



**HAL**  
open science

# L'implication des annexines dans le développement des dystrophies musculaires humaines

Léna d'Agata

► **To cite this version:**

Léna d'Agata. L'implication des annexines dans le développement des dystrophies musculaires humaines. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0326 . tel-04961297

**HAL Id: tel-04961297**

**<https://theses.hal.science/tel-04961297v1>**

Submitted on 21 Feb 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.

THESE PRESENTEE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

## **DOCTEUR EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE**

**UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
SPECIALITE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Léna d'Agata

# **L'IMPLICATION DES ANNEXINES DANS LE DEVELOPPEMENT DES DYSTROPHIES MUSCULAIRES HUMAINES**

Sous la direction d'Anthony Bouter

Soutenue le 2 décembre 2024

Membres du Jury :

Mme Chazaud, Bénédicte : Directrice de Recherche Inserm - Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mme Coirault, Catherine : Directrice de Recherche Inserm – Sorbonne Université	Rapporteur
M. Arveiler, Benoît : Professeur des universités - Praticien hospitalier – Université de Bordeaux	Evaluateur
Mme Martin-Negrier, Marie-Laure : Professeur des universités - Praticien hospitalier – Université de Bordeaux	Evaluateur

# Présentation

## **L'implication des annexines dans le développement des dystrophies musculaires humaines**

### **Résumé**

La rupture de la membrane plasmique est un événement physiologique survenant dans les cellules exposées à des stress mécaniques fréquents (cellules musculaires squelettiques ou cardiaques, cellules épithéliales...). Une cellule normale est capable de réparer ces ruptures à l'échelle de la minute. Selon le modèle actuel, la réparation de la membrane plasmique est un processus actif  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant basé sur la fusion de vésicules cytoplasmiques et le recrutement du patch lipidique formé à l'endroit de la rupture. La machinerie protéique de réparation membranaire commence à être identifiée et comprend notamment la dysferline, la cavéoline-3 (CAV3), mitsugumine 53 (MG53), Neuroblast differentiation-associated protein (AHNAK) ou encore certaines annexines (ANX). L'équipe d'accueil a ainsi montré que les ANXA5 (Carmeille et al., 2016, 2017) et ANXA6 (Croissant et al., 2020) sont indispensables pour la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines.

Alors qu'une cellule normale est capable de réparer une rupture membranaire rapidement, l'absence ou un défaut de réparation conduit à la mort cellulaire et peut contribuer au développement de maladies dégénératives. Certaines dystrophies musculaires, qui sont caractérisées par une faiblesse et une atrophie progressive des muscles squelettiques, résultent ainsi d'un défaut de réparation membranaire. C'est le cas de la dystrophie musculaire des ceintures de type R2 (LGMDR2) ou de la myopathie de Miyoshi (MM). Nous émettons l'hypothèse que d'autres dystrophies musculaires pourraient résulter d'un défaut de réparation membranaire. De plus, si la LGMDR2 et la MM résultent d'abord d'une anomalie génétique liée à la dysferline, des études ont montré que des variants génétiques secondaires, dont font partie les ANX, sont dérégulés dans ces dystrophies musculaires et que ces dérégulations impactent de façon très négative l'évolution de la maladie.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la relation entre réparation membranaire et dystrophies musculaires. A partir de cellules musculaires squelettiques collectées de patients atteints de dystrophie musculaire des ceintures de type R2, de la maladie des muscles ondulants, de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale ou de dystrophie musculaire de Duchenne,

j'ai identifié celles atteintes d'un défaut de réparation membranaire. J'ai également mesuré le niveau d'expression et la distribution subcellulaire des principaux composants de la machinerie de réparation membranaire dans ces cellules. Enfin, j'ai initié un travail visant à étudier l'implication de cellules auxiliaires (macrophages et précurseurs fibro-adipogéniques) dans la réparation membranaire des myocytes. Ce travail participe à apporter les connaissances fondamentales essentielles pour guider les futures stratégies thérapeutiques. L'existence d'une corrélation entre ANX et sévérité clinique des dystrophies musculaires pourrait aussi servir d'indicateur pronostic de la maladie.

## **Mots-clefs**

Cellule musculaire squelettique, Dystrophies musculaires, Annexine, Réparation membranaire, Microscopie à fluorescence



# **The implication of annexins in the development of human muscular dystrophies**

## **Abstract**

Sarcolemma (micro-)disruption is a physiological phenomenon induced by mechanical stress in muscle fibers. Normal skeletal muscle cells are able to repair these ruptures at the minute scale. According to current models of cell membrane repair, membrane resealing is an active  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent process based on the formation of a membrane patch by aggregation of intracellular vesicles and fusion of the patch with the cell membrane surrounding the disruption site. The molecular machinery start being identified, with notably dysferlin, caveolin-3, mitsugumin 53 (MG53), Neuroblast differentiation-associated protein (AHNAK) or annexins (ANX). The group of A. Bouter has shown that ANXA5 (Carmeille et al., 2016, 2017) and ANXA6 (Croissant et al., 2020) are instrumental for the membrane repair of human skeletal muscle cells.

Whereas a normal cell is able to reseal rapidly a membrane disruption, defective membrane repair leads to cell death and may contribute to the development of degenerative diseases, such as muscular dystrophies. Limb girdle muscular dystrophy type (LGMD) R2 and Miyoshi myopathy (MM) result from a defect of membrane repair. Some other myopathies may also result from a defect in the membrane repair machinery. In addition, it has been reported that the same primary mutation results in variable disease progression due to the existence of secondary genetic variants, termed genetic modifiers, which greatly impact the severity of the muscular dystrophy. In this context, it has been shown that ANX are often dysregulated in many muscular dystrophies.

The PhD thesis aimed at addressing the interplay of muscular dystrophies and membrane repair. From skeletal muscle cells collected from patients suffering from LGMDR2, rippling muscle disease, facioscapulohumeral muscular dystrophy or Duchenne muscular dystrophy, I identified those exhibiting a defect of membrane repair. I also measured expression level and subcellular distribution of main components of the membrane repair machinery in these cells. Finally, I initiated work aiming at studying the involvement of helping cells (macrophages and fibro-adipogenic precursors) in myocyte membrane repair. This work contributes to providing fundamental knowledge to guide future therapeutic strategies. The existence of a correlation

between ANX and clinical severity of muscular dystrophies could also serve as a prognostic indicator of the disease.

### **Key words**

Skeletal muscle cells, muscular dystrophies, Annexin, Membrane repair, Fluorescence Microscopy

# Remerciements

Avant toute chose, je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance envers les membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à l'évaluation de mon travail de thèse. Je souhaite ainsi remercier Mme Bénédicte Chazaud, Mme Catherine Coirault d'avoir accepté le rôle de rapporteur. Votre expertise et vos retours précieux ont grandement enrichi ce travail. Je tiens également à remercier M. Benoît Arveiler et Mme Marie-Laure Négrier-Leibreich pour avoir rejoint ce jury et contribué à la discussion scientifique autour de mes résultats.

Je ne peux omettre de remercier tout particulièrement Anthony Bouter, qui a été un excellent directeur de thèse. Ta confiance, dès le début de ce projet, a été un moteur essentiel pour mener à bien ce travail. Grâce à tes conseils avisés, ton soutien constant et ta disponibilité, j'ai pu surmonter les nombreux défis de cette thèse. Ton enthousiasme et ta rigueur ont été une véritable source d'inspiration.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe, en particulier Céline Gounou, Flora Bouvet et Sisareuth Tan, qui ont joué un rôle crucial dans l'accomplissement de ce projet. Merci pour votre aide technique et vos conseils précieux. Vos encouragements ont fait de ces années de thèse une expérience enrichissante. Je ne peux omettre de citer Alain Brisson que je remercie sincèrement pour son soutien et ses commentaires constructifs lors des présentations de mes résultats.

Les différents stagiaires et doctorants qui ont rendu ce temps si agréable, je vous remercie également : Dorian Chapeau désormais doctorant dans le laboratoire mais également Camille Breuzin et Mégane Lequang.

Lors des congrès j'ai pu rencontrer de nombreuses personnes dont certains collaborateurs tels que Mme Marie-Laure Martin-Négrier, ou encore M. Gaëtan Juban. Chacun a contribué à ma progression dans ce parcours de recherche. Je remercie Fabienne Soulet pour son aide précieuse lors des expériences de RT-qPCR.

Sébastien Marais, merci pour ton aide précieuse lors des irradiations lasers qui ont ponctué cette dernière année, tu m'as permis d'obtenir des résultats.

Je remercie aussi les personnels techniques et administratifs du CBMN, notamment Karine Lanusse et Célia Gauthier pour leur assistance sans faille et leur réactivité dans l'organisation

des congrès et la gestion des différents aspects logistiques. Vous avez contribué à créer un environnement de travail agréable, facilitant le déroulement de cette recherche.

Une dernière personne me semble importante à citer dans cette partie. Lilly Maneta-Peyret. Rencontrée en troisième année de licence, elle est celle sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui. D'un point de vue autant professionnel que personnel, je te dois beaucoup.

Je souhaite exprimer ma gratitude à ma mère, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. À cette femme d'exception, pour son soutien inébranlable et son amour, qui m'ont permis de poursuivre mes rêves malgré les difficultés rencontrées : merci, maman.

Je rajoute enfin une dernière partie, dédiée aux satellites de ma vie, à ces personnes qui vont et viennent au gré des saisons. À vous, qui avez émaillé ma vie depuis ma première année à Bordeaux jusqu'à aujourd'hui.

À Elene, Hibat, Anaïs, Wenli et Ilghang,

À Ali, Nabil et Eric,

À Maëlys, Margaux et Agnès,

À Hamza,

Merci à tous.

De manière générale, je souhaite remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Que ce soit par leurs encouragements, leur écoute ou leurs précieux conseils, je leur en suis profondément reconnaissante. Cette thèse est l'aboutissement de plusieurs années d'efforts, mais elle est aussi le reflet des nombreuses personnes qui m'ont entourée et soutenue.

# Sommaire

I.	Introduction	
1.	Les dystrophies musculaires	1
1.1.	Structure et fonction du tissu musculaire	1
1.1.1.	Anatomie et organisation des muscles striés squelettiques	1
1.1.2.	Propriétés fonctionnelles des muscles : la contraction	3
1.2.	Principales dystrophies musculaires	4
1.2.1.	Les Dystrophies Musculaires des Ceintures (Limb-Girdle Muscular Dystrophy LGMD)	4
1.2.2.	Myopathie des muscles ondulants (Rippling Muscle Disease RMD)	7
1.2.3.	Dystrophie musculaire de Duchenne	8
1.2.4.	Dystrophie Facioscapulohumérale	10
2.	La réparation membranaire dans le contexte des dystrophies musculaires	11
2.1.	Mécanismes de réparation membranaire	12
2.2.	La machinerie de réparation membranaire	16
2.2.1.	L'anoctamine-5	16
2.2.2.	Les calpaïnes	17
2.2.3.	La cavéoline-3	18
2.2.4.	La dysferline	20
2.3.	Rôle des cellules auxiliaires dans la réparation membranaire	21
2.3.1.	Implication des macrophages dans la réponse inflammatoire et la réparation musculaire	21
2.3.2.	Contribution des FAPs à la régénération	23
2.3.3.	Les cellules auxiliaires dans les dystrophies musculaires	24
3.	Les annexines et leur rôle dans les Dystrophies Musculaires	25
3.1.	Structure moléculaire et propriétés biochimiques	26

3.2. Fonctions des ANX _____	29
3.3. Implication des ANX dans la réparation membranaire des cellules musculaires ____	34
3.3.1. Rôle des ANX dans la réparation membranaire _____	34
3.3.2. Altérations liées aux ANX dans les dystrophies musculaires _____	45
II. Objectifs	
III. Matériels et Méthodes	
1. Culture Cellulaire _____	51
1.1. Cellules musculaires _____	51
1.1.1. Lignées cellulaires _____	51
1.1.2. Entretien _____	53
1.1.3. Différenciation _____	54
1.2. Macrophages _____	54
1.2.1. Cellules _____	54
1.2.2. Entretien _____	54
1.2.3. Coculture avec cellules musculaires _____	55
2. Etude de la capacité des myoblastes à former des myotubes <i>in vitro</i> _____	55
3. RT-qPCR _____	56
3.1. Extraction et purification des ARN _____	56
3.2. Transcription inverse des ARN messagers _____	57
3.3. Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne _____	57
3.4. Analyse et quantification relative d'ARN messagers par la méthode du $\Delta\Delta Ct$ ____	58
4. Western-Blot _____	58
4.1. Extraction et préparation des extraits protéiques _____	58
4.2. Séparation et transfert des protéines _____	59
4.3. Identification des protéines d'intérêt _____	59
5. Expériences de stress de cisaillement _____	61
5.1. Etude de la capacité des cellules musculaires à réparer leur membrane suite à un dommage _____	61

5.2. Etude de la capacité des cellules musculaires à survivre à des contraintes mécaniques répétées _____	62
6. Analyse du trafic des annexines lors d'un dommage membranaire dans des cellules musculaires dystrophiques _____	64
6.1. Les plasmides _____	64
6.2. Transfection et expression des ANX couplées à des protéines fluorescentes par des myoblastes différenciés 24 heures _____	64
6.3. Expériences de rupture de la membrane plasmique par irradiation laser _____	65
7. Implication de cellules auxiliaires dans le processus de réparation _____	65
7.1. Courbe de croissance des macrophages _____	65
7.2. Détection des profils des macrophages _____	65
7.2.1. Induction des profils M1 et M2 pour l'analyse par Western-Blot _____	65
7.2.2. Induction des profils M1 et M2 pour l'analyse par immunocytofluorescence _____	65
7.3. Coculture _____	66
8. Statistiques _____	67
IV. Résultats	
1. Capacité myogénique des lignées cellulaires dystrophiques <i>in vitro</i> _____	69
2. Développement d'une nouvelle méthode d'étude de la réparation membranaire basée sur le stress de cisaillement _____	72
3. Quelles dystrophies musculaires résultent d'un défaut de réparation membranaire ? _____	74
3.1. Test de réparation membranaire _____	74
3.2. Analyse du taux de survie à 24h _____	77
4. Les dystrophies musculaires sont-elles associées à une dérégulation de l'expression des annexines ? _____	79
4.1. Expression des ANX dans les cellules musculaires contrôles et dystrophiques en condition basale _____	79
4.1.1. Expression des ARNm _____	79
4.1.2. Expression protéique _____	82

4.2. Présence d'une isoforme tronquée d'ANXA6 dans les myotubes dystrophiques humains _____	88
4.3. Influence des contraintes mécaniques sur l'expression des ANX _____	89
4.4. Quel est le comportement des ANX lors de dommages membranaires dans les cellules musculaires dystrophiques ? _____	92
4.4.1. ANXA1 _____	93
4.4.2. ANXA2 _____	101
4.4.3. ANXA4 _____	107
4.4.4. ANXA5 _____	114
4.4.5. ANXA6 _____	116
5. Des cellules auxiliaires sont-elles impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires ? _____	121
5.1. Macrophages RAW 264.7 _____	122
5.1.1. Sélection de marqueurs de polarisation des RAW 264.7 _____	122
5.1.2. Développement d'un modèle de coculture de macrophages et de cellules musculaires _____	124
5.1.3. Effet des macrophages sur la capacité de différenciation des myoblastes _____	126
5.2. Macrophages dérivés de moelle osseuse murine _____	129
V. Discussion	
1. Développement d'une nouvelle méthode dans l'étude de la réparation membranaire _____	134
2. La dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : une dysferlinopathie _____	136
3. La maladie des muscles ondulants 2: une cavéolinopathie _____	139
4. La dystrophie musculaire de Duchenne _____	140
5. La dystrophie facio-scapulo-humérale _____	142
6. L'implication des cellules auxiliaires dans le processus de réparation membranaire _____	143
7. Conclusion générale _____	145
VI. Perspectives	
VII. Bibliographie	



# Table des abréviations

AC : Anticorps

AHNAK : Neuroblast differentiation-associated protein

ANX : Annexine A

ANO5 : Anoctamine-5

ANXA1 : Annexine A1

ANXA2 : Annexine A2

ANXA4 : Annexine A4

ANXA5 : Annexine A5

ANXA6 : Annexine A6

ANXA7 : Annexine A7

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique Messenger

AAV : Adeno-Associated Virus ou virus adéno-associé

BMDM : Bone-Marrow Derived Macrophage ou es macrophage dérivé de la moelle osseuse

BSA : Bovin Serum Albumin ou albumine de sérum bovin

CAPN : Calpaïne

CAPN1 : Calpaïne 1

CAPN2 : Calpaïne 2

CAV3 : Cavéoline 3

CCL3 : Chemokine (C-C motif) Ligand 3 ou chimiokine ligand 3

CD163 : Cluster Differentiation 163 ou cluster de différenciation 163

CD206 : Cluster Differentiation 206 ou cluster de différenciation 206

COX-2 : Cyclooxygénase-2

DAPC : Dystrophin-Associated Protein Complex ou complexe de protéines associées à la dystrophine

DGC : Dystrophin Glycoprotein Complex ou complexe dystrophine-glycoprotéine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium ou milieu Eagle modifié de Dulbecco

DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ou solution tampon saline phosphate de Dulbecco

DPBS<sup>-/-</sup> : DPBS sans calcium ni magnésium

DPBS<sup>+/+</sup> : DPBS avec calcium et magnésium

DMD : Duchenne Muscular Dystrophy ou dystrophie musculaire de Duchenne

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor ou récepteur du facteur de croissance épidermique

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid ou acide éthylène glycol tétra-acétique

FAP : Fibro-Adipogenic Progenitor ou progéniteur fibro-adipogénique

FSHD : Facio-Scapulo-Huméral Dystrophy ou dystrophie facioscapulohumérale

GAPDH : Glycer-Aldehyde 3-Phosphate De-Hydrogenase OU glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFP : Green Fluorescent Protein ou protéine fluorescente verte

IL-4 : Interleukine-4

KMEM : « K » Modified Eagle Medium ou milieu Eagle modifié « K »

LGMD : Limb-Girble Muscular Dystrophy ou dystrophie musculaire des ceintures

LPS : Lipo-Poly-Saccharide

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

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MG53 : Mitsu-Gumin-53

MM : Miyoshi Myopathie ou myopathie de Miyoshi

MMP : Matrix Métallo-Proteinases ou métalloprotéases matricielles

MVB : MultiVesicular Body ou corps multivésiculaire

PA : Phosphatidique Acid ou acide phosphatidique

PLD1 : Phospholipase D<sub>1</sub>

PE : PhosphatidylEthanolamine

PLA2 : Phospholipase A<sub>2</sub>

PFT : Pore-Forming Toxin ou toxine formeuse de pores

PI : PhosphatidylInositol

PS : PhosphatidylSérine

PVDF : PolyVinylidene Fluoride ou polyfluorure de vinylidène

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase quantitative

RMD : Rippling Muscle Disease ou maladie des muscles ondulants

ROI : Region Of Interest ou région d'intérêt

RT : Reverse-Transcriptase ou transcriptase inverse

RT-qPCR : Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate ou dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ou électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS

SLO : StreptoLysine-O

SMA : SphingoMyélinase Acide

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBST : Tris-Buffered Solution with Twen ou solution saline tamponnée au Tris avec du Tween

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance vasculaire endothélial



# I. Introduction

## 1. Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires représentent un groupe hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une faiblesse progressive et une dégénérescence des muscles, affectant l'ensemble des muscles du corps humain. Ces maladies peuvent toucher trois principaux types de muscles : les muscles lisses, qui entourent les organes internes et les vaisseaux sanguins ; le muscle strié cardiaque, qui sont responsables des contractions rythmiques du cœur ; et les muscles striés squelettiques, reliés aux os par les tendons, qui sont impliqués dans la locomotion et sont sous contrôle volontaire. Ces derniers sont les plus fréquemment affectés dans les dystrophies musculaires, ce qui a des conséquences significatives sur la mobilité et la qualité de vie des patients.

### 1.1. Structure et fonction du tissu musculaire

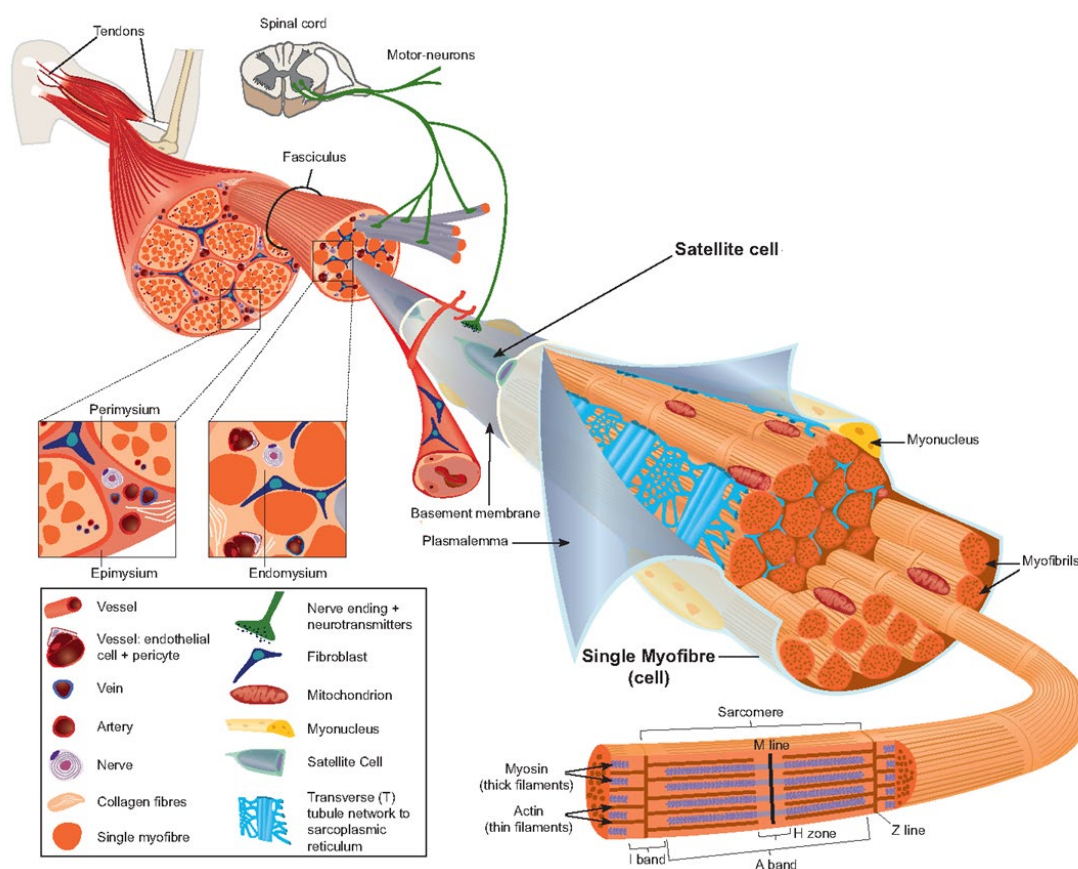
#### 1.1.1. Anatomie et organisation des muscles striés squelettiques

Les muscles striés squelettiques sont des organes complexes et multifonctionnels constitués principalement de fibres musculaires, également appelées myocytes, cellules allongées et multinucléées. Chaque fibre musculaire est entourée par une fine couche de tissu conjonctif appelée endomysium, tandis que les faisceaux de fibres sont quant à eux enveloppés par le périmysium. Ces faisceaux sont regroupés pour former l'ensemble du muscle, qui est lui-même recouvert d'une couche extérieure de tissu conjonctif appelée épimysium. Cette organisation hiérarchique assure non seulement l'intégrité structurelle du muscle, mais facilite également la transmission des forces générées lors de la contraction.

Au sein de chaque fibre musculaire, on trouve des myofibrilles, des structures cylindriques allongées qui s'étendent sur toute la longueur de la cellule (Figure 1). Ces myofibrilles sont constituées de myofilaments fins (actine) et épais (myosine), organisés en unités répétitives appelées sarcomères (Figure 1 et 2). Les sarcomères constituent les unités fonctionnelles à la base de la contraction musculaire. Ils sont caractérisés par une disposition alternant bandes claires (bandes isotropes, ou bandes I) et bandes sombres (bandes anisotropes, ou bandes A), donnant aux muscles striés squelettiques leur apparence striée distincte au microscope. Les sarcomères sont également reliés entre eux au niveau des stries Z, composés principalement d'actinine- $\alpha$ , myotiline et téléthonine, qui servent de point d'ancrage pour les filaments d'actine.

La myosine, quant à elle, est liée au strie M, situé au centre du sarcomère. La titine, une protéine géante, s'étend du strie Z au strie M, jouant un rôle crucial dans la stabilité et l'élasticité des myofibrilles, en aidant les sarcomères à revenir à leur longueur initiale de repos (Figure 2).

L'organisation des muscles striés squelettiques ne se limite pas à ces structures cellulaires. Le muscle est également riche en vaisseaux sanguins et en nerfs, qui assurent respectivement l'apport en oxygène et en nutriments ou la coordination de la contraction musculaire. Le système nerveux somatique contrôle les muscles striés squelettiques via les motoneurones, dont les axones se terminent en plaques motrices sur les fibres musculaires, initiant la contraction via la libération d'acétylcholine.



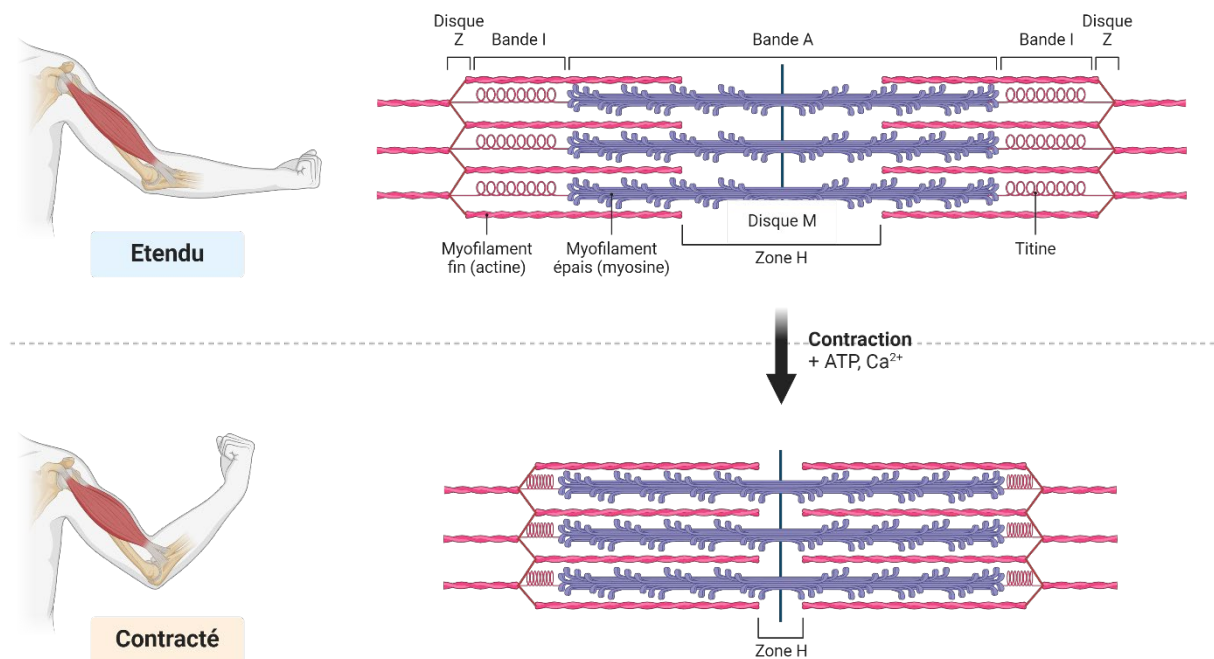
**Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation générale d'un muscle strié squelettique à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire**

Trois couches de tissu conjonctif peuvent être distinguées dans le muscle squelettique. L'épimysium enveloppe tout le muscle. Le périmysium enveloppe les fibres musculaires individuelles en faisceaux. L'endomysium est situé entre les fibres et entoure les fibres musculaires individuelles. À l'intérieur de la myofibre, la principale source intracellulaire de calcium nécessaire à la contraction musculaire est le réticulum sarcoplasmique, qui est connecté aux tubules transverses (T), entourant les sarcomères. Les cellules satellites nécessaires à la régénération musculaire sont situées entre la membrane basale et le sarcolemme de la myofibre.

