin1 expression in human macrophages attenuates the response to endotoxin.¹⁵



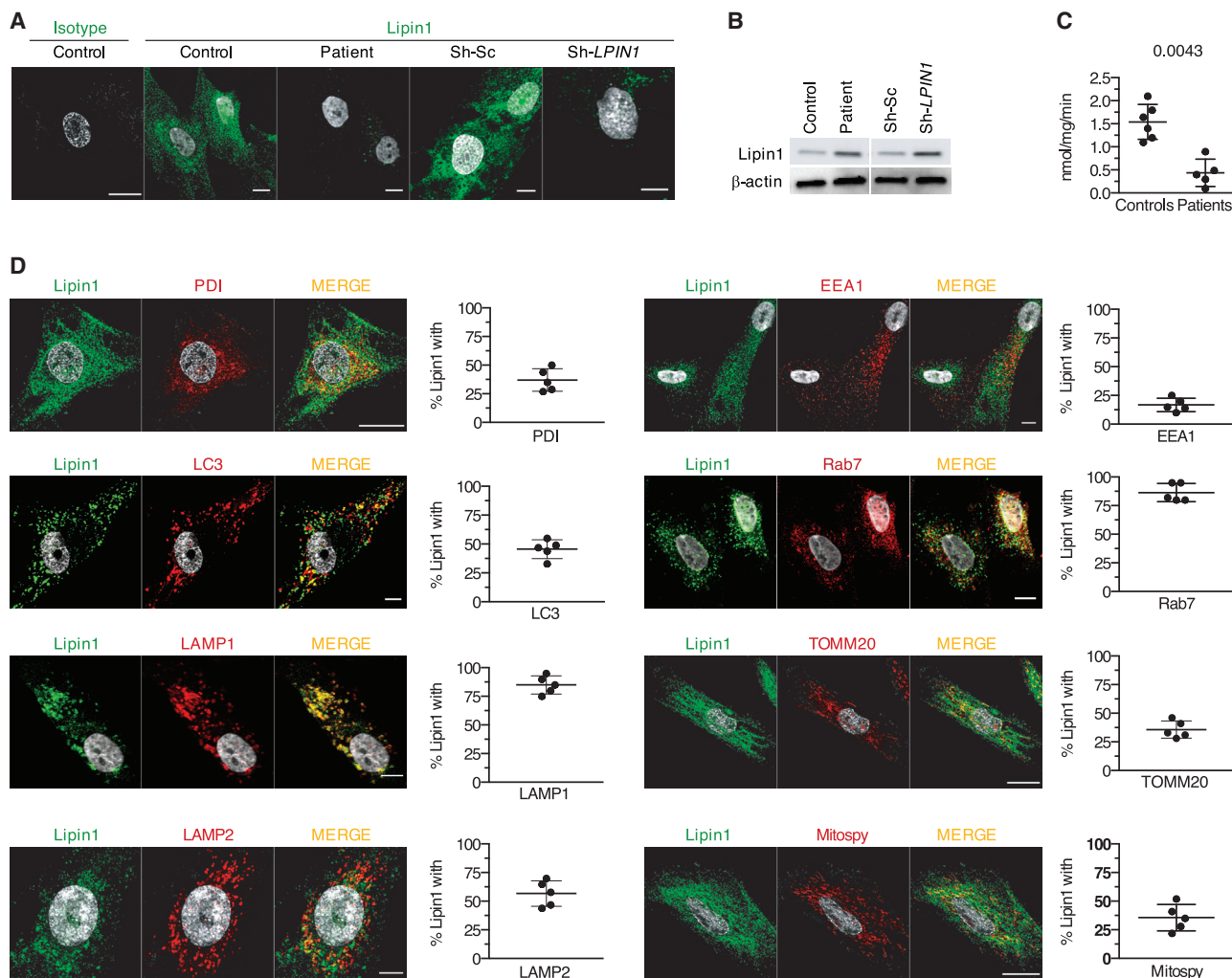


Figure 1. Lipin1 localizes in proximity of late endosomes, autophagosomes, and mitochondria in human myoblasts

(A) The confocal images show a representative staining of endogenous lipin1 in primary myoblasts from 1 of 6 controls and 6 patients carrying *LPIN1* mutations (Table S1) and in immortalized myoblasts from 1 healthy donor transduced with sh-*LPIN1* or control scrambled (sh-Sc) shRNA.

(B) Immunoblot analysis of endogenous lipin1 expression as in (A) in 5 patients.

(C) Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) depict the means \pm SDs of PAP activity quantified in myoblasts from 6 controls and 5 patients (Mann-Whitney *U* test).

(D) Lipin1 distribution within myoblast organelles of 5 controls by confocal microscopy. Dot plots (50–80 cells/dot) show the means \pm SDs of the percentage of lipin1 in proximity with a given protein. The images are representative of 1 of at least 3 independent experiments.

Scale bars, 10 μ m.

Moreover, inflammatory infiltrates are absent from muscle biopsies of patients.¹⁶ However, lipin1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes, thus inhibiting the secretion of inflammatory factors.¹⁷

Here, we show that lipin1 synthesizes phosphatidylinositol-3 phosphate (PI3P) selectively at the membrane of autophagosomes and late endosomes, promoting their fusion with hydrolase-containing lysosomes, which is critical for efficient mitochondrial quality control and the resolution of inflammation mediated by Toll-like receptor 9 (TLR9). Blocking TLR9 activation prevents inflammation and myolysis *in vitro* and may suppress or attenuate rhabdomyolysis flares in patients.

RESULTS

Lipin1 regulates the level of PI3P at the membrane of late endosomes in human myoblasts

To determine whether human lipin1 was implicated in autophagy, we knocked down its expression using a lentivirus expressing a short hairpin RNA (shRNA) targeting lipin1 (sh-*LPIN1*). In control myoblasts transduced with sh-*LPIN1* and in patient myoblasts (see mutations in Table S1), lipin1 was barely detectable by confocal imaging (Figure 1A) or immunoblot (Figure 1B). PAP activity was also blunted, although not abolished, likely reflecting residual PAP activity of lipin2 and lipin3 (Figure 1C).

In 5 primary control myoblast lines, endogenous lipin1 was found in close proximity (50%–85%) of small punctate and tubular structures positive for Rab7 and the lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) and LAMP2 (Figure 1D) involved in the fusion of lysosomes with phagosomes and late endosomes.¹⁸ Lipin1 furthermore displayed proximity with the autophagosomal marker microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) (45%–50%). To a lesser extent, lipin1 overlapped with protein disulfide isomerase (PDI, 35%), a marker of the ER involved in autophagosome biogenesis¹⁹ and with the mitochondrial network as shown by 35% proximity with the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOMM)20 and with the MitoSpy fluorescent membrane probe. By contrast, we found no relevant proximity with the early endosome antigen 1 (EEA1) marker (Figure 1D).

Next, we examined the consequence of a loss of lipin1 on the activity of Vps34. We used a green fluorescent protein (GFP) probe encoding the Fab1, YOTB, Vac1, and EEA1 (FYVE) domain, which specifically binds to membrane PI3P. Myoblasts transfected with a plasmid encoding GFP-2xFYVE displayed a 60% reduction in fluorescent dots in patient cells (Figure 2A) and sh-*LPIN1*-transduced control cells (Figure 2B), confirmed by probing with a PI3P-specific antibody (Figures S1A and S1B). Individual PI3P vesicles had a smaller volume in patient cells (Figure S1B). Consistent with the subcellular distribution of lipin1, this dearth of PI3P concerned vesicles staining for Rab7 and LC3 but not EEA1⁺ compartments (Figure 2C).

Examining the impact on other phosphoinositides (PIs) strongly expressed in late endosomal structures and produced by PI3P metabolism,²⁰ we found a significant reduction in phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI35P2), which is produced by the phosphorylation of PI3P by the PI kinase PIKfyve, in the proximity of Rab7 vesicles (Figure 2D), but no effect on phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PI34P2) levels (Figure S1C). We concluded that lipin1 expression in human myoblasts regulates the levels of PI3P and its downstream product PI35P2 close to late endosomes and autophagosomes.

Lipin1 modulates Rab7 activity by promoting the recruitment of the Rab7 GAP Armus through PI3P production

To monitor the role of lipin1 in late endosome homeostasis, we examined the size and the distribution of Rab7⁺ endosomes. In control myoblasts, Rab7 localized to small vesicular structures at the cell periphery (Figures 2C and 3A), whereas in patient cells, slightly larger Rab7⁺ vesicles (Figure S2A) accumulated in the perinuclear region, presumably in close proximity to the microtubule-organizing center (MTOC) (Figure 3A), a feature reminiscent of Vps34-deficient mouse embryonic fibroblasts.²¹ Positioning of Rab7⁺ vesicles in the cell relies on the balance of Rab7 binding to 2 effectors: the FYVE coiled-coil domain-containing 1 (FYCO1) protein mediating kinesin-dependent anterograde transport and the Rab-interacting lysosomal protein (RILP) mediating retrograde transport via dynein motor proteins.^{22–24} FYCO1 depends on PI3P to promote the microtubule-dependent translocation to the periphery. We speculated that the reduction of PI3P levels compromised the recruitment of FYCO1 to Rab7⁺ vesicles and favored a perinuclear positioning. FYCO1 displayed

a reduced ability to interact with Rab7 (Figure 3B) and showed less proximity with residual PI3P in patient myoblasts (Figure 2B).

Considering that FYCO1 competes with RILP for binding to Rab7, we suspected enhanced RILP recruitment to patient late endosomes. Red fluorescent protein (RFP)-tagged RILP displayed enhanced proximity with endogenous Rab7 in patient cells (Figure 3C). Since only the guanosine triphosphate (GTP)-bound Rab7 can recruit RILP, this suggested that Rab7 was preferentially shifted toward its active GTP-bound form. Physiologic hydrolysis of Rab7-bound GTP to guanosine diphosphate (GDP) is mediated by the GTPase activating protein (GAP) Armus, which binds to late endosomal PI3P.^{21,25} An Armus-RFP fusion protein displayed extensive proximity with Rab7 and PI3P in control myoblasts, which was strongly reduced in patient cells (Figures 3D and 3E). Thus, lipin1 deficiency is associated with impaired recruitment of Armus, presumably because of reduced production of PI3P at late endosomes, suggesting that lipin1 regulates the balance between GTP- and GDP-bound Rab7.

Given the key role of Rab7 in regulating endosome homeostasis,²⁶ we speculated that lipin1 deficiency may perturb a broad range of endosome functions. Confocal imaging revealed the presence of hybrid endosomes staining for EEA1 and Rab7 in patient myoblasts (Figure S2C), suggesting compromised endosome maturation. The enlarged vesicles positive for both Rab7 and LAMP1 in patient myoblasts (Figure S2D) suggest perturbation in the transition from late endosomes to endolysosomes. In contrast, we did not observe any increase in the proximity of Rab7 with the mannose 6 phosphate receptor (M6PR), indicating that M6PR trafficking between the trans-Golgi network (TGN) and late endosomes is not modified (Figure S2E). However, retrograde transport from late endosomes to the TGN was impaired as assessed by the compromised accumulation of internalized cholera toxin B-subunit in GM130⁺ (Golgi) structures after a 30-min chase (Figure S2F). Rab7 is required for the degradation of various cell surface receptors.²⁷ Degradation of 2 model proteins, epidermal growth factor receptor (EGFR) (Figure 3F) and DQ-ovalbumin (DQ-OVA, a substrate becoming fluorescent upon degradation; Figure 3G), was delayed and/or reduced in patient cells. This correlated with a decreased proteolytic conversion of cathepsin D to the mature form (Figure 3H); yet, the quantity of acidic vesicles was similar between patient and control cells (Figure S2F). The proximity of Rab7⁺ with LC3⁺ vesicles, the structures affected by low PI3P levels (Figure S2C), but not LAMP1⁺ structures with LysoTracker Red, a dye labeling acidic structures, was also significantly increased in patient myoblasts (Figure 3I). Since acidification relies on the interaction of the V-ATPase subunit V1G1 with RILP,²⁸ enhanced RILP recruitment to GTP-locked Rab7 likely explains this observation, as well as predominant perinuclear distribution of Rab7 vesicles in patient myoblasts.²⁹ We concluded that compromised Rab7 inactivation in lipin1-deficient myoblasts leads to a perturbation in global endosome maturation and function, and ultimately to a decrease in cellular degradative capacities.

Lipin1 regulates the clearance of autophagosomes and of mitochondrial DNA (mtDNA) from damaged mitochondria via the GAP Armus

Paralleling Rab7 distribution, LC3 staining concentrated in the perinuclear region in patient myoblasts (Figure S3A). Considering

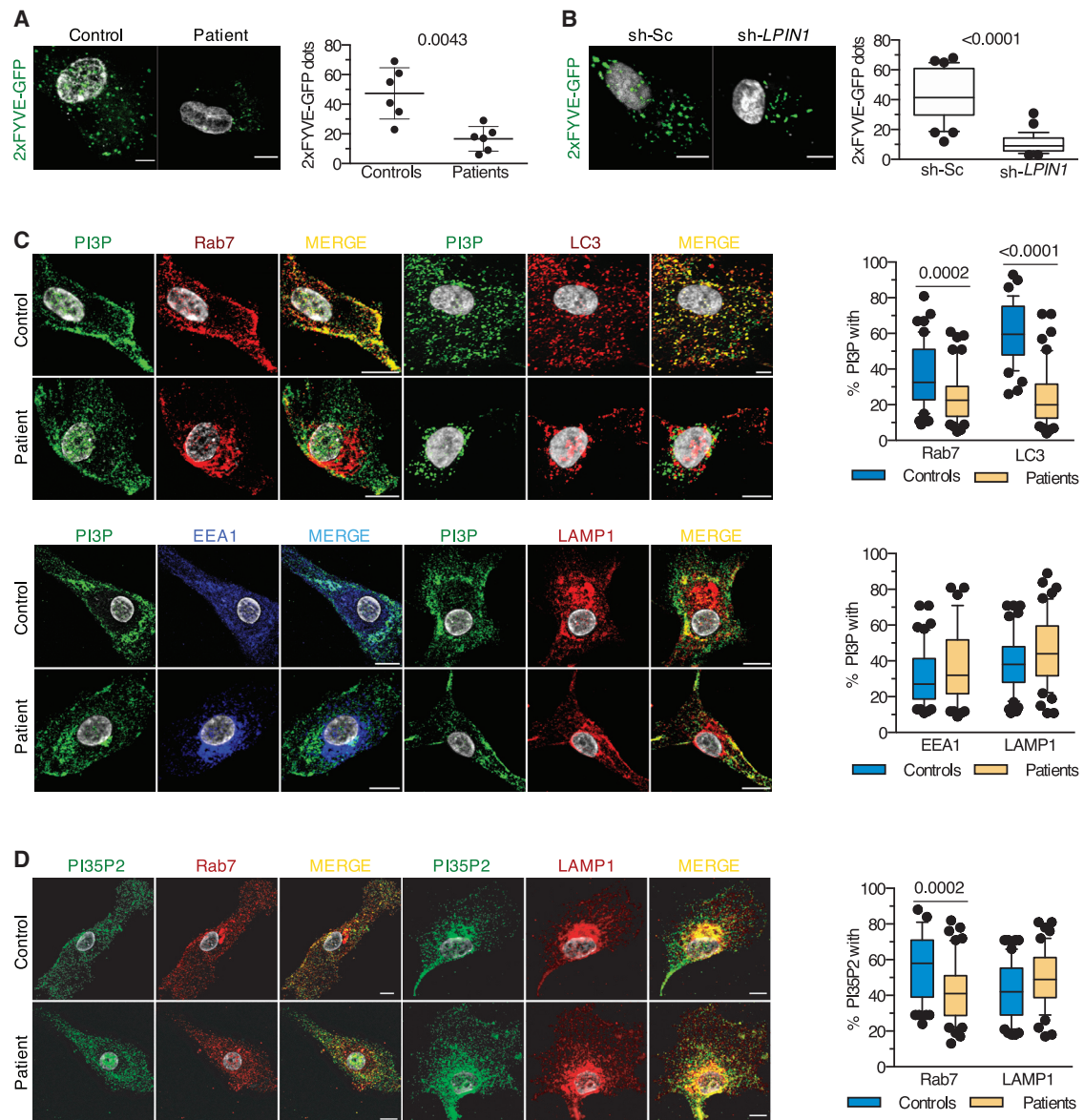


Figure 2. Lipin1 deficiency results in a loss of PI3P close to Rab7 structures in myoblasts

(A) The confocal images show a representative 2xFYVE-GFP staining from 1 of 6 controls and patients. Dot plots (50 images/dot) show the means \pm SDs number of 2xFYVE-GFP dots per patient versus control myoblast (Mann-Whitney *U* test).

(B) As in (A), but using immortalized myoblasts from 1 healthy donor treated with sh-Sc or sh-*LPIN1*. The plots (30–45 cells/condition) show the number of 2xFYVE-GFP dots (Mann-Whitney *U* test).

(C) Typical distribution of PI3P within the myoblast vesicles from 1 of 3 controls and patients. Box and whisker plots (50 images/condition) depict the percentage of proximity between PI3P and the given marker for 1 representative control and patient (Mann-Whitney *U* test).

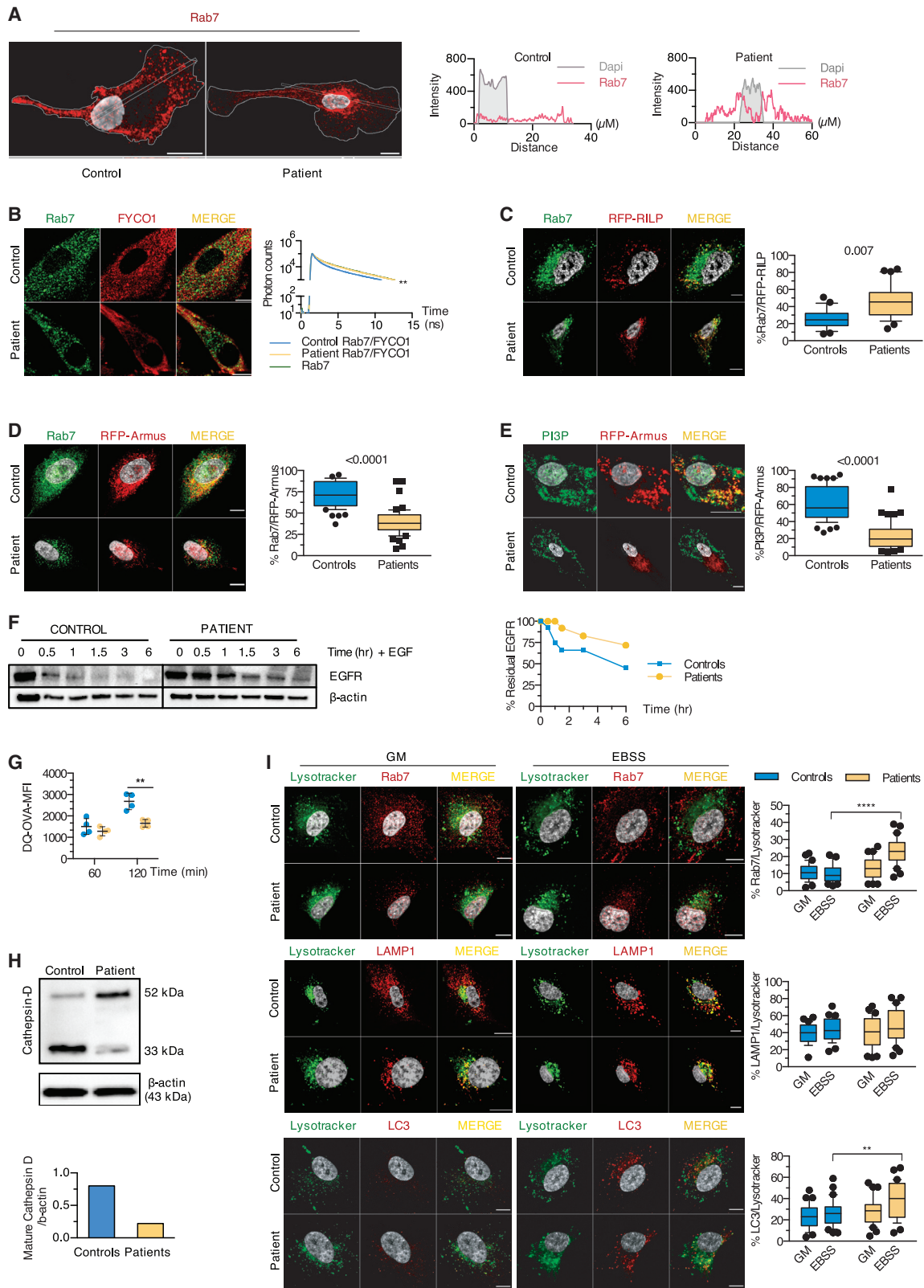
(D) Myoblasts from 3 controls and 3 patients were stained for PI35P2 and late endosomal or lysosomal markers. Proximity was calculated as in (C) (unpaired *t* test). Results are from 1 representative of at least 3 independent experiments.

Scale bars, 10 μ m.

See also [Figure S1](#).

the role of complexes formed by FYCO1, Rab7, and LC3 in the microtubule transport of autophagic vesicles,³⁰ we reasoned that defective FYCO1 recruitment may disturb autophagosomes. The proximity between LC3 and FYCO1 was significantly reduced in patient myoblasts ([Figure S3B](#)), as was that between LC3 and Armus-RFP ([Figure S3C](#)).

Armus depletion, mediating a shift to GTP-locked Rab7, significantly delays autophagic flux.³¹ To examine the fusion of autophagosomes with lysosomes, we transfected myoblasts with a vector encoding RFP-GFP-LC3, allowing the distinction of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺) from autolysosomes (RFP⁺GFP⁻), due to the loss of GFP fluorescence in acidic compartments.



(legend on next page)

Incubation in minimal medium lacking growth factors and amino acids (Earle's balanced salt solution, EBSS) induced the formation of autophagosomes in both patient and control myoblasts. However, while supplementation with a nutrient-rich growth medium (GM) increased the percentage of autolysosomes strongly in control cells, it had no effect in patient cells, indicating defective autophagosome maturation in the absence of lipin1 (Figure 4A). This suggested that although late endosomes undergo enhanced acidification in patient myoblasts, acidification in autophagosome maturation is compromised.

Mitochondrial quality control depends on autophagy to remove damaged mitochondria.³² Deletion of the lipin ortholog in *Drosophila* results in abnormal mitochondrial and autophagosomal structures in fat body cells.³³ Perturbed mitochondrial and autophagosomal structures and functions are also observed in muscle cells of lipin1-deficient mice.¹⁴ We hypothesized that damaged mitochondria may accumulate in patient myoblasts because of impaired mitophagy. The formation of mitophagosomes was not impaired (Figure 4B) in patient cells exposed to the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) or to EBSS. However, CCCP-induced mitophagosomes failed to be cleared at late time points (Figure 4C), as indicated by the increased number of nucleoids as compared to baseline (0 h) 16 h after exposure to CCCP. Considering the key role of mitophagy in mitochondrial homeostasis, we suspected that mitochondrial function may be perturbed in the absence of lipin1. Patient myoblasts displayed a significantly lower oxygen consumption rate (OCR) at baseline conditions. The lower OCR was more pronounced upon challenging with the uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone (FCCP; Figures 4D, S3D, and S3E), while the maximal glycolytic capacity was significantly increased (Figure S3F). The total mass of mitochondrial structures remained unchanged between patient and control myoblasts (Figure S3G), suggesting that damaged or non-functional mitochondrial material accumu-

lating at the steady state does not affect cell growth, as supported by a normal proliferation rate upon culture with different glucose concentrations (Figure S3H). Incubation with EBSS induced a substantial loss of mitochondrial transmembrane potential in patient myoblasts, as indicated by reduced tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM) sequestration (Figure 4E), resulting in an increased production of reactive oxygen species (ROS) (Figure S3I). These observations suggest that mitochondrial dysfunction is unmasked upon higher energetic demand and results from a higher proportion of damaged mitochondria in patient myoblasts.