Image tirée de Tajbaksh, 2009

### 1.1.2. Propriétés fonctionnelles des muscles : la contraction

La contraction musculaire repose sur une interaction hautement coordonnée entre les myofilaments d'actine et de myosine au sein des sarcomères. Ce processus est initié par un potentiel d'action nerveux qui se propage le long du sarcomère et pénètre dans la fibre via les tubules transverses (tubules-T) (Figure 3). Ce signal électrique déclenche la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique.

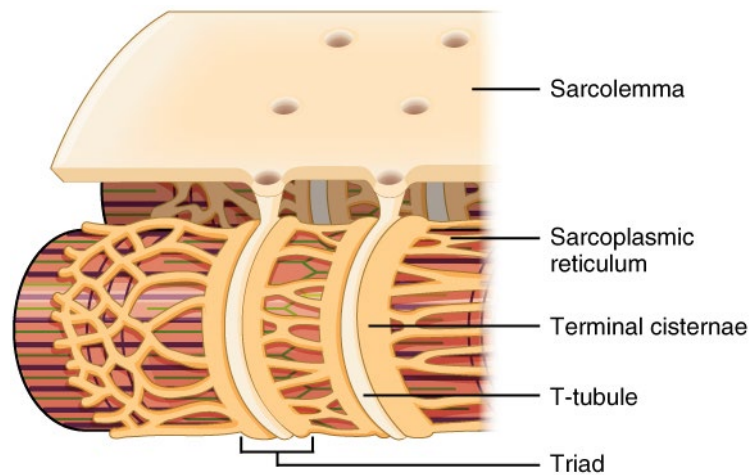


#### Figure 2 : Représentation schématique de la contraction du sarcomère

Le sarcomère s'organise longitudinalement. Il comprend des filaments d'actine (fins) et de myosine (épais), ainsi que des protéines directement impliquées dans le processus de contraction. Il est délimité par les lignes Z et comprend une bande A accompagnée de deux bandes I. La contraction est déclenchée par la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , tandis que l'ATP permet aux filaments d'actine de glisser sur les filaments de myosine, provoquant ainsi le raccourcissement des sarcomères, conduisant au raccourcissement du muscle à l'échelle tissulaire.

Image créée avec BioRender.com

Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la troponine, une protéine associée au filament d'actine, ce qui entraîne un changement de conformation de la tropomyosine. Ce changement expose les sites de liaison de la myosine sur l'actine, permettant à la tête de myosine, associée à une molécule d'ADP et de phosphate inorganique, de se lier à l'actine. La myosine effectue alors un mouvement de bascule, entraînant le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine, raccourcissant ainsi le sarcomère. Le raccourcissement du sarcomère entraîne le raccourcissement du muscle, sa contraction et la production de la force (Figure 2).



**Figure 3 : Représentation schématique du réticulum sarcoplasmique et des tubules-T**

Le sarcolemme forme des invaginations sur toute la surface des fibres musculaires, créant des canaux transversaux, les tubules-T, qui pénètrent profondément entre les myofibrilles. Les tubules-T, situés de part et d'autre des stries Z des sarcomères, jouent un rôle clé dans la propagation rapide de la dépolarisation du sarcolemme, déclenchée par la stimulation d'un motoneurone au niveau de la jonction neuromusculaire.

Image tirée d'OpenStax - <https://cnx.org/>, CC BY 4.0

## 1.2. Principales dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence progressive des muscles striés squelettiques, conduisant à une perte fonctionnelle. Ces pathologies héréditaires résultent de mutations des gènes responsables de la production de protéines essentielles au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du tissu musculaire. La transmission peut être autosomique dominante, autosomique récessive ou liée au chromosome X.

### 1.2.1. Les Dystrophies Musculaires des Ceintures (**L**imb-**G**irdle **M**uscular **D**ystrophy **L**GMD)

#### *Présentation générale et sous-types*

Historiquement, la classification et la nomenclature des maladies ont souffert d'un manque de systématicité, les règles établies échouant à associer de manière claire les symptômes, les signes cliniques et les organes affectés à une pathologie spécifique. Cette absence de rigueur a conduit à des confusions et, parfois, à une classification erronée de certaines maladies (la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la maladie des muscles ondulants (RMD) et la myopathie myofibrillaire, anciennement LGMD1B, LGMD1C et LGMD2R). L'identification de nouvelles



pathologies liée aux progrès des techniques de biologie moléculaire et l'identification en 2016 de la LGMD2Z a, en outre, soulevé des interrogations quant à la nomenclature des maladies nouvellement identifiées. C'est ainsi qu'est intervenu en 2017 un consortium d'experts pour revoir la définition et harmoniser la classification des LGMD (Tableau 1 ; Straub et al., 2018). On estime que 1 à 3 individus sur 100 000 sont touchés par une des pathologies de cette famille.

### *Signes cliniques*

Les LGMD forment un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires, qui sont caractérisées par une faiblesse musculaire progressive, prédominant au niveau des muscles proximaux (ceintures scapulaires et pelviennes), comme stipulé dans la nouvelle définition.

Les arguments paracliniques incluent une élévation des niveaux de créatine kinase sérique (CPK), les changements dégénératifs (atrophie musculaire, infiltration adipeuse) visibles à l'imagerie médicale (IRM), les anomalies de type myopathique à l'EMG et les anomalies de type dystrophique (nécrose/régénération, involution fibroadipeuse) à l'examen histopathologique de la biopsie musculaire.

### *Mécanismes moléculaires impliqués*

Les LGMD sont causées par des mutations génétiques qui affectent des protéines cruciales pour le maintien de l'intégrité structurelle du muscle. Ces protéines, généralement de structure mais parfois à activité enzymatique, sont associées à la matrice extracellulaire, au sarcolemme, au sarcomère, au réticulum endoplasmique, à l'enveloppe nucléaire ou encore au cytosquelette. Les mutations de ces protéines conduisent à une dégénérescence musculaire progressive notamment due à la fragilité accrue de la membrane plasmique (LGMD liées à une mutation sur les sarcoglycanes ; Blain & Straub, 2011; Hack et al., 1998) ou à une altération des mécanismes de réparation du sarcolemme (LGMDR2 liée à une mutation sur la dysferline ; Bansal et al., 2003).

Le mode de transmission génétique permet la classification des LGMD en sous-catégorie : LGMD D (autosomique dominant) et LGMD R (autosomique récessif).

Old name	Gene	Proposed new nomenclature	Reason for exclusion
LGMD 1A	<i>Myot</i>	Myofibrillar myopathy	Distal weakness
LGMD 1B	<i>LMNA</i>	Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)	High risk of cardiac arrhythmias; EDMD phenotype
LGMD 1C	<i>CAV3</i>	Rippling muscle disease	Main clinical features rippling muscle disease and myalgia
LGMD 1D	<i>DNAJB6</i>	LGMD D1 DNAJB6-related	
LGMD 1E	<i>DES</i>	Myofibrillar myopathy	Primarily false linkage; distal weakness and cardiomyopathy
LGMD 1F	<i>TNP03</i>	LGMD D2 TNP03-related	
LGMD 1G	<i>HNRNPDL</i>	LGMD D3 HNRNPDL-related	
LGMD 1H	?	Not confirmed	False linkage
LGMD 1I	<i>CAPN</i>	LGMD D4 calpain3-related	
LGMD 2A	<i>CAPN</i>	LGMD R1 calpain3-related	
LGMD 2B	<i>DYSF</i>	LGMD R2 dysferlin-related	
LGMD 2C	<i>SGCG</i>	LGMD R5 $\gamma$ -sarcoglycan-related <sup>a</sup>	
LGMD 2D	<i>SGCA</i>	LGMD R3 $\alpha$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2E	<i>SGCB</i>	LGMD R4 $\beta$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2F	<i>SGCD</i>	LGMD R6 $\delta$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2G	<i>TCAP</i>	LGMD R7 telethonin-related	
LGMD 2H	<i>TRIM32</i>	LGMD R8 TRIM 32-related	
LGMD 2I	<i>FKRP</i>	LGMD R9 FKRP-related	
LGMD 2J	<i>TTN</i>	LGMD R10 titin-related	
LGMD 2K	<i>POMT1</i>	LGMD R11 POMT1-related	
LGMD 2L	<i>ANO5</i>	LGMD R12 anoctamin5-related	
LGMD 2M	<i>FKTN</i>	LGMD R13 Fukutin-related	
LGMD 2N	<i>POMT2</i>	LGMD R14 POMT2-related	
LGMD 2O	<i>POMGnT1</i>	LGMD R15 POMGnT1-related	
LGMD 2P	<i>DAG1</i>	LGMD R16 $\alpha$ -dystroglycan-related	
LGMD 2Q	<i>PLEC</i>	LGMD R17 plectin-related	
LGMD 2R	<i>DES</i>	myofibrillar myopathy	Distal weakness
LGMD 2S	<i>TRAPPC11</i>	LGMD R18 TRAPPC11-related	
LGMD 2T	<i>GMPPB</i>	LGMD R19 GMPPB-related	
LGMD 2U	<i>ISPD</i>	LGMD R20 ISPD-related	
LGMD 2V	<i>GAA</i>	Pompe disease	Known disease entity, histological changes
LGMD 2W	<i>PINCH2</i>	PINCH-2 related myopathy	Reported in one family
LGMD 2X	<i>BVES</i>	BVES related myopathy	Reported in one family
LGMD 2Y	<i>TOR1AIP1</i>	TOR1AIP1 related myopathy	Reported in one family
LGMD 2Z	<i>POGLUT1</i>	LGMD R21 POGLUT1-related	
Bethlem myopathy recessive	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	LGMD R22 collagen 6-related	
Bethlem myopathy dominant	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	LGMD D5 collagen 6-related	
Laminin $\alpha$ 2-related muscular dystrophy	<i>LAMA2</i>	LGMD R23 laminin $\alpha$ 2-related	
POMGNT2-related muscular dystrophy	<i>POMGNT2</i>	LGMD R24 POMGNT2-related	

<sup>a</sup> Sarcoglycan-related LGMDs rationalised based on order of gene discovery.

### Tableau 1 : Tableau référençant les différentes pathologies LGMD à la lumière de la nouvelle définition adoptée

Tableau issu de Straub et al., 2018

#### La LGMDR2

LGMDR2, anciennement connue sous le nom de LGMD2B, est causée par des mutations récessives dans le gène *DYSF* situé sur le chromosome 2p13.2, codant pour la dysferline. Du fait de la nature du gène muté, la LGMDR2 fait également partie des dysferlinopathies, groupe dans lequel est également classée la myopathie distale de Miyoshi de type 1 (MM1).

Les patients atteints de LGMDR2 et MM1 présentent une faiblesse musculaire qui débute généralement à l'adolescence ou au début de l'âge adulte (98% dès 10 ans selon Audhya et al., 2022). La MM1 touche principalement les muscles distaux tandis que la LGMDR2 affecte surtout les muscles proximaux. Elles épargnent généralement le muscle cardiaque.

La dysferline, première protéine identifiée dans le mécanisme de réparation membranaire (Bansal et al., 2003; Han, 2011), joue un rôle crucial dans la réparation des fibres musculaires endommagées. Dans le contexte de la LGMDR2, le déficit en dysferline empêche la réparation du sarcolemme endommagé, ce qui conduit à la mort des cellules musculaires et à la dégénérescence du tissu musculaire. Nous évoquons la dysferline de manière plus exhaustive dans la partie qui lui est dédiée (cf. Introduction, partie 2.2.4.).

### **1.2.2. Myopathie des muscles ondulants (Rippling Muscle Disease RMD)**

#### *Présentation générale et sous-types*

Désormais exclue des LGMD dans la classification de 2018 (Tableau 1), la RMD regroupe des maladies musculaires caractérisées par une faiblesse musculaire progressive, affectant principalement les muscles proximaux notamment les quadriceps. Parmi ces maladies, certaines ne sont pas héréditaires mais immuno-médiées, et, en cela, ne sont pas des dystrophies musculaires (Rashed & Milone, 2025). Ces pathologies ne seront donc pas discutées dans ce paragraphe.

#### *Signes cliniques*

Les patients atteints de RMD présentent des contractions musculaires déclenchées mécaniquement, sans activité électrique, ce qui se traduit par des ondulations visibles à la surface des muscles. Ces contractions, dites "silencieuses", sont souvent accompagnées de crampes musculaires, de douleurs, et d'une hypertrophie des muscles. La transmission est principalement autosomique dominante, bien que des cas récessifs aient été documentés. La présentation clinique peut varier, avec certains patients montrant des faiblesses musculaires dès l'enfance, et d'autres développant des symptômes plus tardifs.

#### *Mécanismes moléculaires impliqués*

Les mécanismes sous-jacents des RMD sont mal connus. La RMD de type 2 est toutefois causée par des mutations dans le gène *CAV3*, qui code pour la caveoline-3, une protéine essentielle au maintien de l'intégrité du sarcolemme des cellules musculaires soumises à des contraintes mécaniques (Parton et al., 2018). Ces mutations peuvent provoquer une perte d'expression de la caveoline-3, entraînant une instabilité membranaire et une hyperexcitabilité musculaire.

### *La RMD2*

La RMD2, autrefois connue sous le nom de LGMD1C, résulte de mutations hétérozygotes dans le gène *CAV3*. Du fait de la nature du gène muté, la RMD2 fait également partie de la famille des cavéolinopathies, dans laquelle figurent également des maladies liées à des mutations dans le gène codant pour la cavine-1.

La RMD2, généralement transmise de manière autosomique dominante, se manifeste par des contractions musculaires induites mécaniquement, souvent sans activité électrique associée, qui se propagent aux fibres musculaires voisines. Bien que la transmission dominante soit la plus courante, des cas récessifs ont également été documentés. Cette maladie, qui touche principalement les muscles proximaux, se manifeste dès l'enfance ou à l'âge adulte, mais n'est pas associée à des complications cardiaques. La reclassification de cette dystrophie en tant que RMD2 lors du 229th workshop du Centre Européen Neuromusculaire (European Neuromuscular Centre ENMC) reflète une compréhension accrue des mécanismes moléculaires spécifiques, différenciant cette maladie des LGMD traditionnelles.

Nous évoquons la *CAV3* de manière plus exhaustive dans la partie qui lui est dédiée (cf. Introduction, partie 2.2.3.).

### **1.2.3. Dystrophie musculaire de Duchenne**

#### *Présentation générale et sous-types*

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique récessive liée au chromosome X, qui touche principalement les garçons, les filles conductrices pouvant être parfois symptomatiques. C'est la forme la plus fréquente et la plus sévère de dystrophie musculaire, avec une prévalence estimée à 7,1 pour 100 000 hommes. On peut préciser que l'incidence à la naissance a été évaluée à 19,8 pour 100 000 naissances masculines vivantes (Crisafulli et al., 2020)

#### *Signes cliniques*

La DMD est caractérisée par une dégénérescence progressive des muscles striés squelettiques, lisses et cardiaques. Les premiers symptômes apparaissent généralement entre 2 et 5 ans, avec une perte de la marche autonome vers l'âge de 10-12 ans, et une espérance de vie rarement au-delà de la troisième décennie. Les manifestations cliniques incluent une faiblesse musculaire progressive, une hypertrophie des mollets, des troubles respiratoires nécessitant une ventilation assistée, et des cardiomyopathies (cardiomyopathie dilatée, arythmies et insuffisance cardiaque congestive) (Bez Batti Angulski et al., 2023).

Parmi les sous-types, la dystrophie de Becker, une forme plus légère, résulte de mutations conduisant à une présence et fonction partielle de la protéine, contrairement à la DMD dont les mutations entraînent son absence.

### *Mécanismes moléculaires impliqués*

La DMD est causée par des mutations du gène *DMD*, situé sur le chromosome X, qui code pour la dystrophine, une protéine essentielle à la stabilité du sarcolemme (Hoffman et al., 1987). La dystrophine se localise sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules musculaires et forme un lien crucial entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire (MEC) via le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC), également appelé le complexe de protéines associées à la dystrophine (DAPC) (Ervasti & Campbell, 1993). Ce complexe comprend des protéines transmembranaires telles que les sarcoglycanes et la  $\beta$ -dystroglycane, qui sont essentielles pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique (Ervasti & Campbell, 1991). L'absence de dystrophine, due aux mutations du gène *DMD*, entraîne une rupture de cette connexion mécanique, rendant le sarcolemme vulnérable aux dommages lors des contractions répétées. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol conduit à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Cela perturbe l'homéostasie calcique et déclenche une cascade de signalisation qui conduit à la dégénérescence des fibres musculaires en activant des enzymes telles que les calpaïnes (CAPN), qui dégradent les protéines du cytosquelette (Gailly et al., 2007; Mareedu et al., 2021). De plus, les perturbations du complexe DGC affectent la distribution de protéines associées, ce qui aggrave encore la perte de fonction musculaire. En effet, il a été montré que des myoblastes C2C12 déficient à la dystrophine présentaient des défauts de migration résultant d'une mécanotransduction aberrante. Cette dernière est liée à une transmission altérée de la tension des adhésions focales, due notamment à une localisation altérée de la Yes-associated Protein (YAP) (Ramirez et al., 2022). La neuronal nitric oxide synthase (nNOS), normalement recrutées par le DGC, est également mal localisée lorsque le complexe DGC est perturbé (Crosbie et al., 1998). Bien que dans un premier temps, il a été conclu que cette localisation altérée ne participait pas significativement à la pathogenèse, il a été démontré par la suite dans des modèles de souris transgéniques que la perte de nNOS dérégulait les processus de régénération musculaire, aggravait l'inflammation et inhibait l'hypertrophie musculaire compensatrice, indicateurs d'une augmentation des dommages musculaires induits (Froehner et al., 2015). La perte de fonction musculaire est exacerbée par la fibrose et l'infiltration graisseuse secondaire résultant de la mort des myocytes (Tsuda, 2018). Enfin, il a été rapporté une désorganisation des microtubules et une surproduction de radicaux libres, augmentant le

stress oxydatif et les dommages mitochondriaux (Kyrychenko et al., 2015). Le dysfonctionnement mitochondrial dans des modèles de souris mdx a été relié à un défaut de réparation des myofibres endommagées (Vila et al., 2017). En effet, les mitochondries, en tamponnant la surcharge de  $Ca^{2+}$ , voient leurs fonctions s'atténuer avant d'être éliminées par autophagie. La perte des mitochondries nuit à la réparation des fibres musculaires, aggrave la surcharge en  $Ca^{2+}$ , contribuant à la nécrose des fibres musculaires dystrophiques.

#### **1.2.4. Dystrophie Facioscapulohumérale**

##### *Présentation générale et sous-type*

La dystrophie facioscapulohumérale (FSHD) est une myopathie autosomique dominante qui affecte principalement les muscles du visage, de la ceinture scapulaire et des membres supérieurs. Elle est l'une des dystrophies musculaires les plus courantes, avec une prévalence estimée à environ 4,5 sur 100 000 individus. Les premiers symptômes apparaissent généralement à l'adolescence ou au début de l'âge adulte, bien que des formes infantiles plus sévères puissent survenir. La FSHD est divisée en deux sous-types principaux : FSHD1, liée à une contraction du locus D4Z4 sur le chromosome 4 (Wijmenga et al., 1992) et FSHD2, liée à des mutations dans des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (Lemmers et al., 2012).

##### *Signes cliniques*

Cliniquement, la FSHD se manifeste par une faiblesse progressive puis une atrophie des muscles faciaux, scapulaires et huméraux, souvent asymétrique. D'autres muscles, comme ceux du tronc et des jambes, peuvent être touchés à un stade plus avancé. La progression est généralement lente, mais elle peut conduire à une perte significative de la fonction motrice et à des atteintes respiratoires chez certains patients.

##### *Mécanismes moléculaires impliqués*

Les FSHD sont causées par la dérégulation épigénétique de la répétition polymorphique D4Z4 sur le chromosome 4q (Van Der Maarel et al., 2012; Wijmenga et al., 1992). Cette région est normalement constituée de fragments d'ADN répétés, chacun mesurant 3,3 kb. Un individu sain présente normalement entre 11 et 150 répétitions.

Dans la forme la plus courante qu'est la FSHD1, cette dérégulation est due à une réduction du nombre d'unités répétées de D4Z4 (Van Deutekom et al., 1993). Pour la forme plus rare qu'est la FSHD2, la dérégulation de D4Z4 résulte de dysfonctionnements des répresseurs de la chromatine D4Z4. Chez 85 % des personnes atteintes de FSHD2, ces altérations sont associées

à des mutations dans le gène SMCHD1 (Lemmers et al., 2012), tandis que pour les autres, des anomalies sont observées dans les gènes DNMT3B (Van Den Boogaard et al., 2016) ou LRIF1 (Hamanaka et al., 2020).

Cette dérégulation entraîne l'activation aberrante de DUX4, conduisant à une expression anormale de gènes germinaux, de médiateurs immunitaires et de voies apoptotiques, perturbant le métabolisme des acides ribonucléiques (ARN) et des protéines, ce qui entraîne une myopathie progressive (Feng et al., 2015; Geng et al., 2012; Knopp et al., 2016).

En 2020, une étude est parue établissant un lien entre la FSHD et un déficit en réparation membranaire *in vivo* sur des myofibres murines ainsi que *in vitro* dans des cellules musculaires humaines (Bittel et al., 2020).

### *La FSHD1*

Dans la forme FSHD1, la contraction des répétitions D4Z4 entraîne une hypométhylation de l'ADN et une expression aberrante de gènes proches, dont DUX4, FRG1 et FRG2. Le gène FRG2 a été identifié comme un candidat potentiel impliqué dans la pathogenèse de la FSHD, en raison de son expression spécifique dans les myoblastes des patients atteints de FSHD, contrairement aux témoins sains où il est normalement silencieux. FRG2 est localisé à environ 37 kb en amont de la région D4Z4 et son expression anormale pourrait perturber la myogenèse.

## **2. La réparation membranaire dans le contexte des dystrophies musculaires**

La réparation de la membrane plasmique est un processus physiologique essentiel aux cellules soumises à des contraintes mécaniques. L'influx initial de  $Ca^{2+}$ , du milieu extracellulaire (d'une concentration millimolaire) vers le milieu intracellulaire (concentration micromolaire), déclenche le mécanisme de réparation membranaire du fait de l'activation de protéines dépendantes du calcium et la fermeture rapide de la rupture (Horn & Jaiswal, 2018; Moe et al., 2015). *In vitro*, une cellule endommagée, qui est non réparée en moins de deux minutes, finit par mourir (Bouter et al., 2011; Carmeille et al., 2015, 2016). Des processus ultérieurs, impliquant la suppression de l'excès de membrane au site de rupture nouvellement réparé, permettent la restauration complète de l'homéostasie membranaire. Toutefois, les études à ce sujet sont peu nombreuses. Nous parlons de l'implication de cellules auxiliaires dans ce processus plus loin dans ce chapitre (chapitre I, partie 2.3.)

## 2.1. Mécanismes de réparation membranaire

Les cellules musculaires sont exposées à un environnement stressant et sont hautement sujettes aux dommages membranaires (McNeil & Khakee, 1992), faisant de la réparation membranaire, un processus essentiel dans la vie de la cellule.

Des observations réalisées sur des liposomes, des membranes artificielles (membranes smectiques) et des globules rouges ont mis en évidence leur capacité d'autoréparation spontanée, ou *self-sealing* (Figure 4) (Gozen & Dommersnes, 2014; Hoffman, 1992; McNeil & Steinhardt, 2003). Cette capacité est limitée aux ruptures de l'ordre du nanomètre chez ces modèles dépourvus de noyau et d'organelles. En effet, le réarrangement des lipides membranaires, provoqué par l'hydrophobie de leur queue et l'hydrophilie de leur tête, génère une tension de surface qui favorise le rapprochement des bords lésés et le scellement de la rupture.

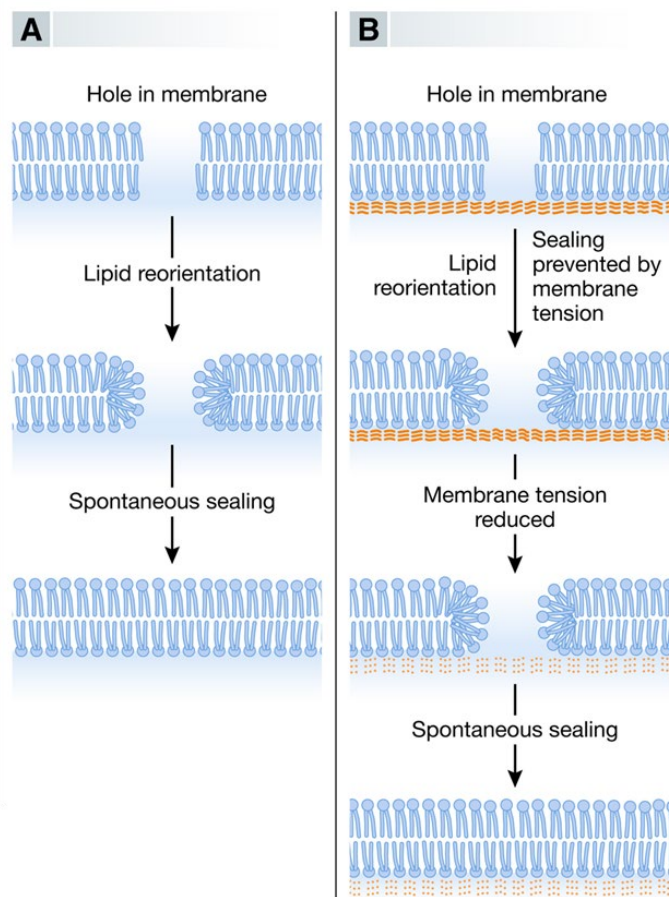
Dans le contexte biologique d'une cellule eucaryote, l'adhésion de la membrane plasmique à un cytosquelette sous-jacent génère une tension membranaire qui empêche un mécanisme passif pour tout dommage supérieur au nanomètre (Cooper & Mcneil, 2015; Gozen & Dommersnes, 2014; McNeil & Kirchhausen, 2005).

In vitro, par des expériences d'ablation laser, il a été déterminé que le temps nécessaire à la fermeture d'une lésion était d'environ 1 minute (Carneille et al., 2016; Defour et al., 2014). Différents mécanismes sont impliqués dans la réparation membranaire (Cooper & Mcneil, 2015; Zhen et al., 2021). Ils peuvent coexister et dépendent de la taille du dommage, de son origine ou de la nature de la cellule où se produit la lésion. On peut ainsi citer le modèle de réduction de la tension membranaire, de l'exocytose/endocytose, « membrane shedding » ou ectocytosis et du patch lipidique. L'objectif de ce chapitre est donc de dresser un tableau général des processus de réparation membranaire.

### *Réduction de la tension*

La tension du cytosquelette cortical constitue un obstacle à la réparation des dommages de la membrane plasmique. Ainsi, la réduction de cette tension pourrait faciliter ce processus. Deux mécanismes ont été proposés : l'ajout de membrane par exocytose de vésicules intracellulaires (Togo et al., 2000) et le réarrangement du cytosquelette par la dépolymérisation de l'actine corticale (McNeil & Steinhardt, 2003) (Figure 4).





**Figure 4 : Représentation des modèles de réparation par self-sealing et par réduction de la tension**

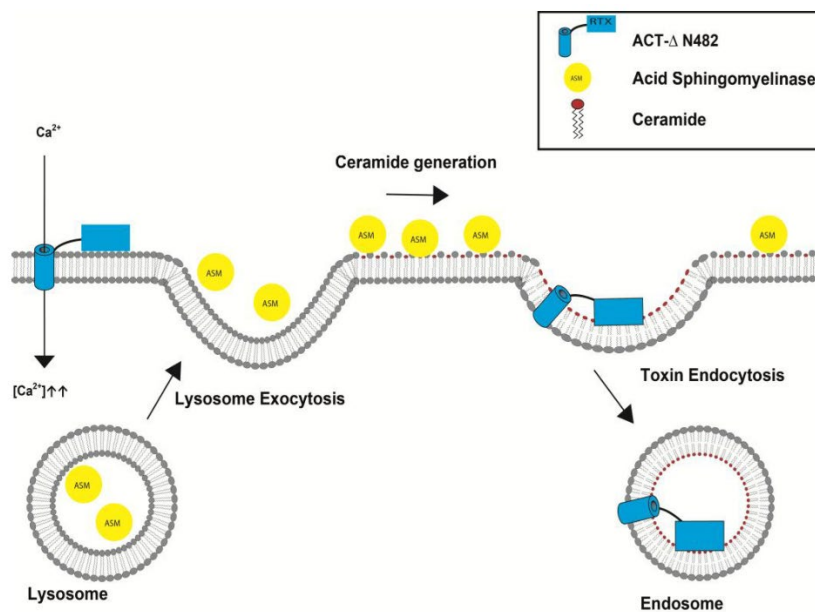
(A) L'exposition des parties hydrophobes des queues lipidiques au milieu aqueux induit un réarrangement des lipides à la périphérie de la lésion et à scellement de celle dernière. Dans une cellule toutefois, le cytosquelette cortical exerce une force opposée à cette tension de surface, ce qui peut empêcher la réparation spontanée. (B) La tension exercée par le cytosquelette cortical peut être réduite pour faciliter ce processus. Ce mécanisme repose sur l'exocytose ou la dépolymérisation de l'actine corticale. Ces deux processus permettent d'augmenter la tension de surface et de diminuer la résistance du cytosquelette, facilitant ainsi la fermeture de la rupture.

Image tirée de Zhen et al., 2021

### Modèle de l'exocytose/endocytose

Ce modèle a été majoritairement proposé pour expliquer la réponse cellulaire aux pores formés par des toxines bactériennes (Idone et al., 2008; Tam et al., 2010). Lorsqu'un dommage est induit, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne une exocytose des lysosomes, libérant leur contenu, incluant la sphingomyélinase acide (SMA), dans le milieu extracellulaire. Cette enzyme hydrolyse la sphingomyéline présente dans le feuillet externe de la membrane plasmique, générant des céramides, dont la structure provoque une invagination de la membrane (Holopainen et al., 2000). Cette invagination favorise ensuite l'endocytose de la zone endommagée médiée par des cavéolines ou des clathrines (Corrotte et al., 2013) (Figure 5). Il a été rapporté que les complexes ESCRT, ainsi que plusieurs protéines Rab, notamment Rab-5 et Rab-11, jouent un rôle crucial dans la régulation de cette endocytose (Los et al., 2011). Par ailleurs, des protéases lysosomales telles que les cathepsines B, D, et L, qui sont également libérées durant ce processus, semblent

participer à l'autorégulation de la réparation pour éviter d'endommager davantage la cellule (Castro-Gomes et al., 2016). En effet, les cathepsines B et L participent activement à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique, permettant ainsi à la SMA d'agir efficacement sur la membrane plasmique. La cathepsine D joue quant à elle un rôle régulateur négatif en contrôlant l'activité SMA pour éviter une production excessive de céramides, potentiellement délétères en cas de surabondance (Castro-Gomes et al., 2016).



**Figure 5 : Représentation schématique du modèle d'exocytose/endocytose médiée par la sphingomyélinase acide (SMA) lors de la formation de pores causée par la toxine ACT mutante**

Les pores formés par la toxine mutante ACT-ΔN482 entraînent l'entrée massive de  $Ca^{2+}$ . Cette élévation de  $Ca^{2+}$  déclenche l'exocytose de vésicules lysosomales, libérant de la SMA dans le milieu extracellulaire. La SMA hydrolyse les sphingomyélines présentes dans le feuillet externe de la membrane, produisant des céramides. Cette portion de membrane riche en céramides induit une courbure membranaire qui provoque l'invagination de la membrane lésée et conduit à l'endocytose des toxines insérées dans la membrane. Ce processus, indépendant de l'ATP, permet l'élimination des complexes protéiques et la réparation de la membrane plasmique.

Image tirée de Etxaniz et al., 2018

#### Modèle du « membrane shedding » ou ectocytosis

Le modèle du "membrane shedding" a été initialement proposé pour expliquer l'élimination des pores membranaires causés par des toxines bactériennes (Babiychuk et al., 2009, 2011; Walev et al., 2000). Ce modèle suggère que la zone de la membrane endommagée est isolée et expulsée sous forme de vésicules appelées « toxosomes » ou « ectosomes » (Atanassoff et al., 2014). Des

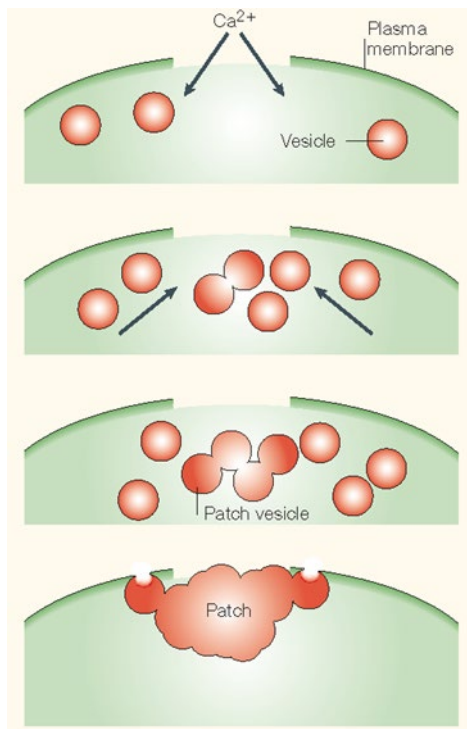
protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , telles que le complexe ESCRT-III, VPS4B, ALG-2, ALIX, ainsi que des sphingomyélinases neutres, jouent un rôle clé dans la formation et la fermeture d'une courbure membranaire autour de la lésion, entraînant ainsi la formation d'un bourgeon (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014; Walev et al., 2000).

### *Modèle du patch lipidique*

Le modèle du « patch » lipidique est un mécanisme de réparation membranaire qui a été initialement proposé à partir d'observations faites sur les ovocytes d'oursin endommagés mécaniquement (Terasaki et al., 1997). Ce modèle propose ainsi que l'augmentation du calcium intracellulaire entraîne le recrutement et l'agrégation de vésicules intracellulaires au site de la lésion, formant ainsi un « patch » qui fusionne ensuite avec la membrane plasmique endommagée pour sceller la déchirure (Davenport et al., 2016; McNeil et al., 2000; Terasaki et al., 1997) (Figure 6).

Les lysosomes ont été initialement identifiés comme les principales vésicules impliquées dans ce processus de réparation (McNeil et al., 2000; Reddy et al., 2001). On sait toutefois aujourd'hui qu'ils ne sont pas plus recrutés que d'autres vésicules. En effet, il a été rapporté que d'autres types de vésicules membranaires et d'organelles peuvent également participer à la réparation selon le type cellulaire et la nature de la lésion, tels que les endosomes (Eddleman et al., 1998), les enlargeosomes (Borgonovo et al., 2002) et les mitochondries (Sharma et al., 2012).

Un aspect intéressant du modèle du « patch » est la question de l'élimination de l'excès de membrane résultant de la fusion/agrégation des vésicules. Il a été proposé l'existence d'un phénomène appelé « explodosis » où la face extracellulaire du patch se rompt, permettant ainsi à la membrane de retrouver une structure en bicouche unique (Davenport et al., 2016). Cependant, de plus en plus d'études se penchent sur le rôle éventuel des macrophages pour l'absorption de cet excès membranaire. Cela sera discuté plus en détail dans la section correspondante (cf. Introduction, partie 2.3.1.).



**Figure 6 : Représentation schématique du modèle de réparation du « patch » lipidique**

*Ce modèle propose que lors d'une rupture micrométrique dans la membrane plasmique, l'influx de  $Ca^{2+}$  déclenche le recrutement de vésicules vers le site de la rupture. Les vésicules interagissent entre elles pour former un agrégat vésiculaire, appelé « patch ». Ce patch fusionne ensuite avec la membrane endommagée, colmatant la déchirure.*

*Image tirée de Mcneil & Kirchhausen, 2005*

## 2.2. La machinerie de réparation membranaire

A ce jour, de nombreuses protéines ont été identifiées comme composant la machinerie de réparation membranaire (Croissant et al., 2021). La plupart d'entre elles ont une fonction calcium-dépendante et sont activées par l'influx calcique lié à la rupture membranaire. On peut citer parmi ces protéines AHNAK, les ANX, les ferlines, les complexes ESCRT, la MG53, les protéines S100, les SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Attachment protein REceptor), la sphingomyélinase acide et les synaptotagmines (Barthélémy et al., 2018). Dans cette partie, nous nous concentrerons sur la présentation des acteurs de la machinerie de réparation pertinents ayant un lien dans le développement des dystrophies musculaires, les ANX seront quant à elles traitées dans une partie ultérieure.

### 2.2.1. L'anoctamine-5

L'anoctamine-5 (ANO5) est hautement exprimée dans les muscles (Tsutsumi et al., 2004) et retrouvée dans la membrane d'organelles notamment l'appareil de Golgi et son réseau transgolgien, le réticulum endoplasmique, ou de vésicules intracellulaires telles que les vésicules sécrétoires et les endosomes (Mizuta et al., 2007), où elle est supposée exercer une activité de scramblase (permutation bidirectionnelle et passive de phospholipides entre les feuillettes interne et externe de la membrane plasmique) (Pedemonte & Galletta, 2014). Cependant, son rôle dans la réparation membranaire semble être indépendant de cette activité

de scramblase, comme en témoignent les mutations R58W et R758C, situées en dehors du domaine SCRD responsable du *scrambling* des phospholipides, qui entraînent des défauts de réparation membranaire (Chandra et al., 2021; Foltz et al., 2021).

Dans le contexte des maladies musculaires, les mutations du gène *ANO5* sont associées à plusieurs myopathies squelettiques, notamment la LGMDR12 (Bolduc et al., 2010). Les études récentes ont montré que les cellules déficientes en *ANO5* présentent une incapacité à réparer efficacement leur membrane plasmique après un dommage induit par laser (Chandra et al., 2021; Foltz et al., 2021; Griffin et al., 2016). Il a été démontré qu'*ANO5* était présent à la membrane endommagée et semblait également jouer un rôle crucial en facilitant le recrutement des ANX au site de la lésion (Foltz et al., 2021).

En outre, il a également été montré que dans les fibres musculaires lésées, *ANO5* se localisait dans la membrane du réticulum endoplasmique en agissant comme un canal chlorure activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) (Hartzell et al., 2009). Ce canal est activé par une augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , lequel se lie à des sites spécifiques sur la protéine *ANO5*, induisant un changement de conformation qui ouvre le canal. Cette ouverture permet le passage des ions  $\text{Cl}^-$  à travers la membrane, assurant une conduction sélective grâce à des boucles repliées situées entre les domaines transmembranaires TMD5 et TMD6, qui forment le pore ionique. En maintenant l'électroneutralité de la lumière du RE, ce canal soutient l'activité d'une pompe nommée SERCA qui permet l'import de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le cytosol vers le RE. Lors d'un dommage membranaire, *ANO5* participe ainsi au captage de l'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique par le réticulum (Chandra et al., 2021). La perte de fonction d'*ANO5* altère l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum, entraînant une surcharge toxique de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol compromettant la survie cellulaire.

De manière surprenante, les mutations du gène *ANO5*, bien qu'il ne soit pas situé sur les chromosomes sexuels, entraîne un déséquilibre marqué dans la répartition de la maladie entre les femmes et les hommes (ratio homme:femme de 2 :1 à 4 :1). Ce phénomène, observé à plusieurs reprises dans différentes études, reste inexpliqué sur le plan clinique et biochimique. Les hypothèses avancées incluent des différences hormonales entre les sexes ou l'influence de modificateurs génétiques situés sur le chromosome X (Christiansen et al., 2022; De Bruyn et al., 2023).

### **2.2.2. Les calpaïnes**

Les calpaïne-1 (CAPN1 ou  $\mu$ ) et calpaïne-2 (CAPN2 ou  $m$ ) sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que CAPN3 est spécifique du muscle strié squelettique. Lors d'une lésion

membranaire, CAPN1 et 2, pour faciliter la réparation membranaire, sont impliquées dans la formation de la mini-dysferlineC72, une version clivée de la dysferline, essentielle pour le recrutement des protéines de réparation à la zone endommagée (Lek et al., 2013; Mellgren et al., 2009; Redpath et al., 2014; Roche et al., 2008). Cette mini-dysferlineC72, contrairement à la dysferline complète, se localise spécifiquement au site de la lésion membranaire et recrute MG53, formant un réseau stabilisant le site endommagé et facilitant le recrutement d'autres éléments de la machinerie de réparation (Lek et al., 2013). De plus, CAPN1 et CAPN2 jouent un rôle crucial dans la réparation membranaire en remodelant le cytosquelette, notamment en dégradant rapidement des protéines telles que la vimentine et la taline (Mellgren et al., 2007), ce qui pourrait diminuer la tension de surface de la membrane plasmique.

Enfin, il a été démontré qu'une déficience en CAPN3 conduit au développement de la LGMDR1. Il a été proposé qu'il s'agissait du résultat d'un défaut de régulation du complexe dysferline-AHNAK (Huang et al., 2008). En effet, CAPN3 clive AHNAK pour limiter son interaction avec la dysferline, ce qui est essentiel pour maintenir l'équilibre des processus de réparation membranaire. Une déficience en CAPN3 conduit à une accumulation d'AHNAK au sarcolemme, altérant la fonction réparatrice de la dysferline.

### **2.2.3. La cavéoline-3**

CAV3, essentielle à la formation des cavéoles, est spécifiquement exprimée dans les muscles striés squelettiques, où elle constitue l'unique isoforme présente. La séquence de CAV3 comprend une région transmembranaire en forme de fer à cheval qui permet l'ancrage à la membrane, ainsi qu'un « domaine de scaffolding » essentiel à l'oligomérisation des cavéolines et à leur interaction avec d'autres protéines (Razani & Lisanti, 2001).

Dans les tissus musculaires, riches en cavéoles, ces structures semblent prévenir les ruptures de la membrane plasmique en réduisant la tension exercée par le cytosquelette cortical, en permettant d'augmenter rapidement (de l'ordre de la minute) la surface membranaire (Sinha et al., 2011). L'implication directe de CAV3 dans la réparation du sarcolemme a été suggérée (Corrotte et al., 2013), bien que ce rôle reste encore à élucider. Une étude récente a démontré que les protéines cavéoline-1 (CAV1) et CAV3 ne s'accumulaient pas au site de lésion, suggérant qu'elles ne contribuent pas directement à la réparation (Štefl et al., 2024). Cependant, il a été observé que les cavéoles se désassemblent à proximité du site de rupture, ce qui pourrait indiquer un rôle dans l'apport de membrane supplémentaire pour sceller le dommage, un mécanisme plus lent que la formation du patch, ce dernier correspondant alors à une procédure d'urgence pour la survie de la cellule (Štefl et al., 2024).

CAV3 interagit avec des protéines clés impliquées dans la réparation du sarcolemme, comme la dysferline (Bansal et al., 2003) et MG53 (Cai, Masumiya, et al., 2009). L'interaction avec CAV3 stabilise la dysferline à la membrane plasmique (Hernández-Deviez et al., 2008). En l'absence de CAV3, la dysferline est rapidement endocytée, réduisant sa disponibilité pour la réparation membranaire. De plus, MG53 contribue au trafic intracellulaire des vésicules et constitue un élément essentiel de la machinerie de réparation membranaire dans le muscle strié (Cai, Masumiya, et al., 2009). Les mutations de *CAV3* qui entraînent sa rétention au niveau du Golgi provoquent une mauvaise localisation de MG53 et de la dysferline, entraînant des défauts dans la réparation membranaire (Cai, Weisleder, et al., 2009). De plus, il a été montré que les dommages cellulaires, déclenchant un afflux de  $Ca^{2+}$ , conduisent à l'exocytose des compartiments lysosomaux et à la libération de sphingomyélinase acide, une enzyme qui favorise l'invagination de la bicouche lipidique et la concentration des cavéoles au site de la lésion (Corrotte et al., 2013). Ce processus est toutefois compromis dans les cavéolinopathies, où des mutations dans les cavéolines altèrent leurs fonctions.

Les études immunohistochimiques montrent généralement une réduction sévère ou une absence de CAV3 au niveau du sarcolemme des fibres musculaires, provoquant généralement une désorganisation du réseau des tubules-T ainsi qu'une altération des voies de signalisation cellulaire (Gazzerro et al., 2010). Bien que son rôle exact ne soit pas encore élucidé, son absence entraîne une réduction de la capacité de réparation membranaire des cellules musculaires (Corrotte et al., 2013). Il est possible que CAV3 n'intervienne pas directement dans la réparation membranaire, mais qu'elle joue un rôle crucial dans le recrutement d'autres protéines impliquées dans ce processus, telles que la dysferline et MG53 (Cai, Weisleder, et al., 2009; Hernández-Deviez et al., 2006, 2008; Matsuda et al., 2001)..

Fait surprenant, chez certains patients, un niveau d'expression normale a été rapportée en particulier chez ceux présentant des mutations CAV3 faux-sens conduisant à une protéine dysfonctionnelle (Fulizio et al., 2005). En outre, un niveau d'expression normale de CAV3 a parfois été observée dans les fibres en régénération, ce qui a été associé à un développement excessif de l'appareil de Golgi. Cette observation est à mettre en perspective avec le fait que, chez un individu sain, les fibres en régénération présentent une expression en CAV3 réduite (Fulizio et al., 2005). Il a été suggéré que cette différence observée chez les patients atteints de cavéolinopathie résulterait d'une surexpression de CAV3 en réponse aux mutations entraînant une diminution ou une absence de CAV3 fonctionnelle dans les fibres musculaires adultes. Bien qu'il ait été suggéré que la CAV3 produite dans les fibres en régénération pourrait inclure des formes natives qui atteignent la membrane plasmique, cette réponse compensatoire visant

probablement à augmenter le taux d'exocytose pour compenser partiellement le défaut de réparation membranaire demeure incomplète. (Fulizio et al., 2005; Pradhan & Prószyński, 2020; Rashed & Milone, 2025). En effet, cette surexpression entraîne une accumulation de CAV3 mal repliée dans l'appareil de Golgi, perturbant le fonctionnement de ce dernier, limitant l'adressage de la protéine au sarcolemme et in fine, aggravant les dysfonctionnements de la réparation membranaire. (Fulizio et al., 2005).

#### **2.2.4. La dysferline**

La dysferline joue un rôle essentiel dans la réparation de la membrane plasmique des cellules musculaires striées squelettiques en facilitant la fusion du patch lipidique avec le sarcolemme endommagé. En réponse à un dommage membranaire, la dysferline est endocytée puis subit un clivage protéolytique catalysé par une calpaïne, conduisant à la formation d'une forme tronquée, la mini-dysferlineC72 (Lek et al., 2013). Il a été montré que le recrutement de vésicules couvertes de mini-dysferlineC72 est impliqué dans la réparation membranaire (Lek et al., 2013). Elle aide ainsi à l'agrégation de vésicules exocytotiques pour former un "patch de réparation" au niveau du site endommagé.

Les domaines C2 de la dysferline jouent des rôles variés dans la régulation de la réparation de la membrane plasmique et la gestion intracellulaire du  $Ca^{2+}$ . En particulier, les domaines C2A et C2B sont critiques pour la réparation membranaire ; leur suppression entraîne une baisse significative de l'efficacité de la réparation (Muriel et al., 2022). Ces domaines sont également impliqués dans la liaison aux phospholipides comme la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI), ce qui est essentiel pour l'ancrage de la dysferline à la membrane endommagée (Cai, Masumiya, et al., 2009; Davis et al., 2002; Therrien et al., 2009). Par ailleurs, certaines mutations dans ces domaines, telles que V76D, altèrent les propriétés de liaison de la dysferline à la membrane, compromettant ainsi sa fonction dans la réparation membranaire (Hofhuis et al., 2017; Matsuda et al., 2012).

La dysferline interagit également avec d'autres protéines essentielles à la réparation membranaire, notamment MG53 et CAV3. MG53 est une protéine spécifique des muscles, surtout connue pour s'auto-assembler, comme l'ANXA5, sur la membrane plasmique endommagée. Calcium-indépendante, elle est en revanche activée suite à l'entrée dans la cellule de facteurs oxydants. Il a été rapporté qu'elle facilite l'assemblage du complexe de réparation membranaire en recrutant rapidement des vésicules de réparation au site de lésion (Cai, Masumiya, et al., 2009). En présence de  $Ca^{2+}$ , la dysferline et MG53 interagissent pour fusionner le patch vésiculaire avec la membrane endommagée, un processus essentiel pour une



réparation efficace (Lek et al., 2013; Matsuda et al., 2012). CAV3, quant à elle, stabilise la dysferline à la membrane en inhibant son endocytose et en facilitant son transport au sarcolemme (Hernández-Deviez et al., 2006, 2008). Les mutations dans *CAV3* peuvent perturber cette interaction, entraînant une réparation membranaire défectueuse (Cai, Weisleder, et al., 2009). Il a également été rapporté que l'ANXA2 régule la localisation de la dysferline à la membrane sarcolemmique en réponse au  $Ca^{2+}$ , facilitant ainsi la réparation de la membrane endommagée (Bittel et al., 2020).

En outre, il a été démontré que la dysferline sert au couplage entre le canal calcique récepteur de la dihydropyridine (DHPR) situé dans le sarcolemme et le canal de libération de  $Ca^{2+}$  du récepteur de la ryanodine 1 (RyR1) dans le réticulum sarcoplasmique. Son absence conduit à une surcharge de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme et à une augmentation du flux calcique en cas de dommage membranaire (Lukyanenko et al., 2017) et compromet la réparation de la membrane (Bansal et al., 2003). Enfin, la découverte de la mini-dysferlineC72, un fragment de 72 kDa généré par clivage CAPN-dépendant de la dysferline, a également enrichi notre compréhension du processus de réparation membranaire. Ce fragment régule la fusion de l'agrégat vésiculaire à la membrane endommagée, jouant un rôle majeur dans la réparation des membranes (Ballouhey et al., 2021; Lek et al., 2013).

### **2.3. Rôle des cellules auxiliaires dans la réparation membranaire**

Jusqu'à récemment, le modèle de réparation membranaire ne prenait pas en considération l'implication d'éventuelles cellules auxiliaires dans le processus de rescellement des micro-ruptures.

La littérature indique (Bittel & Jaiswal, 2019; Tidball, 2011) toutefois que les lésions membranaires induisent un état inflammatoire propice au recrutement des macrophages et FAPs, qui participent à la régénération musculaire. On peut également noter que, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient encore que partiellement compris, les interactions entre les cellules immunitaires, en particulier les macrophages, et les cellules musculaires squelettiques jouent un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation des myoblastes et la réparation du tissu musculaire (Juban & Chazaud, 2017).

#### **2.3.1. Implication des macrophages dans la réponse inflammatoire et la réparation musculaire**

Les macrophages jouent des rôles majeurs et complexes dans la régénération musculaire, notamment au niveau cellulaire avec la restauration de l'homéostasie membranaire dans les

myocytes endommagés. Comme précédemment expliqué, lorsqu'une lésion se produit au niveau du sarcolemme, le colmatage est assuré par la formation et le recrutement d'un patch lipidique. Ce patch, en excès, doit ensuite être éliminé pour restaurer l'intégrité de la membrane plasmique, un processus dans lequel l'implication des macrophages a été montrée (Middel et al., 2016). Ce mécanisme est médié par l'enrichissement sélectif de la PS au niveau de la lésion, la PS servant de signal au macrophage pour la phagocytose (Borisenko et al., 2003). Il a été démontré que la dysferline aidait au transport de la PS depuis le sarcolemme adjacent vers la zone membranaire réparée via un motif de cinq acides aminés (Middel et al., 2016), ce qui conduisait à l'enrichissement. De manière intéressante, il a été rapporté que la déplétion des macrophages à 2 et 4 jours après un dommage empêchait la réparation complète du sarcolemme, indiquant une implication tardive des macrophages dans ce processus (Tidball & Wehling-Henricks, 2007).

Au niveau tissulaire, l'orchestration de l'inflammation par les macrophages est un phénomène hautement régulé où deux populations de macrophages à la polarisation différente ont été décrites : M1 (dits pro-inflammatoires) et M2 (dits anti-inflammatoires) (Chazaud et al., 2009). Ainsi lors d'une lésion, les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) libérés par les myofibres endommagées recrutent des cellules de la réponse immunitaire innée (Forcina et al., 2020; Fuchs & Blau, 2020; Heredia et al., 2013; Tidball, 2017). Les neutrophiles, en éliminant les débris cellulaires, favorisent la polarisation des monocytes en macrophages M1 par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Fuchs & Blau, 2020; Tidball, 2017). Les macrophages M1 ainsi polarisés stimulent la prolifération des cellules satellites en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (Fuchs & Blau, 2020; Tidball, 2017). En outre, des interactions entre les cellules immunitaires ont également été rapportées (Ceafalan et al., 2018; Ratnayake et al., 2021). Aux stades tardifs de la réparation tissulaire, les macrophages M1 transitionnent vers des macrophages M2 grâce aux cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes T régulateurs et par les débris cellulaires phagocytés (B. Deng et al., 2012; Tidball, 2017). Les macrophages M2 suppriment l'inflammation, favorisent la différenciation des myoblastes dérivés des cellules satellites via notamment la libération de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance comme l'IL-10 et l'IGF-1 (Cantini & Carraro, 1995; Dumont & Frenette, 2010), stimulent l'angiogenèse et activent les FAPs pour produire la matrice extracellulaire (ECM) nécessaire à la réparation et à la régénération (Cui & Ferrucci, 2020; Forcina et al., 2020; Fuchs & Blau, 2020; Lemos et al., 2015; Nawaz et al., 2022).

Cette dichotomie M1 et M2 reste à considérer avec précaution, et présente ses limites pour la compréhension des processus *in vivo* (Juban & Chazaud, 2017).

Enfin, il a été proposé que l'excès de macrophages recrutés était éliminé par apoptose locale plutôt que par migration vers les ganglions lymphatiques à la fin de la réparation (Randolph, 2008; Tidball & St. Pierre, 1996).

### **2.3.2. Contribution des FAPs à la régénération**

Les progéniteurs mésenchymateux résidents, également appelés progéniteurs fibro-adipogéniques (FAP), jouent un rôle central dans la régénération du tissu musculaire. Ils fournissent un soutien fonctionnel aux cellules satellites (Contreras et al., 2021; Theret et al., 2021). Après une lésion musculaire, les FAPs se multiplient de façon marquée pour soutenir le processus de réparation. Leur nombre atteint un pic 96 heures après la lésion dans des modèles murins (Lemos et al., 2015).

Des travaux visant à analyser *in silico* le sécrétome des FAPs ont identifié qu'ils exprimaient au cours du processus de régénération musculaire de la follistatine ou encore de l'IL-6 (Negroni et al., 2022). Or l'IL-6 et la follistatine ont été rapportées comme favorisant respectivement la prolifération (Serrano et al., 2008) et la fusion (Mozzetta et al., 2013) des cellules souches musculaires.