Compromised mitophagy can alter the integrity of mtDNA and result in the accumulation of damaged mtDNA. Double-stranded mtDNA (dsDNA) and the transcriptional factor A mitochondrial (TFAM), an exclusively mitochondrial protein involved in the maintenance of intact mtDNA,³⁴ showed normal proximity in patient myoblasts (Figure S4A). Consistently, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), a marker of oxidized mtDNA physiologically removed by mitophagy,³⁵ showed limited proximity with TFAM and TOMM20 (Figures S4A and S4B). However, upon exposure to EBSS, the total cellular amount of oxidized mtDNA increased strongly in patient myoblasts, suggesting that oxidized mtDNA was properly released from mitochondria but not degraded upon metabolic distress (Figure S4C). Consistently, qPCR analysis demonstrated a significant increase in mtDNA (Figure S4D).

Oxidized mtDNA could accumulate within the endolysosomal pathway or in the cytosol. In patient myoblasts, 8OHdG localized mainly to LC3⁺ and LAMP1⁺ structures at the steady state and upon metabolic stress, which persisted after refeeding cells (Figure 4F). In contrast, the cytosolic fraction purified from stressed myoblasts did not contain increased amounts of 12S DNA and of D-loop, 2 mtDNA-related products³⁴ (Figure 4G). We concluded that in the absence of lipin1, oxidized mtDNA accumulates in a non-degradative poorly acidified vesicular compartment, most

Figure 3. Lipin1-deficient myoblasts display alterations in Rab7 positioning and activation and impaired lysosomal function

(A) The distribution of endogenous Rab7 in 30 individual patient and control myoblasts was determined by calculating the intensity of Rab7 fluorescence along a longitudinal axis traversing the nucleus.

(B) The interaction between Rab7 and FYCO1 determined by fluorescence resonance energy transfer (FRET) after staining with Rab7 (green) only or for Rab7 (donor) and FYCO1 (acceptor) in red was depicted by line graphs (ns, nanoseconds).

(C) Myoblasts transfected with RFP-RILP were immunostained for Rab7. Box and whisker plots (30 images/condition) show the percentage of proximity of Rab7 with RFP-RILP (unpaired *t* test).

(D and E) Myoblasts transfected with a construct encoding RFP-Armus were stained for Rab7 or PI3P. Box and whisker plots (50 images/condition) show the percentage of proximity of Rab7 (D) or PI3P (E) with RFP-Armus (Mann-Whitney *U* test).

(F) Dot plot (mean of 2 technical replicates/dot) with lines depicts the relative level of residual EGFR as compared to β -actin upon incubation with EGF for indicated times.

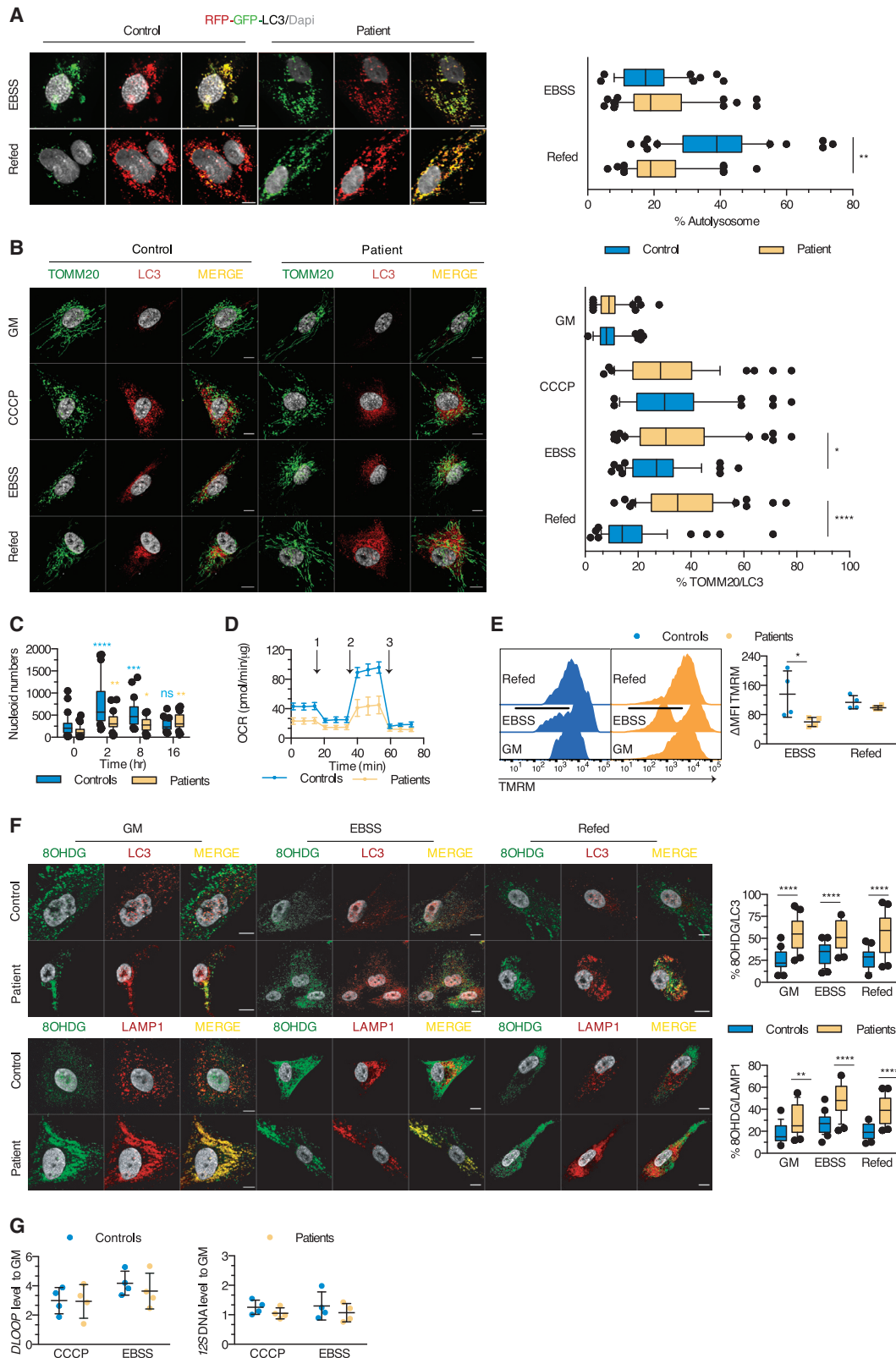
(G) Myoblasts were loaded with DQ-OVA, and fluorescence resulting from the cleavage of DQ-OVA substrate was analyzed by flow cytometry. Dot plots (mean of 2 technical replicates/dot) show the means \pm SDs of the value of the mean fluorescence intensity (MFI) of DQ-OVA 60 and 120 min after uptake (mean effect of interaction $F(1,6) = 14.43$, $p = 0.009$, of time $F(1,6) = 53.46$, $p = 0.0003$, of subjects $F(1,6) = 11.23$, $p = 0.0154$).

(H) Levels of immature and mature cathepsin D relative to β -actin expression in primary myoblasts were determined by immunoblot.

(I) Myoblasts cultured in GM or EBSS were loaded with the LysoTracker Red dye, then stained for endogenous Rab7, LAMP1, and LC3. Box and whisker plots (30 images/condition) show the percentage of proximity of Rab7 (mean effect of interaction $F(1,116) = 22.01$, $p < 0.0001$, of stimulus $F(1,116) = 16.55$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,116) = 47.86$, $p < 0.0001$), LAMP1 (mean effect of interaction $F(1,116) = 0.2088$, $p = 0.6486$, of stimulus $F(1,116) = 4.252$, $p = 0.0414$, of subjects $F(1,116) = 0.7115$, $p = 0.4007$), or LC3 (mean effect of interaction $F(1,116) = 1.786$, $p = 0.1840$, of stimulus $F(1,116) = 7.002$, $p = 0.0093$, of subjects $F(1,116) = 11.76$, $p = 0.0008$) with LysoTracker Red.

Scale bars, 10 μ m (A–E and I). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$: adjusted *p* values as determined by within-subjects (G) or between-subjects (I) 2-way ANOVA and post hoc Sidak's correction for multiple comparisons. Images and graphs show typical staining in myoblasts from 1 of 2 (B), 3 (C–F, H, and I), or 4 (A and G) patients and controls. Results are from 1 of at least 3 independent experiments.

See also Figure S2.



(legend on next page)

likely mitophagosomes, and fails to be cleared as observed for autophagosomes (Figures 4A–4C). We propose that the loss of PI3P close to autophagosomes, similar to that of late endosomes, compromises the recruitment of Armus, which in turn inhibits the assembly of FYCO1/Rab7/LC3 complexes required for efficient autophagic/mitophagic clearance. This results in functional perturbation of mitochondria and accumulation of oxidized mtDNA in lipin1-deficient myoblasts.

Accumulation of mtDNA enhances inflammation in patient cells through a TLR9-dependent pathway

Fasting and metabolic stress precede flares of lipin1-related rhabdomyolysis. We reasoned that the accumulation of damaged mtDNA may be responsible for inflammation precipitating flares. mtDNA was readily detectable in the plasma of patients with chronic and residual elevated creatine kinase (CK) between flares, as were pro-inflammatory cytokines and chemokines (Figure 5A). We also identified a type I interferon (IFN) signature by quantifying 6 IFN-related genes (Figure 5B) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients. Since circulating inflammatory mediators are mainly produced by peripheral blood monocyte-derived cells activated by microbial products,³⁶ we examined the production of inflammatory cytokines and IFN by dendritic cells (DCs) following stimulation by TLR ligands. DCs from patients displayed enhanced production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 when stimulated by a synthetic TLR9 agonist, but not by ligands for other endosomal or plasma membrane TLRs (Figure 5C). In line with this, TLR9 stimulation induced an increased maturation of patient DC (Figure 5C) and a much stronger type I IFN response (Figure 5D). Patient and sh-*LPIN1*-transduced control myoblasts were also hypersensitive to TLR9 ligands (Figures 5E and 5F). Rescuing lipin1 expression (Figures S5A–S5D) abrogated hypersensitivity to TLR9 ligands of patient myoblasts (Figure 5G), confirming the causative role of lipin1 expression and/or mutation

Febrile illness due to viral infection, another factor frequently preceding rhabdomyolysis flares, not only causes metabolic stress but also provides TLR ligands. We reasoned that the simultaneous presence of metabolic stress and microbial TLR9 ligands may enhance inflammation in a synergistic manner or through the cooperative binding of mtDNA and exogenous ligands to TLR9.³⁷ We exposed myoblasts to EBSS alone or in combination with CpG-A to mimic an episode of febrile illness. Exposure to EBSS created proinflammatory conditions only in patient cells (Figure S5E), which was exacerbated by the addition of CpG-A. Depleting mitochondria (Figure 5H) significantly reduced the inflammatory response to a level close to control myoblasts (Figure 5I), indicating that mitochondria and probably mtDNA are mandatory for triggering inflammation upon starvation. mtDNA can also trigger inflammatory responses through the cytosolic stimulator of interferon genes (STING) pathway.³⁸ We could not detect any significant difference in IFN expression upon exposure to EBSS combined to the STING ligand cyclic GMP-AMP (cGAMP; Figure S5F), consistent with the lack of an effect of EBSS and CCCP on the cytosolic concentration of mtDNA (Figure 4G).

These results suggested that mtDNA could reach endolysosomal compartments, where it could bind and activate TLR9. To verify this hypothesis, we studied the trafficking of TLR9 in myoblasts transfected with a plasmid encoding hemagglutinin (HA)-tagged TLR9. In patient myoblasts, a larger proportion of HA-TLR9 was observed in the proximity of 8OHdG at the steady state or upon exposure to CpG-A alone or in combination with EBSS and persisted after refeeding with GM (Figure 5J). Similarly, exposure to both CpG-A and EBSS but not CpG-A alone (Figure 5K) significantly increased the proximity of HA-TLR9 with LC3 exclusively in patient myoblasts. Our results suggest that mtDNA can accumulate in a LC3⁺ compartment together with TLR9 and trigger its activation in lipin1-deficient cells. Starvation and cell exogenous TLR9 ligands exacerbate this by

Figure 4. Autophagic clearance and mitochondrial quality and functions are impaired in human lipin1-deficient myoblasts

(A) Autolysosome formation (red puncta) in myoblasts transfected with the RFP-GFP-LC3 construct upon exposure to EBSS and refed or not with GM. Box and whisker plots (50 images/condition) represent the percentage of autolysosomes (mean effect of interaction $F(1,196) = 44.4$, $p < 0.0001$, of stimulus $F(1,196) = 47.63$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,196) = 17.78$, $p < 0.0001$).

(B) Myoblasts were cultured in GM or EBSS and refed or not with GM (starvation-induced mitophagy) or exposed to CCCP before immunostaining for TOMM20 and LC3. Box and whisker plots (50 images/condition) depict the percentage of proximity of TOMM20 with LC3 (mean effect of interaction $F(3,392) = 11.09$, $p < 0.0001$, of stimulus $F(3,392) = 62.9$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,392) = 20.70$, $p < 0.0001$).

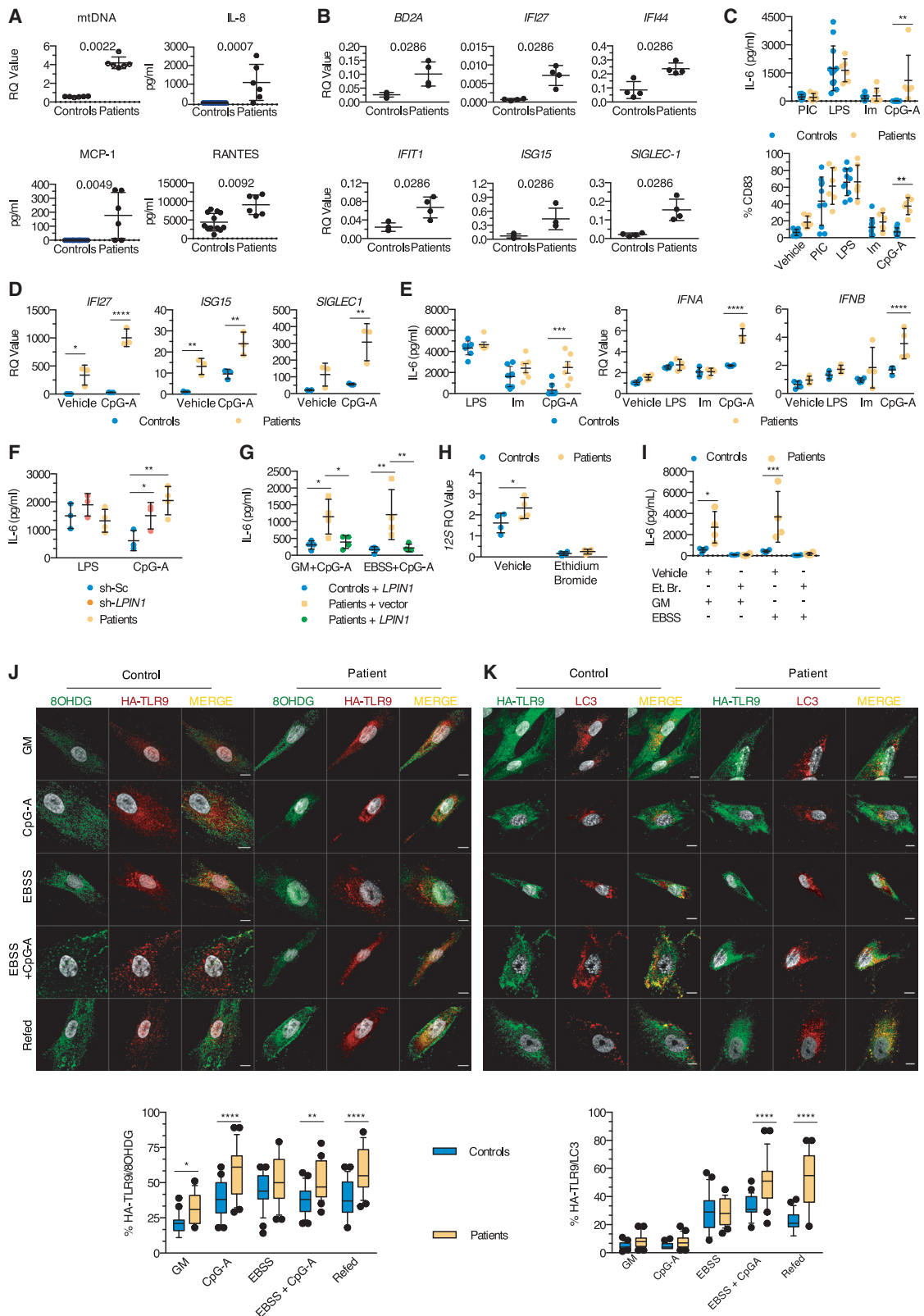
(C) Box and whisker plots (30 images/condition) represent the number of mitochondrial nucleoids per myoblast after exposure to CCCP (mean effect of interaction $F(3,116) = 9.554$, $p < 0.0001$, of time $F(3,116) = 19.99$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1;116) = 26.22$, $p < 0.0001$).

(D) Real-time analysis of oxygen consumption rate (OCR) in myoblasts under basal respiration and after addition of (1) oligomycin, (2) FCCP, or (3) antimycin A. Dot plot (mean of 4–6 technical replicates/dot) represents the means \pm SDs of the OCR in myoblasts from 5 controls and 4 patients.

(E) Evaluation of the mitochondrial membrane potential by flow cytometry. Dot plot (mean of 2 technical replicates/dot) depicts the means \pm SDs of the MFI of TMRM, expressed as a percentage of the MFI for GM condition (mean effect of interaction $F(1,12) = 3.340$, $p = 0.0926$, of stimulus $F(1,12) = 7.313$, $p = 0.0192$, of subjects $F(1,12) = 0.2404$, $p = 0.6327$).

(F) Distribution of oxidized DNA within the LC3 and LAMP1 structures of myoblasts cultured as in (B). Box and whisker plots (25 images/condition) show the percentage of proximity of 8OHdG with LC3 (mean effect of interaction $F(2,144) = 1.504$, $p = 0.2258$, of stimulus $F(2,144) = 0.2997$, $p = 0.7415$, of subjects $F(1,144) = 100.8$, $p < 0.0001$) or LAMP1 (mean effect interaction $F(2,144) = 3.130$, $p = 0.0467$, of stimulus $F(2,144) = 18.41$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,144) = 96.93$, $p < 0.0001$).

(G) Quantification of 12S mtDNA levels qPCR in cytosolic fractions from myoblasts of 4 patients and controls exposed to CCCP or EBSS (mean effect of interaction $F(1,12) = 0.004867$, $p = 0.9455$, of stimulus $F(1,12) = 1.798$, $p = 0.2047$, of subjects $F(1,12) = 0.03755$, $p = 0.8496$) and of the mtDNA motif *DLOOP* (mean effect of interaction $F(1,12) = 0.2168$, $p = 0.6498$, of stimulus $F(1,12) = 0.3160$, $p = 0.5844$, of subjects $F(1,12) = 3.371$, $p = 0.0913$). Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) depict the means \pm SDs of the ratio of cycle threshold (CT) values of the given cytosolic fraction normalized to unfractionated cells. Scale bars, 10 μ m (A and B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: adjusted p values after between-subjects (A, B, and E–G) or within-subjects (C, as compared to H0 for each family) 2-way ANOVA and post hoc Sidak's correction for multiple comparisons. Images and plots show typical staining and quantification for 1 of 3 patients and controls (A, B, C, and F). Results are representative from 1 of 2 (G), 3 (A–D and F), and 4 (E) independent experiments. See also Figures S3 and S4.



(legend on next page)

favoring the transport or accumulation of mtDNA and/or the recruitment of TLR9 to endolysosomes. CpG-A may also increase TLR9 activation in patient myoblasts helped by the cooperative binding with 8OHDG.³⁷

mtDNA accumulation triggers clinical inflammation and rhabdomyolysis *in vivo*

We next focused on identifying the pathogenic sequence leading to myoblast cell death. During rhabdomyolysis, skeletal muscle fibers release high concentrations of Ca²⁺ before activation of apoptosis and/or necrosis.³⁹ Exposure of patient, but not control, myoblasts, to CpG-A was sufficient to trigger a Ca²⁺ flux (Figure 6A). This was TLR9 dependent since pre-incubation with ODN TTAGGG (A151), a synthetic TLR9 antagonist ligand, normalized Ca²⁺ profiles (Figure 6A). Cell death of patient myoblasts was triggered by exposure to EBSS alone and greatly enhanced by the addition of a TLR9 ligand (Figures 6B and 6C). Importantly, staurosporin triggered similarly cell death in primary patient and control myoblasts. Again, rescuing lipin1 expression (Figures 6B and 6C) in primary myoblasts from patients, knocking down lipin1 expression (Figure 6D), or depleting mitochondria (Figure 6E) was sufficient to prevent caspase-

dependent cell death. Consistent with a role of inflammatory signaling, dexamethasone prevented cell death *in vitro* (Figure 6F), and the treatment of 2 patients with steroids during a flare up resulted in the rapid regression of muscle pain and normalization of plasma CK levels (Figure 6G). Pre-incubating patient myoblasts with a TLR9 antagonist or chloroquine (CLQ), a drug used to prevent acidification of endolysosomes and consequently TLR9 proteolytic activation and signaling, was sufficient to reverse inflammation (Figure 6H) and prevent cell death (Figure 6I). Thus, TLR9 signaling promotes mitochondrial caspase-dependent cell death in metabolically stressed patient myoblasts. Prompted by these promising results, we treated 6 patients, 5 of whom had previously undergone between 3 and 6 flares, with hydroxychloroquine sulfate (HS; daily dose 6.5 mg/kg) given orally for 12–36 months. Four patients were completely protected from flares while adhering to the treatment, whereas 2 other patients experienced a single episode (Table 1). In all 6 patients, HS was well tolerated, except for moderate abdominal pain in 3. Therefore, targeting inflammatory TLR9 signaling directly by inhibiting its activation, or indirectly using steroids, may be of significant clinical interest to prevent flare-ups and manage lipin1-related rhabdomyolysis.

Figure 5. Accumulation of oxidized mitochondria enhances inflammation in lipin1-deficient cells through a TLR9 pathway

(A) Circulating mtDNA was quantified in plasma by qPCR and inflammatory molecules were measured in sera by flow cytometry, from 12 healthy donors (6 for mtDNA) and 6 patients (Mann-Whitney *U* test). Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) show the means \pm SDs.