L'interaction entre les FAPs et les macrophages est essentielle dans la régénération musculaire, jouant un rôle critique dans la régulation fine des processus de réparation tissulaire. En effet, la phase de prolifération des FAPs est suivie d'une réduction rapide de leur population due à leur apoptose. Cette dernière est induite par les macrophages M1 qui sécrètent du TNF. Cette apoptose précoce est cruciale pour éviter une prolifération excessive de FAP et prévenir ainsi la fibrose musculaire (Lemos et al., 2015).

Cependant, à un stade plus avancé de la régénération, les macrophages M2, généralement associés à la résolution de l'inflammation, interagissent différemment avec les FAPs. En effet, contrairement aux macrophages M1, les M2 peuvent inhiber l'effet promyogénique des FAPs tout en favorisant leur fonction profibrogénique (Nawaz et al., 2022). Cette dualité d'action des macrophages M2 est bénéfique en petite quantité, mais leur excès peut entraîner une fibrose excessive, nuisant ainsi à la régénération des muscles striés squelettiques.

Les FAPs sont aussi connues pour sécréter de l'IL-10 en réponse à une lésion (Lemos et al., 2012), jouant ainsi un rôle important dans le changement phénotypique des macrophages vers un profil anti-inflammatoire et favorisant la régénération musculaire (Dort et al., 2019).

L'interleukine (IL)-33, majoritairement produite par les FAPs au cours des 12 premières heures après la lésion, permet de stimuler la prolifération des cellules immunitaires T régulatrices (Kuswanto et al., 2016), dont il a été prouvé qu'elles amélioreraient la régénération musculaire dans les modèles de lésions aiguës et chroniques (Burzyn et al., 2013). De manière générale, suite à un dommage, la signature génique des FAPs tend à évoluer (Mathieu et al., 2023) traduisant un état dit « activé » et à dicter les processus clés dans la régénération tissulaire (Biferali et al., 2019; Contreras et al., 2021; Theret et al., 2021).

### **2.3.3. Les cellules auxiliaires dans les dystrophies musculaires**

Les dystrophies musculaires sont marquées par une inflammation chronique due à des lésions musculaires récurrentes. Ces lésions récurrentes causent la libération répétée de DAMPs qui activent le système immunitaire inné et entraînent une activation aberrante des macrophages et des voies inflammatoires (Tripodi et al., 2021)

Cette inflammation persistante peut favoriser le développement de fibrose. Des macrophages pro-fibrosants, exprimant des marqueurs pro-inflammatoires ont en effet été identifiés dans un modèle murin (Juban et al., 2018) de DMD caractérisé par une fibrose (Desguerre et al., 2012), ainsi que dans les muscles de patients atteints de DMD (Juban et al., 2018). L'isolement de ces macrophages a révélé une surexpression du gène LTBP4. Ce gène a été associé à une perte accélérée des capacités motrices chez les patients atteints de DMD (Flanigan et al., 2013). En outre, cette surexpression conduit à une sécrétion accrue de TGF $\beta$ 1 qui stimule la production de collagène par les fibroblastes contribuant à une fibrose caractéristique des dystrophies (Juban et al., 2018).

Dans la section précédente, il a également été évoqué que la PS s'accumulait au niveau du patch de réparation, facilitant la phagocytose de l'excès de membrane du patch lipidique par les macrophages, et que l'enrichissement du patch en PS était médié par la dysferline. La partie de la dysferline impliquée dans ce processus est un motif composé de cinq acides aminés, riche en arginine proche de son domaine transmembranaire (TM) (Middel et al., 2016). Chez certains patients LGMDR2, ce motif présente des mutations. Cela suggérerait une nouvelle piste pour expliquer la pathophysiologie de cette maladie avec une altération du recrutement des macrophages et une perturbation de la restauration de l'homéostasie membranaire.

En outre, il a été rapporté que la prolifération, la différenciation et l'apoptose des FAPs étaient altérées in vitro dans la DMD (Lemos et al., 2015; Moratal et al., 2019; Uezumi et al., 2014).

### **3. Les annexines et leur rôle dans les Dystrophies Musculaires**

Les ANX forment une superfamille de protéines solubles présentes chez la plupart des eucaryotes, à l'exception des levures (Moss & Morgan, 2004). La découverte de ces protéines a commencé en 1978, avec l'identification du premier membre, l'ANXA7, initialement nommé « synexine ». Ce premier membre a été isolé à partir de cellules chromaffines des glandes surrénales de bœuf lors d'expériences visant à identifier des facteurs régulés par le  $\text{Ca}^{2+}$  susceptibles de favoriser l'exocytose des granules contenant des catécholamines (Creutz et al., 1978). Puis, d'autres protéines « synexin-like », renommées, par la suite, ANX, ont été identifiées.

À ce jour (au 1<sup>er</sup> septembre 2024), pas moins de 32 625 articles citant les ANX sont répertoriés sur la plateforme PubMed, dont 1 402 ont été publiés en 2023, soit plus de trois par jour.

Les études phylogénétiques ont regroupé les membres de cette superfamille en cinq grandes familles, notées de A à E. La famille A regroupe les ANX retrouvées chez les vertébrés, tandis que les autres familles se répartissent entre les invertébrés, les mycètes, les plantes et les protistes (Moss & Morgan, 2004).

Chez l'Homme, les ANX comprennent 12 membres, nommés ANXA1 à ANXA13 (l'ANXA12 n'étant pas attribuée dans la nomenclature officielle). Ces protéines partagent une capacité commune à se lier aux membranes en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui les implique dans de nombreux processus cellulaires tels que le transport et l'agrégation de vésicules, la dynamique du cytosquelette membranaire, l'exocytose, la modulation de la réponse inflammatoire, la migration cellulaire, la fusion cellulaire, la coagulation, et la réparation membranaire (Draeger et al., 2011; Gerke & Moss, 2002). Du fait de leurs rôles multiples, les ANX sont abondantes. Généralement exprimées de manière ubiquitaire (exception faite de l'ANXA3 et A4), certaines, comme l'ANXA5, constituent jusqu'à 2 % de la masse protéique totale dans les fibroblastes dérivés de prépuce human HFF (Human Foreskin Fibroblasts) et les neutrophiles (Schlaepfer & Haigler, 1990; Sopkova et al., 2002).

Parmi les ANX, celles principalement impliquées dans la réparation membranaire sont les ANXA1, A2, A4, A5, A6 et A7, qui ont fait l'objet d'une analyse plus approfondie au cours de ma thèse.

### 3.1. Structure moléculaire et propriétés biochimiques

Les ANX présentent deux régions principales : la région C-terminale hautement conservée, et la région N-terminale plus variable, tant en taille qu'en séquence. Ces deux parties jouent des rôles distincts dans la fonction des ANX.

#### *Région C-terminale*

La région C-terminale des ANX est caractérisée par la présence d'un domaine (deux pour l'ANXA6) incurvé, à la structure très conservée. Ce domaine est constitué de quatre répétitions d'une séquence d'environ 70 acides aminés, chacune formant cinq hélices alpha, reliées entre elles par de courtes boucles polypeptidiques (Gerke et al., 2005) (Figure 7). L'ANXA5 a été la première ANX à voir sa structure cristalline résolue, révélant cette organisation en hélices (Huber et al., 1990).

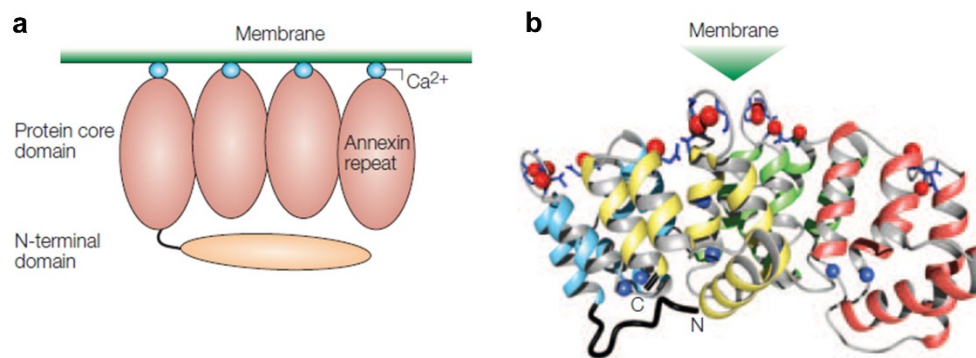
Ce domaine est responsable de la liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et aux membranes biologiques (plasmique ou vésiculaires) (Figure 7). Les résidus impliqués dans l'interaction avec le  $\text{Ca}^{2+}$ , exposés sur la face concave du domaine, sont situés dans des boucles hydrophiles reliant les hélices alpha, et leur charge négative permet la formation d'interactions électrostatiques avec les ions calciums chargés positivement. Les sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  se classent en 3 catégories (A, AB et DE), chacun contribuant inégalement à l'affinité générale de la protéine pour la membrane (Jin et al., 2004).

Malgré une structure hautement conservée, il a également été démontré une sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  différente de chaque ANX pour la liaison aux membranes. L'ANXA2 ne nécessite par exemple que  $0,65 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  pour se lier à des liposomes contre  $16 \mu\text{M}$  pour l'ANXA5 (Blackwood and Ernst, 1990). L'hypothèse avancée est que cette variation de sensibilité permet d'activer spécifiquement les différentes ANX en réponse à l'élévation de la concentration calcique cytosolique (Gerke et al., 2005; Raynal & Pollard, 1994). Toutefois, les études présentent des résultats hétérogènes quant à la séquentialité de ce recrutement (Croissant et al., 2022; Monastyrskaya et al., 2007; Schlaepfer & Haigler, 1987; Skrahina et al., 2008). Notre équipe a proposé que les ANXA1 et A2, activées par des concentrations plus faibles en  $\text{Ca}^{2+}$ , peuvent interagir avec des vésicules intracellulaires profondément dans le cytoplasme (Croissant et al., 2022). Au contraire, les ANXA5 et A6, moins sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , interagissent avec le sarcolemme au niveau du site de rupture, là où la concentration calcique est la plus élevée (Croissant et al., 2022) (Figure 8).

La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  induirait un changement subtil de conformation dans la région C-terminale, permettant aux ANX de se lier aux membranes via des ponts électrostatiques entre les ions  $\text{Ca}^{2+}$

et les têtes polaires des phospholipides chargés négativement (PS, PI, phosphatidyléthanolamine (PE) et acide phosphatidique (PA)) (Gerke et al., 2005; Zachowski, 1993)

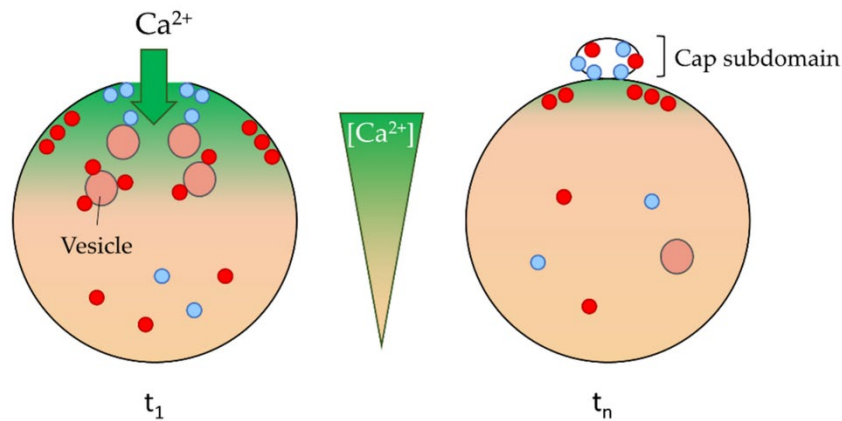
Il est important de noter que la région C-terminale est également impliquée dans l'interaction avec d'autres molécules, telles que les ARN messagers (ARNm) (Patil et al., 2023) ou la F-actine, qui se lie à certaines ANX en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayes et al., 2004). De plus, la capacité des ANXA4 et A5 à s'oligomériser et à former des réseaux bidimensionnels (2D) sur les membranes biologiques est largement dépendante de cette région conservée (Kaetzel et al., 2001).



**Figure 7 : Représentation schématique et tridimensionnelle de la structure des ANX**

(a) Les ANX se composent d'une région C-terminale, hautement conservée, permettant une liaison  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante aux membranes, ainsi que d'une région N-terminale variable. Les 4 domaines C-terminaux permettant la liaison avec le  $\text{Ca}^{2+}$  sont formés de quatre répétitions d'environ 70 acides aminés. Le domaine N-terminal peut interagir avec d'autres protéines. (b) Sur une représentation tridimensionnelle, chaque domaine des ANX est une structure compacte formée de cinq hélices- $\alpha$  reliées par des boucles. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , représentés sous forme de sphères rouges, se lient à la face convexe du domaine C-terminal, facilitant l'interaction avec les membranes.

Image tirée de Gerke et al., 2005



**Figure 8 : Modèle de translocation et recrutement des ANX suite à un dommage membranaire.**

( $t_1$ ) Suite à une rupture de la membrane plasmique, l'influx de  $Ca^{2+}$  dans la cellule génère un gradient de concentration. Au début de ce processus, la forte concentration de  $Ca^{2+}$  à proximité du site de rupture favorise la liaison à la membrane plasmique des ANX les moins sensibles au  $Ca^{2+}$ , telles que les ANXA1, A6 et A5 (cercles bleus). En revanche, les ANX plus sensibles au  $Ca^{2+}$ , comme les ANXA2 et A4 (cercles rouges), interagissent avec des membranes situées plus loin du site de rupture. ( $t_n$ ) Une fois la membrane réparée, les ANX situées proche de la rupture, où la concentration en  $Ca^{2+}$  reste élevée, continuent d'interagir avec les membranes. À l'intérieur de la cellule, la plupart des ANX se détachent des membranes lorsque le  $Ca^{2+}$  retrouve son niveau normal, à l'exception potentielle de l'ANXA2, qui est la plus sensible au  $Ca^{2+}$ .

Image tirée de Croissant et al., 2022

### Région N-terminale

Contrairement à la région C-terminale, la région N-terminale, du fait de sa grande variabilité de séquence, joue un rôle crucial dans la spécificité fonctionnelle de chaque ANX. Cette région joue un rôle déterminant dans l'interaction des ANX avec d'autres protéines ou composants cellulaires (Rosengarth & Luecke, 2003). Par exemple, l'ANXA1, en association avec S100A11 (la famille S100 regroupant des protéines cytosoliques impliquée dans le remodelage de la membrane plasmique et du cytosquelette, ainsi que dans divers processus cellulaires), joue un rôle dans la régulation de la polarité cellulaire lors de la morphogénèse des cellules de mammifères (Fankhaenel et al., 2023). L'ANXA2, quant à elle, forme un complexe avec la protéine S100A10 via son domaine N-terminal, permettant l'agrégation de vésicules et la fusion membranaire (Gerke & Moss, 2002).

En outre, la région N-terminale est sensible à des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui modulent son interaction avec d'autres partenaires moléculaires et régulent l'activité de la protéine (Lizarbe et al., 2013). A titre d'exemple, la phosphorylation de la Ser27 de l'ANXA1 ou de la Thr6 de l'ANXA4 altère la capacité de ces deux ANX à agréger des vésicules lipidiques.

La fonction de cette région est également modulée par la présence du  $Ca^{2+}$ , qui provoque un changement conformation. Par exemple, en l'absence de  $Ca^{2+}$ , la région N-terminale de



l'ANXA1 est enfouie au cœur du domaine de liaison aux membranes, mais devient exposée lors de la liaison à des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant ainsi des interactions supplémentaires avec d'autres molécules (Rosengarh & Luecke, 2003).

Grâce à leur structure unique, les ANX participent à une variété de processus cellulaires liés aux membranes. Leur capacité à interagir avec les membranes et d'autres protéines en réponse aux variations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  en fait des acteurs clés dans la physiologie cellulaire.

### **3.2. Fonctions des ANX**

Outre l'implication dans la réparation membranaire dont nous parlerons dans le chapitre suivant, les ANX ont été rapportées comme impliquées dans de nombreux processus cellulaires et fonctions physiologiques. De manière non-exhaustives nous apportons quelques clefs de compréhension sur quelques uns de leurs rôles en débutant par l'échelle cellulaire avec leur participation aux phénomènes d'endocytose/exocytose et de prolifération et d'invasion cellulaire, puis en poursuivant par l'échelle tissulaire et leur implication dans des processus tels que l'inflammation, l'angiogenèse et l'homéostasie lipidique.

#### *Exocytose*

Dans les cellules chromaffines, l'ANXA2, en formant un complexe avec S100A10, participe à la stabilisation des radeaux lipidiques, essentiels à l'exocytose régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules neuroendocrines (Rescher & Gerke, 2004). Ce complexe facilite également l'organisation des filaments d'actine à proximité de la membrane plasmique, contribuant ainsi à une exocytose efficace des granules sécrétoires contenant des catécholamines (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Dans les cellules bronchiques épithéliales, l'ANXA2 interagit avec des protéines du complexe SNARE, notamment SNAP-23, syntaxin-2 et VAMP2, pour réguler la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène VI (Dassah et al., 2014). Cette interaction facilite la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique et permet une libération contrôlée des molécules. En l'absence d'ANXA2, les vésicules contenant le collagène VI s'accumulent dans l'appareil Golgi, entraînant des défauts de sécrétion et des altérations structurelles des membranes basales bronchiques.

Une étude a démontré que l'ANXA6, par son interaction avec la phospholipase  $\text{D}_1$  (PLD1), influence la dynamique des lipides membranaires, en particulier la formation de phosphatidylinositols et d'acide phosphatidique (PA) (Cubells et al., 2007). Le PA, un messenger

lipidique essentiel, participe activement à la courbure des membranes et à la fusion des vésicules avec la membrane plasmique, processus essentiels à l'exocytose.

Dans les hépatocytes, l'ANXA6 est également impliquée dans l'organisation des domaines membranaires riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques, et dans le trafic des protéines SNARE (comme syntaxin-4 et SNAP23) (Enrich et al., 2017). Dans des modèles cellulaires exprimant des niveaux élevés d'ANXA6, l'accumulation de cholestérol dans les compartiments endosomaux tardifs a été observée, ce qui perturbe la distribution du cholestérol entre les membranes cellulaires, notamment l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ces perturbations influencent la localisation et l'export de protéines comme la CAV1, réduisant ainsi le nombre de cavéoles à la surface cellulaire.

### *Endocytose*

L'endocytose, processus par lequel des composants extracellulaires sont internalisés dans la cellule, dépend également des ANX. Par exemple, l'ANXA2 participe à l'endocytose indépendante de la clathrine en interagissant avec les phospholipides membranaires et en stabilisant les courbures membranaires nécessaires à la formation des vésicules d'endocytose (Blouin, 2013). L'ANXA1 est aussi impliquée dans l'endocytose régulée. Une étude a démontré que la phosphorylation d'ANXA1 par la PKC- $\alpha$  favorise son recrutement aux membranes et facilite l'internalisation des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Grewal & Enrich, 2009).

### *Prolifération cellulaire*

Les ANX jouent également un rôle clé dans la régulation de la prolifération cellulaire. Par exemple, l'ANXA1 est impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Sabran et al., 2019; Wei et al., 2021). Elle est régulée par les glucocorticoïdes et participe à la signalisation intracellulaire favorisant la prolifération. L'ANXA1 module notamment les voies de signalisation impliquant les MAP kinases, qui contrôlent la progression du cycle cellulaire et la réponse des cellules aux facteurs de croissance (Parente & Solito, 2004).

Une étude réalisée dans des modèles de cancer du sein a montré que l'expression de l'ANXA1 est significativement augmentée dans les cellules tumorales en prolifération active, renforçant son rôle dans la croissance tumorale (Moraes et al., 2018). Par ailleurs, la phosphorylation de

l'ANXA1 influence ses interactions avec des partenaires cytoplasmiques et membranaires, facilitant l'adaptation des cellules aux signaux mitogènes.

L'ANXA2 est surexprimée dans divers cancers, notamment ceux du sein, du poumon et du pancréas (Ning et al., 2023). Elle interagit avec des voies de signalisation clés telles que celles médiées par les récepteurs tyrosine kinases (RTK), favorisant ainsi la division cellulaire et la croissance tumorale (Christensen et al., 2011, Cancer Research).

### *Invasion cellulaire*

L'ANXA2 joue un rôle central dans l'invasion cellulaire, particulièrement dans le contexte tumoral. Elle forme un complexe avec S100A10, favorisant la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine, en activant les métalloprotéases matricielles (MMP), dégrade la matrice extracellulaire et facilite la migration des cellules tumorales à travers les barrières tissulaires).

Des études sur le glioblastome montrent que l'inhibition de l'expression d'ANXA2 réduit significativement l'invasion des cellules tumorales, confirmant son rôle essentiel dans la progression des métastases (Zhai et al., 2011). De plus, l'ANXA2 influence la polarisation cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine, des mécanismes critiques pour la migration directionnelle des cellules (Rescher et al., 2008).

L'ANXA5, bien que moins étudiée dans ce contexte, a été associée à une diminution de l'invasion tumorale lorsqu'elle est surexprimée. Elle agit en stabilisant les membranes et en limitant l'activité des MMP, ce qui réduit la capacité des cellules tumorales à envahir les tissus environnants (Rand et al., 2004).

### *Inflammation*

A l'échelle tissulaire, il a également été démontré que les ANX jouent un rôle central dans la régulation de l'inflammation, notamment grâce à leur capacité à moduler la migration cellulaire, la libération de médiateurs inflammatoires et la résolution des réponses inflammatoires. Ces fonctions dépendent souvent des interactions entre les annexines et les phospholipides membranaires ou d'autres protéines régulatrices.

Parmi elles, l'ANXA1 est la mieux caractérisée pour son rôle anti-inflammatoire. Son expression est principalement induite par les glucocorticoïdes et elle agit en inhibant la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA2) (Kim et al., 2001), une enzyme clé dans la libération de l'acide arachidonique, précurseur des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires tels que les prostaglandines et les leucotriènes (Parente & Solito, 2004; Perretti, 2003). En bloquant cette

voie, l'ANXA1 réduit la production de ces médiateurs et atténue l'inflammation (Kim et al., 2001). Par ailleurs, elle favorise l'apoptose des neutrophiles et leur élimination par phagocytose, un mécanisme essentiel pour la résolution de l'inflammation (D'Acquisto et al., 2008).

En plus de ses propriétés anti-inflammatoires directes, l'ANXA1 intervient dans la migration leucocytaire. Elle interfère avec l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et les leucocytes, diminuant ainsi leur recrutement vers les sites inflammatoires (Dalli et al., 2008). Chez les modèles murins déficients en ANXA1, on observe une inflammation accrue et prolongée, ce qui met en évidence son rôle central dans la limitation des réponses inflammatoires excessives (Hannon et al., 2003).

L'ANXA2, quant à elle, joue un rôle indirect dans l'inflammation par son implication dans la fibrinolyse et la dégradation de la matrice extracellulaire. En formant un complexe avec S100A10, elle facilite la conversion du plasminogène en plasmine, permettant la dissolution des dépôts fibrineux dans les sites inflammatoires (Valls et al., 2021). Cette activité contribue à la restauration des tissus endommagés et au contrôle des réponses inflammatoires chroniques. Enfin, l'ANXA5 a des propriétés anti-thrombotiques qui s'avèrent essentielles dans le contexte inflammatoire. En se liant aux phosphatidylsérines exposées à la surface des cellules apoptotiques et des plaquettes activées, elle empêche la formation excessive de caillots et favorise la résorption des lésions inflammatoires (Rand et al., 2004; Rand & Wu, 2006).

### *Angiogenèse*

L'ANXA2 joue un rôle central dans l'angiogenèse, notamment par son implication dans la fibrinolyse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette protéine agit comme co-récepteur pour le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), facilitant ainsi la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine générée active ensuite les MMP, qui dégradent la matrice extracellulaire, permettant la migration et la prolifération des cellules endothéliales dans les zones où de nouveaux vaisseaux doivent se former (Ling et al., 2004; Sharma & Jain, 2020). Des études *in vivo* ont démontré que l'ANXA2 est essentielle à l'angiogenèse tumorale. En effet, l'administration d'anticorps anti-ANXA2 réduit significativement la croissance tumorale et l'angiogenèse dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein humain (Sharma & Jain, 2020). Cette inhibition est attribuée à une diminution de l'activité fibrinolytique et à une réduction de la migration des cellules endothéliales. En outre, des expériences utilisant des plugs de matrigel enrichis en  $\beta$ FGF montrent une forte expression d'ANXA2 dans les cellules endothéliales proliférantes, corrélée au développement de nouveaux vaisseaux sanguins (Sharma & Jain, 2020). Enfin, dans un contexte physiologique, des modèles

murins knock-out pour l'ANXA2 ont révélé des défauts de l'angiogenèse, confirmant son rôle indispensable dans ce processus (Ling et al., 2004). En outre, il a été rapporté que l'ANXA2 agit en amont d'Arp2 pour organiser l'actine et stabiliser les jonctions cellulaires nécessaires à une angiogenèse équilibrée. Dans la même étude, la réduction de l'ANXA2 entraînait une initiation excessive des bourgeons angiogéniques, mais une incapacité à maturer ces structures (Sveeggen et al., 2023).

Par ailleurs, l'ANXA1 joue également un rôle dans l'angiogenèse. Cette dernière est activée par phosphorylation via la voie p38/MAPK en réponse au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), un facteur clé de l'angiogenèse. Le VEGF diminue l'expression de miR-196a, un microARN qui réprime ANXA1 en ciblant son ARNm. Cela entraîne une augmentation des niveaux d'ANXA1, favorisant la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Pin et al., 2012).

#### *Homéostasie du cholestérol*

Les ANX jouent un rôle crucial dans l'homéostasie lipidique cellulaire. Comme expliqué précédemment, l'ANXA1 a une propriété inhibitrice de la PLA2 (Kim et al., 2001), entraînant un impact sur la régulation de la libération d'acides gras. L'ANXA2 joue aussi un rôle dans l'assimilation des acides gras grâce à son interaction avec le transporteur CD36 (Y. Wang et al., 2019). Des études *in vivo* montrent que les souris KO pour l'ANXA2 éliminent les acides gras du sang plus lentement, soulignant son importance dans ce processus (Salameh et al., 2016). En outre, une analyse lipidomique a révélé que 42 espèces lipidiques sont altérées avec la perte d'ANXA2, y compris une accumulation de phosphatidylcholine (Sveeggen et al., 2023). Dans la même étude, il a été spécifié que la localisation du cholestérol était affectée, bien que sa concentration demeurait inchangé. Ceci indique une altération de la dynamique des lipides membranaires (Sveeggen et al., 2023).

Outre son interaction avec la PD1 qui agit sur la composition en acide gras, l'ANXA6 joue un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol, agissant comme un régulateur clé de sa distribution et de son organisation dans les cellules. Il a été rapporté que la surexpression d'ANXA6 induisait l'accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs (ou corps multivésiculaires (MVB)) limitant ainsi sa disponibilité au niveau de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi. Cette redistribution affecte l'organisation des microdomaines lipidiques et impacte des processus cellulaires cruciaux tels que la signalisation et le trafic membranaire, médiés par les protéines SNARE (Cubells et al., 2007; Enrich et al., 2011, 2015; Grewal & Enrich, 2009). En plus de l'ANXA6, l'ANXA1 et A2 jouent un rôle crucial dans

l'homéostasie du cholestérol. L'ANXA1 facilite les interactions entre le réticulum endoplasmique et les MVB, favorisant ainsi le transfert de cholestérol de le reticulum endoplasmique vers les MVB ou inversement. Ce rôle est particulièrement important pour la régulation de l'expression des EGFR et pour la formation des vésicules intracellulaires nécessaires au trafic membranaire (Eden et al., 2016). L'ANXA2, quant à elle, a été montrée comme s'associant à des MVB riches en cholestérol (Morel & Gruenberg, 2007). En outre, une expression réduite de l'ANXA2 a été corrélée à une augmentation du transport des molécules vers les MVB, suggérant un rôle de cette dernière dans l'homéostasie du cholestérol.

### **3.3. Implication des ANX dans la réparation membranaire des cellules musculaires**

#### **3.3.1. Rôle des ANX dans la réparation membranaire**

##### **3.3.1.1. ANXA1**

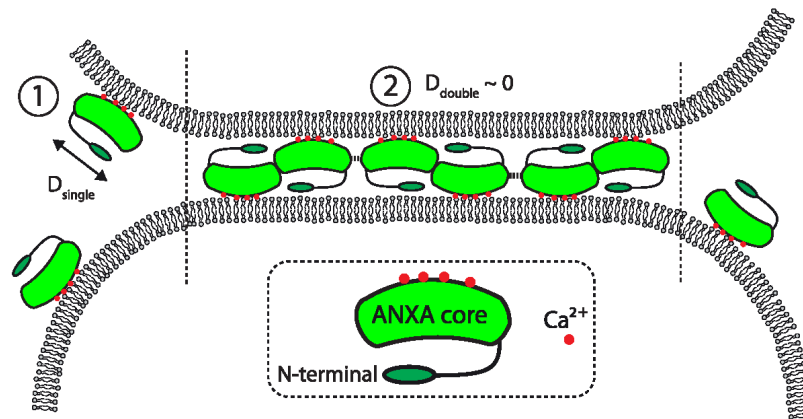
L'ANXA1, autrefois connue sous le nom de lipotropine-1 ou lipocortine-1, a été initialement découverte comme une protéine inhibitrice de la phospholipase, jouant un rôle clé dans les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes (Flower, 1988). Elle a été l'une des premières ANX identifiées pour son implication dans la réparation membranaire, en particulier dans les cellules musculaires (Lennon et al., 2003; Roostalu & Strähle, 2012).

Avec une masse moléculaire de 37 kDa, l'ANXA1 possède la capacité d'agréger des vésicules en présence de  $Ca^{2+}$ , une caractéristique qu'elle partage avec l'ANXA2 (Bitto & Cho, 1999; Blackwood & Ernst, 1990; Lambert et al., 1997). Cette capacité à agréger les vésicules est essentielle pour le recrutement des composants nécessaires à la formation du "patch" lipidique au site de rupture membranaire.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment l'ANXA1 participe à l'agrégation des membranes. Un premier modèle suggère que l'ANXA1, sous forme monomérique, pourrait ancrer une seconde membrane via un site de liaison situé dans son domaine N-terminal (De La Fuente & Parra, 1995).

Un autre modèle propose que l'agrégation des vésicules se produit par la formation préalable d'un hétérotétramère avec la protéine S100A11, où deux molécules d'ANXA1 se lient à deux membranes différentes (Lambert et al., 1997; Lizarbe et al., 2013). En effet, la séquence N-terminale de l'ANXA1, en formant des hélices alpha amphipathiques, sert de sites de liaison avec la protéine S100A11. Dans ce complexe, la liaison de la protéine S100A11 au  $Ca^{2+}$  est nécessaire pour établir une conformation capable d'interagir efficacement avec l'ANXA1 (Réty et al., 2000). Enfin, un dernier modèle, dimérique cette fois-ci, où deux ANXA1 se lient entre elles par leur domaine N terminal respectif a été récemment proposé permettant la réticulation

sans fusion de deux membranes de vésicules unilamellaires géantes (GUVs). Les mesures en temps réel ont montré que cette réticulation était compatible avec le processus de réparation de la membrane plasmique (Klenow et al., 2021) (Figure 9).



**Figure 9 : Représentation schématique de la réticulation membranaire induite par les ANXA1 et A2 pour la fusion des membranes**

Dans le modèle proposé par Klenow et al., 2021, les ANXA1 et A2 ont une position fixe à la jonction entre deux membranes (2). L'interprétation proposée est qu'il existe des interactions entre ANX, aussi bien lorsqu'elles se situent sur des membranes opposées que si elles sont attachées à une même membrane. En revanche, lorsqu'une seconde membrane ne vient pas empêcher le mouvement des ANX (1), ces dernières demeurent sous forme de monomères.

Image tirée de Klenow et al., 2021

Dans le contexte de la réparation membranaire, l'ANXA1 interagit également avec la dysferline, une protéine cruciale pour la réparation du sarcolemme endommagé (Lennon et al., 2003). L'hétérotétramère ANXA1/S100A11 semble jouer un rôle clé dans l'agrégation des vésicules, en particulier des lysosomes, facilitant ainsi la formation et l'attachement du patch lipidique à la zone endommagée (Lennon et al., 2003). Cette interaction est particulièrement importante dans les cellules musculaires, où la rupture mécanique du sarcolemme entraîne un influx massif de  $\text{Ca}^{2+}$ , activant l'ANXA1 et favorisant ainsi la réparation membranaire (Cagliani et al., 2005). Une étude a également mis en évidence l'accumulation d'ANXA1 au site de rupture dans les cellules musculaires endommagées par un laser, formant un sous-domaine que les auteurs ont appelé « cap ». Également enrichi en ANXA2, le sous-domaine « cap » présente à sa base un sous-domaine « shoulder », dans lequel d'autres protéines impliquées dans la réparation, comme la dysferline ou MG53, sont localisées (Demonbreun, Quattrocchi, et al., 2016).

En outre, l'ANXA1 est impliquée dans la réparation des membranes endommagées par des toxines formant des pores (PFTs), telles que la streptolysine-O (SLO). Dans ces situations, l'ANXA1 est recrutée aux sites de perméabilisation membranaire, où elle contribue à la

formation de microparticules, favorisant ainsi l'élimination des segments endommagés de la membrane (Babiychuk et al., 2009, 2011). Ce mécanisme, basé sur l'accumulation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et le bourgeonnement de la membrane perméabilisée, souligne le rôle critique de l'ANXA1 dans divers processus cellulaires nécessitant une réparation rapide et efficace des membranes.

De plus, il est démontré que l'ANXA1 est essentielle pour la régénération tissulaire du muscle squelettique, mais pas pour la réparation des myofibres. En effet, chez des souris ANXA1<sup>-/-</sup>, la régénération après une blessure est retardée en raison d'une fusion cellulaire réduite. L'ANXA1 est donc cruciale pour la fusion des myoblastes avec les myofibres endommagées, mais selon cette étude, pas pour la réparation du sarcolemme (Leikina et al., 2015).

Enfin, il a été montré que l'ANXA1 est essentielle pour la régénération musculaire, en favorisant la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-réparateur via les récepteurs FPR2/ALX et la voie AMPK (McArthur et al., 2020).

### **3.3.1.2. ANXA2**

L'ANXA2, autrefois appelée Lipocortine II ou encore chaîne lourde de Calpactine I, est une protéine de 38 kDa qui partage de nombreuses caractéristiques fonctionnelles avec l'ANXA1, notamment sa capacité à agréger des vésicules en présence de  $Ca^{2+}$  (Bitto & Cho, 1999; Blackwood & Ernst, 1990; Lambert et al., 1997) et à interagir avec les protéines S100 (Réty et al., 1999; Rintala-Dempsey et al., 2008).

Le rôle de l'ANXA2 dans la réparation de la membrane plasmique est particulièrement évident dans les cellules musculaires, où elle forme un complexe avec la dysferline. Ce complexe aide à fixer le patch lipidique à la membrane endommagée, jouant ainsi un rôle crucial dans le colmatage de la zone de rupture (Lennon et al., 2003). En interaction avec S100A10, l'ANXA2 facilite l'agrégation des vésicules et leur recrutement au site de la lésion, un processus essentiel pour une réparation efficace des membranes (Lambert et al., 1997).

L'ANXA2 interagit également avec d'autres membres de la famille des protéines S100, notamment S100A11. Dans les cellules endothéliales et cancéreuses, le complexe ANXA2/S100A11 est recruté au site de rupture, où il favorise la repolymérisation de l'actine, stabilisant ainsi la membrane néo-formée (Jaiswal et al., 2014; Koerdt & Gerke, 2017). Cette interaction est particulièrement cruciale dans les cellules métastatiques, où une réparation rapide et efficace de la membrane est vitale, faisant de l'ANXA2 et de S100A11 des cibles potentielles pour les thérapies contre les cancers métastatiques (Jaiswal et al., 2014).



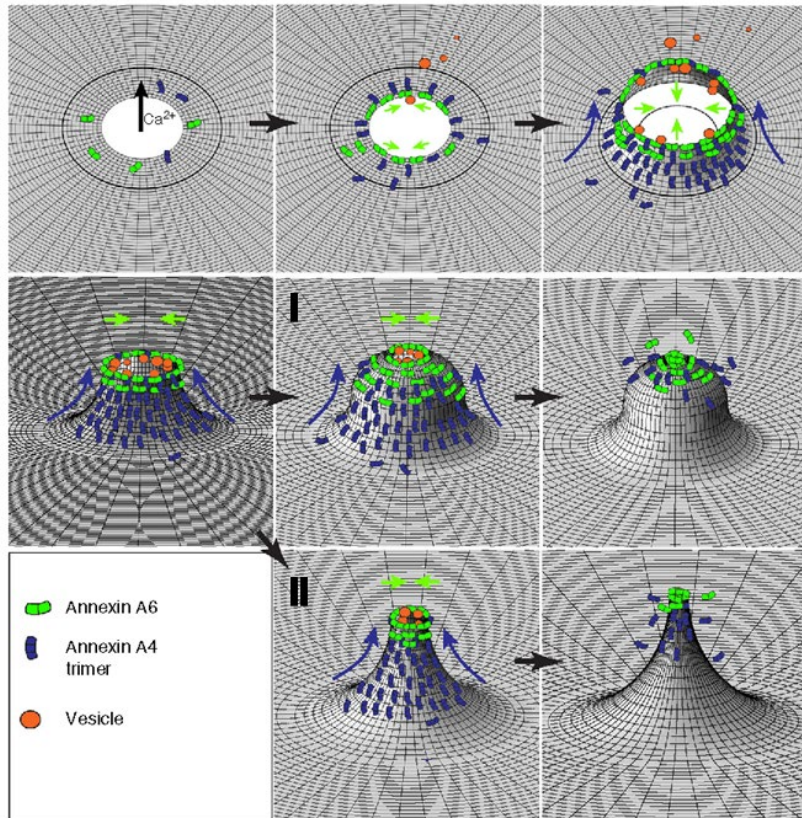
Contrairement à l'ANXA1, l'absence d'ANXA2 compromet la réparation des myofibres et entraîne une diminution progressive de la fonction musculaire, similaire à ce qui est observé dans le cas d'un déficit en dysferline. De plus, l'absence d'inflammation dans le modèle de souris déficientes en ANXA2 a mis en évidence le rôle clé de cette protéine en tant que régulateur de l'inflammation (Defour et al., 2017).

Enfin, notre équipe a démontré que l'ANXA2 était également cruciale pour la réparation de la membrane plasmique dans les cellules cancéreuses invasives du sein et du pancréas. Lorsque l'ANXA2 est inhibée, les cellules ne parviennent pas à réparer les dommages membranaires dus au stress mécanique (Gounou et al., 2023).

### **3.3.1.3. ANXA4**

L'ANXA4, l'une des plus petites protéines de la famille des ANX avec une masse moléculaire de 36 kDa, joue un rôle essentiel dans la réparation membranaire des cellules cancéreuses (Vicic et al., 2022). Comme les ANXA1 et A2, l'ANXA4 est capable d'agréger des vésicules en présence de  $Ca^{2+}$  (Kaetzel et al., 2001), formant des trimères et des réseaux bidimensionnels sur les membranes, ce qui pourrait faciliter le recrutement de vésicules pendant la réparation membranaire. Cette capacité de l'ANXA4 à s'auto-assembler (Piljic & Schultz, 2006) sur les membranes biologiques pour former des agrégats immobiles (Crosby et al., 2013) est également partagée avec l'ANXA5, et permet notamment de stabiliser les membranes endommagées.

L'ANXA4 intervient particulièrement dans les cellules cancéreuses, où elle s'accumule sous forme de trimères au site de la lésion, induisant une évagination des bords de la rupture pour faciliter la constriction par l'ANXA6 (Boye et al., 2017) (Figure 10). Ce mécanisme, essentiel à la réparation membranaire, est soutenu par la capacité de l'ANXA4 à induire des courbures membranaires (Florentsen et al., 2021), une fonction centrale dans le modèle proposé par Boye et al., où l'ANXA4 collabore avec l'ANXA6 pour refermer la lésion (Boye et al., 2017, 2018). En outre, l'interaction entre l'ANXA4 et l'ANXA5, observée dans les cellules MCF7 (Mularski et al., 2021), suggère que ces protéines interagissent pour induire des courbures et stabiliser les membranes, plutôt que de former des réseaux cristallins comme proposé pour l'ANXA5 (Bouter et al., 2011).



**Figure 10 : Simulation en 3D du mode d'action de l'ANXA4 et A6 lors de la réparation membranaire des cellules cancéreuses**

En l'absence de dommage membranaire, l'ANXA6 et l'ANXA4 se trouvent sous forme de monomères répartis uniformément dans le cytoplasme. À la suite d'une lésion de la membrane plasmique, l'entrée de  $Ca^{2+}$  active le recrutement de l'ANXA6 et de l'ANXA4 vers les bords du site de rupture. L'ANXA6 commence alors à resserrer les bords de la déchirure. L'ANXA4, quant à elle, s'assemble en trimères, générant une courbure locale de la membrane. Ces forces conjuguées de constriction des bords et de création de courbure facilitent la fermeture rapide de la plaie, aboutissant à la fusion des bords de la membrane. Les vésicules recrutées et fusionnées avec la membrane autour de la plaie contribuent également à la réparation en réduisant la taille de l'ouverture. La courbure induite par l'ANXA4 peut adopter différentes formes : soit une structure arrondie (I), soit une forme en entonnoir (II).

Image tirée de Boye et al., 2017

L'ANXA4 est surexprimée dans plusieurs types de cancer (Choi et al., 2016; S. Deng et al., 2012), ce qui pourrait expliquer leur capacité à survivre aux contraintes mécaniques lors de la migration. Une implication de l'ANXA4 dans la réparation membranaire d'autres types cellulaires que les cellules cancéreuses épithéliales reste à démontrer.

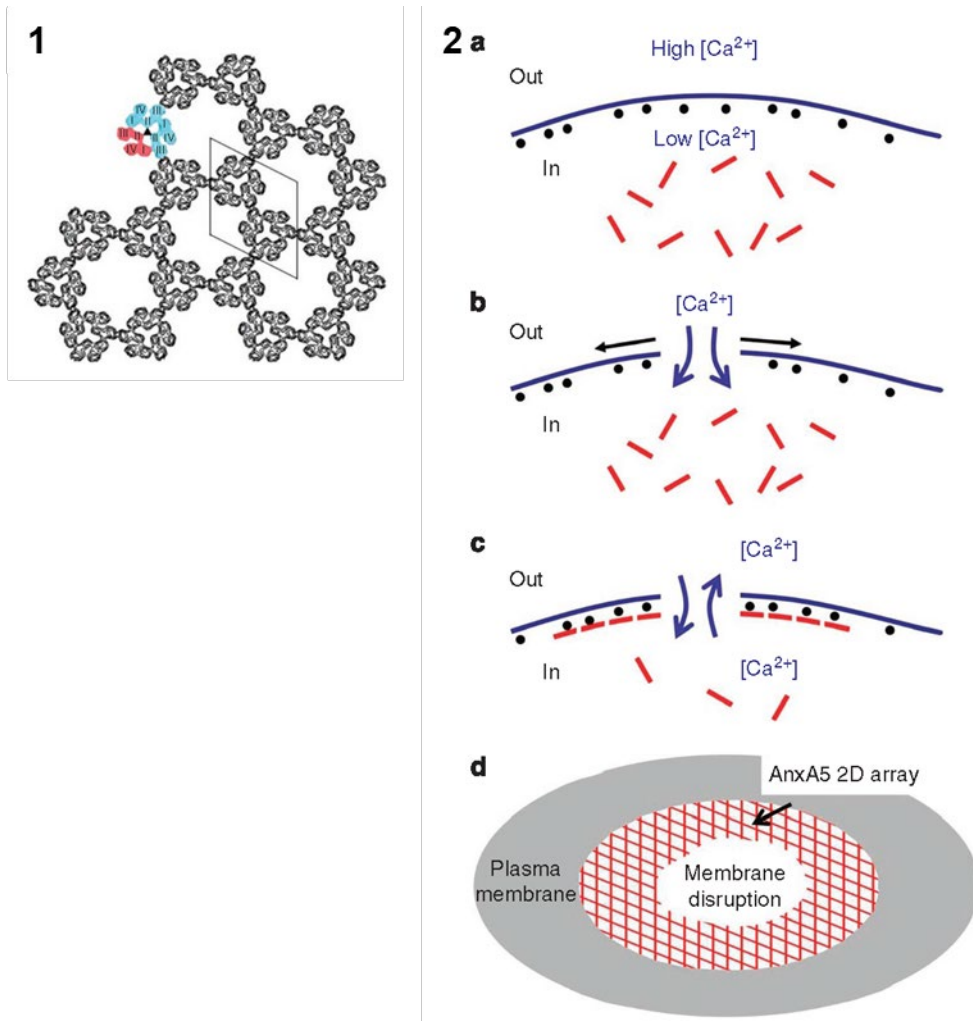
Bien qu'en faible quantité, notre équipe a rapporté sa présence dans le noyau et le cytoplasme des myoblastes ainsi que dans le cytoplasme des myotubes sur une lignée de cellules musculaires squelettiques humaine (Croissant et al., 2022).

#### **3.3.1.4. ANXA5**

L'ANXA5 est une petite protéine de 35 kDa et probablement l'une des ANX les mieux étudiées pour son rôle dans la réparation membranaire. Bien que l'ANXA5 ne soit pas capable d'agrèger des liposomes, il a été démontré qu'elle peut agrèger des vésicules synaptiques dans le tissu nerveux central du rat, et former des réseaux bidimensionnels (2D) lorsqu'elle interagit avec une membrane (Gotow et al., 1996; Bergsma-Schutter et al., 2003). Cette capacité à former des réseaux 2D est cruciale pour stabiliser la membrane plasmique endommagée et empêcher l'expansion de la rupture, un processus essentiel pour la réparation membranaire (Bouter et al., 2011).

Les expériences d'ablation laser sur des cellules périvasculaires murines déficientes en ANXA5 ont montré que l'absence de cette protéine empêche la réparation de la membrane plasmique. L'ajout d'ANXA5 recombinante dans le milieu extracellulaire a restauré la capacité de ces cellules à réparer leur membrane. En revanche, l'ajout d'une ANXA5 mutée, incapable de former des réseaux 2D, n'a pas permis de restaurer cette capacité de réparation (Bouter et al., 2011).

L'ANXA5, tout comme l'ANXA4, est rapidement recrutée au site de rupture membranaire, où elle se lie aux phospholipides chargés négativement, comme la PS, présents sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette liaison est suivie de l'auto-assemblage de trimères d'ANXA5, qui forment un réseau 2D autour de la zone de rupture, permettant de stabiliser la membrane endommagée soumise aux forces de tension exercées par le cytosquelette cortical (Bouter et al., 2011) (Figure 11).



**Figure 11 : Auto-association de l'ANXA5 et représentation schématique de son mode d'action lors d'un dommage membranaire**

**(1)** Auto-assemblage de l'ANXA5 sur la membrane. L'auto-assemblage de trimères d'ANXA5 forme des cristaux bidimensionnels avec différentes organisations spatiales. Un trimère d'ANXA5 est coloré sur l'illustration : un monomère en rouge et deux en bleu. L'unité de base de ce réseau cristallin est caractérisée par une symétrie hexagonale de type p6. **(2)** Etapes de l'auto-assemblage de l'ANXA5 à la membrane lors d'une rupture membranaire **(a)** Cellule intacte caractérisée par un milieu intracellulaire d'une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  inférieure à celle du milieu extracellulaire. L'ANXA5 (bâtonnets rouges) se trouve sous forme libre dans le cytosol tandis que la PS (sphères noires) compose le feuillet interne de la bicouche lipidique. **(b)** Rupture de la membrane : lorsqu'une membrane est déchirée, les forces exercées par le cytosquelette d'actine a tendance à agrandir la rupture (représenté par des flèches noires). **(c)** Formation d'un réseau d'ANXA5 à la rupture : l'influx de calcium et la liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne un changement conformationnel de l'ANXA5. Les molécules d'ANXA5 se fixent aux PS aux bords de la lésion en formant des trimères qui s'auto-assemblent. Ces réseaux bidimensionnels d'ANXA5 stabilisent alors la membrane et empêchent l'expansion de la rupture. **(d)** Vue de dessus d'une membrane endommagée : le réseau 2D d'ANXA5 entoure la zone déchirée.

Images tirées de Bouter et al., 2011

Depuis, il a été montré que l'ANXA5 participe à la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques et placentaires humaines, selon le même mécanisme (Carmeille et al., 2015, 2016).

Les ANXA4 et A5 partagent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles similaires, incluant la capacité de former des trimères qui induisent une courbure élevée de la membrane, un phénomène clé pour accélérer la réparation membranaire (Boye et al., 2017). Les études par microscopie à force atomique ont révélé que ces trimères forment des arrangements désordonnés sur les membranes pendant le processus de réparation, imposant une courbure qui favorise la fermeture des plaies (Mularski et al., 2021).

Ces découvertes soutiennent l'idée que l'ANXA5 joue de multiples rôles dans la stabilisation et la réparation des membranes endommagées, en favorisant la fermeture des ruptures et en retardant les processus apoptotiques.

### **3.3.1.5. ANXA6**

L'ANXA6 est la plus grande des ANX, avec une masse moléculaire de 68 kDa, et se distingue par la présence de deux domaines en C-terminal (Gerke et al., 2005). Elle joue un rôle crucial dans la réparation membranaire, comme cela a été démontré dans diverses études. En cas de dommage mécanique, par exemple, une étude sur des embryons de poisson zèbre a montré que l'absence d'ANXA6 entraîne des défauts de réparation membranaire des cellules musculaires et le développement de myopathies similaires à celles observées en cas de déficience en dysferline (Roostalu & Strähle, 2012).

L'ANXA6 est rapidement recrutée au site de rupture du sarcolemme, indépendamment de la dysferline, dans les 20 secondes suivant une lésion, et son absence empêche l'accumulation des ANXA1 et A2, soulignant l'importance d'un recrutement séquentiel pour une réparation efficace (Demonbreun, Allen, et al., 2016). De plus, l'implication de l'ANXA6 dans la réparation membranaire a été observée dans des cellules exposées à des toxines formant des PFTs, où elle participe à la formation de bourgeons membranaires et à l'émission de microparticules contenant à la fois l'ANXA6 et les PFTs (Potez et al., 2011).

Comme toutes les ANX, l'ANXA6 se lie aux membranes via des lipides contenant de la PS en présence de  $Ca^{2+}$ , formant un patch lipidique au site de lésion dans diverses cellules, notamment les fibres musculaires, les cardiomyocytes et les neurones. L'ajout d'ANXA6 exogène peut améliorer la capacité de réparation de la membrane plasmique sans interférer avec la localisation de la protéine endogène (Demonbreun et al., 2022). Cette capacité à former des structures stabilisatrices à la surface des membranes endommagées est cruciale pour la

réparation, et des études suggèrent que l'ANXA6 pourrait également participer à l'agrégation de vésicules, contribuant ainsi à la stabilisation du cytosquelette cortical lors de ce processus (Monastyrskaya et al., 2009).

Il a également été démontré que la réparation membranaire de cellules de tumeur mammaire MDA-MB-231 (M.D. Anderson Metastatic Breast cancer-231) endommagées par migration sur du collagène fibrillaire requiert l'ANXA5 et l'ANXA6 (Bouvet et al., 2020). Bien que la suppression simultanée de ces deux ANX n'affecte pas la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*, elle réduit leur capacité à former des tumeurs secondaires *in vivo*, ce qui souligne l'importance des ANXA5 et A6 dans l'invasion tumorale et la métastase (Gounou et al., 2023). En outre, une expression élevée de ces ANX est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de certains types de cancer.

L'ANXA6 a également été identifiée comme un facteur secondaire important dans les dystrophies musculaires, où une forme tronquée d'ANXA6 (ANXA6N32) empêche la translocation de la protéine sauvage au site de rupture, perturbant ainsi la réparation membranaire (Swaggart et al., 2014).

Enfin, des recherches récentes ont montré que l'ANXA6 joue un rôle crucial dans la sécrétion d'exosomes lors de la réparation de la membrane plasmique. En présence de  $Ca^{2+}$ , l'ANXA6 est recrutée vers les MVB et est essentielle à la sécrétion d'exosomes. En son absence, les MVB restent bloqués à la périphérie des cellules, montrant ainsi l'importance de l'ANXA6 dans ce processus (Williams et al., 2023).

### **3.3.1.6. ANXA7**

L'ANXA7 a été la première ANX découverte chez l'humain (Creutz et al., 1978). Elle se distingue par la longueur exceptionnelle de sa région N-terminale, qui est la plus longue parmi les ANX humaines. L'ANXA7 est présente sous deux isoformes dans les cellules musculaires : une de 47 kDa, prédominante dans les myoblastes (les cellules précurseurs des muscles), et une autre de 51 kDa, qui n'est exprimée que dans les cellules musculaires différenciées (Selbert et al., 1995). Bien que l'implication de l'ANXA7 dans la réparation membranaire ait été récemment rapportée dans les cellules cancéreuses (Sønder et al., 2019), son rôle dans les cellules musculaires reste à élucider.

Dans le contexte des cellules cancéreuses, l'ANXA7 facilite la réparation de la membrane plasmique endommagée en recrutant les protéines ALG-2 et ALIX, ce qui permet la formation du complexe ESCRT-III. Ce complexe joue un rôle crucial dans le processus de "membrane shedding", où des microvésicules se forment pour éliminer les dommages (Sønder et al., 2019).

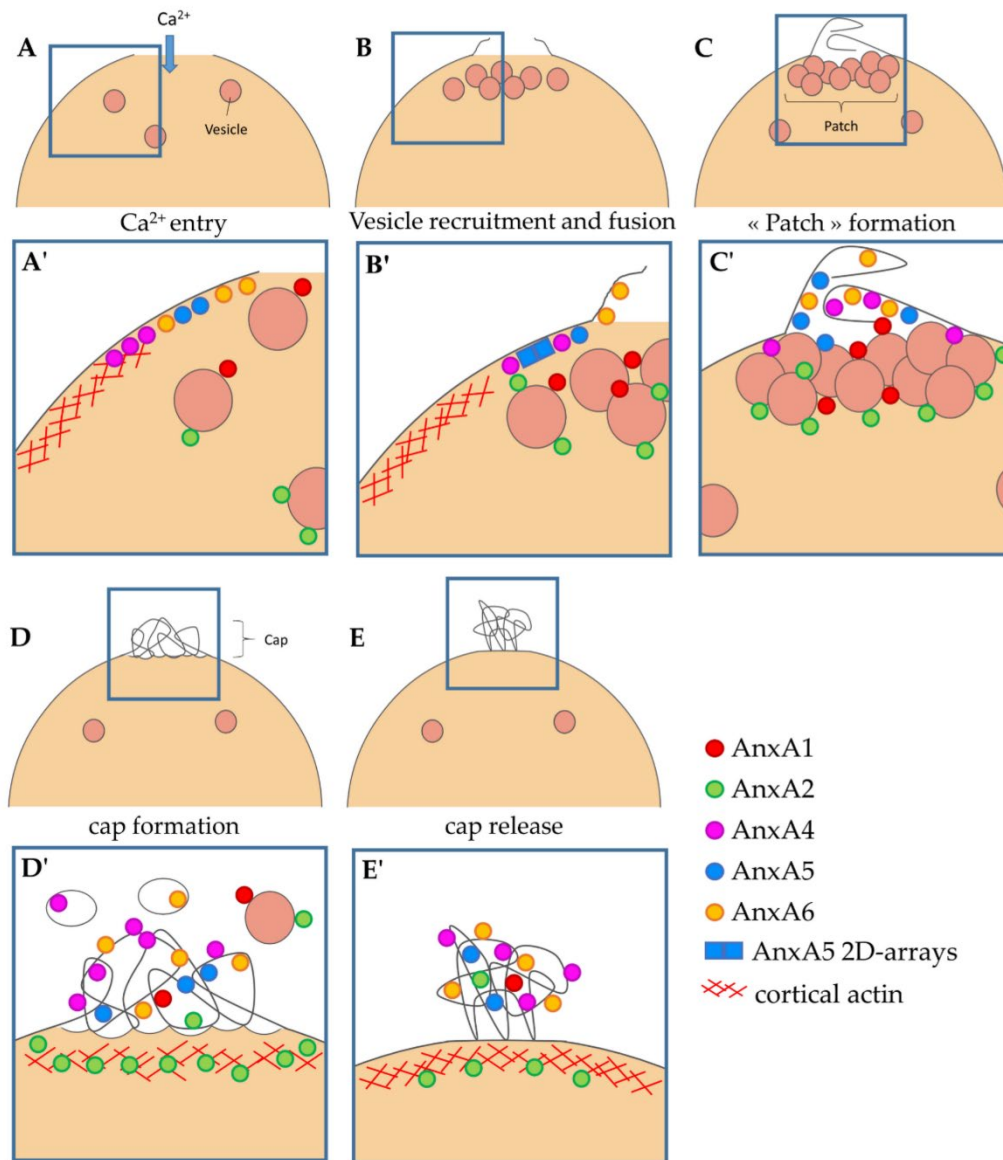
En revanche, bien qu'aucune étude n'ait directement démontré l'implication de l'ANXA7 dans la réparation des membranes musculaires, des recherches ont montré que sa localisation est altérée dans les fibres musculaires des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, suggérant un potentiel rôle dans ce contexte (Selbert et al., 1996).