(B) IFN signature in peripheral blood mononuclear cells was identified by qPCR in 4 controls and 4 patients. Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) show the mean \pm SD of the CT value of a given gene normalized to the CT value of *BACT* (Mann-Whitney *U* test).

(C) DC maturation reflected by CD83 expression (mean effect of interaction $F(4,70) = 2.114$, $p = 0.0881$, of stimulus $F(4,70) = 36.27$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,70) = 14.21$, $p = 0.0003$) and interleukin-6 (IL-6) production (mean effect of interaction $F(3,64) = 2.847$, $p = 0.0444$, of stimulus $F(3,64) = 18.20$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,64) = 2.807$, $p = 0.0987$) were evaluated by flow cytometry and ELISA, respectively, in 10 controls and 6 patients, after exposure to Poly:IC (PIC), lipopolysaccharide (LPS), imiquimod (Im), and CpG-A. Dot plots (mean of 2 [CD83] or 4 [IL-6] technical replicates/dot) show the means \pm SDs.

(D) CpG-A-induced IFN responses in DCs from 3 controls and patients were evaluated by qPCR by quantifying *SIGLEC1* (mean effect of interaction $F(1,8) = 4.436$, $p = 0.0683$, of stimulus $F(1,8) = 9.255$, $p = 0.0160$, of subjects $F(1,8) = 20.78$, $p = 0.0019$), *ISG15* (mean effect of interaction $F(1,8) = 0.3191$, $p = 0.5876$, of stimulus $F(1,8) = 21.75$, $p = 0.0016$, of subjects $F(1,8) = 41.33$, $p = 0.0002$), and *IFI27* (mean effect of interaction $F(1,8) = 21.99$, $p = 0.0016$, of stimulus $F(1,8) = 25.45$, $p = 0.0010$, of subjects $F(1,8) = 91.20$, $p < 0.0001$) expression. Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) show the means \pm SDs of CT value calculated as in (B).

(E) Production of IL-6 (ELISA) by myoblasts from 8 controls and 6 patients (mean effect of interaction $F(2,36) = 3.882$, $p = 0.0297$, of stimulus $F(2,36) = 45.49$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,36) = 15.28$, $p = 0.0004$), *IFNA* (mean effect of interaction $F(3,24) = 23.44$, $p < 0.0001$, of stimulus $F(3,24) = 74.13$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,24) = 42.33$, $p < 0.0001$), and *IFNB* (mean effect of interaction $F(3,24) = 2.207$, $p = 0.1133$, of stimulus $F(3,24) = 10.19$, $p = 0.0002$, of subjects $F(1,24) = 13.60$, $p = 0.0012$).

(F) As in (E), but using sh-Sc or sh-*LPIN1*-transduced immortalized myoblasts from 1 healthy donor (1 different cell vial from the same single healthy donor/dot) and primary myoblasts from 4 patients. Dot plots (mean of 4 technical replicates/dot) show the means \pm SDs of the IL-6 concentration (mean effect of interaction $F(2,14) = 6.234$, $p = 0.0116$, of stimulus $F(1,14) = 0.0874$, $p = 0.3653$, of subjects $F(2,14) = 4.397$, $p = 0.0330$).

(G) As in (F), but primary myoblasts from 4 controls and patients were transduced with a lentivirus expressing a plasmid encoding for a myc-DDK-tagged lipin1 protein (+*LPIN1*) or an empty vector (+vector) before being challenged (mean effect of interaction $F(2,18) = 0.2196$, $p = 0.8050$, of stimulus $F(1,18) = 0.2906$, $p = 0.5965$, of subjects $F(2,18) = 14.80$, $p = 0.0002$).

(H) Myoblasts from 6 controls and patients were exposed to a vehicle or ethidium bromide (Et. B.). Dot plots (mean of 3 technical replicates/dot) show the means \pm SDs of the ratio of the CT value for *12S* mitochondrial DNA normalized to the CT value for *BACT* (mean effect of interaction $F(1,12) = 3.186$, $p = 0.0996$, of stimulus $F(1,12) = 101.6$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,12) = 5.268$, $p = 0.0405$).

(I) Myoblasts from 6 controls and patients pre-treated with Et. B. for 5 days were exposed to EBSS and challenged or not with CpG-A for 16 h. Dot plots (mean of 4 technical replicates/dot) show the mean \pm SD of IL-6 concentration in culture supernatants at the end of the experiment (mean effect of interaction $F(3,24) = 4.989$, $p = 0.0079$, of stimulus $F(3,24) = 8.218$, $p = 0.0006$, of subjects $F(1,24) = 15.14$, $p = 0.0007$).

(J) Myoblasts were transfected with a plasmid encoding HA-tagged TLR9 and exposed to GM or EBSS and with vehicle or CpG-A before refeeding (Refed) cells exposed to EBSS and CpG-A with GM. Cells were then stained for HA-TLR9 (anti-HA antibody, red) and 8OHDG (green). Box whisker plots (25 images/condition) show the percentage of proximity of TLR9 with 8OHDG (mean effect of interaction $F(4,240) = 1.712$, $p = 0.1481$, of stimulus $F(4,240) = 25.07$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,240) = 68.55$, $p < 0.0001$) in myoblasts from 1 of 3 controls and patients.

(K) As in (J) but myoblasts were immunostained for HA-TLR9 (green) and LC3 (red). Mean effect of interaction $F(4,240) = 18.56$, $p < 0.0001$, of stimulus $F(4,240) = 125.8$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,240) = 61.39$, $p < 0.0001$.

IL-6 concentration is presented after background (which corresponds to values obtained with a control vehicle) subtraction (C, E, F, H, and I). Scale bars, 10 μ m (J and K). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$: adjusted *p* values after between-subjects 2-way ANOVA (B–K) and post hoc Sidak's correction for multiple comparisons. Data are representative of 1 of at least 3 independent experiments.

See also Figure S5.

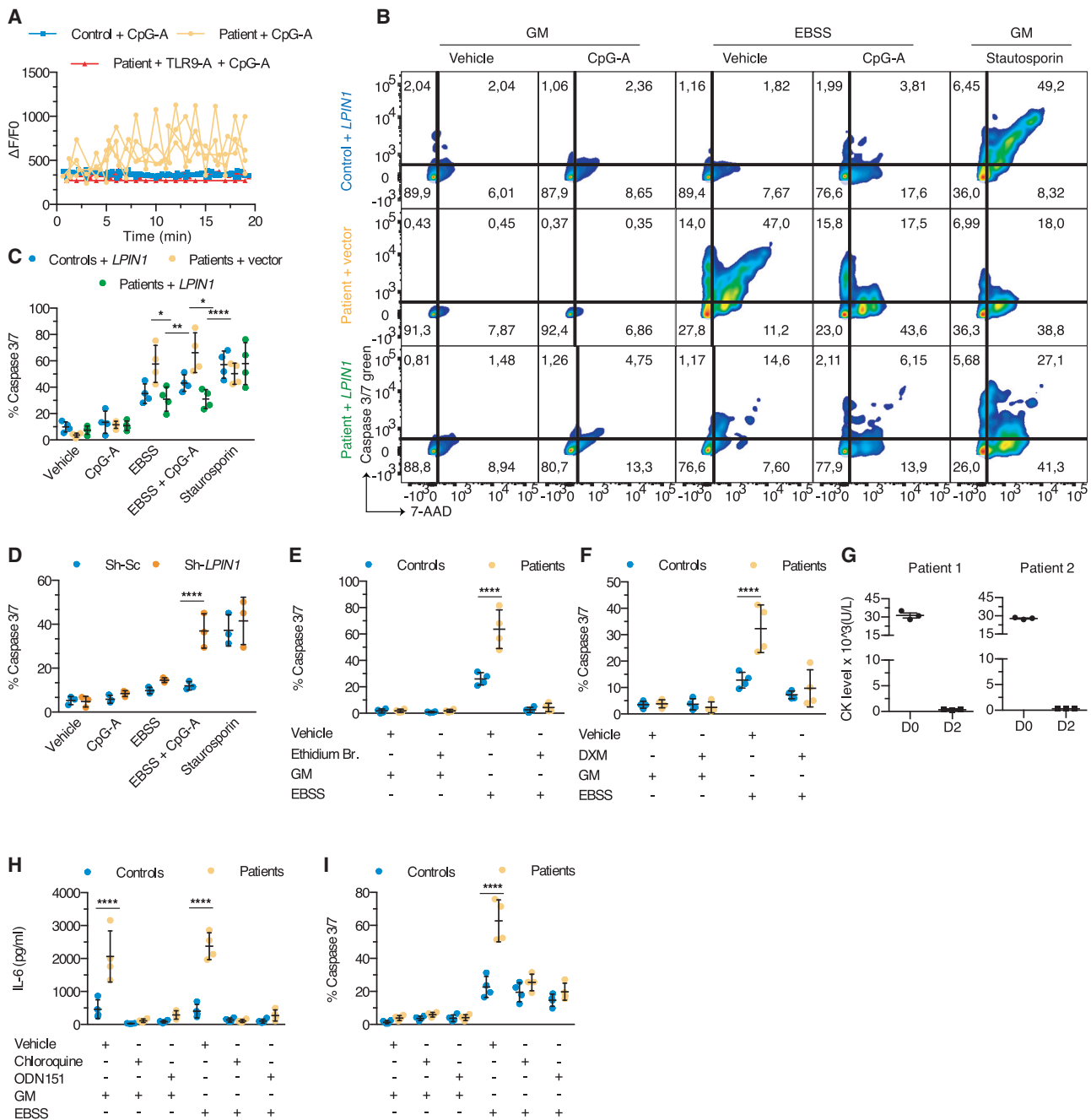


Figure 6. mtDNA accumulation is responsible for inflammation and rhabdomyolysis that can be reversed by steroids or chloroquine (CLQ) treatment *in vivo*

(A) Real-time calcium flux in myoblasts from 4 controls and patients challenged with CpG-A, after pre-incubation with ODN151, a synthetic TLR9 antagonist. Each dot plot with lines depicts the mean \pm SD of the intensity of the fluo-4 calcium probe as normalized to basal intensity of 1 single individual (≥ 10 cells/condition). (B) Death of myoblasts was evaluated by staining cells from 4 control individuals transduced with a lentivirus expressing a plasmid encoding for myc-DDK-tagged lipin1 protein (+LPIN1) and 4 patients transduced with a lentivirus expressing a plasmid encoding for myc-DDK-tagged lipin1 or an empty vector, for the apoptosis marker caspase3/7 green and propidium iodide or 7-actinomycin D (7-AAD), a dye that stains both apoptotic and necrotic cells. Staurosporin (ST): positive control. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) plots show the codistribution of the fluorescence intensity of caspase3/7 and of 7-AAD in 1 of 4 controls and patients.

(C) Dot plots ($\geq 1,000$ single cells/dot) depict the mean \pm SD of the proportion of dead cells (ie, cells positive for caspase3/7 and/or 7-AAD) from (B) (mean effect of interaction $F(8,45) = 5.296$, $p = 0.0001$, of stimulus $F(4,45) = 70.03$, $p < 0.0001$, of subjects $F(2,45) = 6.607$, $p = 0.003$).

(D) As in (C), but using immortalized myoblast cell line transduced with Sh-Sc or Sh-LPIN1 shRNA (mean effect of interaction $F(4,20) = 6.154$, $p = 0.0021$, of stimulus $F(4,20) = 48.93$, $p < 0.0001$, of subjects $F(1,20) = 15.62$, $p = 0.0008$).

(legend continued on next page)

DISCUSSION

The results of this study suggest a key role of perturbed late endosome and autophagosome positioning and fusion in the pathogenesis of lipin1 disease. We find that lipin1 deficiency with a consequent lack of PI3P hampers recruitment of the Rab7 GAP Armus, thereby preventing the physiologic Rab7 cycling between the GTP/GDP-bound states and shifting the balance of Rab7 effector binding to RILP at the expense of FYCO1.^{31,40} It is well documented, although incompletely understood, that kinesin-mediated transport mediated by FYCO1 is required to complete the clearance of late endosome/autophagosome content.⁴¹ This phenomenon is in apparent contrast to the fact that peripheral late endosomes/lysosomes are known to be less degradative than those positioned at the MTOC.⁴² However, our observations suggest that lipin1-deficient late endosomes display poor proteolytic capacity despite their positioning close to the MTOC. In lipin1-deficient endosomes/lysosomes, efficient acidification contrasts with reduced maturation of cathepsin D, suggesting dissociation between vesicles containing hydrolases and others rich in V-ATPase. A plausible explanation for normal or even enhanced acidification is provided by recruitment of the V-ATPase subunit V1G1 by RILP.²⁸ Conversely, immature cathepsins are stored in lysosomes and require activation by lysosome fusion with late endosomes, which relies on the kinase PIKfyve producing PI35P2,⁴³ a compound with reduced abundance at lipin1-deficient late endosomes, likely because of the dearth of its precursor PI3P. Additional factors may contribute to deficient fusion between late endosomes and lysosomes, including an impaired activation of Wdfy3/Alfy,^{44,45} an enzyme expressed in skeletal muscle directly recruited through a PI3P-binding domain,⁴⁴ and/or the enzyme EPG5, which requires activation by the PI3P phosphatase MTMR-3.^{46,47} We argue that lipin1-deficient myoblasts contain static late endosomes retained at the MTOC but are unable to fuse with hydrolase-containing lysosomes. Does lipin1 co-transcriptional activity play any role in the pathophysiology of lipin1-related rhabdomyolysis? Considering our previous report arguing against this hypothesis,¹⁰ as did findings in recent mouse models,^{8,9} there is strong support for the causative role of defective PAP-1 activity.

Lipin1 deficiency can increase mitochondrial proteolysis⁴⁸; however, this phenomenon is not likely sufficient to explain mitochondrial dysfunction, which may also relate to increased local PA levels. For example, the lack of dephosphorylation of mitochondrial phosphatidate by lipin1 may enhance mitochondrial

fusion itself, inhibiting organelle elimination by autophagy. However, given the strong evidence for defective late endosome-lysosome fusion, we propose that mitochondrial dysfunction preferentially results from failed mitochondrial quality control. The low mitochondrial OCR at baseline may in part reflect dysfunctional free cytoplasmic mitochondria and/or mitochondria found in vesicles. A formal experimental demonstration would be difficult to achieve considering the tight connections between autophagic flux and mitochondrial homeostasis, but would likely include strategies to restore defective autophagic clearance.⁴⁹ The finding that autophagosomes form normally in lipin1-deficient myoblasts indicates that the activation of Atg14-containing Vps34 complexes is independent of lipin1 and that LC3⁺ vesicles staining for lipin1 correspond to autophagosomes having fused with late endosomes (“autoendosomes”). Considering the strong overlap of 8OHdG with LC3 staining, it is likely that mitochondrial-derived vesicles (MDVs) delivering mtDNA directly to late endosomes account for a minor source of oxidized mtDNA in TLR9⁺ vesicles and that compromised resolution of mitophagy is its principal source.⁵⁰ Compromised recruitment of FYCO1 and Armus to LC3⁺ structures suggests that the mechanisms responsible for blocking late endosome fusion with lysosomes also hinder fusion of autolysosomes with lysosomes and therefore degradation of mtDNA. This fusion event likely is also required for TLR9 inactivation. TLR9 associates with the chaperone Unc93b in the ER and travels to endosomes where it can be activated by proteolytic cleavage.⁵¹ Strong and prolonged proximity of TLR9 with 8OHdG in stressed myoblasts indicates that vesicles containing MDVs, which undergo fusion with TLR9-containing endosomes, are sufficiently degradative to activate TLR9, but not equipped to degrade either mtDNA or TLR9 to terminate signaling. We did not observe any difference in TLR9 expression by qRT-PCR between patient and control myoblasts or DCs (data not shown). The strong TLR9-dependent deleterious effect of mtDNA is not restricted to lipin1 deficiency; has been observed for renal tubular cells, cardiomyocytes, and neurons^{32,52,53}; and acts both in a cell-autonomous manner and through release from cells upon cell death, formation of extracellular DNA traps, or exosome secretion.³⁴ The presence of mtDNA in patient sera, together with this study, indicate that both mechanisms are at work in lipin1 patients.

The cell-autonomous effects of mtDNA include pro-inflammatory signaling through inflammasome or cGAMP synthase-STING pathway activation upon mtDNA release into the cytosol.

(E and F) As in (C), but myoblasts were pre-treated with Et. B. or vehicle (mean effect of interaction F(3,24) = 21.28, $p < 0.0001$, of stimulus F(3,24) = 114.8, $p < 0.0001$, of subjects F(1,24) = 25.79, $p < 0.0001$) for 5 days (E) or dexamethasone (DXM) or vehicle (mean effect of interaction F(3,24) = 9.490, $p = 0.0003$, of stimulus F(3,24) = 33.95, $p < 0.0001$, of subjects F(1,24) = 11.56, $p = 0.0024$) for 8 h (F), before challenging myoblasts with CpG-A in the presence of GM or EBSS. (G) CK levels (means \pm SDs of 3 individual values obtained from independent blood samples drawn the same day) were measured in 2 patients during a flare before and after the administration of steroids.

(H) As in (C) and Figure 5, but myoblasts from 4 controls and patients were pre-treated with CLQ or ODN151, or vehicle for 8 h followed by challenging with CpG-A together with GM or EBSS for another 16 h (mean effect of interaction F(5,36) = 19.53, $p < 0.0001$, of stimulus F(5,36) = 38.32, $p < 0.0001$, of subjects F(1,36) = 67.60, $p < 0.0001$). Dot plots (mean of 4–6 technical replicates/dot) show the mean \pm SD of IL-6 concentration at the end of the experiment.

(I) As in (H), but evaluating the proportion of cell death (mean effect of interaction F(5,36) = 17.51, $p < 0.0001$, of stimulus F(5,36) = 73.41, $p < 0.0001$, of subjects F(1,36) = 40.06, $p < 0.0001$). Dot plots ($\geq 1,000$ single cells/dot) show the means \pm SDs. IL-6 concentration is presented after background (which corresponds to values obtained from culture supernatants of cells exposed to vehicle) subtraction.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$: adjusted p values as determined by a between-subjects 2-way ANOVA (C–F, H, and I) and post hoc Sidak’s correction for multiple comparisons. Results are from 1 representative of 2 (D) or at least 3 (A–C, E–I) independent experiments.

Table 1. Follow-up of 6 patients treated by HS (6.5 mg/kg/day)

Patient no.	Age at diagnosis, y	Age at the initiation of treatment, y	No. severe rhabdomyolysis (CK > 10,000 U/L)		Mean (median) plasma concentration of HS (μg/L)
			Before treatment	During treatment (treatment duration, months)	
P1	5	7	7	0 ^a (36)	99 (101)
P2	10	13	3	0 ^a (33)	292 (318)
P3	7	17	1	0 (12)	466 (597)
P4	12	12	1	0 (12)	637 (593)
P5	3	9	3	1 triggered by gastroenteritis (12)	1,060 (993)
P6	2	4	4	2 triggered by gastroenteritis (12)	1,043 (922)

CK, creatine kinase; HS, hydroxychloroquine sulfate.

^aOccurrence of 1 rhabdomyolysis flare 6 weeks after stopping HS (non-adherence to prescribed treatment), without any other identified trigger. Although the frequency of rhabdomyolysis events is known to decrease with patient age, this factor is unlikely to have contributed to the low number of flares in treated patients considering the limited duration of treatment.

Our results argue against a significant role of the latter pathways in lipin1 myoblast pathology. Damaged mitochondria and, more specifically, a reduction in mitochondrial membrane potential can directly engage caspase-dependent cell death. We show that both exogenous TLR9 ligands and starvation, conditions mimicking patient fasting and infections frequently triggering rhabdomyolysis episodes, induce inflammation and myoblast inflammation and death, with an additive effect. Exacerbation of stressed cell death by an exogenous TLR9 agonist has also been observed in cardiac muscle.^{34,54} The additive effect may involve the capacity of TLR9 to recognize multiple types of DNA through 2 specific binding sites that function in cooperation to boost TLR9 activation.³⁷ Termination of TLR9 signaling requires the degradation of ligands and/or receptor in the lysosomes, which is impaired in lipin1-deficient muscle and/or immune cells. How precisely TLR9-containing late endosomes fuse with lysosomes containing specific hydrolase remains poorly investigated, but may depend on the regulation of the late endosomal/lysosomal Rab7b small GTPase⁵⁵ and/or on the Vps33b subunit of the homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex,⁵⁶ at least in human macrophages.

While our results highlight the pivotal role of mtDNA-driven inflammation in lipin1 pathology, mice lacking lipin1 display chronic myopathy and evidence suggesting a contribution of ER stress to pathology.^{8,57} Given that the dysregulation of autophagy can trigger ER stress and vice versa,⁵⁸ it is conceivable that ER stress contributes to pathology. However, lipin1-deficient mice do not undergo acute episodes of massive and lethal rhabdomyolysis, limiting extrapolation to humans. Our observations documenting a direct role of mtDNA and TLR9 signaling in myoblast death led us to conclude that pro-inflammatory signaling by trapped mtDNA plays a key role in human lipin1 pathology, even though it may not be the sole pathogenic mechanism involved. Finally, human lipin1 deficiency may affect the crosstalk between TLR9 and Beclin-1, recently identified to be critical for muscle contraction during exercise.⁵⁹ As a future direction, we propose investigating *in vivo* the capacity of natural TLR9 ligands to trigger hyperinflammation and acute rhabdomyolysis episodes in lipin1-deficient animal models.

The results of this study have provided therapeutic leads for lipin1 pathology. Attenuation of inflammation with steroids is strikingly efficient; however, they are not well suited as a preventive therapy because of the adverse effects on metabolism. Our *in vitro* and *in vivo* observations support the use of HS to block TLR9 activation and signaling as an alternative opportunity. Mauthe et al.⁶⁰ reported that CLQ and hydroxychloroquine block the fusion of autophagosomes with degradative lysosomes in U2OS and HeLa cell lines. This effect may be different in muscle cells and depend on drug concentration. For example, Mauthe et al.⁶⁰ observed that receptor-mediated versus fluid phase endocytosis were differentially affected. We speculate that, in lipin1 disease, HS may predominantly affect TLR9 activity while permitting residual autophagosome clearance.^{59,61} However, further experimentation is required to dissect the mechanism of defective clearance of TLR9-containing vesicles and to study the effect of HS on autophagic flux in myoblasts. In addition, HS can act on immune cells blocking TLR9 activation.^{62–64} Drugs restoring resolution of autophagy, shifting endosomal/autophagosome cargos toward alternative quality control mechanisms not affected by lipin1 deficiency or restoring efficient PI3P synthesis at late endosomes would seem sensible objectives of future research for the clinical management of lipin1 deficiency. As the pathophysiological sequence identified in this work may also be active in other inherited or sporadic forms of rhabdomyolysis, the therapeutic leads resulting from studying lipin1 disease may be of broader interest in the future.