Il a été rapporté que l'ANXA7 peut s'auto-associer en dimère à la surface des membranes, favorisant la fusion et l'agrégation des membranes de manière dépendante du  $Ca^{2+}$  (Srivastava et al., 2023). Sa région N-terminale, bien que sa fonction spécifique ne soit pas complètement établie, est cruciale pour la liaison aux phospholipides, l'agrégation et la fusion membranaire. La suppression de 100 acides aminés dans cette région affecte négativement ces processus, indiquant que l'extrémité N-terminale est essentielle pour l'activité de l'ANXA7 (Naidu et al., 2005). De plus, cette région contient des sites de liaison pour d'autres protéines, telles que la galectine-3, cette dernière étant impliquée dans le recrutement des composants ESCRT pour réparer les lysosomes endommagés (Jia et al., 2020).

Enfin, il a été montré que l'expression d'ANXA7 est augmentée dans le carcinome hépatocellulaire. Lorsque l'expression d'ANXA7 est supprimée par interférence avec des ARNs, la prolifération et la métastase des cellules de carcinome hépatocellulaire sont réduites, suggérant un rôle clé de l'ANXA7 dans ces processus via la voie MAPK/ERK (Zhao et al., 2018).

En conclusion les ANX coopèrent entre elles et avec d'autres protéines de la machinerie de réparation afin d'orchestrer le rescellement de la membrane (Figure 12 et Tableau 2). Ce qu'il faut retenir est que l'ANXA1 et ANXA2 participent à la formation du patch lipidique avec l'agrégation des vésicules intracellulaires et leur recrutement au site de la lésion membranaire. L'ANXA2, en interaction avec la dysferline, joue un rôle crucial dans la fixation du patch lipidique et la repolymérisation de l'actine, essentielle à la stabilisation de la membrane nouvellement formée. ANXA4 et ANXA5 stabilisent les membranes endommagées en formant des réseaux bidimensionnels. L'ANXA4 en coopération avec l'ANXA6 induit également une courbure de la membrane lésée, favorable à la réparation. Ces protéines interagissent de manière séquentielle pour garantir une réparation rapide et efficace des membranes cellulaires endommagées. L'ANXA7 participe à la mise en place du processus de membrane shedding dans le but d'éliminer les dommages.





**Figure 12 : Modèle de la réparation membranaire dans les cellules musculaires squelettiques et du rôle des ANX**

Lorsqu'une rupture du sarcolemme se produit, l'afflux de  $Ca^{2+}$  et facteurs oxydants dans le sarcoplasme active plusieurs processus. Séquentiellement : (A, A') L'influx de  $Ca^{2+}$  provoque l'activation des ANX au niveau du sarcolemme endommagé, notamment les ANXA5, A6 et A4, ainsi que le recrutement de vésicules intracellulaires associées aux ANXA1 et A2. (B, B') La réduction de la tension membranaire s'opère grâce à la dépolymérisation de l'actine et à l'exocytose des vésicules intracellulaires, ce qui augmente la surface du sarcolemme. Cet excès de membrane au site de la lésion permet à l'ANXA6 de s'y associer, tandis que l'ANXA5 s'organise en réseau pour empêcher l'agrandissement de la lésion. Les vésicules intracellulaires sont également acheminées vers la zone endommagée. (C, C') Les vésicules intracellulaires s'agrègent pour former un patch lipidique qui scelle la rupture. Les ANXA4 et A6 favorisent le repli des extensions du sarcolemme afin de créer une barrière solide  
Image tirée de (Croissant et al., 2022)



Nom	Rôle	Interaction
ANXA1	Formation du patch lipidique : agrégation et recrutement des vésicules intracellulaires.	S100A11 Dysferline Elle-même
ANXA2	Formation du path lipidique : agrégation et recrutement des vésicules intracellulaires. Accrochage du patch lipidique via interaction avec dysferline.	S100A10 Dysferline
ANXA4	Agrégation des vésicules intracellulaires. Stabilisation, courbure puis évagination des bords endommagés de la membrane.	Elle-même ANXA5
ANXA5	Agrégation de certaines vésicules intracellulaires. Stabilisation de la membrane plasmique endommagée.	Elle-même ANXA4
ANXA6	Agrégation de vésicules intracellulaires. Formation du patch lipidique. Secrétion d'exosomes.	
ANXA7	Fusion et aggrégation de membranes. Participation à la mise en place du « membrane shedding » par le recrutement ALG-2 et ALIX.	Elle-même

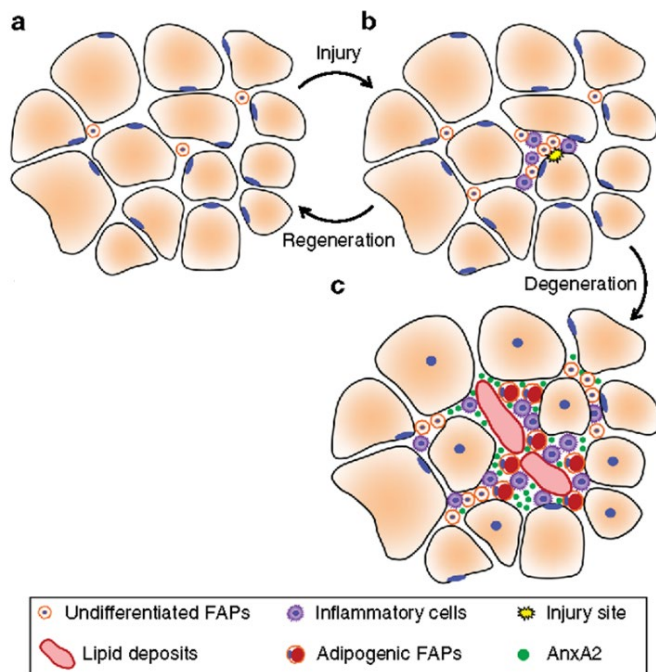
**Tableau 2 : Récapitulatif des interactions et rôles des différentes ANX dans la réparation membranaire**

### 3.3.2. Altérations liées aux ANX dans les dystrophies musculaires

Bien que jusqu'à présent aucune corrélation n'ait été établie entre le développement d'une dystrophie musculaire et la mutation d'un gène codant pour une des ANX, il semblerait qu'elles aient une influence sur le phénotype clinique.

En effet, dans les dystrophies musculaires, une même mutation primaire entraîne des signes cliniques variés, tant en nature qu'en gravité (Cagliani et al., 2005; Heydemann et al., 2005; Quattrocelli et al., 2017; Vilchez et al., 2005). Dans ce cadre, les ANX seraient donc des facteurs secondaires de ces pathologies. Il a été rapporté que les ANXA1 et A2 sont surexprimées chez des patients italiens (Cagliani et al., 2005), américains (Kesari et al., 2008) et australiens (Waddell et al., 2011) atteints de dysferlinopathies. L'hypothèse avancée serait que ces surexpressions seraient une tentative pour compenser l'absence de dysferline. Toujours chez les dysferlinopathies, il a été révélé qu'un excès d'ANXA2, qui s'échappe des myofibres endommagés, active les FAPs résidents des muscles, qui se différencient en adipocytes, conduisant au remplacement progressif du tissu musculaire par du tissu adipeux, une

caractéristique bien connue de certaines LGMD (Hogarth et al., 2019) (Figure 13). Dans des modèles déficients en ANXA2, les cellules musculaires montrent un défaut significatif de réparation membranaire, bien que cela n'entraîne pas une inflammation chronique du muscle squelettique comme cela est généralement attendu lors de lésions récurrentes (Defour et al., 2017).



**Figure 13 : Représentation schématique de la conversion des FAPs en adipocytes causée par des fuites d'ANXA2 dans la LGMDR2.**

a) Dans un muscle sain, des FAPs résidents sont présents (b) Après une lésion des myofibres, des cellules inflammatoires envahissent le muscle et déclenchent la prolifération des FAPs. (c) Dans un muscle dysferlinopathique (LGMDR2), il y a une fuite et une accumulation progressive d'ANXA2 dans le milieu extracellulaire. Le maintien de l'environnement pro-inflammatoire ainsi induit, entraîne une prolifération excessive des FAPs, favorisant leur différenciation en adipocytes et concourant au remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux.

Image tirée de Hogarth et al., 2019

La surexpression d'ANXA1 et A2 a également été observée dans d'autres dystrophies musculaires telles que la DMD, la dystrophie musculaire de Becker et la LMGDR12, où elle pourrait, au vu des dernières avancées, contribuer au remplacement adipogénique des myofibres (Cagliani et al., 2005; Foltz et al., 2021).

L'ANXA6 est probablement l'ANX la plus étudiée en tant que facteur secondaire des dystrophies musculaires. Son rôle clé dans la réparation de la membrane plasmique a d'abord été révélé dans des modèles de poisson-zèbre et de souris. L'inhibition de son expression compromet la réparation des myofibres d'une manière similaire à une mutation dans le gène *DYSF* (Roostalu & Strähle, 2012). La déficience de l'ANXA6 perturbe l'accumulation d'ANXA1 et A2 au site de rupture, prévenant ainsi la réparation membranaire.

De plus, une forme tronquée d'ANXA6, nommée ANXA6N32, a été identifiée dans des modèles murins de LGMDR5 ou dysferlinopathiques, où elle empêche la translocation de la

forme complète d'ANXA6 vers le site de la lésion, perturbant ainsi l'assemblage de la machinerie de réparation membranaire et exacerbant la dystrophie (Demonbreun, Allen, et al., 2016; Swaggart et al., 2014).

Il a été rapporté que chez des modèles de souris LGMDR12 et DMD, les myofibres lésées présentaient une accumulation en ANXA1 et A6 réduite, altérant le mécanisme de réparation (Foltz et al., 2021; Quattrocelli et al., 2017). Ces observations faites uniquement chez la souris restent à confirmer chez l'Homme.

Enfin, l'ANXA7 a été étudiée dans le contexte de la DMD, où sa localisation dans les myofibres est perturbée. L'accumulation d'ANXA7 dans le sérum des patients au fur et à mesure de la progression de la maladie suggère en effet une fuite et donc un échec de la réparation membranaire des myofibres endommagées (Selbert et al., 1996). Contrairement aux muscles sains, où l'isoforme de 51 kDa devient majoritaire dans les myocytes différenciés, les muscles dystrophiques présentent une persistance de l'isoforme de 47 kDa, normalement prédominante dans les myoblastes indifférenciés. Cela traduit une perturbation de la myogenèse (Selbert et al., 1995).



## II. Objectifs

L'objectif global de ce projet de thèse est d'approfondir, par le prisme de l'étude des ANX, notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques et de leur lien avec le développement des dystrophies musculaires humaines. L'hypothèse de travail repose sur le fait qu'un grand nombre de dystrophies musculaires pourraient résulter d'un défaut de réparation membranaire et qu'une forte expression en ANX constituerait un facteur aggravant de ces pathologies. Ce travail a visé à fournir des bases fondamentales pour le développement de stratégies thérapeutiques innovantes.

Les quatre questions auxquelles nous nous sommes attachés à répondre dans le cadre de ce projet de thèse sont :

1. Quelles dystrophies musculaires résultent d'un défaut de réparation membranaire ?
2. Les dystrophies musculaires sont-elles associées à une dérégulation de l'expression des ANX ?
3. Le trafic des ANX lors du processus de réparation est-il altéré dans le cas des dystrophies musculaires ?
4. Des cellules auxiliaires sont-elles impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires ?

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes focalisés sur les ANXA1 à A6 (à l'exception de l'ANXA3) que nous avons étudiées chez 11 lignées musculaires myoblastiques, 2 saines et 9 dystrophiques. Nous avons suivi pour cela la feuille de route ci-dessous :

1. Déterminer la capacité myogénique des cellules dystrophiques,
2. Développer une nouvelle méthode pour l'induction de dommages à grande échelle permettant d'analyser, dans les cellules dystrophiques :
  - 2.1. La réparation membranaire,
  - 2.2. La survie cellulaire,
  - 2.3. L'impact de contrainte mécanique sur l'expression des ANX,
3. Evaluer l'expression basale des ANX au niveau transcriptionnel et traductionnel dans les myotubes dystrophiques comparés aux contrôles,
4. Etudier le trafic des ANX en temps réel dans les myotubes dystrophiques,
5. Mettre au point les conditions expérimentales l'étude des macrophages cocultivés avec des cellules musculaires.



# III. Matériels et Méthodes

## 1. Culture Cellulaire

### 1.1. Cellules musculaires

#### 1.1.1. Lignées cellulaires

Onze lignées de cellules musculaires striées squelettiques humaines (myoblastes), deux contrôles et neufs pathologiques, ont été utilisées dans le cadre de ce projet.

#### *Les lignées saines : LHCN-M2 et KM1421*

- La lignée LHCN-M2 est constituée de myoblastes dérivés de cellules satellites du grand pectoral d'un homme de 41 ans, individu sain. LHCN est l'acronyme de Lox-hTERT Hygromycin et Cdk4-Neomycin et deux constructions plasmidiques ont été utilisées pour l'immortalisation de ces cellules (C. H. Zhu et al., 2007). M2 désigne un sous-clone sélectionné pour sa capacité à former des myotubes lorsqu'incubé dans un milieu de différenciation.

Selon le même protocole d'immortalisation (à cela près que les marqueurs de sélection ont été modifiés), d'autres lignées ont été produites.

- La lignée KM1421 correspond à des myoblastes établis à partir de cellules satellites issues d'un muscle paravertébral d'une enfant de 13 ans, individu sain. KM est l'acronyme de Kamel Mamchaoui, l'expérimentateur à l'origine de la lignée.

#### *Les lignées LGMD R2 : 578, 107 et 814*

Pour des raisons pratiques, les expériences ont toujours été réalisées sur deux lignées pour chaque pathologie, la 107 remplaçant la 814 au fil du temps.

- La lignée 578 a été développée à partir de cellules satellites extraites d'un triceps d'une femme de 25 ans atteinte de LGMDR2. La patiente est atteinte d'une mutation homozygote (c.2810+2T>A) du gène de la dysferline aboutissant à une absence totale d'expression de la protéine (Philippi et al., 2012).

- La lignée 107 a été produite à partir de cellules satellites du muscle vaste latéral d'un homme de 37 ans atteint de LGMDR2. Ce dernier a été diagnostiqué avec une mutation composée hétérozygote faux-sens du gène de la dysferline (c.855+1delG/c.895G>A) (Philippi et al., 2012; Schoewel et al., 2012).

- La lignée 814 a été élaborée à partir de cellules satellites du muscle vaste latéral d'un homme de 57 ans atteint de LGMDR2. Le patient a été diagnostiqué comme étant porteur d'une

mutation homozygote faux-sens du gène de la dysferline (c.4022T>C) qui à l'instar de la lignée 107, conduit à l'agrégation intracellulaire de la protéine et une expression réduite de celle-ci (Philippi et al., 2012; Schoewel et al., 2012).

#### *Les lignées RMD2 : Cav69 et 650*

Les patients présentaient des signes cliniques modérés bien que les mutations à l'origine de la myopathie conduisent à des réductions sévères de la protéine.

- La lignée Cav69 a été établie à partir de cellules satellites d'une femme adulte atteinte de RMD avec une mutation hétérozygote faux sens (c.83C>T) (Timmel et al., 2015), conduisant à une réduction notoire de l'expression de la CAV3.

- La lignée 650 a été conçue à partir de cellules satellites extraites du muscle vaste latéral d'un homme de 44 ans atteint de RMD. Ce patient présentait une mutation hétérozygote faux sens (c.80G>A) sur le gène codant la CAV3 entraînant également une réduction marquée de l'expression de la protéine (Timmel et al., 2015).

#### *Les lignées DMD : AB1098 et 6594*

- La lignée AB1098 a été générée à partir de cellules satellites provenant d'un muscle paravertébral d'un garçon de 14 ans atteint de DMD. La mutation exhibée par ce patient concernait une délétion des exons 48 à 50 du gène de la dystrophine DMD (Tasca et al., 2023).

- La lignée 6594 a été élaborée depuis des cellules satellites extraites du quadriceps d'un nouveau-né de 20 mois. Également touchée par une délétion des exons 48 à 50 du gène DMD, la protéine présente une expression drastiquement réduite (Echigoya et al., 2019; Tasca et al., 2023).

#### *Les lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263*

- La lignée AB1080 a été développée à partir des cellules satellites d'un muscle paravertébral d'un homme de 26 ans atteint de FSHD. Ce dernier présentait une perte partielle du nombre de répétitions dans la région D4Z4, avec seulement 6,3 répétitions (Ma et al., 2024).

- La lignée KM1263 a été produite à partir des cellules satellites du rhomboïde d'un patient de 21 ans. Ce patient présentait quant à lui un nombre de répétitions estimé seulement à 2.

Toutes les lignées nous ont été fournies par Myoline, plateforme d'immortalisation des myoblastes humains de l'Institut de Myologie de Paris (UM76, Université Paris 6, France). Un résumé des informations principales sur les lignées utilisées se trouve dans le Tableau 3.



Pathologie	Mutation	Nom	Muscle	Âge	Sexe
Saines	∅	LHCN-M2	Pectoral	41 ans	M
		KM1421	Paravertébral	13 ans	F
LGMDR2	Dysferline	578	Triceps	25 ans	F
		107	Vastus lateralis	37 ans	M
		814	Vastus lateralis	57 ans	M
RMD2	Cavéoline-3	Cav69	?	Adulte	F
		650	Vastus lateralis	44 ans	M
DMD	Dystrophine	AB1098	Paravertébral	14 ans	M
		6594	Quadiceps	20 mois	?
FSHD1	Nombre de répétition D4Z4 réduit	AB1080	Paravertébral	26 ans	M
		KM1263	Rhomboïde	21 ans	M

**Tableau 3 : Liste des lignées cellulaires myoblastiques humaines immortalisées utilisées lors du projet**

Toutes les lignées cellulaires ont été fournies par la plateforme d'immortalisation des cellules humaines du Centre de Recherche en Myologie (UMR-S 974, Paris, France). Les lignées cellulaires contrôles correspondent aux LHCN-M2 et KM1421. Les lignées établies à partir de patients atteints de dystrophie musculaire de ceinture de type R2 (LGMDR2, anciennement LGMD2B), de maladie musculaire ondulante (RMD, anciennement LGMD1C), de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (FSHD) sont spécifiées. Les principales caractéristiques associées à chaque pathologie ainsi que les informations pertinentes concernant les patients dont sont issues ces lignées sont également indiquées.

### 1.1.2. Entretien

Les myoblastes des lignées saines et dystrophiques ont été cultivés dans un milieu de croissance dit KMEM (« K » Modified Eagle Medium). Ce milieu est composé comme suit : un volume de milieu 199 + Glutamax™ (Gibco® by Life Technologies), 4 volumes de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) « high glucose » + Glutamax™ sans pyruvate (Gibco® by Life Technologies). A ce volume, il a fallu rajouter 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco® by Life Technologies), 1% de gentamycine à 50 µg/mL (Gibco® by Life Technologies) et un mélange d'additifs « Skeletal Muscle Cell Growth Medium SupplementMix » (Promocell) concentré deux fois. Ce mélange d'additifs comprend 25 µg/mL de fœtine, 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique, 0.5 ng/mL de facteur de croissance fibroblastique, 5 µg/mL d'insuline recombinante humaine, et 0.2 µg/mL de dexaméthasone (DEX).

Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> placées à l'horizontale dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

Les passages ont été effectués à un rythme régulier de deux fois par semaine. Lorsque les cellules atteignaient une confluence de 80%, vérifiée par microscopie optique (Olympus IX81), le milieu de culture a été aspiré et les cellules lavées une fois au DPBS dépourvu de calcium et

de magnésium (DPBS<sup>-/-</sup>) puis détachées du support de culture par incubation dans 1 mL d'une solution de trypsine (1mM) – EDTA à 0,05% (Gibco®) pendant 5 minutes à 37°C. Pour neutraliser la trypsine, les cellules ont été reprises dans 9 mL de milieu DMEM additionnés de 10% de SVF. La solution a été centrifugée pendant 5 minutes à 200 g à température ambiante. Le culot cellulaire a été repris dans 1 mL de milieu de culture KMEM à 37°C, et la concentration cellulaire a été calculée par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma et d'un marquage au bleu de Trypan. Selon le temps nécessaire pour atteindre à nouveau 80% de confluence, le volume adéquat de suspension cellulaire a été réensemencé dans les flasques.

### **1.1.3. Différenciation**

Dès que les myoblastes atteignaient 80% de confluence, la différenciation des myoblastes a été induite en remplaçant le milieu de croissance par un milieu de différenciation préalablement chauffé à 37°C. Ce dernier est composé d'un volume de milieu « M199 + Glutamax<sup>TM</sup> », de quatre volumes de DMEM « high glucose + Glutamax<sup>TM</sup> » sans pyruvate, et de 10 µg/mL d'insuline recombinante humaine. La différenciation variait de 24 à 96 heures selon les protocoles d'expérience.

## **1.2. Macrophages**

### **1.2.1. Cellules**

Deux types de macrophages ont été utilisés au cours de ce projet, les RAW 264.7 et les BMDM - La lignée cellulaire RAW 264.7 correspond à des macrophages murins isolés depuis une tumeur artificiellement induite chez une souris mâle par le virus de la leucémie murine Abelson (Ab-MLV). Cette lignée nous a été gracieusement fournie par l'équipe de Frédéric Saltel (U1312, BRIC, Bordeaux). La lignée reçue avait été transformée pour que l'actine fluoresce dans le rouge avec un tag mCherry.

- Les BMDM de Bone-Marrow-Derived Macrophages correspondent à des macrophages générés en laboratoire à partir de cellules de moelle osseuse de souris. Ces cellules nous ont été envoyées par Gaëtan Juban dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe de Bénédicte Chazaud (UMR 5261 - U1315, Institut NeuroMyoGène, Lyon).

### **1.2.2. Entretien**

Les macrophages ont été cultivés en DMEM « high glucose » + Glutamax<sup>TM</sup> avec pyruvate (Gibco® by Life Technologies), additionné de 10% de SVF et de 1% de Penicilline-Streptomycine.

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

Les passages ont été effectués deux fois par semaine. Lorsque les cellules atteignaient une confluence de 80%, vérifiée par microscopie optique (Olympus IX81), le milieu de culture a été aspiré, les cellules lavées deux fois au DPBS<sup>-/-</sup> puis détachées de leur support en deux étapes : une incubation pendant 5 minutes à 37°C dans 1,5 mL d'une solution de trypsine (1mM) – EDTA à 0,05% et leur grattage avec un grattoir stérile. Pour neutraliser la trypsine, les cellules ont été reprises dans 9 mL de milieu de croissance. La solution a été centrifugée pendant 7 minutes à 400 g à température ambiante. Le culot cellulaire a été repris dans 5 mL de milieu de culture DMEM 10% SVF à 37°C, et la concentration cellulaire a été calculée par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma et d'un marquage au bleu de Trypan. Selon le temps nécessaire pour atteindre à nouveau 80% de confluence, le volume adéquat de suspension cellulaire a été réensemencé dans de nouvelles boîtes de Pétri.

### **1.2.3. Coculture avec cellules musculaires**

Pour les expériences de cocultures, les macrophages ont également été cultivés en présence de myoblastes dans les milieux de croissance (KMEM) et de différenciation (KMEM Différenciation) spécifiques à ces derniers.

## **2. Etude de la capacité des myoblastes à former des myotubes *in vitro***

Pour chaque lignée cellulaire,  $1,1 \cdot 10^5$  cellules ont été ensemencées dans un puits de 1 cm de côté (plaque 8 puits, fond plat, Ibidi) dans 250 µL de milieu KMEM pendant 24 heures. Il s'est ensuivi une incubation d'au moins 72 heures dans 250 µL de KMEM Différenciation. Après vérification de la présence de myotubes en microscopie à champ clair (présence de larges cellules multinuclées), les cellules ont été rincées 3 fois avec du DPBS supplémenté en calcium et magnésium (DPBS<sup>+/+</sup>), puis fixées dans 1 mL de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10 minutes. A la suite de trois lavages au DPBS<sup>+/+</sup>, les cellules ont été perméabilisées au Triton X-100 à 0,1% pendant 5 minutes, puis à nouveau lavées trois fois avec le DPBS<sup>+/+</sup>. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 10 minutes avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) 1% puis 1 heure dans de la phalloïdine couplée au tétraméthylrhodamine-isothiocyanate (TRITC) (Sigma, P1951) au 1/1000 dans de la BSA 1%. Après trois lavages supplémentaires au DPBS<sup>+/+</sup>, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes en DAPI 1X (Sigma), puis lavées à trois reprises

avec du DPBS<sup>+/+</sup>. Les observations ont été réalisées en microscopie à fluorescence (Olympus IX81).

### **3. RT-qPCR**

#### **3.1. Extraction et purification des ARN**

Après vérification par microscopie optique de l'état de différenciation des cellules musculaires, les myotubes ont été soigneusement rincés au DPBS<sup>-/-</sup> avant d'être décollés et centrifugés suivant les mêmes étapes que celles du protocole de passage des cellules. A l'issue de la centrifugation, le surnageant a été délicatement aspiré, puis le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 mL de DPBS<sup>-/-</sup> et transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL. Une nouvelle centrifugation à 200g pendant 5 minutes a alors été effectuée, le surnageant a été aspiré et les culots cellulaires obtenus ont ensuite été congelés à -80°C.

L'extraction des ARN a commencé par la reprise du culot de cellules congelées à -80°C dans 1 mL de Trizol froid. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés au mélange. Après 2-3 minutes à température ambiante, le mélange a ensuite été vortexé pendant 30 secondes jusqu'à ce que la solution devienne blanche. La phase suivante a consisté en une série de centrifugations successives. La première centrifugation du mélange a été réalisée à 15 000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été soigneusement récupérée et additionnée de 500 µL d'isopropanol pour précipiter les ARN. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Une nouvelle centrifugation à 15 000g pendant 20 minutes à 4°C a été effectuée pour obtenir le culot d'ARN. Le surnageant a été retiré et le culot a été lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 75% (dilué dans de l'eau Milli-Q), chaque lavage ayant été suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 15 000g. Après les lavages, le surnageant a été retiré autant que possible et le culot a été laissé à l'air libre sur la paillasse pour sécher. Une fois sec, le culot a été resuspendu dans 40 µL d'eau stérile puis stocké à 4°C.