Limitations of study

The main limitations are the limited number of patients treated with HS and the design of our small clinical trial, precluding formal demonstration of the efficacy of HS. Further directions should ideally include an international randomized control study to compare HS versus placebo, although this would be difficult to organize considering the very low incidence of the disease. Another limitation is the use of mono-DCs rather than plasmacytoid DCs to study TLR9 response in myeloid cells, motivated by the scarcity of plasmacytoid DCs in the limited blood sample

volumes from pediatric patients. However, human mono-DCs express TLR9 and respond to TLR9 agonists.⁶⁵ Finally, the number of myoblast cell lines was limited, as muscle biopsy is an invasive procedure no longer required for the diagnosis of lipin-1 disease.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **RESOURCE AVAILABILITY**
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Human subjects
 - Hydroxychloroquine sulfate treatment
 - Study approval
 - Primary myoblasts from controls and patients
 - Generation of monocyte-derived dendritic cells
 - Generation of myoblasts deficient for lipin1
 - Generation of myoblasts overexpressing lipin1
- **METHOD DETAILS**
 - Plasmids and transfection of myoblasts
 - Vps34 activity and PI3P production assay
 - Immunofluorescence and confocal microscopy
 - Image analysis
 - Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy
 - Phosphatidic acid phosphatase (PAP) activity
 - EGFR degradation assays
 - DQ-OVA assays
 - Multiplex cytokine assay
 - IL-6 ELISA assay
 - Gene expression analysis by RT-qPCR
 - Mitochondrial DNA gene expression analysis by qPCR
 - Cholera toxin uptake
 - Autophagic flux analyses
 - Mitophagy flux analyses
 - Cell fractionation
 - Measurements of mitochondrial mass, potential and ROS
 - Muscle oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) measurements
 - MtDNA depletion
 - Ca²⁺-mobilization
 - Caspase 3/7-cell death assay
 - Cell proliferation assay
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
- **ADDITIONAL RESOURCES**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100370>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to P.d.L. from Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV1-0020-01), the Fondation Bettencourt (2012), the Fondation Lejeune (grant 2014), and patient associations (Nos Anges, AMMI, Hyperinsulinisme, OPPH, Noa Luü); grants to P.d.L. and Y.H. from the Association Française contre les Myopathies (grant nos. 13988 and 15947); grant 14-CE11-0014 from the ANR to P.v.E.; and grant AO2017-5 from the patient association Vaincre les Maladies Lyosomales, to F.-X.M. F.-X.M. was supported by a Poste d'Accueil Inserm. We thank Arnaud Hubas from the Department of Biology and Molecular Genetics, Cochin Hospital, for assistance in isolating human myoblasts; Sylvie Fabrega (Viral Vector for Gene Transfer core facility, INSERM US24/CNRS UMS3633) for production of the VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles; Meriem Garfa-Traoré from the cell imaging platform, for assistance in confocal imaging; Gillian Rice and Yanick Crow for their help in qPCR experiments and analysis of type I interferon-related genes; Patrice Codogno, Nicolas Dupont, Vania Braga, and Jacques Neeffes for providing plasmids; the MYOBANK-AFM (myology institute BB-0033); Laure Cacavelli of the Department of Biotherapy, Necker Hospital, for technical assistance; and Fatima Djouadi and Jean Bastin for providing myoblasts. The authors are grateful to Mario Pende, Timothy Wai, Erika Brunet, Patrice Codogno, and Nicolas Dupont for helpful discussions. The authors thank Salvatore Cisternino, Philippe Henri Secretan, and Joel Schlatter from the Department of Pharmacy, Necker Hospital, for the preparation of hydroxychloroquine sulfate; Antoine Legendre from the Cardiology Department, Necker Hospital, for the monitoring of patients; and Benoit Blanchet from the Department of Pharmacology, Cochin Hospital, and Noël Zahr from the Department of Pharmacology, Pitié-Salpêtrière Hospital, for dosing of HS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, Y.H., F.-X.M., P.d.L., and P.v.E. Methodology, Y.H., F.-X.M., C.L., X.T., D.N.B., P.v.E., and P.d.L. Investigation, Y.H., F.-X.M., M.M., P.R., C.L., N.G., I.N., M.P.R., X.T., O.P., and C.T.-D. Resources, I.N., M.P.R., X.T., D.N.B., and P.N. Writing – original draft, Y.H., F.-X.M., and P.v.E. Writing – review & editing, Y.H., F.-X.M., P.v.E. and P.d.L. Supervision, Y.H., F.-X.M., P.v.E., and P.d.L. Funding acquisition, Y.H., F.-X.M., P.v.E., and P.d.L.

DECLARATION OF INTERESTS

Y.H., F.-X.M., C.L., P.v.E., and P.d.L. have filed PCT (WO/2017/085115; EP3377095; PCT/EP2016/077843) and US patent applications (US20180325890). Y.H., F.-X.M., M.M., P.v.E., and P.d.L. have filed PCT (WO/2019/020732; PCT/EP2018/070256) patent applications. The remaining authors declare no competing interests.

INCLUSION AND DIVERSITY

We worked to ensure gender balance in the recruitment of human subjects. We worked to ensure ethnic or other types of diversity in the recruitment of human subjects. One or more of the authors of this article self-identifies as an under-represented ethnic minority in science. While citing references scientifically relevant for this work, we also actively worked to promote gender balance in our reference list.

Received: April 1, 2020

Revised: May 18, 2021

Accepted: July 19, 2021

Published: August 17, 2021

REFERENCES

1. Cervellin, G., Comelli, I., and Lippi, G. (2010). Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**, 749–756.

2. Luck, R.P., and Verbin, S. (2008). Rhabdomyolysis: a review of clinical presentation, etiology, diagnosis, and management. *Pediatr. Emerg. Care* 24, 262–268.
3. Michot, C., Hubert, L., Brivet, M., De Meirleir, L., Valayannopoulos, V., Müller-Felber, W., Venkateswaran, R., Ogier, H., Desguerre, I., Altuzarra, C., et al. (2010). LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. *Hum. Mutat.* 31, E1564–E1573.
4. Baba, T., Kashiwagi, Y., Arimitsu, N., Kogure, T., Edo, A., Maruyama, T., Nakao, K., Nakanishi, H., Kinoshita, M., Frohman, M.A., et al. (2014). Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J. Biol. Chem.* 289, 11497–11511.
5. Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D.N., and Reue, K. (2007). Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem.* 282, 3450–3457.
6. Pascual, F., and Carman, G.M. (2013). Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 514–522.
7. Sasser, T., Qiu, Q.S., Karunakaran, S., Padolina, M., Reyes, A., Flood, B., Smith, S., Gonzales, C., and Fratti, R.A. (2012). Yeast lipin 1 orthologue pah1p regulates vacuole homeostasis and membrane fusion. *J. Biol. Chem.* 287, 2221–2236.
8. Rashid, T., Nemazany, I., Paolini, C., Tatsuta, T., Crespin, P., de Ville-neuve, D., Brodessa, S., Benit, P., Rustin, P., Baraibar, M.A., et al. (2019). Lipin1 deficiency causes sarcoplasmic reticulum stress and chaperone-responsive myopathy. *EMBO J.* 38, e99576.
9. Schweitzer, G.G., Collier, S.L., Chen, Z., McCommis, K.S., Pittman, S.K., Yoshino, J., Matkovich, S.J., Hsu, F.F., Chrast, R., Eaton, J.M., et al. (2019). Loss of lipin 1-mediated phosphatidic acid phosphohydrolase activity in muscle leads to skeletal myopathy in mice. *FASEB J.* 33, 652–667.
10. Michot, C., Mamoune, A., Vamecq, J., Viou, M.T., Hsieh, L.S., Testet, E., Lainé, J., Hubert, L., Dessein, A.F., Fontaine, M., et al. (2013). Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 2103–2114.
11. Pelosi, M., Testet, E., Le Lay, S., Dugail, I., Tang, X., Mabillego, G., Hamel, Y., Madranga, M., Blanc, T., Odent, T., et al. (2017). Normal human adipose tissue functions and differentiation in patients with biallelic *LPIN1* inactivating mutations. *J. Lipid Res.* 58, 2348–2364.
12. Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr., and Kelly, D.P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metab.* 4, 199–210.
13. Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408–420.
14. Zhang, P., Verity, M.A., and Reue, K. (2014). Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle. *Cell Metab.* 20, 267–279.
15. Meana, C., Peña, L., Lordén, G., Esquinas, E., Guijas, C., Valdearcos, M., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2014). Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J. Immunol.* 193, 4614–4622.
16. Bergounioux, J., Brassier, A., Rambaud, C., Bustarret, O., Michot, C., Hubert, L., Arnoux, J.B., Laquerriere, A., Bekri, S., Galene-Gomez, S., et al. (2012). Fatal rhabdomyolysis in 2 children with LPIN1 mutations. *J. Pediatr.* 160, 1052–1054.
17. Kim, H.B., Kumar, A., Wang, L., Liu, G.H., Keller, S.R., Lawrence, J.C., Jr., Finck, B.N., and Harris, T.E. (2010). Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3126–3139.
18. Hyttinen, J.M., Niittykoski, M., Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2013). Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 503–510.
19. Bissa, B., and Deretic, V. (2018). Autophagosome Formation: Cutting the Gordian Knot at the ER. *Curr. Biol.* 28, R347–R349.
20. Schink, K.O., Tan, K.W., and Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 143–171.
21. Jaber, N., Mohd-Naim, N., Wang, Z., DeLeon, J.L., Kim, S., Zhong, H., Sheshadri, N., Dou, Z., Edinger, A.L., Du, G., et al. (2016). Vps34 regulates Rab7 and late endocytic trafficking through recruitment of the GTPase-activating protein Arp2/3. *J. Cell Sci.* 129, 4424–4435.
22. Hong, Z., Pedersen, N.M., Wang, L., Torgersen, M.L., Stenmark, H., and Raiborg, C. (2017). PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning. *J. Cell Biol.* 216, 4217–4233.
23. Krauß, M., and Haucke, V. (2015). A grab to move on: ER-endosome contacts in membrane protrusion formation and neurite outgrowth. *EMBO J.* 34, 1442–1444.
24. Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* 188, 253–269.
25. Lemmon, M.A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201–213.
26. Kümmel, D., and Ungermann, C. (2014). Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 61–66.
27. Guerra, F., and Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells* 5, E34.
28. De Luca, M., and Bucci, C. (2014). A new V-ATPase regulatory mechanism mediated by the Rab interacting lysosomal protein (RILP). *Commun. Integr. Biol.* 7, e971572.
29. Cabukusta, B., and Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic* 19, 761–769.
30. Pankiv, S., and Johansen, T. (2010). FYCO1: linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors. *Autophagy* 6, 550–552.
31. Carroll, B., Mohd-Naim, N., Maximiano, F., Frasa, M.A., McCormack, J., Finelli, M., Thoresen, S.B., Perdios, L., Daigaku, R., Francis, R.E., et al. (2013). The TBC/RabGAP Arp2/3 coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. *Dev. Cell* 25, 15–28.
32. Wang, K., and Klionsky, D.J. (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7, 297–300.
33. Ugrankar, R., Liu, Y., Provaznik, J., Schmitt, S., and Lehmann, M. (2011). Lipin is a central regulator of adipose tissue development and function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1646–1656.
34. West, A.P., and Shadel, G.S. (2017). Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 363–375.
35. Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K., Clayton, S., Gong, M., et al. (2016). Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J. Exp. Med.* 213, 697–713.
36. Roers, A., Hiller, B., and Hornung, V. (2016). Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* 44, 739–754.
37. Ohto, U., Ishida, H., Shibata, T., Sato, R., Miyake, K., and Shimizu, T. (2018). Toll-like Receptor 9 Contains Two DNA Binding Sites that Function Cooperatively to Promote Receptor Dimerization and Activation. *Immunity* 48, 649–658.e4.
38. Fang, C., Wei, X., and Wei, Y. (2016). Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. *Protein Cell* 7, 11–16.
39. Torres, P.A., Helmstetter, J.A., Kaye, A.M., and Kaye, A.D. (2015). Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner J.* 15, 58–69.
40. Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* 11, 1680–1685.

41. Saridakis, T., Nippold, M., Dinter, E., Roos, A., Diederichs, L., Fensky, L., Schulz, J.B., and Falkenburger, B.H. (2018). FYCO1 mediates clearance of α -synuclein aggregates through a Rab7-dependent mechanism. *J. Neurochem.* *146*, 474–492.
42. Johnson, D.E., Ostrowski, P., Jaumouill e, V., and Grinstein, S. (2016). The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J. Cell Biol.* *212*, 677–692.
43. Nakamura, S., and Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J. Cell Sci.* *130*, 1209–1216.
44. Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C., Lamark, T., et al. (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol. Cell* *38*, 265–279.
45. Napoli, E., Song, G., Panoutsopoulos, A., Riyadh, M.A., Kaushik, G., Halmai, J., Levenson, R., Zarbali, K.S., and Giulivi, C. (2018). Beyond autophagy: a novel role for autism-linked Wdfy3 in brain mitophagy. *Sci. Rep.* *8*, 11348.
46. Cullup, T., Kho, A.L., Dionisi-Vici, C., Brandmeier, B., Smith, F., Urry, Z., Simpson, M.A., Yau, S., Bertini, E., McClelland, V., et al. (2013). Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy. *Nat. Genet.* *45*, 83–87.
47. Hori, I., Otomo, T., Nakashima, M., Miya, F., Negishi, Y., Shiraishi, H., Nonoda, Y., Magara, S., Tohyama, J., Okamoto, N., et al. (2017). Defects in autophagosome-lysosome fusion underlie Vici syndrome, a neurodevelopmental disorder with multisystem involvement. *Sci. Rep.* *7*, 3552.
48. MacVicar, T., Ohba, Y., Nolte, H., Mayer, F.C., Tatsuta, T., Sprenger, H.G., Lindner, B., Zhao, Y., Li, J., Bruns, C., et al. (2019). Lipid signalling drives proteolytic rewiring of mitochondria by YME1L. *Nature* *575*, 361–365.
49. Kameoka, S., Adachi, Y., Okamoto, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2018). Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol.* *28*, 67–76.
50. Sugiura, A., McLelland, G.L., Fon, E.A., and McBride, H.M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* *33*, 2142–2156.
51. Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.M., and Ploegh, H.L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *9*, 1407–1414.
52. Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., et al. (2012). Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* *485*, 251–255.
53. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* *464*, 104–107.
54. Shintani, Y., Kapoor, A., Kaneko, M., Smolenski, R.T., D’Acquisto, F., Copen, S.R., Harada-Shoji, N., Lee, H.J., Thiernemann, C., Takashima, S., et al. (2013). TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 5109–5114.
55. Yao, M., Liu, X., Li, D., Chen, T., Cai, Z., and Cao, X. (2009). Late endosome/lysosome-localized Rab7b suppresses TLR9-initiated proinflammatory cytokine and type I IFN production in macrophages. *J. Immunol.* *183*, 1751–1758.
56. Akbar, M.A., Mandraju, R., Tracy, C., Hu, W., Pasare, C., and Kr amer, H. (2016). ARC Syndrome-Linked Vps33B Protein Is Required for Inflammatory Endosomal Maturation and Signal Termination. *Immunity* *45*, 267–279.
57. Kok, B.P., Kienesberger, P.C., Dyck, J.R., and Brindley, D.N. (2012). Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (flid) mice. *J. Lipid Res.* *53*, 105–118.
58. Senft, D., and Ronai, Z.A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 141–148.
59. Liu, Y., Nguyen, P.T., Wang, X., Zhao, Y., Meacham, C.E., Zou, Z., Bordinian, B., Johanns, M., Vertommen, D., Wijshake, T., et al. (2020). TLR9 and beclin 1 crosstalk regulates muscle AMPK activation in exercise. *Nature* *578*, 605–609.
60. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* *14*, 1435–1455.
61. Chaanine, A.H., Gordon, R.E., Nonnenmacher, M., Kohlbrenner, E., Bernard, L., and Hajjar, R.J. (2015). High-dose chloroquine is metabolically cardiotoxic by inducing lysosomes and mitochondria dysfunction in a rat model of pressure overload hypertrophy. *Physiol. Rep.* *3*, e12413.
62. Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., and Jerala, R. (2011). Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* *186*, 4794–4804.
63. Sacre, K., Criswell, L.A., and McCune, J.M. (2012). Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R155.
64. Torigoe, M., Sakata, K., Ishii, A., Iwata, S., Nakayama, S., and Tanaka, Y. (2018). Hydroxychloroquine efficiently suppresses inflammatory responses of human class-switched memory B cells via Toll-like receptor 9 inhibition. *Clin. Immunol.* *195*, 1–7.
65. Hoene, V., Peiser, M., and Wanner, R. (2006). Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1328–1336.
66. Ketel, K., Krauss, M., Nicot, A.S., Puchkov, D., Wiewer, M., M ller, R., Subramanian, D., Schultz, C., Laporte, J., and Haucke, V. (2016). A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* *529*, 408–412.
67. Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* *3*, 452–460.
68. Jongsma, M.L., Bakker, J., Cabukusta, B., Liv, N., van Elstrand, D., Fermie, J., et al. (2020). SKIP-HOPS recruits TBC1D15 for a Rab7-to-Arl8b identity switch to control late endosome transport. *EMBO J.* *39*, e102301. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102301>.
69. Hamel, Y., Blake, N., Gabrielson, S., Haigh, T., Jooss, K., Martinache, C., Caillat-Zucman, S., Rickinson, A.B., Hacein-Bey, S., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002). Adenovirally transduced dendritic cells induce bispecific cytotoxic T lymphocyte responses against adenovirus and cytomegalovirus pp65 or against adenovirus and Epstein-Barr virus EBNA3C protein: a novel approach for immunotherapy. *Hum. Gene Ther.* *13*, 855–866.
70. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
71. Kenworthy, A.K., and Edidin, M. (1999). Imaging fluorescence resonance energy transfer as probe of membrane organization and molecular associations of GPI-anchored proteins. *Methods Mol. Biol.* *116*, 37–49.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse monoclonal anti- β -actin (clone C4), HRP-conjugated	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-47778 HRP, RRID: AB_2714189
Mouse monoclonal anti-ds DNA (clone HYB331-01)	Abcam	Cat# ab27156, RRID: AB_470907
Rabbit polyclonal anti-cathepsin D	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-6487, RRID: AB_2292414
Mouse monoclonal anti-DDK (clone OTI4C5)	OriGene	Cat# TA50011-100, RRID:AB_2622345
Goat polyclonal anti-EEA1	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-6415, RRID: AB_2096822
Mouse monoclonal anti-EGF-R (clone 6F1)	MBL International	Cat# MI-12-1
Rabbit polyclonal anti-FYCO1	Sigma-Aldrich	Cat# HPA035526, RRID: AB_10672867
Mouse Anti-GM130 Monoclonal Antibody (clone 35/GM130)	BD Biosciences	Cat# 610822, RRID: AB_10015242
Mouse monoclonal anti-HA-Tag (clone HA.C5)	Applied Biological Materials	Cat# G036, RRID: AB_2616604
Mouse monoclonal anti-LAMP-1 (clone 1D4B)	BD Biosciences	Cat# 553792, RRID: AB_2134499
Rabbit monoclonal anti-HA-Tag (clone C29F4)	Cell signaling Technology	Cat# 3724S
Rabbit monoclonal anti-LAMP1 (clone D2D11)	Cell signaling Technology	Cat# 9091S
Mouse monoclonal anti-LAMP2 (clone H4B4)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-18822, RRID:AB_626858
Rabbit monoclonal anti-TFAM (clone D5C8)	Cell signaling Technology	Cat# 8076S
Rabbit polyclonal anti-LC3	MBL International	Cat# PM036, RRID: AB_2274121
Mouse monoclonal anti-LC3 (clone 5F10)	Nanotools	Cat# 0231-100/LC3-5F10, RRID: AB_2722733
Mouse monoclonal anti-Myc (clone 9E10)	OriGene	Cat# TA150121, RRID:AB_2622266
Mouse monoclonal anti-PDI (clone C-2)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-74551, RRID: AB_2156462
Rabbit polyclonal antibody anti-lipin1	Cell Signaling Technology	Cat# 5195S, RRID: AB_10694491
Mouse monoclonal 8OHDG (clone 15A3)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-66036, RRID: AB_832272
Mouse monoclonal anti-PI3P	Echelon Biosciences	Cat# Z-P003, RRID: AB_427221
Mouse monoclonal anti-PI34P2	Echelon Biosciences	Cat# Z-P034B, RRID: AB_427223
Mouse monoclonal anti-PI35P2	Echelon Biosciences	Cat# Z-P035, RRID: AB_427224
Mouse monoclonal anti- SQSTM1 (Clone 2C11)	Abnova Corporation	Cat# H00008878-M01, RRID: AB_437085
Rabbit monoclonal anti-Rab7 (clone D95F2)	Cell Signaling	Cat# 9367S, RRID: AB_1904103)
Mouse monoclonal anti-Rab7 (clone Rab7-117)	Abcam	Cat# ab50533, RRID: AB_882241
Rabbit polyclonal anti-STX6	Proteintech Group	Cat# 10841-1-AP, RRID: AB_2196506
Mouse monoclonal anti-TOMM20 (clone 29)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-136211, RRID: AB_2207538
Mouse monoclonal anti-CD14 conjugated to microbeads	Miltenyi Biotec	Cat# 130-050-201, RRID: AB_2665482
Mouse monoclonal anti-CD56 conjugated to microbeads (clone AF12-7H3)	Miltenyi Biotec	Cat# 130-050-401, RRID: AB_244333

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Mouse monoclonal anti-CD56 Allophycocyanin Conjugated (clone B159)	BD Biosciences	Cat# 555518, RRID: AB_398601
Mouse monoclonal anti-CD83 Phycoerythrin Conjugated (clone HB15e)	BD Biosciences	Cat# 556855, RRID: AB_396526
Goat Anti-Mouse polyclonal IgG, Human ads-HRP antibody	Southern Biotech	Cat# 1030-05, RRID: AB_2619742
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) secondary antibody Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A32723, RRID: AB_2633275
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11008, RRID: AB_143165
Donkey anti-Goat IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11055, RRID: AB_2534102
Goat anti-Mouse IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11032, RRID: AB_2534091
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11037, RRID: AB_2534095
Goat anti-Mouse IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A32728, RRID: AB_2633277
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A32733, RRID: AB_2633282)
Bacterial and virus strains		
<i>LPIN1</i> - Human shRNA lentiviral particle	OriGene	Cat# TL303494V
Biological samples		
Human primary myoblasts from healthy individuals and patients	Department of biology and molecular genetics, Cochin Hospital, Paris, France	N/A
Human immortalized myoblasts from healthy donor	MYOBANK-AFM (Myology institute BB-0033), Paris, France	N/A
Blood samples from healthy individuals and patients	Department of Inherited Metabolic Diseases, Necker Hospital, Paris, France	N/A
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Recombinant human IL-4	Miltenyi Biotec	Cat# 130-095-915
Recombinant human GM-CSF	Miltenyi Biotec	Cat# 130-093-372
Animal-Free Recombinant Human EGF	Peptotec	Cat# AF-100-15
Pam3CSK4	Invivogen	Cat# tlr-pms
Poly(I:C) (HMW)	Invivogen	Cat# tlr-pic
LPS-B5 (LPS from <i>E. coli</i> 055:B5)	Invivogen	Cat# tlr-b5lps
FLA-BS, standard flagellin from <i>B. subtilis</i>	Invivogen	Cat# tlr-bsfla
Imiquimod (R837)	Invivogen	Cat# tlr-imqs
CpG-A (ODN2216)	Invivogen	Cat# tlr-2216
TLR9 antagonist ODN TTAGGG (A151)	Invivogen	Cat# tlr-ttag151
Calcium indicator Fluo-4 AM	Thermo Fisher Scientific	Cat# F14201
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Thermo Fisher Scientific	Cat# D1306
DQ-Ovalbumin	Thermo Fisher Scientific	Cat# D12053
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Sigma-Aldrich	Cat# D6546
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose	Sigma-Aldrich	Cat# D5546
Earle's Balanced Salt Solution, EBSS, calcium, magnesium, phenol red	Thermo Fisher Scientific	Cat# 24010043
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific	Cat# 16000044
Fluoromount-G	Thermo Fisher Scientific	Cat# 00-4958-02