La pureté des ARN a été vérifiée au spectrophotomètre en mesurant les ratios DO260/DO230 et DO260/DO280 pour évaluer la contamination respectivement par le phénol et par les protéines. La quantité d'ARN total a également été évaluée avec le spectrophotomètre en utilisant la DO260 pour déterminer la concentration, avec un coefficient d'extinction de 40 ng/µL.

### 3.2. Transcription inverse des ARN messagers

La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814. Ainsi, 1 µg d'ARN a été placé dans un volume final de 10 µL d'eau dans un tube PCR. Parallèlement, un mélange de réactifs a été préparé en combinant 2 µL du tampon commercial RT (composition non communiquée), 0,8 µL de dNTP, 2 µL d'amorces aléatoires, 1 µL de reverse-transcriptase (RT), et en ajustant le volume final à 10 µL avec de l'eau Milli-Q. Ce mélange a ensuite été ajouté au tube PCR contenant l'ARN, puis le tout a été incubé selon le programme suivant : une étape d'hybridation à 25°C pendant 10 minutes, suivie d'une reverse transcription à 37°C pendant 2 heures. L'enzyme RT a ensuite été inactivée par incubation à 85°C pendant 5 minutes. Les cDNA obtenus ont été stockés à 4°C.

### 3.3. Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne

La qPCR a été effectuée à l'aide du kit SYBR (Eurogentec Takyon ROX SYBR 2x Master Mix dTTP). La GAPDH a été utilisée comme gène de ménage pour chaque expérience. Les cDNA ont été dilués au 1/25 et 10 µL de la dilution ont été ajoutés à 40 µL d'eau. Le tableau 4 présente les séquences des primers GAPDH (primer fourni par l'équipe de Majid Khatib du BRIC, U1312, Bordeaux). Le mélange de réactifs pour la GAPDH a été préparé en combinant 10 µL de SYBR 2X, 3 µL de primers, et 5 µL d'eau. Les mélanges de réactifs pour les primers Biorad d'ANXA1, A2, A4, A5, A6 et A7 ont été préparés en combinant 10 µL de SYBR 2X, 1 µL de primers stock 20X, et 7 µL d'eau. Lors de la préparation de la plaque 96 puits, 18 µL du mélange de primers ont été ajoutés d'un côté de chaque puits à l'aide d'une pipette à répétition, puis 2 µL de cDNA ont été ajoutés de l'autre côté. La plaque a ensuite été scellée et centrifugée pendant 1 minute à 67g pour bien mélanger les deux composants. La plaque a été placée dans l'appareil Step One plus (Applied Biosystems) et le cycle de qPCR a été lancé en utilisant le logiciel Step One Software, avec le mode  $\Delta\Delta C_t$  et Sybr Green (with melt curve).

Gène	Primer	Séquence 5' → 3'
GAPDH	Forward	AATCCCATCACCATCTTCCA
	Reverse	CGTCTTCCCCCCTGCAT

Tableau 4 : séquence des amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification de la GAPDH

### **3.4. Analyse et quantification relative d'ARN messagers par la méthode du $\Delta\Delta Ct$**

Une fois la qPCR terminée, les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Step One plus. Les informations de la plaque ont été saisies, incluant la définition des cibles (gènes) et des échantillons (cDNA), ainsi que leur assignation aux puits correspondants. La première colonne a été marquée comme un témoin négatif ( $H_2O$ ).

L'analyse a débuté par l'évaluation des courbes d'amplification. Si la différence entre les duplicats était inférieure à 0,5, les résultats ont été considérés comme fiables. Les courbes de fusion ont également été examinées pour vérifier la spécificité des amplicons. Une courbe de fusion idéale montre un seul pic à la température de fusion spécifique de l'amplicon attendu. En cas de multiples pics, cela pouvait indiquer la présence de produits non spécifiques et l'expérience était alors répétée. Les cycles seuil (Ct) ont été récupérés pour chaque échantillon et gène, puis les moyennes des duplicats ont été calculées. Le  $\Delta Ct$  a ensuite été déterminé en normalisant les valeurs par rapport au gène de ménage (GAPDH). Le  $\Delta\Delta Ct$  a été calculé en comparant les échantillons aux échantillons de référence. Le fold change a été calculé à l'aide de la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Un fold change supérieur à 2 était considéré comme marqueur d'une surexpression significative du gène, tandis qu'un fold change inférieur à 0,5 était considéré comme marqueur d'une sous-expression significative.

## **4. Western-Blot**

### **4.1. Extraction et préparation des extraits protéiques**

Les cellules ont été soigneusement rincées, détachées de leur support puis centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans 10 mL de DPBS<sup>-/-</sup> avant d'être soumis à une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 200g à température ambiante.

Par la suite, les cellules ont été

- soit resuspendues dans 100  $\mu L$  de DPBS<sup>-/-</sup>, puis transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Une nouvelle centrifugation à 8000g pendant une minute a ensuite été réalisée, permettant d'aspirer le surnageant jusqu'à obtenir un culot sec. Ce culot a par la suite été resuspendu dans 50  $\mu L$  d'eau distillée.

- soit resuspendues dans 150  $\mu L$  de DPBS<sup>-/-</sup> contenant 1 mM d'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA). La suspension a ensuite été conservée à  $-20^\circ C$  pendant 24 heures. Après décongélation sur glace, une lyse cellulaire a été effectuée par sonication pendant 2 minutes (amplitude 20%, cycles de 5 secondes avec des intervalles de 5 secondes). Deux centrifugations

successives à 12 000g pendant 1 minute ont permis d'éliminer les débris cellulaires du surnageant.

La quantification des protéines totales extraites a été réalisée selon la méthode de Bradford en utilisant le réactif « Quick start™ Bradford 1X dye reagent » (Biorad). Enfin, les extraits protéiques ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

Pour finir, un mélange d'inhibiteurs de protéases (dilué au 1/10<sup>e</sup>, Sigma) a été ajouté.

#### **4.2. Séparation et transfert des protéines**

Des aliquots contenant 3 ou 10 µg de protéines totales ont été mélangés avec un tampon de charge composé de 10% de glycérol, 2% de sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,05% de bleu de bromophénol, 50 mM de Tris-HCl, 290 mM de β-mercapto-éthanol, ajusté à un pH de 6,8. Ce mélange a ensuite été chauffé à 95°C pendant 5 minutes. La séparation des protéines a été réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) sur des gels de polyacrylamide à 10% contenant 0,1% de SDS, sous conditions dénaturantes. La migration s'est déroulée dans un tampon de migration composé de 25 mM de Trizma® Base, 200 mM de glycine et 1% de SDS, avec un courant initial de 15 mA, puis de 30 mA par gel, sur une durée totale d'environ 1h30. Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (ou PVDF) prétraitée pendant 5 minutes dans du méthanol, puis réhydratée et rincée à l'eau distillée. Le transfert s'est effectué dans un tampon de transfert froid contenant 20% d'éthanol, 25 mM de Trizma® Base, 200 mM de glycine et 1% de SDS, sous agitation constante, à une tension de 100 V pendant 1 heure. Un marqueur de masse moléculaire, tel que le Dual Color ou le Precision Plus Protein Dual Color standards (Biorad), a été utilisé pour estimer la taille des protéines ciblées.

#### **4.3. Identification des protéines d'intérêt**

Après le transfert, la membrane a été rapidement rincée à l'eau distillée puis bloquée dans une solution saline tamponnée au Tris avec du Tween (TBST)/lait, composée de 10 mM de Trizma® Base, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20 et 5% de lait écrémé en poudre, à pH 8, pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue. La membrane a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps (AC) primaire approprié (Tableau 5 et 6), dilué dans le même tampon TBST/lait, toujours sous agitation. Le lendemain, après cinq lavages de 5 minutes avec le tampon TBST/lait, la membrane a été exposée pendant 2 heures à température ambiante aux AC secondaires conjugués à la HRP (Horse Radish Peroxydase) (Tableau 5 et 6), également dilués dans le tampon TBST/lait. La GAPDH ou l'actine a été utilisée comme gène de ménage

selon le contexte. Enfin, après cinq derniers lavages, la détection des protéines d'intérêt a été réalisée en utilisant soit le kit Opti-4CN™ Substrate (Biorad) pour une révélation colorimétrique, soit le kit Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad) pour une révélation chimioluminescente. Les membranes colorimétriques ont été scannées via le logiciel ImageScanner (Amersham) tandis que les membranes chimioluminescentes ont été numérisées avec le logiciel FluorChem Imaging System (Alpha Innotech Corporation). Dans les deux cas, les analyses ont été réalisées avec ImageJ,

<b>Anticorps primaires</b>						
<b>Cible</b>	<b>Espèce de provenance</b>	<b>Clonalité</b>	<b>Fournisseur (référence)</b>	<b>Dilution</b>		
				<b>WB</b>		
AnxA1	Lapin	Polyclonal	Boster Biological (PA1006)	1:1000		
AnxA2	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich (WH0000302M1)	1:1000		
AnxA5	Souris	Monoclonal	Sigma-Aldrich(WH0000302M1)	1:1000		
AnxA6	Souris	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-271859)	1:1000		
Actine	Lapin	Polyclonal	Sigma-Aldrich (A2066)	1:5000		
GAPDH	Lapin	Polyclonal	Sigma-Aldrich (G9545)	1:100000		
<b>Anticorps secondaires</b>						
<b>Cible</b>	<b>Espèce de provenance</b>	<b>Clonalité</b>	<b>Couplage</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>	
					<b>WB</b>	
IgG de souris	Mouton	Polyclonal	HRP	Amersham (NA931VS)	1:2000	
IgG de lapin	Âne	Polyclonal	HRP	Amersham (NA934VS)	1:2000	

*Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt en Western-Blot (WB) dans les cellules musculaires*

<b>Anticorps primaires</b>					
<b>Cible</b>	<b>Espèce de provenance</b>	<b>Clonalité</b>	<b>Fournisseur (référence)</b>	<b>Dilution</b>	<b>Dilution</b>
				<b>WB</b>	<b>IF</b>
iNOS	Souris	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-7271)	1:1000	1:50
TNF $\alpha$	Lapin	Polyclonal	Cell Signaling Technology (#3707)	1:1000	1:50
CD206	Souris	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-58986)	1:1000	1:50
Actinine- $\alpha$	Souris	Monoclonal	Sigma (A7811)		1:250
iNOS	Souris	Monoclonal	Abcam (AB49999)	-	1:50
CCL3	Lapin	Polyclonal	Abcam (AB32609)	-	1:50
CD206	Lapin	Polyclonal	Abcam (AB64693)	-	1:50
CD163	Lapin	Polyclonal	Bioss Antibodies (bs-2527R)	-	1:50



Anticorps secondaires						
Cible	Espèce de provenance	Clonalité	Couplage	Fournisseur (reference)	Dilution	Dilution
					WB	IF
IgG de souris	Mouton	Polyclonal	HRP	Amersham (NA931VS)	1:2000	-
IgG de lapin	Âne	Polyclonal	HRP	Amersham (NA934VS)	1:2000	-
IgG de souris	Chèvre	Polyclonal	Alexa488	Invitrogen (A11001)	-	1:500
IgG de lapin	Chèvre	Polyclonal	Alexa488	Invitrogen (A11008)	-	1:500

*Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt en Western-Blot (WB) et immunocytofluorescence (IF) dans les macrophages.*

## 5. Expériences de stress de cisaillement

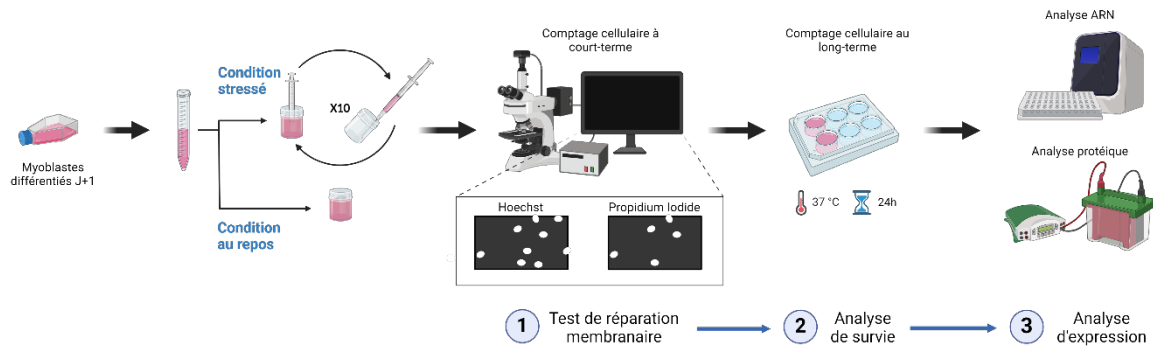
### 5.1. Etude de la capacité des cellules musculaires à réparer leur membrane suite à un dommage

Afin d'induire la différenciation dès le lendemain, les cellules ont étéensemencées à une concentration de  $6.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Le jour suivant, après vérification que la densité cellulaire ait atteint environ 80% de confluence, le milieu de croissance KMEM a été remplacé par le milieu de différenciation pour 24 heures. Les cellules ont alors été collectées dans les mêmes conditions que lors d'un passage. Le culot cellulaire a été resuspendu dans un volume approprié de KMEM afin d'obtenir une concentration finale de  $5.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>.

À partir de cette étape, deux protocoles étaient possibles. Si l'éjection était automatisée, 2,5 mL de la suspension cellulaire ont été prélevés et chargés dans une seringue en verre Terumo (Vmax = 2,5 mL) sur laquelle une aiguille de 30 gauges (diamètre interne de 160 µm) était fixée. Les cellules ont ensuite été éjectées de la seringue à un débit constant de 197 µL/s à l'aide d'une pompe « Nemesys low pressure syringe pump 290N » (Cetoni, 14:1 Gear Box). Si l'éjection était manuelle, 1 mL de la suspension cellulaire a été chargé dans une seringue en plastique (Vmax = 1 mL) équipée d'une aiguille de 30 gauges. Dans les deux scénarios, les cellules ont subi 10 passages à travers la seringue à température ambiante avant d'être laissées au repos pendant 10 minutes. La durée d'expérience était d'environ 15-30 minutes.

Pour quantifier le pourcentage de cellules endommagées, 50 µL de la suspension cellulaire ont été incubés pendant 10 minutes dans une solution de DPBS<sup>++</sup> contenant 4 µg/mL d'iodure de propidium (PI) (Fluka) et 10 µg/mL de Hoechst 33342 (Sigma-aldrich). L'observation des cellules a été réalisée par microscopie à fluorescence. Les cellules positives au PI ont été identifiées comme des cellules nécrotiques, irrémédiablement endommagées, leur membrane ne s'étant pas réparée après le stress. Le comptage des cellules a été effectué à l'aide du logiciel

ImageJ, permettant de calculer le rapport entre les cellules endommagées et les cellules totales (positives au Hoechst).



**Figure 14 : Vue d'ensemble des applications du « muscle shear stress assay »**

Des myoblastes, à la concentration de  $5 \cdot 10^5$  par mL, sont divisés en deux populations : la population dite stressée est passée dix fois à travers une aiguille de 30G, tandis que l'autre population, dite non-stressée, demeure en condition de repos et sert de contrôle. Pour le test de réparation membranaire, 50  $\mu$ L de chaque population sont prélevés et placés dans un mélange de Hoechst (40  $\mu$ g/mL) et de PI (8  $\mu$ g/mL). Les cellules positives au PI (endommagées) et au Hoechst (total) sont observées et comptées après acquisition d'images au microscope à fluorescence. Les cellules restantes sont remises en conditions de culture pour 24 heures. L'impact des contraintes mécaniques sur le taux de survie cellulaire est évalué par le comptage des cellules adhérentes contrôles (sans stress) et des cellules soumises au stress de cisaillement 24 heures après l'ensemencement. Le taux de survie correspond au rapport du nombre de cellules vivantes entre la population stressée et la population non stressée. Enfin, l'impact du stress mécanique sur l'expression des ANX est analysé par Western-Blot en comparant leur expression entre les cellules stressées et non stressées, 24 heures après le stress de cisaillement. Il est également possible d'évaluer cet impact sur le plan transcriptionnel avec une analyse par qPCR.  
Image adaptée de Gounou et al., 2024 en utilisant Biorender.com

## 5.2. Etude de la capacité des cellules musculaires à survivre à des contraintes mécaniques répétées

Immédiatement après les passages en seringue ou après le test de réparation membranaire, la suspension cellulaire stressée a été réensemencée dans un puits d'une plaque 6 puits, avec 3 mL de KMEM. Nous avons pris soin de noter précisément le volume de suspension stressée utilisé pour l'ensemencement pour tenir compte des pertes potentielles dues au volume mort de la seringue ou au prélèvement de 50  $\mu$ L pour le test de réparation membranaire.

Parallèlement, 1 mL de suspension cellulaire témoin, n'ayant pas été soumis au stress, a été également ensemencé dans les mêmes conditions.

Le lendemain, nous avons poursuivi avec les étapes du protocole de passage des cellules, en trypsinant puis en comptant les cellules à l'aide de la cellule de Thoma. Le nombre de cellules survivantes dans les deux conditions a alors été comparé, et le taux de survie a été calculé en conséquence.

Lors du calcul du taux de survie, deux biais ont été identifiés :

- Biais 1 : la mortalité liée aux conditions expérimentales (Température ambiante, CO<sub>2</sub> atmosphérique...), commune aux deux populations contrôles et stressées.
- Biais 2 : la perte de matériel (suspension cellulaire) au cours des passages successifs de la population stressée à travers l'aiguille.

Pour rappel, la suspension initiale, dont la concentration cellulaire s'établit à  $5.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> est divisée en deux populations : une soumise au « shear stress » et l'autre non. Ces deux populations sont rigoureusement soumises aux mêmes paramètres environnementaux : elles sont placées dans des tubes en polystyrène sous une hotte, en conditions stériles, à température ambiante et pour une durée identique, avant d'être remises en culture pour 24 heures. Cette période d'exposition à une température non-physiologique est nécessairement délétère. La mortalité cellulaire inhérente aux paramètres expérimentaux n'est pas imputable aux stress de cisaillement (biais 1) et doit être prise en compte dans les calculs. Pour s'affranchir de ce biais, il a donc été nécessaire de déterminer la concentration réelle de la population contrôle 24h après l'expérience lorsqu'aucun « shear stress » n'est appliqué. En comparant cette concentration cellulaire réelle à 24h à celle utilisée initialement pour l'ensemencement, nous avons déterminé le taux de mortalité associé aux conditions expérimentales. Ce facteur correctif a été appliqué aux cellules soumises au stress de cisaillement.

D'autre part, au cours de l'expérience, une perte significative, estimée entre 10 et 20 % de la suspension cellulaire, a été constatée lors du traitement de stress de cisaillement, due notamment à l'existence de volume mort dans le système aiguille-seringue (biais 2). Cela signifie que seulement 4 à  $4,5.10^5$  cellules sur les  $5.10^5$  initiales étaient ensemencées lors du retour en culture. Afin d'éliminer ce second biais, le volume de suspension cellulaire ensemencé après le « shear stress » a donc été systématiquement mesuré et, en considérant que la concentration cellulaire était homogène au sein de la population stressée, toutes les données ont été corrigées proportionnellement à cette perte.

Nous avons ensuite déterminé le taux de survie en calculant le rapport du nombre de cellules survivantes en condition de stress, corrigé pour les pertes, par le nombre de cellules survivantes en condition de repos.

L'ajout d'EGTA, un chélateur d'ions CA<sup>2+</sup> lors de cette expérience a permis de déterminer le taux de cellules endommagées.

## **6. Analyse du trafic des annexines lors d'un dommage membranaire dans des cellules musculaires dystrophiques**

### **6.1. Les plasmides**

Les plasmides permettant l'expression des ANX fusionnées à des protéines fluorescentes étaient déjà disponibles au laboratoire (Croissant et al., 2022).

Brièvement, les plasmides pEGFP-N3 et pEGFP-N1, contenant les constructions ANXA1-GFP, ANXA2-GFP, ANXA2-mCherry, et ANXA6-GFP, avaient été généreusement fournis par le laboratoire de Volker Gerke (Université de Münster, Allemagne). Ces plasmides ont été préalablement validés par digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose. La transformation bactérienne a été réalisée en utilisant la souche *Escherichia coli* XL1-Blue pour les amplifier, suivie d'une extraction à grande échelle à l'aide d'un kit commercial (Maxiprep, Thermofisher scientific). De plus, d'autres constructions plasmidiques, telles qu'ANXA4-GFP, ANXA5-GFP, ANXA1-mCherry, ANXA4-mCherry, et ANXA5-mCherry, ont été obtenues au laboratoire en utilisant le kit In-Fusion® HD Cloning (Takara Bio). Toutes les séquences ont été validées par séquençage pour confirmer l'intégrité des constructions avant utilisation dans les expériences.

### **6.2. Transfection et expression des ANX couplées à des protéines fluorescentes par des myoblastes différenciés 24 heures**

Les myoblastes ont étéensemencés dans des boîtes de culture MatTek à une densité de  $4.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. La transfection avec les différents plasmides ANXA1-GFP, ANXA2-GFP, ANXA4-GFP, ANXA5-GFP et ANXA6-GFP a été initiée le lendemain en utilisant des lipides cationiques. Pour ce faire, 1 µL de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) a été dilué dans 50 µL d'Opti-MEM®, tandis que 0,5 µg de plasmide a été dilué séparément dans 50 µL d'Opti-MEM®. Les deux solutions ont ensuite été combinées et incubées ensemble pendant 20 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules ont été incubées avec de l'Opti-MEM® à 37°C pendant 20 minutes.

La solution de transfection a été ajoutée goutte à goutte sur les cellules, à une distance de plusieurs centimètres au-dessus de la boîte, afin d'assurer une distribution effective. Les cellules ont ensuite été replacées à 37°C pour une incubation de 4 heures. Après cette période, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de croissance KMEM, et les cellules ont été incubées pendant 20 heures supplémentaires à 37°C. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du KMEM de différenciation, avec une incubation de 24 heures à 37°C.

### **6.3. Expériences de rupture de la membrane plasmique par irradiation laser**

Les myoblastes transfectés et différenciés 24 heures ont été soumis à une ablation laser 48 heures après leur transfection. Brièvement, une rupture du sarcolemme a été déclenchée en présence de 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  en utilisant un laser pulsé infrarouge (Mai Tai HP, Spectra-Physics, Irvine, USA) paramétré à 820 nm avec une puissance de 110 mW. La dynamique des ANX-GFP a été suivie et enregistrée avec un microscope confocal SP5 (Leica) à l'aide d'un laser argon, les images étant capturées toutes les 1,3 secondes sur une durée d'environ 90 secondes. Afin de visualiser le tag GFP des protéines recombinantes, la longueur d'onde d'excitation a été paramétrée à 488 nm et la plage de détection de 500 à 550 nm.

## **7. Implication de cellules auxiliaires dans le processus de réparation**

### **7.1. Courbe de croissance des macrophages**

$6.10^5$  RAW 264.7 ont étéensemencées pour 3 jours dans des plaques 6 puits, avec 3 mL de milieu par puits. 3 puits ont été dédiés à chaque condition et toutes les 24 heures, un puits a permis de déterminer la croissance des cellules par comptage grâce à un compteur automatique Scepter™ 3.0. Les milieux utilisés étaient le DMEM à 10% SVF pour le contrôle, ainsi que deux milieux spécifiques aux cellules musculaires, le KMEM et le KMEM Différenciation. Une dernière condition a compris une incubation initiale en KMEM puis 48h en KMEM Différenciation.

### **7.2. Détection des profils des macrophages**

#### **7.2.1. Induction des profils M1 et M2 pour l'analyse par Western-Blot**

$6.10^5$  cellules RAW 264.7 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits contenant 3 ml de DMEM supplémenté avec 10 % de SVF. Le lendemain, le milieu a été remplacé, et les cellules ont été stimulées pendant 24 heures soit avec du LPS ( $100 \text{ ng.ml}^{-1}$ ), soit avec de l'IL-4 ( $5 \text{ ng.ml}^{-1}$ ).

#### **7.2.2. Induction des profils M1 et M2 pour l'analyse par immunocytofluorescence**

Les cellules RAW 264.7 et BMDM ont été cultivées en Ibidi à une densité respective de  $2,2.10^5 \text{ .cm}^{-2}$  et  $0,6.10^5 \text{ cellules.cm}^{-2}$  en utilisant 250  $\mu\text{l}$  de DMEM supplémenté avec 10 % de SVF comme milieu de culture. Les conditions de culture appliquées ont été les suivantes :

- RAW 264.7 : condition de contrôle sans induction, condition d'induction au LPS (200 ng.  
ml<sup>-1</sup>) pendant 24h et condition d'induction à l'IL-4 (10 ng.ml<sup>-1</sup>) pendant 24h.

- BMDM : condition de contrôle sans induction, condition d'induction au DEX (100 nM) entre  
6 et 72 heures et condition d'induction au DAMPS (1 µg.ml<sup>-1</sup>) pour 24 heures.

Après incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du DPBS<sup>+/+</sup>, puis fixées avec du PFA  
à 4 % pendant 10 minutes à température ambiante. Trois autres lavages au DPBS<sup>+/+</sup> ont été  
effectués avant l'incubation des cellules pendant 5 minutes en DPBS<sup>+/+</sup> supplémenté de 0,5%  
Triton X-100. Après 3 nouveaux lavages, les cellules ont été incubées 10 minutes dans un  
tampon de saturation constitué de DPBS<sup>+/+</sup> et 4% de BSA. Les cellules ont ensuite été incubées  
toute la nuit à 4°C avec des AC primaires dilués en DPBS<sup>+/+</sup>/BSA 4% (Tableau 6).

Après cette incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du DPBS/BSA 2%, puis  
incubées pendant 1 heure à 37°C avec des AC secondaires couplés au fluorochrome Alexa488  
dilués en DPBS<sup>+/+</sup>/BSA 4%. Après 3 derniers lavages au DPBS/BSA 2 %, les cellules ont été  
incubées avec du DAPI à 200 nM pendant 5 minutes à température ambiante, puis lavées trois  
fois avec du DPBS<sup>+/+</sup>.

Les cellules immunomarquées ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope  
d'épifluorescence (Olympus IX81), équipé des cubes de fluorescence spécifiques présentés ci-  
dessous.

- le cube U-MWU2 permettant une observation dans le bleu (pour l'observation des noyaux  
marqués au DAPI) avec filtre d'excitation passe-bande 330-385 nm, un miroir dichroïque 400  
nm et un filtre d'émission passe-haut 420 nm

- le cube U-MINIBA2 permettant une observation dans le vert (pour l'observation des protéines  
marquées par les AC couplés à l'Alexa488) avec un filtre d'excitation passe-bande 470-490 nm,  
un miroir dichroïque 505 nm et un filtre d'émission passe-bande 510-550 nm

- le cube U-MWG2 permettant une observation dans le rouge (pour l'observation des RAW  
264.7 dont l'actine est marquée au mCherry) avec un filtre d'excitation passe-bande 510-550  
nm, un miroir dichroïque 570 nm et un filtre d'émission passe-haut 590 nm.

### 7.3. Coculture

Deux protocoles ont été testés. Dans le premier, les myoblastes et les macrophages ont été  
ensemencés simultanément dans 250 µl KMEM, et la différenciation a été initiée après 24  
heures. Dans le second protocole, les myoblastes ont été ensemencés seuls dans le KMEM, puis  
les macrophages ont été ajoutés 24 heures plus tard dans le KMEM, avec un délai de 5 heures  
avant d'induire la différenciation.

Les cellules musculaires ont été systématiquementensemencées à une densité de  $1.1.10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup> dans des lamelles compartimentées Ibidi. La densité de macrophages à ensemençer a été calculée en fonction des paramètres de l'expérience avec des ratios choisis de 1:0,5 ou 1:1 ou 1:3 ou 1:5.