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Ham's F-10 Nutrient Mix	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11550043
Image-iT TMRM Reagent (mitochondrial membrane potential indicator)	Thermo Fisher Scientific	Cat# I34361
LysoTracker Deep Red	Thermo Fisher Scientific	Cat# L12492
MitoSpy Orange CMTMRos	Biologend	Cat# 424804
MitoTracker Green FM	Thermo Fisher Scientific	Cat# M22425
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15140122
Phosphate-Buffered Saline, PBS, pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10010023
Puromycin	Thermo Fisher Scientific	Cat# A1113802
Recombinant Cholera Toxin subunit B Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	Cat# C34777
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	Cat# A2153; CAS Number: 9048-46-8
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP	Sigma-Aldrich	Cat# C2759; CAS Number: 555-60-2
Dexamethasone	Sigma-Aldrich	Cat# D4902; CAS Number: 50-02-2
Etidium bromide	Sigma-Aldrich	Cat# E7637; CAS Number: 1239-45-8
Hexadimethrine bromide, Polybrene	Sigma-Aldrich	Cat# H9268; CAS Number: 28728-55-4
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich	Cat# P6148; CAS Number 30525-89-4
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich	Cat# R0278
Saponin	Sigma-Aldrich	Cat# 47036; CAS Number: 8047-15-2
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	Cat# P5280; CAS Number: 113-24-6
Staurosporin	Sigma-Aldrich	Cat# S4400; CAS Number: 62996-74-1
Uridine	Sigma-Aldrich	Cat# U3003; CAS Number 58-96-8
Propidium Iodide Solution	Biologend	Cat# 421301
7-AAD Viability Staining Solution	Biologend	Cat# 420404

Critical commercial assays

Caspase 3/7 assay	Thermo Fisher Scientific	Cat# R37111
Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit, 50 assays	Thermo Fisher Scientific	Cat# C10424
Human Inflammatory Cytokine Kit	BD Bioscience	Cat# 551811
ELISA MAX Deluxe Set Human IL-6	Biologend	Cat# 430504
Cell ROS flow cytometry assay kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# C100491
Seahorse XFP cell mito stress test kit	Seahorse Bioscience	Cat#103010-10
JetPrime Transfection assay	Polyplus transfection	Cat# 114-07
Cell Fractionation Kit standard	Abcam	Cat# ab109719

Oligonucleotides

12S-forward 5'-TAGCCCTAACCTCAACAGT-3'; reverse 5'-TGCGCTTACTTTGTAGCCTCAT-3'	Eurofins Genomics	N/A
BACTIN-forward 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'; reverse 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'	Eurofins Genomics	N/A
DLOOP-forward 5'-ACCTGTGATCCATCGTGATGT-3'; reverse 5'-GCCATAAACACTTGGGGTA-3'	Eurofins Genomics	N/A
GAPDH-Hs03929097_g1	Thermo Fisher Scientific	N/A
IFI27-Hs01086370_m1	Thermo Fisher Scientific	N/A
IFI44-Hs00199115_m1	Thermo Fisher Scientific	N/A
IFIT1-Hs01675197_m1	Thermo Fisher Scientific	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<i>IFNA</i> -forward 5'-GAAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCC-3'; reverse 5'-ATGGAGGACAGAGATGGCTTG-3'	Eurofins Genomics	N/A
<i>IFNB</i> -forward 5'-CAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGC-3'; reverse 5'-TCATCCTGTCTTGAGGCAGT-3'	Eurofins Genomics	N/A
<i>ISG15</i> -Hs01921425_s1	Thermo Fisher Scientific	N/A
<i>LPIN1</i> -forward 5'-CCTTCTATGCTGCTTTGGGAACC-3'; reverse 5'-CTGATCGACCACTTCGCAGAGC-3'	Eurofins Genomics	N/A
<i>RSAD2</i> -Hs00369813_m1	Thermo Fisher Scientific	N/A
<i>SIGLEC1</i> -Hs00988063_m1	Thermo Fisher Scientific	N/A
Recombinant DNA		
pGFP-2XFYVE	Ketel et al., 2016 ⁶⁶	N/A
pRFP-GFP-LC3	Kimura et al., 2007 ⁶⁷	N/A
pRFP-RILP	Jongsma et al., 2020 ⁶⁸	N/A
pRFP-ARMUS	Carroll et al., 2013 ³¹	N/A
pTLR9-HA	Invivogen	Cat# puno1ha-htr9a
<i>LPIN1</i> (Myc-DDK-tagged)-Human lipin1 (LPIN1) ORF clone (NM_145693)	OriGene	Cat# RC207138
Software and algorithms		
FIJI v2.00	https://fiji.sc	RRID: SCR_002285
FlowJo v9.3.0 (Mac)	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo	RRID: SCR_008520
Image Reader LAS-1000 v2.3	http://www.imb.sinica.edu.tw/core/publicfacilities/pdf/LAS-1000plus_om_e_ver2.pdf	RRID: SCR_014585
GraphPad Prism v6.0	https://www.graphpad.com/	RRID: SCR_002798
Icy v1.9.5.1	http://icy.bioimageanalysis.org/	RRID: SCR_010587
Imaris v8.4.2	https://imaris.oxinst.com/packages	RRID: SCR_007370
Soft Flow v3.00	http://softflow.com/	RRID: SCR_002599
System Detector System (SDS) v2.3	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4444202	RRID: SCR_015806
Other		
3 Well Chamber, removable microscopy glass slide, sterilized	Ibidi	Cat# 80381

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Yamina Hamel (yamina.hamel@inserm.fr).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

This study did not generate/analyze datasets/code.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Human subjects

Blood samples and skeletal muscle biopsies from six individuals carrying two recessively inherited mutations in *LPIN1* and suffering from recurrent episodes of rhabdomyolysis, and from healthy control teenagers and children (30 for blood samples, 6 for skeletal muscle biopsies) were obtained at Necker Hospital, Paris, France. All patients had at least one flare of severe rhabdomyolysis and two causal mutations in the *LPIN1* gene and were followed-up in the Department of inherited metabolic diseases of Necker hospital. Age range of subjects was 2–11 years, 4 patients were male and 2 female. Clinical and molecular characteristics of patients are shown in [Table S1](#). Skeletal muscle biopsies were performed in the brachial region (deltoid muscle) for lipin1-deficient patients, or from the dorsal region (dorsal paravertebral muscle) for control individuals with no chronic muscle disease history.

Hydroxychloroquine sulfate treatment

The treatment of 6 patients with Hydroxychloroquine Sulfate treatment was approved by the ethical institutional review board “Ile-de-France II.” Patients received an oral daily dose of 6.5 mg/kg, based on the clinical guidelines for treated pediatric patients suffering from lupus or rheumatoid inflammatory disorders. Informed written consent was obtained from the legal representatives of the children and ophthalmological examination was performed to eliminate the presence of macular pathology, prior to the initiation of the treatment. Patients were followed at regular intervals: 4 weeks after the initiation of the treatment then every 3 months and in the presence of any clinical sign suggesting a flare. All patients underwent clinical examination, and blood samples were collected to measure Hydroxychloroquine Sulfate concentrations, creatine kinase (CK) levels, liver enzymes activity and renal function. Primary outcome was the number of severe rhabdomyolysis (defined by plasma CK levels > 10,000 U/L), upon treatment initiation during the follow up period.

Study approval

Written informed consent was obtained from all individuals in accordance with local regulations and with a human research protocol approved by the ethical institutional review board of the University Paris XI. Experiments using samples from human subjects were conducted in France in accordance with local regulations and with the approval of the ethical institutional review board of the University Paris XI. The biological collection (plasma, myoblasts) has been declared to the *Ministère de la Santé*.

Primary myoblasts from controls and patients

Primary myoblasts from patients and age- and gender-matched controls were obtained from the cell bank of Cochin Hospital, Paris, France. Primary myoblasts were isolated and grown as described.¹⁰ CD56⁺ myoblasts were isolated by magnetic cell sorting using CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec) and routinely maintained in F10 medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) both from Thermo Fisher Scientific on gelatin (Sigma Aldrich) coated tissue culture flasks. After magnetic sorting, purity of cells was assessed by flow cytometry using anti-CD56 Allophycocyanin conjugated antibody (BD Biosciences). All cell lines tested negative for the presence of Mycoplasma at the time of the study.

Generation of monocyte-derived dendritic cells

Monocytes were purified using immunomagnetic CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and frozen at -80°C for further experiments. Monocytes were cultured for 7 days in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS, 100 IU/mL Penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific), 50 ng/mL Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF, Miltenyi Biotec) and 100 ng/mL interleukin (IL)-4 (Miltenyi Biotec) to generate immature DC as previously described.⁶⁹

Generation of myoblasts deficient for lipin1

An immortalized human myoblast cell line from a healthy donor was obtained from the cell bank. Lentiviral cassettes containing 2 major functional elements, shRNA targeting *LPIN1* (Sh-*LPIN1*) or a scramble sequence (Sh-Sc) and a puromycin selection marker (Origene), were transduced in immortalized myoblasts from 1 healthy control individual for 72 hr and selected with puromycin 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thermo Fisher Scientific). Efficacy of lipin1 knock-down was determined by real-time quantitative RT-PCR,¹⁰ by confocal imaging and by immunoblot. All cell lines were tested negative for the presence of Mycoplasma at the time of the study.

Generation of myoblasts overexpressing lipin1

A pCMV6 plasmid carrying a Myc-DDK-tagged-human lipin1 ORF clone that contains a puromycin resistance gene was purchased from Origene and used to produce VSV-G Pseudotyped Lentiviral Vector lentiviruses with an average titer of 9.46×10^9 TU/mL. Forty to fifty thousand primary myoblasts/well were harvested into 24-well flat bottom culture plate, exposed to lentivirus infection in the presence of polybrene at 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a nutrient-rich growth medium at a multiplicity of infection of 100. Sixteen hr later, cells were washed once with culture medium and the day after washed twice and cultured in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin. Two days later, medium was replaced by fresh medium supplemented with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin for 2 to 3 days before using primary myoblasts for further experimentation.

METHOD DETAILS

Plasmids and transfection of myoblasts

pGFP-2XFYVE was a gift from Mario Pende (INSERM U1151, Paris, France) and described previously.⁶⁶ pRFP-RILP was a gift from Jacques Neefjes (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands). pRFP-Armus was a gift from Vania Braga (Imperial College London, London, UK) and described elsewhere.³¹ pRFP-GFP-LC3 was a gift from Patrice Codogno (INSERM U1151, Paris, France) and described previously.⁶⁷ The plasmid encoding TLR9-HA was purchased from Invivogen.

Vps34 activity and PI3P production assay

Vps34 activity was evaluated by visualization of PI3P production in myoblasts. Myoblasts were seeded on glass coverslips at 20×10^3 per coverslip and transfected with pGFP-2XFYVE using Jet prime reagent (Polyplus) according to the manufacturer's instructions before being processed for confocal microscopy 16 hr later. GFP dots corresponding to PI3P were quantified in more than 80 cells per group.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells plated on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich) in Phosphate Buffered-Saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific) for 12 min at 37°C, washed three times with PBS and permeabilized with 0.2% saponin (Sigma Aldrich) in PBS for 10 min. After blocking in PBS 0.2% saponin 0.2% Bovine Serum Albumin 2% Donkey and 2% Goat serum (Sigma Aldrich) for 30 min, myoblasts were incubated with primary antibodies for 60 min at 37°C in 0.2% saponin, 0.2% Bovine Serum Albumin in PBS. After washing, cells further incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies in PBS with 0.2% saponin for 30 min at 37°C, further washed in PBS, stained for DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and mounted using Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific). To detect acid compartments or mitochondria, myoblasts were incubated with a growth medium containing 100 mM LysoTrackerTM Deep Red (Thermo Fisher Scientific) or 250 nM MitospyTM Orange CMTMRos for 30 min, followed by incubation in dye-free medium for at least another 30 min and by further processing for the detection of endogenous proteins by confocal imaging. Images were recorded on a confocal Leica SP8 microscope, equipped with a 63X 1.3 numerical aperture (NA) oil immersion objective.

Image analysis

Images were processed using the Imaris software (Bitplane AG v8.4.2). A Gaussian Filter was applied to images using default value. Each cell was then segmented with the area selection tool and considered as a region of interest (ROI). We used the Imaris "Coloc" module to set the threshold for signal positivity based on signal intensity and calculate the overlapping percentage between the 2 signals of interest over the volume analyzed, reflecting a percentage of 3D proximity between the 2 proteins. Threshold calculation was based on manual pre-analysis of 10 cells, determined as compared to signal obtained with the use of appropriate isotype control (background) and applied to all the cells of a same set of experiments. The number of cells or images containing 1 cell or more used for calculation and the number of independent experiments is indicated in each legend. The number of fluorescent dots was quantified by analyzing cells using the Icy software (v1.9.5.1 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France). After processing on Imaris, images were exported to TIFF files and opened with the FIJI software⁷⁰ v2.00 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) transformed into RGB color images. For each key illustration, a representative single z-level was selected, and images of single-color and merged channels were generated. TIFF illustrations for publication were generated by using the "Make montage" feature. The number of fluorescent dots was quantified by analyzing cells using the "Spot detector" module of the Icy software (v1.9.5.1 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France). The number of fragments of PI3P, PI34P2 and PI35P2 among Rab7 structures was determined as follows. A mask for Rab7 and the given PI species was created using the Imaris Software and the "Add Surfaces" wizard module with the following parameters: a region of interest was segmented before processing entire Image finally; for each channel of fluorescence, thresholding was based on absolute intensity as compared to isotype control or cells stained with fluorochrome-conjugated secondary antibodies only and applied to all the images of actual experiment including patient and control individual cells. Then the number of PI3P, PI34P2 and PI35P2 binary objects within the Rab7 mask was determined using the Imaris "statistics" module.

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy

FRET was measured by using the acceptor photobleaching technique⁷¹ where, upon irreversible photobleaching of the acceptor, we record if the donor fluorescence increases. Myoblasts grown for 2 days on Ibidi chambers were fixed and mounted in PBS/glycerol (1:1) for FRET measurements on an SP8 confocal microscope (Leica) with a 63X oil objective with a NA of 1.4. The donor is fused to CFP fluorophore (detected with 405-nm wavelength laser) and the acceptor is fused to YFP fluorophore (detected with 514-nm wavelength laser). For each analysis, a square of 3 \times 2 mm was selectively photobleached.

Phosphatidic acid phosphatase (PAP) activity

PAP activity was measured using an enzymatic assay at 37°C for 20 min as described previously.⁵⁷ Total phosphatidate phosphatase activity was measured in the presence of 1.5 mM MgCl_2 . Each sample was assayed in a total volume of 100 μL consisting of 100 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 0.6 mM DTT, 1.5 mM MgCl_2 , 2 mg/ml fat-free BSA, protease inhibitor cocktail, 30 nM microcystin-LR,

0.6 mM PA labeled with [³H]palmitate (approximately 6,000 dpm per assay), 1 mM EDTA/EGTA, 0.4 mM phosphatidylcholine, and 200 μM tetrahydrolipstatin to block lipase activity. Parallel measurements were performed in the absence of Mg²⁺ and in the presence of 8 mM N-ethylmaleimide to determine the contribution from lipid phosphate phosphatase (LPP) activity. PAP activity was calculated by subtracting the NEM-insensitive LPP activity from the total phosphatidate phosphatase activity. Each sample was assayed at 3 different protein concentrations to ensure a proportional response. One unit of PAP activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 nmol of product/min. Specific activity was defined as units/mg of protein.

EGFR degradation assays

Myoblasts were serum starved overnight then stimulated with 100 ng/ml EGF (Peprotech) in serum-free medium for the indicated time. Cells were rinsed twice with PBS and lysed in RIPA buffer plus 1% SDS, and EDTA (5 mM) all from Sigma Aldrich. The expression of EGFR in total cell lysates was determined by immunoblot using an anti-EGFR monoclonal antibody and normalized to the unstimulated condition. Fluorescence intensity was measured using Luminescent Image Reader LAS-1000 Pro software version 2.3 and an Intelligent Dark Box II (FUJIFILM). EGFR levels, proportional to fluorescence intensity, were then quantified using the FIJI software.

DQ-OVA assays

DQ Ovalbumin (DQ-OVA, Thermo Fisher Scientific) was added (200 μg/ml) to myoblasts in culture plates for 20 min at 4°C. Cells were washed 3 times with ice-cold PBS containing 2% FBS to remove unbound or nonspecifically associated DQ-OVA. Cells were incubated at 4°C for 10 min or for various time intervals at 37°C. Cells were then removed from the plates by trypsin, washed with ice-cold PBS, fixed with 2% paraformaldehyde. Flow cytometric measurements were performed on a BD LSR Fortessa cell analyzer from BD Biosciences. Data were analyzed with FlowJo software (version 9.8.3, Mac).

Multiplex cytokine assay

DC and myoblasts were harvested and transferred (respectively 50×10³ and 10×10³ cells/well) to 96-well plates and incubated with Lipo-PolySaccharide LPS (1 μg/mL), flagellin (10 ng/mL), zymosan (1 μg/mL), CpG-A (10 μg/mL), imiquimod (0.5 μg/mL), poly (I:C) (1 μg/mL), or Pam3CSK4 (100 ng/mL), all from Invivogen, for 16 hr. Cytokine concentrations were measured in culture supernatants and plasma using a ten-plex Cytometric Bead Assay (CBA) kit from BD Biosciences, according to the manufacturer's instructions. In brief, 50 μL of plasma was mixed with 50 μL of mixed capture beads and a standard curve was generated. After 3 hr of incubation at room temperature, the samples were washed and suspended in PBS and then analyzed by flow cytometry (ARIA II; BD Biosciences) with CBA Analysis Software (FCAP Array version 3.0; Soft Flow, St Louis Park, Minnesota). The results are expressed in picograms per milliliter (pg/mL).

IL-6 ELISA assay

DC and myoblasts were harvested and transferred (respectively 50×10³ and 10×10³ cells/well) to 96-well plates and incubated with LipoPolySaccharide LPS (1 μg/mL), flagellin (10 ng/mL), zymosan (1 μg/mL), CpG-A (10 μg/mL), imiquimod (0.5 μg/mL), poly (I:C) (1 μg/mL), or Pam3CSK4 (100 ng/mL), all from Invivogen, for 16 hr. IL-6 concentration was measured in culture supernatants using a Human IL-6 ELISA MAX Deluxe, according to the manufacturer's instructions and performing 3 to 4 technical replicates per condition. The results are expressed in picograms per milliliter (pg/mL). Unless otherwise specified in figures or legends, cytokine concentrations *in vitro* are presented after background subtraction, obtained with cells incubated with vehicle (DMSO or water). In some experiments the TLR9 antagonist ODN TTAGGG (A151) was added 1 hr before addition of stimuli at the concentration of 1 μmol/L.

Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was isolated from PBMC, DC and myoblasts using the RNeasy mini Kit and cDNA (QIAGEN) was prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) after depleting genomic DNA. The expression of a set of 6 interferon-stimulated genes (ISGs) in PBMC, DC and myoblasts was assessed by RT-qPCR using Taqman Gene Expression Assays and normalized against *GAPDH*. Primer-Probes used were as follows *IFI27* - Hs01086370_m1, *IFI44LHs00199115_m1*, *IFIT1* - Hs01675197_m1, *RSAD2* - Hs00369813_m1, *SIGLEC1* - Hs00988063_m1, *ISG15* - Hs01921425_s1, *GAPDH* - Hs03929097_g1 labeled with FAM dye and amplified in a universal reaction mix. Real Time quantitative PCR was performed in duplicate using the Light Cycler VIIA7 System (Roche). The RQ value is equal to 2^{ΔΔct} where ΔΔct is calculated by (Ct target- Ct *GAPDH*) test sample - (Ct target- Ct *GAPDH*) calibrator sample. Each value is derived from 3 technical replicates. The expression of *LPIN1*, *IFNA* and *IFNB* genes in myoblasts was assessed by q-RT-PCR using Power SYBR® Green PCR Master Mix and normalized against β-actin (*BACT*). Reactions were performed in triplicate on an ABI Prism 7000 machine (PE Applied Biosystems) or on an ABI Prism 7900HT Fast Real-time PCR System, equipped with System Detector System (SDS) software v2.3. The RQ value is equal to 2^{ΔΔct} where ΔΔct is calculated by (Ct target- Ct *BACT*) test sample - (Ct target- Ct β *BACT*) calibrator sample. Each value is derived from 3 technical replicates.

Mitochondrial DNA gene expression analysis by qPCR

Primary myoblasts were trypsinized and were re-suspended in 200 μL of PBS buffer containing Proteinase K (0.2mg/ml), SDS (0.2%), EDTA (5mM) for 3 hr at 56°C. After isopropanol precipitation, 50 ng of DNA was amplified by Q-PCR using specific primers for *12S*, *D-LOOP* and *BACT* and Power SYBR® Green PCR Master Mix. Reactions were performed in triplicate and analyzed as described above with a normalization to *BACT*.

Cholera toxin uptake

Fifteen to twenty thousand primary myoblasts seeded on coverslips were deprived of FBS for 30 min and then loaded with 1 $\mu\text{g/ml}$ cholera toxin subunit B (CTxB) CF568 (Thermo Fisher Scientific) for 45 min at 37°C, followed by a 30-min chase in nutrient-rich growth medium. Cells were then fixed and processed for confocal microscopy.

Autophagic flux analyses

Myoblasts seeded on glass coverslips were transfected as described above with pRFP-GFP-LC3,⁶⁷ starved by replacing nutrient-rich growth medium with a starvation medium, EBSS medium (Thermo Fisher Scientific) for 3 hr to induce and evaluate autophagy initiation and maturation and refed for 6 hr with nutrient-rich growth medium to evaluate autophagic clearance. At the end of incubation with the different media, cells were washed in PBS, fixed and processed for confocal microscopy. Images were acquired with a Leica SP8 and with a 63x 1.4 NA oil objective. Puncta structures with GFP-RFP and/or RFP signals were quantified in more than 30 images per group, and the percentage of autolysosomes was expressed as the percent of puncta with red color.

Mitophagy flux analyses

To analyze mitophagy initiation, myoblasts were treated with 30 μM CCCP (Sigma-Aldrich) for 30 min and 2 hr. Mitophagosomes including mitochondrial fractions (TOMM20) were examined for recruited LC3 protein by confocal microscopy. To analyze mitophagy resolution, cells were treated with 30 μM CCCP for 8 and 16 hr, and then fixed and immunostained for dsDNA, TFAM, 8OHdG. Nucleoid number was quantified using Icy software, by segmenting and counting dsDNA dots.

Cell fractionation

Cytosolic, mitochondrial and nuclear fractions were prepared using Cell Fractionation Kit from Abcam according to the manufacturer's instructions and analyzed by qPCR as described above.

Measurements of mitochondrial mass, potential and ROS

Mitochondrial mass and membrane potential (Ψm) were measured by flow cytometry performed on 15,000-20,000 primary myoblasts labeled with the mitochondrion selective dyes MitoTracker Green FM and TMRM (Thermo Fisher Scientific). ROS production in live cells was assessed using the CellROX assay kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. After labeling with dyes, myoblasts were detached with trypsin digestion, washed using culture medium and analyzed by flow cytometry 5 min after the addition of 7-AAD. and analyzed by flow cytometry.

Muscle oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) measurements

Primary myoblasts were plated in cell culture XF96 microplates (Agilent technologies) at 2×10^4 cells/well and the cellular OCR or ECAR was determined by a Seahorse Bioscience XF96e extracellular flux analyzer (Agilent technologies) according to the manufacturer's instructions. Cells were balanced for 1 h in unbuffered XF assay media (Agilent Technologies) supplemented for OCR analysis with either 2 mM Glutamine, 10 mM Glucose and 1 mM Sodium Pyruvate or just 2 mM Glutamine for ECAR measurement. For OCR measurements, compounds were injected during the assay at the following final concentrations: Oligomycin (ATP synthase inhibitor, 1 μM), FCCP (uncoupling agent measuring the maximal respiration capacity; 1 μM), Rotenone and Antimycin A (ETC inhibitors; 1 μM). For ECAR measurements, Glucose (10 mM), Oligomycin (1 μM), and 2-Deoxyglucose (2-DG, glycolytic inhibitor; 500 mM) were injected. For each cell line 4 to 6 technical replicates were evaluated. All OCR and ECAR measurements were normalized to the protein concentration dosed at the end of every experiment.

MtDNA depletion

MtDNA depletion was achieved by incubating myoblasts in complete medium with ethidium bromide (100 ng/ml), uridine (50 $\mu\text{g/ml}$) and sodium pyruvate (110 $\mu\text{g/ml}$) all from Sigma Aldrich for 5 days to reduce mtDNA levels. Depletion was evaluated by performing qPCR, as described above.

Ca²⁺-mobilization

Myoblasts seeded on Ibidi flow chambers (Ibidi) were stained with 5 μM Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37°C in 5% CO₂ incubator. After washing cells were cultured in Krebs medium and the flow chambers were then transferred to a temperature-controlled stage (Harvard Apparatus, Holliston) on a confocal Leica SP8 SMD inverted microscope. Cells were visualized using a 20x and 0.7 NA dry objective. In some experiments a TLR9 antagonist ODN TTAGGG (A151) was added 1 hr before addition of stimuli at the concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$.

Caspase 3/7-cell death assay

Myoblasts were cultured with various conditions with a potential for cell death induction at 37°C, in a 5% CO₂ incubator, including: EBSS and/or TLR ligands, or staurosporin (Sigma-Aldrich), which was used as a positive control. In some experiments the TLR9 antagonist ODN TTAGGG (A151) was added 1 hr before addition of stimuli at the concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$. Cells were then detached by trypsin, transferred into 5 mL FACS tubes and stained in culture medium at room temperature for 1 hr with 5 μM of the Caspase3/7

Green Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific). Five min before fluorescence acquisition, Propidium Iodide (Biolegend) or 7-AAD (Biolegend) according to the manufacturer's instructions, to discriminate between necrotic and apoptotic cells. The fluorescence was recorded on a BD LSR Fortessa flow cytometer and analyzed using the FlowJo software.

Myoblasts were gated on based on FSC and SSC characteristics and single cells were further identified based on successive gating on homogeneous FSC-A and FSC-H characteristics as well as SSC-A and SSC-H characteristics. A dot plot showing the fluorescence intensity for 7-AAD or Propidium Iodide versus caspase3/7 activity was then constructed and a quadrant gate to discriminate live (7-AAD⁻/caspase3/7⁻) from apoptotic (7-AAD⁻/caspase3/7⁺) and necrotic (7-AAD⁺/caspase3/7^{+/-}) cells was drawn. Dead cells were identified as cells contained within apoptotic and/or necrotic cell gates.

Cell proliferation assay

Primary myoblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high (4,500 mg/mL) or low glucose (1,000 mg/mL), all from Sigma-Aldrich, supplemented with 20% FBS, 100 IU/mL Penicillin and 100 μg/mL Streptomycin for 5 days. The proliferation of myoblasts was then evaluated using the Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits according to the manufacturer's instructions. Myoblasts were exposed to 5 μM EdU for 1 hr. The fluorescence was recorded on a BD LSR Fortessa flow cytometer and analyzed using the FlowJo software.


QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as mean ± SD ($n \leq 10$ values per group; dot plots) or median, 10th percentile and 90th percentile ($n > 10$ values per group; box and whisker plots) for continuous variables. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software). The normality of the data distribution was tested in series with $n \geq 20$ values by using the Shapiro-Wilk test. To determine statistical significance for comparison of 1 continuous variable between 2 groups, a non-parametric unpaired two-tailed Mann-Whitney test was applied to series with $n \leq 20$ values per group or to larger series with a non-normal distribution and a parametric unpaired two-tailed t test was applied to series with $n > 20$ values and with a normal distribution of the data. When possible exact p values were indicated. The alpha value for threshold of significance was pre-fixed to 0.05. Two-tailed two-way analysis of variance (ANOVA) test with post hoc Sidak's correction for multiple comparison was performed to determine statistical significance for comparison of 2 or more factors between 2 or 3 series, by indicating for the mean effect of interaction, the mean effect of factors the F-statistics, degrees of freedom and exact p value. In addition, paired two-way ANOVA test was used when within-subjects factor was under evaluation (time). In all experiments, post hoc comparison was performed to test statistical significance, with adjusted p values denoted directly on the figures. Family-wise significance and confidence level were pre-fixed to 0.05 and 95% respectively. All relevant details about statistical tests and analysis can be found in figure legends. For the small clinical trial, no sample size was pre-determined, as dealing with a very rare disorder and all patients suffering from lipin1-related rhabdomyolysis and followed up in the Department of Inherited Metabolic Disorders, Necker hospital, Paris, France were proposed for enrolment. No subject or data was excluded from analysis of the data of the clinical trial. FACS data with less than 500 events in the final gates analyzed were excluded from analysis. Immunofluorescence data with less than 100 cells visible on the slides were excluded from analysis. For *in vitro* experiments, randomization was not applicable in comparing patient versus control individuals. Evaluation of the results of the small open clinical trial in which all the patients enrolled received hydroxychloroquine sulfate was based on before/after observations, so that randomization procedure was not applicable. Flow cytometry and immunofluorescence experiments data were gathered blinded to the status of the cells (i.e., control or patient cells).

ADDITIONAL RESOURCES

The clinical trial has been registered on clinicaltrials.gov under the number NCT04007562 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04007562>).

Systemic corticosteroids for the treatment of acute episodes of rhabdomyolysis in lipin-1-deficient patients

Caroline Tuchmann-Durand¹  | Céline Roda^{2,3} | Perrine Renard⁴ |
 Guillaume Mortamet⁵ | Claire-Marine Bérat⁶ | Lucile Altenburger⁶ |
 Marie Hug de Larauz¹ | Eloise Thevenet¹ | Charles-Henry Cottart^{3,7} |
 Florence Moulin⁸ | Juliette Bouchereau⁶ | Anais Brassier⁶ |
 Jean-Baptiste Arnoux⁶ | Manuel Schiff^{6,9} | Nathalie Bednarek¹⁰ |
 Delphine Lamireau¹¹ | Alexa Garros¹² | Karine Mention¹³ | Aline Cano¹⁴ |
 Lionel Finger¹⁵ | Michele Pelosi⁶ | Cécile Sergent Brochet¹⁶ |
 Laure Caccavelli^{4,6} | Jean-Herlé Raphalen¹⁷ | Sylvain Renolleau^{8,9} |
 Mehdi Oualha^{8,9} | Pascale de Lonlay^{4,6,9}

¹Imagine Institute, Biotherapy Clinical Investigation Center, Biotherapy Department, Necker-Enfants-Malades University Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

²Université Paris Cité, Health Environmental Risk Assessment (HERA) Team, CRESS, INSERM, INRAE, Paris, France

³Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Cité, Paris, France

⁴INSERM U1151, Institut Necker Enfants-Malades (INEM), Paris, France

⁵Pediatric Intensive Care Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

⁶Reference Center for Inherited Metabolic Diseases, Necker-Enfants-Malades University Hospital, APHP, Imagine Institute, G2M, MetabERN, Paris, France

⁷Biochemistry Unit, Biology Department, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Necker-Enfants-Malades University Hospital, Paris, France

⁸Pediatric Intensive Care Unit for, Necker-Enfants-Malades University Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

⁹Medical School, Université Paris Cité, Paris, France

¹⁰Intensive Care Unit and Competence Center for Inherited Metabolic Diseases, Reims University Hospital, Reims, France

¹¹Competence Center for Inherited Metabolic Diseases, Pellegrin University Hospital, Bordeaux, France

¹²Competence Center for Inherited Metabolic Diseases, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

¹³Reference Center for Inherited Metabolic Diseases, Jeanne de Flandre Hospital, MetabERN, Lille, France

¹⁴Reference Center for Inherited Metabolic Diseases, La Timone University Hospital, MetabERN, Marseille, France

¹⁵Biochemistry Unit, Biology Department, Troyes Hospital, Troyes, France

¹⁶Biochemistry Unit, Biology Department, Agens Hospital, Agens, France

¹⁷Adult Intensive Care Unit, Necker-Enfants-Malades University Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

Correspondence

Pascale de Lonlay, INSERM U1151,
 Institut Necker Enfants-Malades (INEM),
 Paris, France.
 Email: pdelonlay@gmail.com

Abstract

Mutations in the *LPIN1* gene constitute a major cause of severe rhabdomyolysis (RM). The TLR9 activation prompted us to treat patients with corticosteroids in acute conditions. In patients with *LPIN1* mutations, RM and at-risk

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Inherited Metabolic Disease* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of SSIEM.

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-13-BSV1-0020-01; Association Française contre les Myopathies, Grant/Award Numbers: 15947, 13988; Fondation Maladies Rares, Grant/Award Number: 09071

Communicating Editor: Areeg El-Gharbawy

situations that can trigger RM have been treated in a uniform manner. Since 2015, these patients have also received intravenous corticosteroids. We retrospectively compared data on hospital stays by corticosteroid-treated patients vs. patients not treated with corticosteroids. Nineteen patients were hospitalized. The median number of admissions per patient was 21 overall and did not differ when comparing the 10 corticosteroid-treated patients with the 9 patients not treated with corticosteroids. Four patients in the non-corticosteroid group died during a RM (mean age at death: 5.6 years). There were no deaths in the corticosteroid group. The two groups did not differ significantly in the number of RM episodes. However, for the six patients who had RM and occasionally been treated with corticosteroids, the median number of RM episodes was significantly lower when intravenous steroids had been administered. The peak plasma creatine kinase level and the area under the curve were or tended to be higher in patients treated with corticosteroids—even after the exclusion of deceased patients or focusing on the period after 2015. The median length of stay (10 days overall) was significantly longer for corticosteroid-treated patients but was similar after the exclusion of deceased patients. The absence of deaths and the higher severity of RM observed among corticosteroid-treated patients could suggest that corticotherapy is associated with greater survival.

KEYWORDS

corticosteroid, lipin-1 deficiency, rhabdomyolysis, survival

1 | INTRODUCTION

Lipin-1 deficiency (caused by mutations in the *LPIN1* gene) is a rare, life-threatening condition that causes episodes of rhabdomyolysis (RM). Whereas severe RM is typically defined by a plasma creatine kinase (CK) level >6000 IU/L, the level in lipin-1 deficiency is usually >50 000 IU/L. RM is typically triggered by fever, fasting, and (more rarely) effort.^{1,2} *LPIN1* mutations are associated with a poor prognosis, despite aggressive management in the intensive care unit (ICU). The complications of RM include cardiac arrhythmia (due to hyperkalaemia) and kidney failure.^{2–5} The cardiac complications are possibly linked to lipin-1's specific regulation of the heart's lipid metabolism and contractile function in response to hemodynamic stress.^{6–8} Accordingly, patients with *LPIN1* mutations accumulate neutral lipid in the myocardium.⁶ Cardiac lipotoxicity has been implicated in the development of cardiac dysfunction in a variety of models.⁸ Disease onset occurs usually in early infancy and rarely in adulthood.⁹ Although episodes of RM are more frequent during infancy (when the incidence of triggering viral infections is highest), the risk remains into adulthood. The incidence of RM episodes per patient ranges from one to several dozen. CK levels are normal or above-normal between RM episodes.

The only available treatment for RM is best supportive care in the ICU, with aggressive intravenous hydration and monitoring for complications; these approaches can reduce the duration of RM episodes from 7–10 days to 5 days.¹⁰

Since RM episodes are triggered by febrile illnesses (conditions that feature high circulating levels of pro-inflammatory mediators), we suspected that inflammation has a major role in lipin-1 deficiency.¹¹ Lipin-1 is abundantly expressed in adipocytes and skeletal muscle. It acts as both (i) a phosphatidate acid phosphatase (PAP1) that dephosphorylates phosphatidic acid to diacylglycerol and thus contributes to triacylglycerol and phospholipid biosynthesis,¹² and (ii) a transcriptional co-activator of PPAR α , SREBP1, and PGC-1 α (all of which are involved in energy pathways).¹³ Coactivator expression patterns were normal in our patients' adipocytes¹⁴ and skeletal muscle.¹¹ We recently showed that the pathogenic sequence linking lipin-1 deficiency and RM results in the loss of PAP1's enzymatic activity, which in turn leads to a reduction in phosphatidylinositol 3-kinase-Vps34 and phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) levels specifically at the membrane of late endosomes in the patients' cells.¹⁵ The loss of PI3P alters mitophagy in animal models¹⁶ and in human myoblasts via an abnormal GTP-bound

Rab7,¹⁵ resulting in the accumulation of mitochondrial DNA (mtDNA), a natural ligand of the Toll-like Receptor 9 (TLR9)¹⁷ in late endosomal/lysosomal structures of patient myoblasts exposed to metabolic stress. In turn, this results in TLR9 activation, elevated secretion of inflammatory cytokines, the release of calcium into the cytoplasm, and cell death; the latter two features are hallmarks of RM.¹⁵

As a new inflammatory disease, lipin-1 deficiency reinforces the notion of immunometabolism—an emerging interface between inflammation and cell metabolism.¹⁸ This notion prompted us to treat our patients' acute episodes of RM with corticosteroids as already proposed in other RM.¹⁹ Our hypothesis was confirmed by (i) the presence of proinflammatory CD4+ and CD8+ lymphocytes within the muscle tissue of one patient,⁵ (ii) the correction of lipid accumulation after the corticosteroid treatment of patient myoblasts cultured with proinflammatory cytokines,¹¹ and (iii) the beneficial role of dexamethasone in a few lipin-1 deficient patients with acute RM.^{5,15,20,21} In order to demonstrate the clinical benefit of corticosteroids in the management of patients with lipin-1 deficiency, we retrospectively collected data from hospital admissions for RM and/or triggering factors (fever, gastroenteritis, etc.). We compared clinical courses, plasma CK levels, and the length of the hospital stay for lipin-1 patients treated with corticosteroids vs. those not treated with corticosteroids.

2 | PATIENTS AND METHODS

We collected medical data from French hospitals where lipin-1-deficient patients were admitted in emergency units (non-scheduled admission) for an episode of RM or an at-risk situation (i.e., “preventive” hospital stays with a RM risk factor such as fever, viral illness, fasting, etc., regardless of the CK level). Hereafter, we shall refer to these non-scheduled admissions simply as “admissions”.

In all cases, the diagnosis of lipin-1 deficiency was confirmed by a PCR analysis of DNA isolated from blood (as described previously²) or by next-generation sequencing with an HiSeq system (Illumina) and Agilent Technologies probes. Moderate RM and severe RM were defined as a plasma CK level > 1000 IU/L and >6000 IU/L, respectively (value in healthy controls: <160 IU/L).

These emergency situations (i.e. an acute episode of RM or an RM risk factor) were managed in the same way at all participating hospitals, thanks to the use of a common, standardized protocol which was common to all RM whatever their cause. In view of the seriousness of the disease, most patients were admitted to an emergency unit or an ICU for at least 24 h (when CK levels were

normal) or 48 h (if patients with normal CK levels experienced muscle pain). Patients were continuously monitored throughout the hospital admission. Hydration in cases of RM (abnormal CK levels) included saline fluid resuscitation (20 mL per kg) and then 3 L/m²/day [body surface area = $(4 \times W + 7)/(W + 90)$] without waiting for an increase in potassium or CK. One liter of solute consisted of 200 mL of 30% glucose (180 g/m², 6 g/kg/24 h), 400 mL of 1.4% isotonic bicarbonate, and 400 mL of 0.9% NaCl, with no potassium or calcium. Hemodialysis was considered in cases with hyperkalaemia (≥ 5 mmol/L) despite effective hyperhydration, electrocardiogram (ECG) abnormalities, anuria or oliguria (<0.5 mL per kg/h), or symptomatic, life-threatening fluid overload (with an overweight of >20%) contraindicating the continuation of hyperhydration. If changes in the ECG suggesting hyperkalaemia, the patient was given intravenous 1.4% isotonic bicarbonate (10 mL/kg [1.5 mmol/kg]), intravenous calcium with 0.1 mmol/kg of elemental calcium; and for patients with persistent, life-threatening ECG abnormalities: 30 mL/kg of 14% isotonic bicarbonate per cannula for intraperitoneal administration, prior to the initiation of continuous renal replacement therapy as soon as possible. In the absence of RM (normal CK levels), only 1.5–2.5 L/m²/day of the same solution were administered.

We monitored the following parameters following the patient's admission to hospital: plasma CK and blood ions (Na and K) every 4 to 12 h for the first 24 h, glycaemia, a complete blood ion assessment with Ca, Ph, Mg, urea, and creatinine (every 6 h); hourly urinary output >2 mL/kg/h; fluid balance assessment every 3 h (in order to adjust treatment, if required), arterial blood pressure, regular ECG, and at least one echocardiography.

The criterion for discharge from hospital were the same at all participating hospitals: the absence of CK elevation after 24–48 h, or a return to normal or subnormal plasma CK levels (<2000 IU/L) after RM.

Since 2015, most patients hospitalized for an episode RM or a risk factor for RM have been treated with corticosteroids immediately upon admission as a routine care through the modification of their emergency certificate. As soon as the signs and symptoms of acute RM or infections (muscle pain, and/or fatigue, fever, gastroenteritis that can trigger RM) appeared, patients typically took an initial oral dose of prednisone (Cortancyl® [Sanofi Aventis, Gentilly, France], 1–2 mg/kg) at home (after phone authorization by a physician) before going to hospital as soon as possible. Intravenous treatment with a corticosteroid (methylprednisolone) was immediately initiated with a single dose of 1–2 mg/kg/day for the first 3 days. However, one patient received a single

TABLE 1 Characteristics of the 19 patients with lipin-1 deficiency.

<i>n</i> (%), mean (SD) or median (IQR)	All patients	Intravenous steroid therapy		<i>p</i> -value
		No	Yes	
All patients	N = 19 (100%)	N = 9 (47.4%)	N = 10 (52.6%)	
Sex, female	9 (47.4)	5 (55.6)	4 (40.0)	0.656
Death	4 (21.1)	4 (44.4)	0	0.033
Number of admissions	21 (14)	21 (17)	19 (12)	0.346
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	14 (17)	14 (18)	14 (10)	0.388
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	1 (3)	1 (2)	1 (3)	0.768
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	2 (3)	2 (2)	3 (3)	0.769
Peak CK level (in IU/L) ^a	210 800 (450 014)	96 099 (160 600)	442 350 (335 310)	0.191
Area under the curve (x10 ⁶ , in IU/Lhours) ^a	8.8 (19.4)	5.2 (6.1)	18.0 (33.5)	0.051
Length of hospital stay (in days)	10 (10.3)	4.6 (9)	12.5 (7.9)	0.041
With no rhabdomyolysis	3 (3)	2 (2)	3 (2)	0.233
With moderate rhabdomyolysis	2 (2)	3 (5)	2 (4)	0.567
With severe rhabdomyolysis	8 (11)	4 (8)	12 (8)	0.027
Number of admissions with moderate rhabdomyolysis	4 (4)	3 (2)	4 (4)	0.837
Number of admissions with severe rhabdomyolysis	2 (3)	2 (2)	3 (3)	0.769
Duration of admissions with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	2 (1)	1 (1)	2 (3)	0.180
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	6 (3)	4 (7)	7 (3)	0.107
Surviving patients				
Number of admissions	22 (11)	22 (0)	19 (12)	0.498
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	18 (9)	18 (1)	14 (10)	0.293
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	1 (2)	1 (2)	1 (3)	0.483
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	2 (2)	2 (2)	3 (3)	0.312
Peak CK level (in IU/L) ^a	220 000 (450014)	57 545 (45899)	442 350 (335310)	0.178
Area under the curve (x10 ⁶ , in IU/Lhours) ^a	14.0 (20.7)	3.9 (3.0)	18.0 (33.5)	0.086
Length of hospital stay (in days)	11.9 (8.1)	10 (10.2)	12.5 (7.9)	0.327
With no rhabdomyolysis	3 (2)	3 (2)	3 (2)	0.391
With moderate rhabdomyolysis	2 (4)	2 (1)	2 (4)	0.684
With severe rhabdomyolysis	11 (10)	5 (11)	12 (8)	0.178
Number of moderate rhabdomyolysis episodes	4 (4)	3 (1)	4 (4)	0.804
Number of severe rhabdomyolysis episodes	2 (2)	2 (1)	3 (3)	0.312
Duration of stays with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	1 (1)	1 (1)	2 (3)	0.077
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	7 (4)	6 (4)	7 (3)	0.620
Period after 2015				
Number of admissions	22 (11)	22 (1)	19 (12)	0.827
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	17 (17)	18 (5)	14 (10)	0.623
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	1 (2)	2 (2)	1 (3)	0.432

TABLE 1 (Continued)

<i>n</i> (%), mean (SD) or median (IQR)	All patients	Intravenous steroid therapy		<i>p</i> -value
		No	Yes	
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	2 (3)	2 (2)	3 (3)	0.616
Peak CK level (in IU/L) ^a	44 462 (459617)	23 053 (29140)	333 650 (524058)	0.065
Area under the curve (x10 ⁶ , in IU/Lhours) ^a	4.0 (17.6)	0.3 (0.8)	14.7 (21.7)	0.013
Length of hospital stay (in days)	6.8 (7.4)	4.7 (8.0)	7.6 (7.5)	0.129
With no rhabdomyolysis	3 (2)	2 (1)	3 (1)	0.157
With moderate rhabdomyolysis	2 (3)	2 (2)	1 (2)	0.356
With severe rhabdomyolysis	6 (6)	2 (5)	8 (7)	0.009
Number of admissions with moderate rhabdomyolysis	4 (4)	4 (4)	4 (4)	0.827
Number of admissions with severe rhabdomyolysis	2 (2)	2 (2)	3 (3)	0.616
Moderate	2 (2)	1 (1)	2 (3)	0.288
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	6 (3)	3 (1)	7 (2)	0.034

Note: *p*-values were from Fisher's exact test or the Mann–Whitney test. Values are quoted as the frequency (percentage), the mean (SD), or the median (IQR). Moderate and severe episodes of rhabdomyolysis were defined as CK levels greater than 1000 IU/L and greater than 6000 IU/L, respectively. Bolditalic indicates important value. Italic indicates significant value.

Abbreviation: CK, creatine kinase.

^aValues were calculated with regard to each patient's longest hospital stay.

dose of 2 mg/kg/day for 4 days and then a single dose of 4 mg/kg/day from day 5 to day 20 due to the severity of the episode and its duration.

Any adverse reactions to corticosteroids (such as susceptibility to infections, metabolic and endocrine effects [hypokalaemia, and pronounced hyperglycaemia needing insulin therapy], and severe hypertension requiring treatment) were noted.

2.1 | Statistical analyses

For each hospitalization, we calculated the length of the hospital stay and examined the distribution of plasma CK levels measured during the stay (i.e. the peak CK value and the area under the curve). We also summarized these parameters at the patient level. Lastly, we quantified the numbers of episodes of moderate RM and severe RM for each patient.

Categorical variables were expressed as the frequency (percentage). Continuous variables were expressed as the means (standard deviation [SD]) or the median [interquartile range (IQR)] and range. Fisher's exact test or the Mann–Whitney test were used to compare survival status, length of the hospital stay, and CK parameters in patients having received intravenous corticosteroids vs. patients not having received intravenous corticosteroids. For the patients who had received corticosteroids during some (but not all) admissions, Wilcoxon's signed-rank test was applied.

As sensitivity analyses, we excluded deceased patients, and we performed the analyses on the period after 2015.

All statistical analyses were performed with STATA software (release 15.0; Stata Corporation, College Station, TX, USA).

3 | RESULTS

3.1 | Patients' characteristics

Nineteen patients with *LPIN1* mutations (born between 1995 and 2016; 10 males and 9 females from 13 different families, including three sets of three siblings) were admitted in emergency unit (non-scheduled admission). The characteristics of the admissions are summarized in Table 1 (the number of hospitalizations and RM, length of the hospital stay, and plasma CK levels) and Table S1 (variables related to RM). The age at the time of the first ever episode of RM ranged from 1.5 to 19.4 years, and the mean (SD) value was 5.6 (4.8). The median (IQR) peak CK level was 210 800 (450014) IU/L. Some patients had a history of myalgia, muscle cramps, fatigability, exercise intolerance, and (more rarely) cardiomyopathy.⁶

Nine patients did not receive any corticosteroids during any of their admissions, seven patients received corticosteroids during some (but not all) admissions (including six patients who had at least one RM treated with corticosteroids and one patient treated with corticosteroids during

TABLE 2 Characteristics (related to RM, plasma creatine kinase levels, and the hospital stay) of 138 admissions by the six patients with *LPIN1* mutations and RM who had been treated occasionally with corticosteroids.

<i>n</i> (%) or median (IQR)	All hospital stays (<i>N</i> = 138, 100%)	Intravenous steroid therapy		<i>p</i> -value
		No (<i>N</i> = 125, 90.6%)	Yes (<i>N</i> = 13, 9.4%)	
Number of admissions				
Without rhabdomyolysis (CK ≤1000 IU/L)	99 (71.7)	96 (76.8)	3 (23.1)	<0.001
With moderate rhabdomyolysis (CK >1000–6000 IU/L)	16 (11.6)	14 (11.2)	2 (15.4)	
With severe rhabdomyolysis (CK >6000 IU/L)	23 (16.7)	15 (12.0)	8 (61.5)	
Peak CK level (in IU/L)	496 (1335)	481 (539)	16 260 (83763)	0.001
Maximum (year) CK level for P1	437 400 (2010)	437 400 (2010)	40 309 (2017)	
Maximum (year) CK level for P4	500 214 (2017)	500 214 (2017)	16 260 (2015)	
Maximum (year) CK level for P5	13 597 (2016)	3098 (2014)	13 597 (2016)	
Maximum (year) CK level for P8	379 900 (2015)	379 900 (2015)	148 443 (2018)	
Maximum (year) CK level for P11	538 740 (2016)	29 122 (2018)	538 740 (2016)	
Maximum (year) CK level for P18	220 000 (2019)	220 000 (2019)	84 863 (2018)	
Area under the curve (×10 ³ , in IU/L h)	19.2 (1094)	15.0 (65.9)	19 952.2 (6163.2)	0.003
Length of hospital stay (in days)	0.3 (2)	0.1 (1.7)	4.1 (2.7)	<0.001
With no rhabdomyolysis	0.1 (1.3)	0.1 (1.0)	3.0 (1.6)	0.008
With moderate rhabdomyolysis	0.1 (1.9)	0 (1.3)	3.1 (2.1)	0.050
With severe rhabdomyolysis	6.0 (6.7)	5.0 (8.2)	6.1 (3.2)	0.988
Duration of stays with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	1.3 (1.0)	1.1 (1.0)	4.1 (0)	0.400
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	4.3 (2.7)	4.9 (3.7)	3.8 (1.5)	0.395

Note: *p*-value from Fisher's exact test or Wilcoxon's signed rank test. Values are quoted as the frequency (percentage) or the median (IQR). Bolditalic indicates important value. Italic indicates significant value.

Abbreviation: CK, creatine kinase.

^aAt least >2 CK measures.

some admissions but not during RM), and three patients received corticosteroids during all of their admissions.

3.2 | Patient survival

Four patients (P16, P15, P17, and P7; two males and two females) died at hospital in 2000, 2010, 2011, and 2016, respectively, as a result of severe RM³; the mean (SD) (range) age at death was 5.6 (0.7) (4.9–6.3) years. None of the four patients had been treated with methylprednisolone (Table 1). The diagnosis of lipin-1 deficiency was known for three patients (P16, P17, and P7) for whom the standardized protocol was strictly applied especially with immediate hospitalization in case of triggering event, in view of disease severity. However, this strict management did not prevent the death of these patients. P16 who died in 2016 was unfortunately treated

without corticosteroids. The patient was well known to his university hospital, and the usual emergency protocol was applied but without being reviewed. The emergency workers also did not call our on-call telephone number, therefore we could not insist on the need to administer corticosteroids. P15 died at his first RM,³ the diagnosis of lipin-1 deficiency being unknown before.

3.3 | Hospitalization characteristics

Median (IQR) number of admissions per patient was 21 (14); there was no difference between patients having received corticosteroids and those who not having received corticosteroids (*p* = 0.346) (Table 1). There were no intergroup differences in the number of admissions with moderate RM (CK > 1000 IU/L), with severe RM (CK > 6000 IU/L) and without RM. Similar results were

TABLE 3 Characteristics of 313 admissions for patients with *LPIN1* mutations: rhabdomyolysis characteristics, plasma creatine kinase variables, and length of hospital stay.

<i>n</i> (%) or median (IQR)	Intravenous steroid therapy			<i>p</i> -value
	All hospital stays	No	Yes	
All patients	<i>N</i> = 313 (100%)	<i>N</i> = 290 (92.6%)	<i>N</i> = 23 (7.4%)	
<i>Number of admissions</i>				
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	229 (73.2)	222 (76.5)	7 (30.4)	<0.001
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	30 (9.6)	28 (9.7)	2 (8.7)	
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	54 (17.2)	40 (13.8)	14 (60.9)	
Peak CK level (in IU/L)	444 (860)	423 (640)	16 260 (92877)	<0.001
Area under the curve (×10 ³ , in IU/L.hours)	20.0 (790.2)	16.4 (90.3)	2218.3 (13700)	<0.001
Length of hospital stay (in days)	0.7 (2)	0.5 (1.8)	4.2 (5.7)	<0.001
With no rhabdomyolysis	0.1 (1.5)	0.1 (1.5)	1.8 (3.0)	0.097
With moderate rhabdomyolysis	1.0 (2.0)	1.0 (1.9)	3.1 (2.1)	0.105
With severe rhabdomyolysis	4.9 (9.0)	3.8 (8.9)	7.3 (7.7)	0.026
Duration of stays with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	1.1 (1.5)	0.9 (1.6)	4.1 (0)	0.111
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	3.6 (3.9)	3.4 (4.8)	4.6 (2.7)	0.122
Surviving patients				
<i>Number of admissions</i>				
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	227 (77.0)	220 (80.8)	7 (30.4)	<0.001
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	28 (9.5)	26 (9.6)	2 (8.7)	
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	40 (13.5)	26 (9.6)	14 (60.9)	
Peak CK level (in IU/L)	423 (664)	404 (495)	16 260 (92877)	<0.001
Area under the curve (×10 ³ , in IU/L.hours)	16.4 (211.3)	14.4 (30.8)	2218.3 (13700)	<0.001
Length of hospital stay (in days)	1 (3)	0.2 (1.8)	4.2 (5.7)	<0.001
With no rhabdomyolysis	0.1 (1.5)	0.1 (1.5)	1.8 (3.0)	0.095
With moderate rhabdomyolysis	1.0 (1.9)	1.0 (1.8)	3.1 (2.1)	0.080
With severe rhabdomyolysis	7.0 (7.6)	6.0 (8.2)	7.3 (7.0)	0.294
Duration of stays with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	0.9 (1.5)	0.9 (1.0)	4.1 (0)	0.116
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	4.6 (3.5)	4.7 (3.5)	4.6 (2.7)	0.973
Period after 2015	<i>N</i> = 214 (100%)	<i>N</i> = 191 (89.3%)	<i>N</i> = 23 (10.8%)	
<i>Number of admissions</i>				
With no rhabdomyolysis (CK ≤ 1000 IU/L)	166 (77.6)	159 (83.3)	7 (30.4)	<0.001
With moderate rhabdomyolysis (CK > 1000–6000 IU/L)	19 (9.9)	17 (8.9)	2 (8.7)	
With severe rhabdomyolysis (CK > 6000 IU/L)	29 (13.6)	15 (7.9)	14 (60.9)	
Peak CK level (in IU/L)	459 (630)	421 (486)	16 260 (92877)	<0.001
Area under the curve (×10 ³ , in IU/L.hours)	15.8 (68.5)	12.9 (22.4)	2218.3 (13700)	<0.001
Length of hospital stay (in days)	0.7 (2)	0.2 (1.7)	4.2 (5.7)	<0.001
With no rhabdomyolysis	0.2 (1.5)	0.2 (1.5)	1.8 (3.0)	0.097
With moderate rhabdomyolysis	1.3 (2.0)	1.0 (1.9)	3.1 (2.1)	0.079

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

<i>n</i> (%) or median (IQR)	All hospital stays	Intravenous steroid therapy		<i>p</i> -value
		No	Yes	
With severe rhabdomyolysis	5.7 (5.1)	3.6 (7.5)	7.3 (7.0)	0.014
Duration of stays with moderate rhabdomyolysis (in days) ^a	1.3 (1.5)	1.1 (1.3)	4.1 (0)	<i>0.113</i>
Duration of stays with severe rhabdomyolysis (in days) ^a	4.3 (2.8)	3.6 (4.0)	4.6 (2.7)	<i>0.241</i>

Note: *p*-values were from Fisher's exact test or the Mann-Whitney test. Values are quoted as the frequency (percentage) or the median (IQR). Bolditalic indicates important value. Italic indicates significant value.

Abbreviation: CK: creatine kinase.

^aAt least 2 CK assays.

obtained when deceased patients were excluded from the analysis and focusing on the period after 2015 (Table 1). However, when considering the six patients who had RM and occasionally been treated with corticosteroids (Table 2), the median [IQR] number of RM was significantly lower when intravenous corticosteroids had been administered (2 [1], vs. 3 [1] in the absence of corticosteroids; $p = 0.033$, Wilcoxon's signed-rank test).

The peak plasma CK level and the area under the curve were higher in the group of patients who had received corticosteroids, although this difference was not significantly significant ($p = 0.191$ and $p = 0.051$, respectively). The same was true when the deceased patients were excluded from the analysis ($p = 0.178$ and $p = 0.086$, Table 1).

The median (IQR) length of the hospital stay was 10 (10.3) days overall and was significantly longer for patients treated with corticosteroids than those treated without corticosteroids ($p = 0.041$), mainly due to the short length of the hospital stay for deceased patients. After the exclusion of deceased patients from the analysis, the median (IQR) length of the hospital stay fell to 11.9 (8.1) days and there was no difference between the corticosteroid and non-corticosteroid groups ($p = 0.327$).

When focusing on the period after 2015, no intergroup difference in the number of admissions with RM and without RM was observed. However, the peak plasma CK level and the area under the curve were higher (tendency or a significant difference) in patients who received corticosteroids. Furthermore, the length of the hospital stay for episodes of severe RM was significantly longer when corticosteroids were administered (Table 1).

The data per admission are summarized in Table 3. The 19 patients had a total of 313 documented admissions with 84 episodes of RM (including 30 with moderate RM and 54 with severe RM). There were 290 admissions without corticosteroid treatment and 23 admissions with corticosteroid treatment. The severity of RM was linked to the use of intravenous steroid therapy because the proportion of admissions with severe RM (as judged by the peak CK

levels and the area under the CK curve) was higher when corticosteroids were administered. Furthermore, the length of the hospital stay for episodes of severe RM was significantly longer when corticosteroids were administered, although this relationship was no longer significant when deceased patients were excluded from the analysis (6.0 [8.2] with corticosteroids vs. 7.3 [7.0] without corticosteroids, $p = 0.294$), but remained significant when focusing on the period after 2015 (7.3 [7.0] vs. 3.6 [7.5], $p = 0.014$).

Accordingly, to the severity of RM treated by corticosteroids, we could note a compartment syndrome involving both lower limbs, requiring fasciotomy with hemodialysis and intubation in one episode; short ventricular extrasystoles during the placement of a central venous access port in another one. This was followed by hyperkalaemia, acute kidney failure, systemic hypertension and posterior reversible encephalopathy syndrome, necessitating hemodialysis, intubation, and vasopressor treatment over 2 days; neurological criteria prompted intubation for another one.

No adverse drug reactions related to corticosteroids (infections, severe hypertension requiring treatment, hypokalaemia, or pronounced hyperglycaemia requiring insulin therapy) were noted.

3.4 | Focus on seven patients with severe rhabdomyolysis that led to death or were cured by corticosteroid treatment

Patient 7 was the eldest of the siblings P7–P8–P9 and passed away at the age of 6 years in 2016, following a severe episode of RM that was not treated with corticosteroids. He had previously experienced severe episodes of RM at the ages of 2, 4, and 6 years (peak CK level at the age of 2 years: 193 300 IU/L). During the fourth episode of RM (triggered by acute gastroenteritis), the patient developed a slight fever; this prompted hospital admission and hyperhydration. Salbutamol was administered

(because of a history of asthma), although the patient's respiratory status remained stable. The ECG showed tachycardia (140 beats/min) and diffuse, symmetrical, high-amplitude T waves with concomitant hyperkalaemia and high CK levels (32 240 IU/L). The patient suddenly developed ventricular fibrillation and then prolonged cardiorespiratory arrest, leading to death despite intensive resuscitation efforts. His sisters P8 and P9 were frequently hospitalized for RM or suspected RM (six of the 25 hospital stays for P8, and three of the 13 for P9). Regardless of the plasma CK level, corticosteroids (methylprednisolone 2 mg/kg/day) were administered at each admission for P9, and at half of the admissions for P8. During P9's hospital stay at 3 years of age, RM (peak CK level: 960 731 IU/L) was associated with compartment syndrome involving both lower limbs; this required fasciotomy with hemodialysis and intubation. Her maximum kalaemia was 8.2 mmol/L. She was hospitalized for 14 days in ICU. During her third hospital stay for RM at the age of 5 (peak CPK level: 321 716 IU/L, with 12 days in the ICU), neurological criteria prompted intubation. Kalaemia was below 5.0 mmol/L. Acute kidney failure did not occur.

Patient 19 was hospitalized three times at the age of 3.5 years and experienced two episodes of severe RM (peak CPK level = 36 824 and 447 300 IU/L, respectively). The second episode of RM was triggered by a pneumococcal infection and required a 21-day stay in the ICU. Patient 19 experienced short ventricular extrasystoles during the placement of a central venous access port. This was followed by hyperkalaemia (6.1 mmol/L), acute kidney failure, systemic hypertension, and posterior reversible encephalopathy syndrome, necessitating hemodialysis, intubation, and vasopressor treatment over 2 days. Methylprednisolone was administered over 3 weeks at an initial dose of 4 mg/kg/day and then 2 mg/kg/day. Patient 19 received prednisone and methylprednisolone during his third hospital stay and did not develop RM.

Patient 17 experienced two severe episodes of RM at the ages of 2 and 2.5 years (peak CPK level = 690 760 and 255 200 IU/L, respectively), which were complicated by systemic hypertension and kidney failure. During the third episode of RM, the patient was admitted to the ICU after experiencing diffuse muscle pain in the morning. The ECG showed diffuse, symmetrical, high-amplitude T waves. The blood potassium level was 5 mmol/L, and arrhythmia soon developed. The peak CPK level was 57 830 IU/L. Despite the application of an intensive resuscitation protocol, the patient died within hours of ICU entry. Corticosteroids were not administered.

At the age of 6 years, P15³ presented at the ICU with diffuse muscle pain and stiffness but stable respiratory and hemodynamic vital signs. The peak CPK level was 22 013 IU/L, and his last kalaemia before arrhythmia was

4.8 mmol/L. The patient suddenly developed ventricular tachycardia and then cardiorespiratory arrest. Despite the application of an intensive cardiopulmonary resuscitation protocol, the patient died a few hours later.

Patient 16 experienced five severe episodes of RM between the ages of 2 and 4 years, with a peak CPK level of 210 800 IU/L. During the fifth episode, the girl (aged 5) died following cardiorespiratory arrest, with a peak CPK level of 25 020 IU/L, and subnormal kalaemia.

4 | DISCUSSION

Despite our intensive treatment of episodes of acute RM or at-risk situations,³ the mortality rate among patients with lipin-1 deficiency was high (as emphasized by P7's death in 2016). Most deaths were due to arrhythmia,³⁻⁵ which was probably related to hyperkalaemia and/or cardiac dysfunction. Indeed, lipin-1 has specific roles in cardiac lipid metabolism.⁶⁻⁸ Hence, there was an urgent need for a treatment that prevented or attenuated RM and its complications. Based on our findings for lipin-1 deficiency (a pro-inflammatory process with TLR9 hyperactivation due to a phospholipid defect and a blockage in mitophagy), and experience for other RM,^{19,20} we proposed short course of systemic corticosteroids following admission for acute situations and we retrospectively evaluated their effectiveness and safety. Corticosteroids decrease capillary permeability and the transcription of inflammatory mediators and therefore reduce the overall inflammatory load.¹⁹ The treatment consisted of the intravenous administration of methylprednisolone (at a dose of 1 to 2 mg/kg/day or, in one case, 4 mg/kg/day) in a hospital setting, together with intensive care. Most of the treated patients also received oral prednisone at home before admission to hospital; this might have saved time, notably because complications can occur soon after the onset of RM.³

Remarkably, none of the corticosteroid-treated patients died; all the deaths resulted from acute episodes of RM in patients not treated with corticosteroids (including three deaths since 2010 and one in 2016; the diagnosis was known for three patients). Moreover, when considering the six patients who had been treated occasionally with corticosteroids, the median number of episodes of RM was significantly lower when corticosteroids were administered orally (before admission to hospital) and then intravenously (in hospital). Even though the episodes of RM were more frequently severe (according to the peak plasma CK level and the area under the curve) in corticosteroid-treated patients, the median length of the hospital stay for patients with moderate RM and those with severe RM were similar after deceased

patients had been excluded from the analysis. These differences were also obtained when focusing on the period after 2015. These data (i.e. no death and a similar length of the hospital stay for more severe RM) could suggest that corticosteroids (together with aggressive organ support and the prevention of at-risk situations, i.e. hospitalization in all cases) help to effectively improve clinical outcomes. These episodes of MR might have led to death without corticosteroids. We have practised “preventive” hospitalizations for a long time in the field of inherited metabolic diseases and we believe it is still an appropriate method in diseases at risk of RM such as mitochondrial fatty acid disorders. In the case of lipin-1 deficiency, even before the *LPIN1* molecular diagnosis, the medical staff and the parents were rapidly aware of those RM episodes seriousness therefore this preventive protocol has been rigorously applied for a long time. Thus, our hospital admission protocol has changed little over time, except for the administration of corticosteroids and (perhaps) stricter monitoring.

It should be noted that the potassium level is probably not a good marker of severity because it was sometimes subnormal or moderately elevated before the death of a patient, and not necessarily correlated with the ECG pattern⁵ (see focus on seven patients).

Our study has several limits: it is a retrospective and not controlled study of a small sample size (not a prospective randomized well-designed comparative-controlled study) and the period without corticosteroids was longer than the period with corticosteroids administration. While treatments during admissions were standardized, we cannot affirm that there was no variation in the management with time. In the same way, although RM treated with corticosteroids were more severe than those not treated with corticosteroids, we cannot exclude that the number of deaths was not due to the larger group (admissions) not treated with corticosteroids. However, when focusing on the period after 2015, the peak plasma CK level and the area under the curve were also higher (tendency or a significant difference) in the group of patients who had received corticosteroids. Furthermore, the length of the hospital stay for episodes of severe RM was significantly longer when corticosteroids were administered.

Given the good safety profile observed during the 23 admissions with corticosteroid administration (in 10 patients), we have continued to give corticosteroids at home and then upon admission to hospital in all at-risk situations. The treatment is simple, inexpensive, and easy to access. The speed of death of patient P15 also shows the interest of corticosteroids at home just before being hospitalized, to save time. It is a real therapeutic education. Given that corticosteroids have been linked to adverse events like susceptibility to infections and

metabolic and endocrine effects (albeit not observed in our cohort), the dose and duration of corticosteroid treatment must be determined on a rigorous basis (i.e. taking account of contraindications, infections, and the risk-benefit ratio) during an admission that features other therapeutic and preventive measures. We recommend vaccinating lipin-1-deficient patients with all available vaccines, as the risk of decompensation is very high during epidemics of viral disease, and corticosteroids can make chickenpox worse. We include the vaccination against COVID-19,²² although PAP-1 deficiency significantly suppresses SARS-CoV-2 replication²³ and this vaccine can be responsive for RM.²⁴

The innate immune system acts as the first line of defense against invading pathogens. Induction of an antiviral innate immune response depends on the TLRs, which then activate signaling pathways and induce the production of antiviral cytokines and chemokines. TLRs are present at the cell surface or in endosomal compartments; for example, TLR9 that is involved in the recognition of single-stranded DNA (hypomethylated CpG motifs, specifically) and then upregulates inflammatory mediators.²⁵ When the mitochondria are stressed or damaged, these organelles generate stress signals that include ROS and mtDNA release. Cell-free mtDNA acts as a damage-associated molecular pattern (due to its similarity to bacterial ancestors) and activates several innate immune pathways (including the TLR9 pathway).¹⁷ Mitophagy that removes damaged mitochondria and thus is crucial for preserving mitochondrial and immune homeostasis. When mitochondria are defective, for example, in lipin-1 deficiency, they trigger inflammatory cascades. Interestingly, the fact that gastrointestinal and respiratory viruses are frequently found in cases of *LPIN1*-mediated RM emphasizes the role of viral triggers via TLR9.²⁶ It should be noted that in *pah1Δ* yeast, expansion of the endoplasmic reticulum (with an increase in phospholipid content) facilitates the replication of RNA viruses, which take advantage of the greater membrane surface area and the change in lipid composition.²⁷

Prolonged exercise (another RM trigger) results in cytokine release, DNA damage, and oxidative stress in skeletal muscle.²⁸ Although regular exercise is crucial for good health (notably by upregulating the transcription of genes encoding programs involved in fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation), overtraining is associated with DNA damage and oxidative stress.²⁹ Furthermore, lipid droplets accumulate in lipin-1-deficient tissues^{5,11,16,30} and might amplify systemic immune responses because the deposits store inflammatory precursors.³¹ Accordingly, the inhibition of lipid droplet formation protects mice from inflammatory mediator production and death by endotoxic

shock.³² We showed previously that the lipid droplet count in patients' myoblasts was much lower following treatment with dexamethasone.¹¹

We believe that our present results open up major perspectives for treating “sporadic” or “epidemic” RM caused by viral infections; these episodes are much more frequent than episodes of hereditary RM.³³ Promising results with dexamethasone have been already described for the treatment of RM variously caused by infection,³³ effort,³⁴ drugs, and alcohol.¹⁹ Approximately 26 000 cases of RM are reported in the United States annually, and little is known about the recurrence rate.³⁵ Whatever the cause, all episodes of RM are thought to have the same downstream mechanism: a shortage of energy, dysfunction of the Na/K-ATPase and Ca²⁺ ATPase pumps, elevated cellular permeability to sodium ions, and a rise in the intracellular calcium concentration.³⁶ Intracellular calcium activates calcium-dependent proteases and phospholipases, leading to the destruction of myofibrillar, cytoskeletal and membrane proteins, and the release of muscle-cell contents into the circulation.³⁷ It has been postulated that RM has an inflammatory component specifically due to the release of inflammatory mediators from dying myocytes.¹⁹ Moreover, skeletal muscle is damaged by the myotoxic cytokines released in response to viral infection.³⁸ Our results have prompted us to treat all cases of severe RM—even in the absence of genetic diagnosis—with corticosteroids, after we have ruled out certain infections in which the drugs are contraindicated. Patient P15 in our study could be an example of this: he might not have died if the corticoids had been immediately administered, but we will never be able to prove it.

Along with the role of inflammation in lipin-1 deficiency, RM involves an energy defect; this is mainly due to the impairment in mitophagy but might also involve abnormal mitochondrial dynamics. In fact, the phosphatidate pool metabolized by lipin-1 interacts with the conserved dynamin-related protein 1.³⁹ In the future, long-term treatment with TLR9 antagonists, autophagy/mitophagy clearance inducers, or antioxidants might prevent acute RM. Fasting should be discouraged because it induces autophagy, and early death is observed in starved lipin-deficient flies.⁴⁰

In conclusion, our study suggests a simple, inexpensive, easy-to-access treatment for patients with life-threatening lipin-1 deficiency with RM or with a high risk of RM: oral steroids prior to hospital admission, intravenous corticosteroids in hospital, supportive treatment (hyperhydration), and close monitoring, consistently with the “inflammatory hypothesis” for lipin-1 deficiency. The findings need to be confirmed by further multicenter randomized studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Caroline Tuchmann-Durand: drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; analysis or interpretation of data. **Céline Roda:** drafting/revision of the manuscript for content; analysis or interpretation of data. **Perrine Renard, Marie Hug de Larauz, Eloise Thevenet, Laure Caccavelli:** major role in the acquisition of data. **Guillaume Mortamet:** major role in the acquisition of data; provision of patient care. **Claire-Marine Bérat, Lucile Altenburger, Florence Moulin, Juliette Bouchereau, Anais Brassier, Jean-Baptiste Arnoux, Manuel Schiff, Nathalie Bednarek, Delphine Lamireau, Alexa Garros, Karine Mention, Aline Cano, Jean-Herlé Raphalen, Sylvain Renolleau:** provision of patient care. **Charles-Henri Cottart, Lionel Finger, Cécile Sergent Brochet:** analysis or interpretation of data. **Michele Pelosi:** revision of the paper. **Mehdi Oualha:** drafting/revision of the manuscript for content; provision of patient care. **Pascale de Lonlay:** drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; study concept or design; analysis or interpretation of data; additional contributions: provision of patient care.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the participating physicians and families. This work was funded to PDL by Agence Nationale de la Recherche (grant number: ANR-13-BSV1-0020-01), the Association Française contre les Myopathies (grant numbers: 13988 and 15947), the Fondation Bettencourt (2012), the Fondation de l'Avenir (grant number: 09071), the Fondation Lejeune (2014), the Fondation Maladies Rares, and several patient associations (Nos Anges, No Myolyse, AMMI, Hyperinsulinisme, association OPPH, and Noa Luû).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Caroline Tuchmann-Durand, Céline Roda, Perrine Renard, Guillaume Mortamet, Claire-Marine Bérat, Lucile Altenburger, Marie Hug de Larauz, Eloise Thevenet, Charles-Henry Cottart, Florence Moulin, Juliette Bouchereau, Anais Brassier, Jean-Baptiste Arnoux, Manuel Schiff, Nathalie Bednarek, Delphine Lamireau, Alexa Garros, Karine Mention, Aline Cano, Lionel Finger, Michele Pelosi, Cécile Sergent Brochet, Laure Caccavelli, Jean-Herlé Raphalen, Sylvain Renolleau, Mehdi Oualha, and Pascale de Lonlay declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The manuscript has no associated data.

ETHICS STATEMENT

This is an observational non-interventional retrospective cohort study. Data were collected from medical records of lipin-1-deficient patients hospitalized for an episode of RM or an at-risk situation acute decompensation. The medications and medical management were prescribed by physicians as part of routine care in case of RM or situations at risk of RM. Accordingly to the French legislation, during medical consultations and routine care, we informed the patients and/or their parents or legal representatives that their medical data can be collected for research purpose. Unless specifically declined, their reticence was taken as consent, and it was noted in their medical record.

All data were anonymised and stored in a secure, password-protected database, and remain confidential, in accordance with the French and European legislation and regulations on data protection.

INFORMED CONSENT

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000 (5). To note, this is an observational, non-interventional retrospective cohort study. Data were collected from medical records of lipin-1-deficient patients hospitalized for an episode of RM or an at-risk situation acute decompensation. According to the French legislation, during medical consultations and routine care, we inform the patients and/or their parents or legal representatives that their medical data can be collected for research purpose and their non-opposition are collected in their medical record. The medications and medical management are prescribed by physicians as part of routine care in case of RM. All data are anonymised.

ORCID

Caroline Tuchmann-Durand  <https://orcid.org/0000-0002-5636-6998>

REFERENCES

- Zeharia A, Shaag A, Houtkooper RH, et al. Mutations in LPIN1 cause recurrent acute myoglobinuria in childhood. *Am J Hum Genet.* 2008;83:489-494.
- Michot C, Hubert L, Brivet M, et al. LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. *Hum Mutat.* 2010;31:E1564-E1573.
- Bergounioux J, Brassier A, Rambaud C, et al. Fatal rhabdomyolysis in 2 children with LPIN1 mutations. *J Pediatr.* 2012;160:1052-1054.
- Jaradat SA, Amayreh W, Al-Qa'qa K, Krayyem J. Molecular analysis of LPIN1 in Jordanian patients with rhabdomyolysis. *Meta Gene.* 2016;7:90-94.
- Stepien KM, Schmidt WM, Bittner RE, O'Toole O, McNamara B, Treacy EP. Long-term outcomes in a 25-year-old female affected with lipin-1 deficiency. *JIMD Rep.* 2019;46:4-10.
- Legendre A, Khraiche D, Ou P, et al. Cardiac function and exercise adaptation in 8 children with LPIN1 mutations. *Mol Genet Metab.* 2018;123:375-381.
- Kok BP, Kienesberger PC, Dyck JR, Brindley DN. Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (fld) mice. *J Lipid Res.* 2012;53:105-118.
- Chambers KT, Cooper MA, Swearingen AR, et al. Myocardial lipin 1 knockout in mice approximates cardiac effects of human LPIN1 mutations. *JCI Insight.* 2021;6:e134340.
- Minton T, Forrester N, Baba SA, Urankar K, Brady S. A rare case of adult onset LPIN1 associated rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord.* 2020;30:241-245.
- Pichler K, Scholl-Buergi S, Birnbacher R, et al. A novel therapeutic approach for LPIN1 mutation-associated rhabdomyolysis—the Austrian experience. *Muscle Nerve.* 2015;52:437-439.
- Michot C, Mamoune A, Vamecq J, et al. Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832:2103-2114.
- Harris TE, Finck BN. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22:226-233.
- Finck BN, Gropler MC, Chen Z, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 2006;4:199-210.
- Pelosi M, Testet E, Le Lay S, et al. Normal human adipose tissue functions and differentiation in patients with biallelic LPIN1 inactivating mutations. *J Lipid Res.* 2017;58:2348-2364.
- Hamel Y, Mauvais FX, Madrange M, et al. Compromised mitochondrial quality control triggers lipin1-related rhabdomyolysis. *Cell Rep Med.* 2021;2:100370.
- Zhang P, Verity MA, Reue K. Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2014;20:267-279.
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464:104-107.
- Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542:177-185.
- Antoon JW, Chakraborti C. Corticosteroids in the treatment of alcohol-induced rhabdomyolysis. *Mayo Clin Proc.* 2011;86:1005-1007.
- Meijer IA, Sasarman F, Maftai C, et al. LPIN1 deficiency with severe recurrent rhabdomyolysis and persistent elevation of creatine kinase levels due to chromosome 2 maternal isodisomy. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;5:85-88.
- Kanderi N, Kirmse B, Regier DS, Chapman KA. LPIN1 rhabdomyolysis: a single site cohort description and treatment recommendations. *Mol Genet Metab Rep.* 2022;30:100844.
- Patel V, Alzghoul B, Kalra SS. COVID-19 infection and severe rhabdomyolysis. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2021;34:478-480.
- Yan B, Yuan S, Cao J, et al. Phosphatidic acid phosphatase 1 impairs SARS-CoV-2 replication by affecting the glycerophospholipid metabolism pathway. *Int J Biol Sci.* 2022;18:4744-4755.

24. Kimura M, Niwa JI, Doyu M. Recurring weakness in rhabdomyolysis following Pfizer-BioNTech coronavirus disease 2019 mRNA vaccination. *Vaccines (Basel)*. 2022;10:935.
25. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408:740-745.
26. Xagorari A, Chlichlia K. Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *Open Microbiol J*. 2008;2:49-59.
27. Chuang C, Barajas D, Qin J, Nagy PD. Inactivation of the host lipin gene accelerates RNA virus replication through viral exploitation of the expanded endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1003944.
28. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2001;84:244-245.
29. Pereira BC, Pauli JR, Antunes LM, et al. Overtraining is associated with DNA damage in blood and skeletal muscle cells of swiss mice. *BMC Physiol*. 2013;13:11.
30. Adeyo O, Horn PJ, Lee S, et al. The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*. 2011;192:1043-1055.
31. Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:540-551.
32. Leite MS, Pacheco P, Gomes RN, et al. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock*. 2005;23:173-178.
33. Summerlin ML, Regier DS, Fraser JL, et al. Use of dexamethasone in idiopathic, acute pediatric rhabdomyolysis. *Am J Med Genet A*. 2020;185:500-507.
34. Brown J, Mitchell S. A complicated case of exertional heat stroke in a military setting with persistent elevation of creatine phosphokinase. *Mil Med*. 1992;157:101-103.
35. Zutt R, van der Kooij AJ, Linthorst GE, Wanders RJ, de Visser M. Rhabdomyolysis: review of the literature. *Neuromuscul Disord*. 2014;24:651-659.
36. Shapiro ML, Baldea A, Luchette FA. Rhabdomyolysis in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2012;27:335-342.
37. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner J*. 2015;15:58-69.
38. Fodili F, van Bommel EF. Severe rhabdomyolysis and acute renal failure following recent coxsackie B virus infection. *Neth J Med*. 2003;61:177-179.
39. Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, Sesaki H. Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics. *Trends Cell Biol*. 2018;28:67-76.
40. Hood SE, Kofler XV, Chen Q, Scott J, Ortega J, Lehmann M. Nuclear translocation ability of lipin differentially affects gene expression and survival in fed and fasting drosophila. *J Lipid Res*. 2020;61:1720-1732.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Tuchmann-Durand C, Roda C, Renard P, et al. Systemic corticosteroids for the treatment of acute episodes of rhabdomyolysis in lipin-1-deficient patients. *J Inherit Metab Dis*. 2023;46(4):649-661. doi:[10.1002/jimd.12592](https://doi.org/10.1002/jimd.12592)

Rhabdomyolyse (RM) par mutation *LPIN1*

Patient prioritaire: ne doit pas attendre aux urgences

Transport SAMU vers un CHU avec réanimation et perfusion dès le domicile au moindre signe clinique de RM

En cas de fièvre, vomissements, diarrhée, douleurs musculaires, ou anesthésie :
Risque de Rhabdomyolyse Aiguë rapidement suivie d'hyperkaliémie menaçante avec troubles du rythme et d'insuffisance rénale

1 BILAN EN URGENGE

CPK, Glycémie, ionogramme sanguin, kaliémie, calcémie, phosphore, urée, créatinine, gaz du sang, Ca ionisé, lactate, ASAT, ALAT, GGT, TP - Facteur V. ECG dès l'arrivée. Noter la **couleur des urines (myoglobinurie)**. Bilan selon maladie intercurrente déclenchante.
Ne pas attendre les résultats du bilan pour débiter la perfusion.

2 TRAITEMENT A METTRE EN PLACE EN URGENGE, sans attendre les résultats du bilan:

A- Prise en charge systématique

- **Corticothérapie:** Débuter au domicile Per Os (Cortancyl®) puis IV dès l'arrivée: **Methylprednisolone 1 à 2mg/kg/j pendant 3 à 5 jours**
- **Arrêt du traitement de fond par Plaquenil**
- **Si signes d'hypoperfusion, remplissage** avec Ringer Lactate ou NaCl 0.9% à **10ml/kg** (maximum 500 ml) en l'absence de signe cardiaque, à réévaluer et compléter si besoin.
- **Perfusion d'hyperhydratation :**
 - Volume **3L/m²/jour**
 - Préparation pour 1 litre de soluté: 200 ml de G30% + 400 ml de Bicarbonate 14 ‰ + 400 ml de NaCl 0,9%
Pas de potassium ni de calcium
- **Hospitalisation en USC ou réanimation systématique si rhabdomyolyse (quelque que ce soit le degré d'élévation des CPK)**
- Mettre en route le traitement spécifique de l'éventuelle infection intercurrente

B- Adaptation selon évolution des CPK

- Perfusion pendant **au minimum 24h** même si CPK normales initialement. Si les CPK restent normales, possibilité de passer à une perfusion de Sérum Glucosé **G10% + NaCl 6g/L** avec apports **2L/m²/j** (débit maximum 150 ml/h). **Ne pas utiliser de solutés tout prêts contenant du potassium dans les premières heures, sauf si hypokaliémie secondaire. Réintroduire K⁺ en l'absence de RM et en fonction de la kaliémie.**

3 SIGNES DE GRAVITE

- **CPK > 20 000 UI/L**
- **Troubles du rythme, signes ECG d'hyperkaliémie, hyperkaliémie > 7 mmol/L**
- **Oligo/anurie, urines rouges porto, insuffisance rénale**
- **Trouble neurologique, prostration** (risque coma hyperosmolaire)
- **Discuter l'épuration extra-rénale si :**
 - kaliémie > 5mmol/L,
 - anomalie de l'ECG quelle qu'elle soit,
 - anurie/oligurie et BES positifs contre-indiquant la poursuite de l'hyperhydratation,
 - atteinte rénale (les chiffres de créatinine ne reflètent pas l'importance de l'atteinte rénale, car libérée par la nécrose musculaire, urée plus fiable).

Retrouver la rubrique
Urgence du site G2M



4 SURVEILLANCE initiale en USC/Réanimation

- Dextro, Na, K/2h les premières 24h, adapter les apports de potassium à la kaliémie et à la fonction rénale (en l'absence d'apport dans la perfusion, il existe également un risque d'hypokaliémie si la rhabdomyolyse n'est pas sévère).
- Iono complet avec Ca, Ph, Mg, urée, créat, CPK / 6h.
- Surveillance débit urinaire horaire > 2ml/kg/h, pHu et densité urinaire <1005.
- BES/ 3h pour adapter l'hyperhydratation.
- ECG en place avec tracé/heure. Echographie cardiaque.
- Si CPK normales, **garder hospitalisé** le patient au moins **24h avec perfusion** pour être sûr que les CPK ne s'élèvent pas secondairement

PHYSIOPATHOLOGIE:

Les mutations du gène *LPIN1* entraînent des rhabdomyolyses aiguës particulièrement sévères et rapides, à risque de décès, surtout par trouble du rythme cardiaque par hyperkaliémie (fibrillation ventriculaire ou tachycardie ventriculaire), mais aussi possiblement par une atteinte myocardique, soit directement responsable de troubles du rythme, soit abaissant le seuil de tolérance à l'hyperkaliémie. Les épisodes aigus peuvent survenir lors de circonstances à risque (fièvre, infection intercurrente, vomissements, diarrhée, activité physique inhabituelle, et tout état de jeûne ou de catabolisme).

Certains patients présentent également des douleurs musculaires chroniques ou une fatigabilité à l'effort, avec des CPK modérément élevées hors contexte aigu. Ces CPK peuvent s'élever secondairement dans les circonstances à risque.

Traitements habituels selon les patients:

- Plaquenil en traitement de fond, à faible dose. Traitement à arrêter lors des poussées aiguës de rhabdomyolyse
- Corticothérapie courte systématique lors de toute circonstance à risque, débutée par les patients à domicile.

CIRCONSTANCES A RISQUE DE DECOMPENSATION:

- Maladie infectieuse intercurrente, fièvre, anorexie, vomissements, **soit tout état de jeûne ou de catabolisme.**
- Exercice physique inhabituel
- Chirurgie / Anesthésie

SIGNES CLINIQUES DE DECOMPENSATION : Ne pas attendre ces signes!

- Douleurs musculaires (pouvant précéder l'élévation des CPK)
- Impossibilité de marcher, prostration
- Troubles du rythme cardiaque, insuffisance cardiaque
- Troubles de conscience
- Choc hypovolémique
- Myoglobinurie (signe une rhabdomyolyse sévère)

CONTRE-INDICATIONS MEDICAMENTEUSES/ CONSEILS GENERAUX :

- Traitements contre-indiqués à la phase aiguë d'une rhabdomyolyse: AINS, tout médicament hyperkaliémiant
- Statines (risque accru de rhabdomyolyse)
- Certains agents anesthésiques: cf ci-dessous

- Toutes les vaccinations sont préconisées (notamment la grippe).

EN CAS D'ANESTHESIE GENERALE :

- **Agents anesthésiques contre-indiqués: Halogénés (dépresseur du myocarde), curares dépolarisants (succinylcholine, favorise la contraction musculaire), propofol en administration prolongée**
- **Surveillances des CPK pré et post-opératoires**

NUMEROS ET MEDECINS REFERENTS

Les numéros d'astreinte téléphonique pour les urgences métaboliques de :

La nuit, seule les équipes médicales peuvent appeler pour des situations d'urgence et seulement si le certificat d'urgence n'est pas compris ou si l'état clinique ou le résultat du bilan sont inquiétants. Anticiper les appels avant la nuit autant que possible.

Les questions de secrétariat se traitent via le secrétariat médical en semaine ou par un e-mail adressé au médecin métabolicien référent du patient.

Certificat remis le

Dr

Le déficit en lipin-1 est une cause majeure d'épisodes aigus de rhabdomyolyses (RM) sévères, déclenchés principalement par le jeûne ou la fièvre, engageant le pronostic vital des patients. La prise en charge uniquement symptomatique en service de réanimation témoigne de la nécessité de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Une meilleure connaissance de la physiopathologie du déficit en lipin-1, liée à un défaut d'autophagie et de mitophagie, a permis d'identifier une cible thérapeutique, le récepteur de l'immunité innée *Toll-like receptor 9* (TLR9), et de mettre en place un traitement à visée compassionnelle par l'hydroxychloroquine sulfate (HCQ). Ce traitement a permis une amélioration des signes cliniques chroniques musculaires des patients ainsi qu'une diminution de leurs marqueurs inflammatoires plasmatiques. Cependant, certains patients ont présenté des accès de RM sous traitement par HCQ, dont nous avons cherché à comprendre l'origine.

Dans une première partie, nous avons montré que les patients ayant soufferts d'accès de RM sous traitement présentaient une concentration plasmatique plus élevée d'HCQ par rapport aux autres patients. Des études *in vitro* sur des myoblastes primaires de patients nous ont permis de montrer que l'HCQ bloque l'autophagie, par modification du pH lysosomal, à forte dose (10 μM) et non à de plus faibles doses (0,1 et 1 μM). Cet effet dose-dépendant *in vitro* pourrait expliquer la survenue de RM chez les patients ayant de fortes concentrations plasmatiques d'HCQ, en aggravant leur déficit d'autophagie initial. Afin d'étudier *in vitro* les effets cellulaires de la RM, les myoblastes primaires ont été soumis à un stress métabolique induit par un milieu pauvre en nutriments. En condition de stress, nous avons montré une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'ADN oxydé dans les myoblastes de patients. Cette accumulation a été prévenue par l'HCQ à faible dose (1 μM), suggérant un effet bénéfique de l'HCQ chez les patients à des doses inférieures à celles inhibant l'autophagie. Par ailleurs, le taux intracellulaire de calcium, l'un des marqueurs de la RM *in vitro*, a été étudié en condition de stress. Nos résultats ont montré une exacerbation de la fuite calcique du réticulum endoplasmique (RE) chez les patients par rapport aux contrôles lors du jeûne, non reversée par le traitement par l'HCQ aux doses de 10 et 1 μM .

Dans une seconde partie, nous avons étudié les mécanismes sous-jacents de l'effet antioxydant de l'HCQ dans des myoblastes immortalisés en recherchant son rôle dans les voies de dégradation et de production des ROS. Nos résultats ont révélé que la diminution des ROS intracellulaires par l'HCQ n'impliquait pas la modification de l'expression des gènes *Antioxidant response element* (ARE), ni l'activité protéique du facteur de transcription *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2). D'autre part, nous avons également montré que le stress oxydatif, observé dans les myoblastes en condition de jeûne, était associé au stress du RE, indépendamment de la voie canonique médiée par *Inositol-requiring protein 1* (IRE1), mais aussi à un dysfonctionnement mitochondrial. Cependant, l'HCQ à la dose de 1 μM n'a pas permis de réverser la survenue du stress du RE en condition de jeûne. Des résultats supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'impact de l'HCQ sur le fonctionnement de la mitochondrie.

L'ensemble de nos résultats suggèrent un effet de l'HCQ à faible dose sur le stress oxydatif, processus critique dans la physiopathologie du déficit en lipin-1.