Au bout de 3 jours de coculture, les cellules ont été fixées avec du PFA à 4 %, saturées dans du BSA à 2%, puis incubées avec un AC monoclonal anti- $\alpha$ -Actinine de souris (Sigma), suivi d'un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa488 (Invitrogen, vert) et du DAPI (bleu). Les cellules ont été ensuite observées en microscopie à fluorescence.

## 8. Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type, calculés à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques, incluant le test de Mann-Whitney, et de Wilcoxon ainsi que ANOVA ont été effectuées à l'aide du GraphPrism 9. Un seuil de significativité de  $p < 0,05$  a été adopté et il est signifié par des étoiles comme suit \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$





# IV. Résultats

## 1. Capacité myogénique des lignées cellulaires dystrophiques *in vitro*

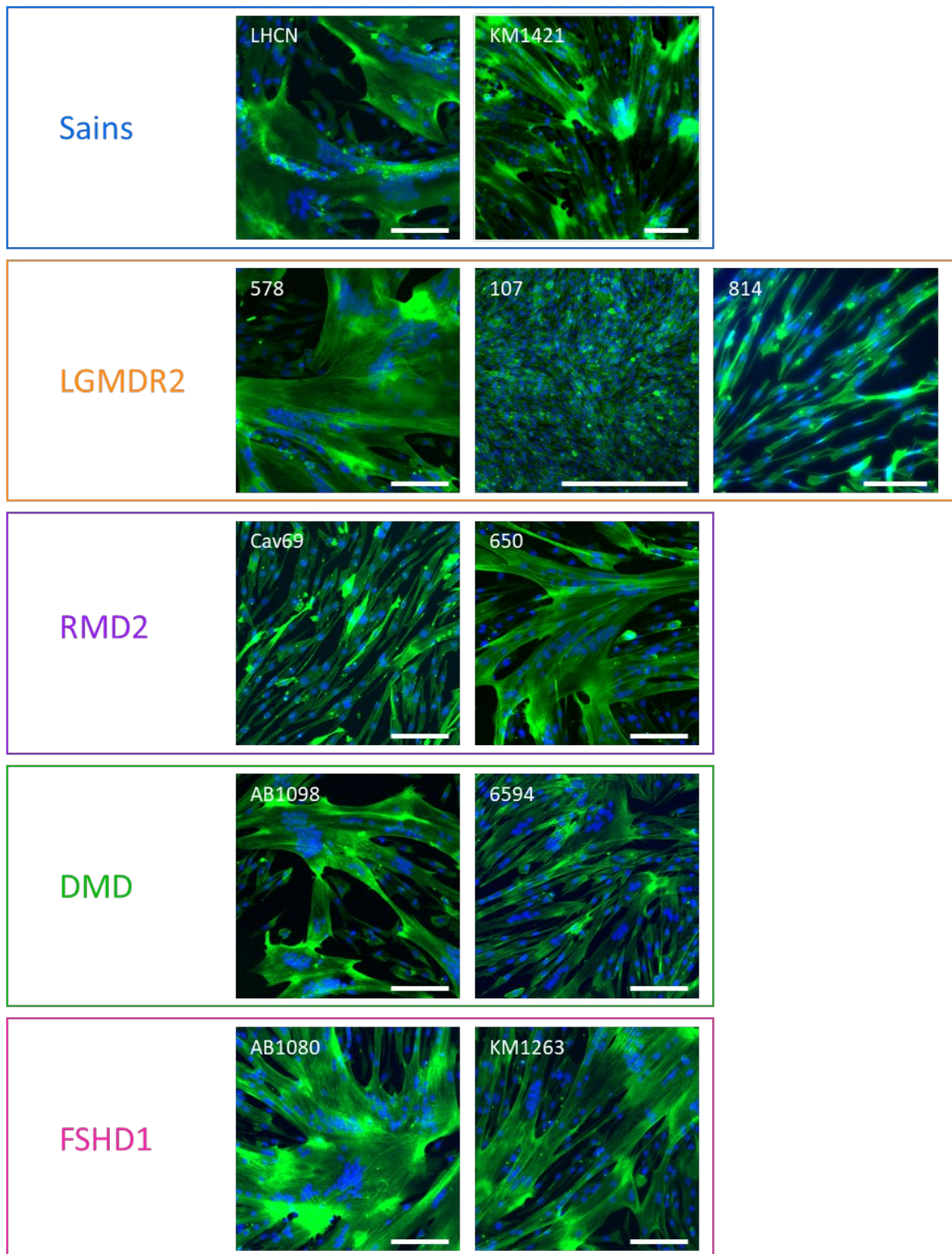
Mon projet a porté sur le rôle des ANX dans le mécanisme de réparation membranaire qui s'opère dans le tissu musculaire humain. Ce projet s'est appuyé sur des études *in vitro* à partir de lignées cellulaires humaines. Seulement, les lignées cellulaires immortalisées auxquelles nous avons eu recours correspondent à des myoblastes (cellules satellites) et non à des fibres musculaires. Ainsi, la phase préliminaire de ce projet a été consacrée à l'évaluation des capacités des cellules myoblastiques squelettiques humaines à former des myotubes.

Les lignées cellulaires à ma disposition ont été établies à partir de cellules satellites d'individus sains ou de patients atteints de dystrophies musculaires (C. H. Zhu et al., 2007). Les lignées cellulaires ont été fournies par la plateforme d'immortalisation des cellules humaines du Centre de Recherche en Myologie (Collaboration Vincent Mouly, Paris, France). La liste des lignées cellulaires utilisées pour ce projet est présentée dans le tableau 3.

Le but du projet a été d'identifier des dérèglements physiopathologiques généraux et spécifiques à chaque dystrophie musculaire. Ainsi, quatre dystrophies musculaires ont été choisies pour l'étude et au sein de chaque pathologie, deux lignées cellulaires ont été analysées. Afin d'éliminer les biais d'échantillonnage liés aux caractéristiques inhérentes des patients, nous avons sélectionné des lignées établies à partir de muscles divers et d'individus d'âge et de genre différents.

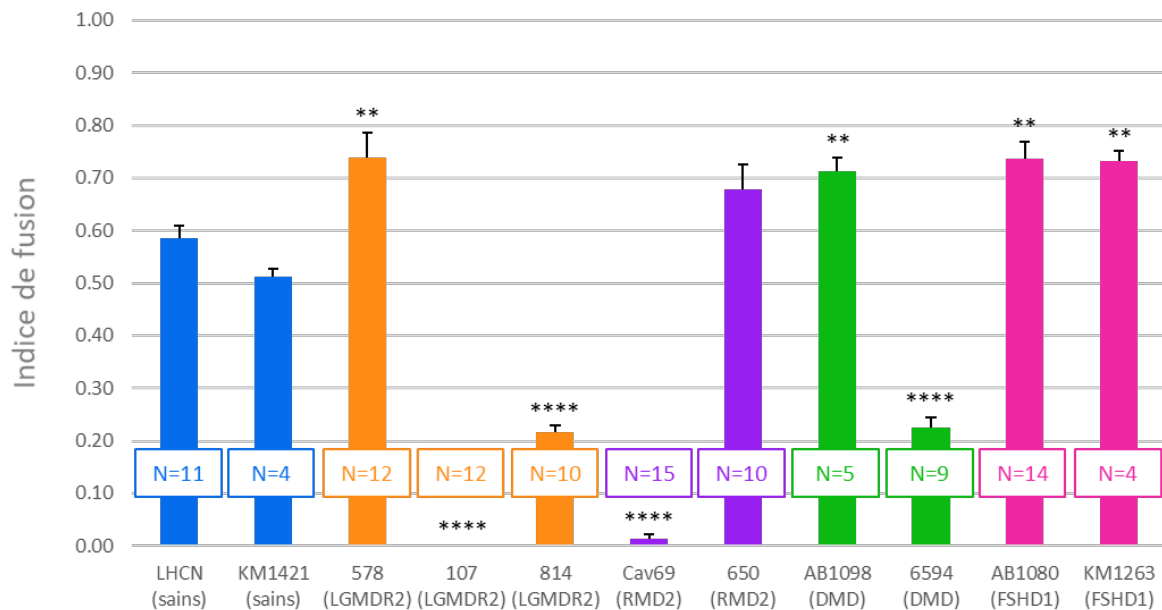
Afin de générer des myotubes, il est nécessaire qu'au moment d'initier la différenciation les myoblastes soient à 80% de confluence. Dans le cas de la lignée saine contrôle LHCN-M2, l'ensemencement de  $2.10^4$  myoblastes par  $cm^2$  conduit à cette confluence en 72 heures. En termes de croissance, les lignées cellulaires dystrophiques se comportent comme les lignées saines, à l'exception des lignées Cav69 (RMD), 814 (LGMDR2) et 6594 (DMD), qui nécessitent 24 heures supplémentaires (non montré). Ces résultats indiquent que la majorité des lignées issues de patients atteints de dystrophies musculaires présentent des propriétés de croissance analogues à celles observées chez les sujets sains.

Une fois le seuil de 80% de confluence atteint, les cellules de chaque lignée ont été maintenues entre 72 et 96 heures dans un milieu de différenciation (milieu de croissance appauvri en sérum).



**Figure 15 : Morphologie des myotubes obtenues après (au moins) 72 heures de différenciation des lignées cellulaires saines et dystrophiques**

Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu) et l'actine avec de la Phalloïdine-TRITC (vert). La lignée 107 a vu son temps de différenciation prolongé à 7 jours, la fusion des autres lignées en myotubes a pris systématiquement entre 72h et 96h selon les clones utilisés. Les cellules ont été observées avec le microscope à fluorescence Olympus IX81. Échelle : 300  $\mu$ m



**Figure 16 : Analyse quantitative des capacités myogéniques des lignées cellulaires musculaires saines et dystrophiques**

L'indice de fusion a été calculé en divisant le nombre de noyaux présents dans les myotubes par le nombre total de noyaux sur un champ d'observation. Au moins trois champs ont été observés pour au moins quatre expériences indépendantes (N). Test de Mann-Whitney en utilisant la lignée saine contrôle LHCN-M2 comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale. Phoebe Rassinoux, étudiante Master2 de janvier à juin 2021, a participé à ce travail.

En accord avec les travaux antérieurs, la différenciation des myoblastes de la lignée saine LHCN-M2 entraîne la formation de myotubes en approximativement 72 heures (Carmeille et al., 2016). Face à l'absence persistante de fusion, la lignée 107 a vu son temps de différenciation prolongé jusqu'à 7 jours, en vain. Nous avons employé une combinaison de DAPI et de phalloïdine-TRITC pour la caractérisation des myotubes (Figure 16), facilitant ainsi l'observation, respectivement, des noyaux cellulaires et des microfilaments d'actine. Mis à part pour les lignées cellulaires 814 (LGMDR2), Cav69 (RMD) et 6594 (DMD), qui ont généré un nombre réduit de myotubes de taille diminuée et la lignée 107 (LGMDR2) qui n'en présente aucun, chaque lignée cellulaire dystrophique a montré un comportement comparable aux cellules saines contrôles.

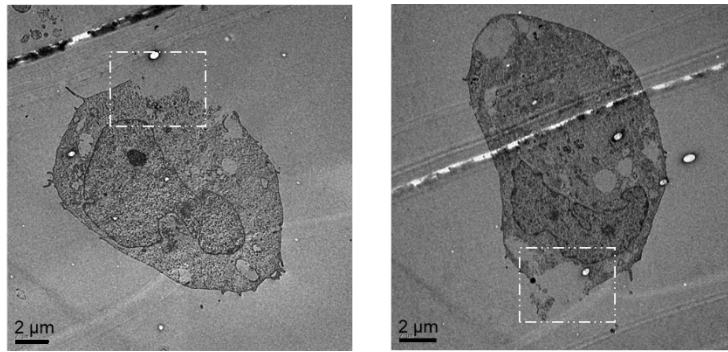
Dans le but d'approfondir l'évaluation de la capacité des lignées cellulaires dystrophiques à former des myotubes, nous avons déterminé l'indice de fusion, correspondant au rapport entre le nombre de noyaux appartenant aux myotubes et le nombre total de noyaux présents dans le champ d'observation (Figure 15). Cette analyse quantitative met en évidence une altération des capacités myogéniques de la totalité des lignées dystrophiques à l'exception de la lignée 650.

Ainsi, les lignées cellulaires 578, AB1098, AB1080 et KM1263 présentent un indice de fusion significativement supérieur à celui des lignées saines contrôles, au contraire des lignées 814 et 6594 qui affichent un indice de fusion trois fois inférieur. Les lignées Cav69 et 107, quant à elles, montrent un indice de fusion quasi-inexistant, voire nul. Ces variations d'indice de fusion étant réparties au sein des différentes pathologies, il semble peu probable qu'elles soient le résultat de la pathologie, exception faite de la FSHD1 dont les deux lignées présentent un indice de fusion supérieur aux lignées saines.

## **2. Développement d'une nouvelle méthode d'étude de la réparation membranaire basée sur le stress de cisaillement**

Le cœur de mon projet de thèse a concerné la réponse des cellules musculaires squelettiques à un dommage membranaire et a nécessité le développement d'une méthode d'étude de la réparation membranaire innovante dans le contexte des pathologies musculaires. Cette dernière a visé à exposer des populations de cellules musculaires à des stress de cisaillement. En mimant ainsi un environnement contraint, l'objectif est double : explorer la capacité des cellules musculaires pathologiques à survivre aux ruptures du sarcolemme et évaluer l'impact des contraintes mécaniques sur l'expression des ANX. Cette méthode est loin d'être nouvelle. Elle est l'adaptation directe sur les cellules musculaires d'un protocole, normalement alloué à des études sur les cellules cancéreuses invasives (Barnes et al., 2012) et bien caractérisé par notre équipe grâce à des expériences en microscopie électronique à transmission (Gounou et al., 2024). Appelée *muscle shear stress assay*, elle a été décrite dans un article que nous avons publié dans *Journal of Cellular Biochemistry* (d'Agata et al., 2024), présenté ci-après.

Brièvement, le test de réparation membranaire consiste à exposer les cellules à une contrainte de cisaillement visant à endommager leur membrane plasmique (Figure 17), suivie dix minutes plus tard, d'une incubation au Hoechst et PI (Figure 14, application 1). Cette expérience permet de quantifier la proportion de cellules endommagées (positives au PI) et non réparées au sein de la population totale (positives au Hoechst). Les cellules peuvent également être remises en culture pendant 24 heures pour évaluer le taux de survie à 24h (application 2) et/ou analyser l'expression des gènes et protéines (application 3).



**Figure 17 : Observation en microscopie électronique à transmission de myoblastes LHCN soumis à un protocole de shear stress**

Deux images représentatives de myoblastes LHCN exposés à un shear stress en présence de 2 mM de  $Ca^{2+}$ . Après l'application du shear stress, les cellules ont été fixées, incluses dans une résine Epon-Araldite, puis des coupes ultrafines ont été réalisées et analysées par microscopie électronique à transmission.


Les cellules ont le plus souvent présenté un dommage membranaire unique micrométrique (encadré blanc).

Pour un problème de taille cellulaire, cette méthode nécessite de travailler avec des cellules musculaires mononucléées au lieu de myotubes ou de fibres musculaires. Bien que l'on pensât la capacité de réparation du sarcolemme limitée aux myotubes et aux fibres musculaires, nous avons montré que les myoblastes différenciés pendant 24 heures expriment une machinerie de réparation membranaire fonctionnelle.

Nous avons pu mettre en évidence que CAV3 est peu ou pas exprimée dans les myoblastes et que son expression est activée dans les 24 premières heures de différenciation. Nous avons d'autre part démontré qu'une différenciation de 24 heures suffisait à la mise en place d'une machinerie de réparation membranaire fonctionnelle sur des lignées saines, à la fois par l'approche de shear stress et des expériences d'ablation laser en présence de FM1-43. Nous avons fait l'hypothèse que le défaut de réparation membranaire dans les myoblastes non différenciés était dû à l'absence de CAV3. Enfin, nous avons démontré que la méthode de shear stress était pertinente pour mettre en évidence un défaut de réparation membranaire en utilisant une lignée cellulaire dysferlinopathique comme témoin positif.

## RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

# A Novel Assay Reveals the Early Setting-Up of Membrane Repair Machinery in Human Skeletal Muscle Cells

Léna d'Agata<sup>1</sup> | Phoebe Rassinoux<sup>1</sup> | Céline Gounou<sup>1</sup> | Flora Bouvet<sup>1</sup> | Dounia Bouragba<sup>2</sup> | Kamel Mamchaoui<sup>2</sup> | Anthony Bouter<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, Pessac, France | <sup>2</sup>Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France

**Correspondence:** Anthony Bouter ([anthony.bouter@u-bordeaux.fr](mailto:anthony.bouter@u-bordeaux.fr))

**Received:** 28 April 2024 | **Revised:** 11 September 2024 | **Accepted:** 15 September 2024

**Funding:** The authors acknowledge the AFM-Telethon Association for its financial support (Grant 23881 to Léna d'Agata and Grant 22442 and 24991 to Anthony Bouter). Christel Poujol and Sébastien Marais are acknowledged for the help in membrane repair assays that were done in the Bordeaux Imaging Center a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

**Keywords:** fluorescence microscopy | limb girdle muscular dystrophy | membrane repair | muscular dystrophy | shear-stress assay | skeletal muscle

## ABSTRACT

Defect in membrane repair contributes to the development of muscular dystrophies such as limb girdle muscular dystrophy (LGMD) type R2 or R12. Nevertheless, many other muscular dystrophies may also result from a defect in this process. Identifying these pathologies requires the development of specific methods to inflict sarcolemma damage on a large number of cells and rapidly analyze their response. We adapted a protocol hitherto used to study the behavior of cancer cells to mechanical constraint. This method is based on forcing the passage of cells through a thin needle, which induces shear stress. Due to size considerations, this method requires working with mononuclear muscle cells instead of myotubes or muscle fibers. Although functional sarcolemma repair was thought to be restricted to myotubes and muscle fibers, we show here that 24h-differentiated myoblasts express a complete machinery capable of addressing membrane damage. At this stage, muscle cells do not yet form myotubes, revealing that the membrane repair machinery is set up early throughout the differentiation process. When submitted to the shear-stress assay, these cells were observed to repair membrane damage in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner, as previously reported. We show that this technique is able to identify the absence of membrane resealing in muscle cells from patient suffering from LGMDR2. The proposed technique provides therefore a suitable method for identifying cellular dysregulations in membrane repair of dystrophic human muscle cells.

## 1 | Introduction

Cell membrane disruption is a physiological event that primarily occurs in cells submitted to mechanical stress, especially those of muscle, epithelial, or endothelial origin [1]. The downregulation of the membrane repair machinery leads to degenerative diseases such as muscular dystrophies [2], whereas its exacerbation in cancer cells promotes tumor

invasion and metastasis [3, 4]. To date, three out of the hundreds of muscular dystrophies have been formally identified as resulting from a defect of sarcolemma repair [2]. LGMDR2 (formerly 2B) [5] and LGMDR12 (2L) [6] result respectively from mutations in *dysferlin* and *anoctamin* gene, while facioscapulohumeral muscular dystrophy [7] is associated with dysregulation in the expression of DUX4, which hinders the membrane repair process. Nevertheless, many other muscular

**Abbreviations:** DIC, differential interference contrast; LGMD, limb girdle muscular dystrophy; PI, propidium iodide; TEM, transmission electron microscopy.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Author(s). *Journal of Cellular Biochemistry* published by Wiley Periodicals LLC.



dystrophies may result from a defect in membrane repair and remain to be identified. The development of methods able to quickly and reliably identify concerned pathologies is needed. The standard membrane repair assay involves inducing damage on a single cell using laser ablation [8]. This method requires complex equipment, including confocal microscope and infrared laser, and are time-consuming, as it necessitates the successive analysis of hundreds of cells, with each requiring several minutes.

Here we report a simple method that allows a large number of muscle cells to be submitted to mechanical constraints within a short timeframe. This method not only rapidly highlights muscle cells with membrane repair defect, but also geno- and pheno-typic consequences of sarcolemma damage. This method, called hereafter the muscle shear-stress assay, is based on forcing the passage of cell suspension through a thin needle inducing shear forces. We demonstrate that this method is able to identify muscle cells suffering from a defect in membrane resealing, notably those established from LGMDR2 patients, as previously reported [5]. This method enabled also to uncover that a functional membrane repair machinery is setting up early in myoblasts as soon as 24 h after differentiation has begun.

## 2 | Materials and Methods

### 2.1 | Cell Lines and Cell Culture

The control LHCN-M2 (referred to hereafter as LHCN) or KM1421 cell lines, and the dysferlin-deficient L578 cell line have been provided by the platform for immortalization of human cells from the Center of Research in Myology (Paris, France). These cell lines have been respectively established from satellite cells of the pectoralis major muscle of a 41-year-old subject [9], the paravertebral muscle of a 13-year-old subject, and the vastus lateralis adult muscle of a 25-year-old patient suffering from LGMDR2 [10]. Myoblasts were cultured in a skeletal muscle medium composed of one volume of Medium 199 with glutamax (Gibco by Life Technologies), four volumes of Dulbecco's modified Eagle Medium with high-glucose and glutamax, and without pyruvate (Gibco by Life Technologies) supplemented with 20% fetal bovine serum, 50- $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamycin and a commercial mixture of supplements (ref. C-39365, Promocell, Heidelberg, Germany), which included 12.5- $\mu\text{g}/\text{mL}$  fetuin, 2.5- $\text{ng}/\text{mL}$  human recombinant epidermal growth factor, 0.25- $\text{ng}/\text{mL}$  basic fibroblast growth factor, 2.5- $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 0.1- $\mu\text{g}/\text{mL}$  dexamethasone, as previously described [11]. Differentiated myoblasts were obtained by cultivating 80%-confluence myoblasts in a differentiation medium, composed of the skeletal muscle medium supplemented only with 10- $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin.

### 2.2 | Western Blotting

Preparation of protein extracts and western blot analysis were performed as previously described [12]. 40- $\mu\text{g}$  protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE. Electrophoretic transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) onto PVDF membrane was

performed for 20 min at 60 V. The cellular content of caveolin-3 (20 kDa) and GAPDH (loading control, 37 kDa) was detected with mouse anti-caveolin-3 monoclonal antibody (C-2, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and rabbit anti-GAPDH polyclonal antibody (FL-335, Santa Cruz Biotechnology), respectively. Anti-caveolin-3 and anti-GAPDH antibodies were respectively diluted 1:100 and 1:5000 in saturation solution composed of Tris buffer saline (10-mM Tris, 150-mM NaCl, pH 8.0) supplemented with 0.1% Tween20% and 5% nonfat dry milk and incubated overnight at 4°C. Revelation was performed using secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (GE-Healthcare) diluted 1:2000 in saturation solution and either Opti-4CN colorimetric kit (Bio-Rad) or Clarity Western Enhanced Chemiluminescent Substrate (Bio-Rad).

### 2.3 | Muscle Shear-Stress Assay

Adherent undifferentiated or 24h-differentiated muscle cells were collected at 80% confluence after incubation with 0.25% trypsin (Gibco) in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and  $5 \times 10^5$  cells were suspended in 1 mL of growth medium. At this stage either Ca<sup>2+</sup> (Final concentration 2 mM), or 2-mM EGTA, was added to the medium. The suspension was slowly loaded into a 1-mL syringe (Becton Dickinson, NJ, USA), which was subsequently equipped with a 30 G needle (Terumo, Tokyo, Japan). Then, the suspension was gently expelled against the wall of a polystyrene tube at room temperature at a constant flow rate either via an automated NeMESYS syringe pump (200  $\mu\text{L}/\text{s}$ , Cetoni GmbH, Korbussen, Germany) or manually. The load/expel cycle was repeated 10 times. 10 min after the treatment, 50  $\mu\text{L}$  of the cell suspension were put into a 96-well plate and a mixture of propidium iodide (PI, final concentration 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Hoechst (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added to stain damaged cells. As a control condition, cells in growth medium with Ca<sup>2+</sup> (final concentration 2 mM) were incubated with PI/Hoechst mixture without being subjected to shear stress. Cell imaging of Hoechst (all cells) and PI (unrepaired cells) was performed as described below. Images were analyzed with ImageJ software.

### 2.4 | Differential Interference Contrast (DIC) and Fluorescence Microscopy

Cell imaging was performed using a conventional fluorescence microscope IX81 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a DIC acquisition system. Hoechst was observed using the U-MWU2 cube containing a band-pass excitation filter (330–385 nm), a dichroic mirror (threshold 400 nm) and a long-pass emission filter (threshold 420 nm). PI was observed using the cube U-MWG2 containing a band-pass excitation filter (510–550 nm), a dichroic mirror (threshold 570 nm) and a long-pass emission filter (threshold 590 nm).

### 2.5 | Membrane Repair Assay by Laser Ablation

Membrane repair assay was performed as previously described [13]. Cells were irradiated at 820 nm with a tunable pulsed

depletion laser Mai Tai HP (Spectra-Physics, Irvine, USA) of a two-photon confocal scanning microscope (TCS SP5, Leica, Wetzlar, Germany). Irradiation consisted of 1 scan (1.6 s) of a  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  area with a power of  $110 (\pm 5)$  mW.  $512 \times 512$  images were acquired at 1.6-s intervals with pinhole set at 1 Airy unit. FM1-43 was excited by the 488 nm laser line (intensity set at 20% of maximal power) and fluorescence emission was measured between 520 and 650 nm. For quantitative analysis, the fluorescence intensity was integrated over the whole cell surface and corrected for the fluorescence value recorded before irradiation, using ImageJ software.

## 2.6 | Statistical Analysis

Data are presented as mean values ( $\pm$ SEM) from at least three independent experiments performed in triplicate. The statistical significance of data was assessed by a Mann–Whitney test using GraphPad Prism software. A probability value less than 0.05 is used for statistical significance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

## 3 | Results

### 3.1 | Principle of the Method

We aimed to develop a method able to concomitantly damage a large cell population for statistical reasons. The muscle shear-stress assay was adapted from a protocol initially developed for cancer cells and based on forcing the passage of cells through a thin 30 Gauge needle [4, 14] (Figure 1). 10 min after the treatment, unrepaired cells were quantified by PI uptake assay and counterstained with Hoechst. PI and Hoechst are respectively membrane-impermeant and membrane-permeant nuclear dyes. Hoechst thus labeled every cell, while PI marked only damaged and unrepaired cells. We expected to be able to apply this method on muscle cells, in a novel way, to identify muscular dystrophies resulting from defective membrane repair. We also aimed to analyze molecular changes in stressed/damaged muscle cells. The muscle shear-stress assay required to work with mononucleated myoblasts instead of myotubes, which were too large to pass through the needle. Nevertheless, we previously demonstrated that myoblasts,

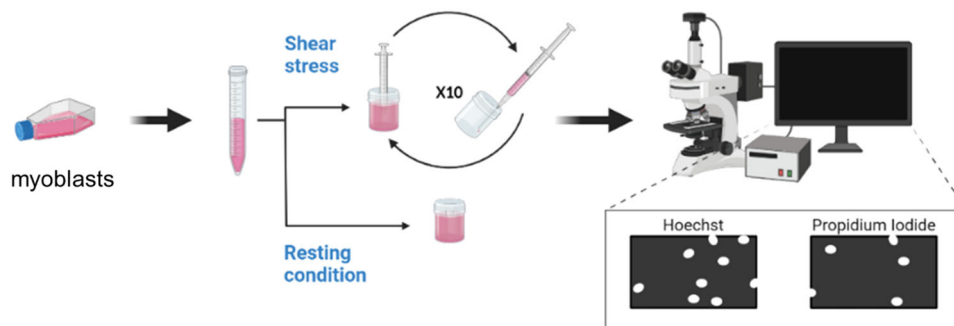
unlike myotubes, were unable to repair membrane damage [12]. Therefore, we needed to determine whether differentiating myoblasts acquired the ability to repair membrane damage before fusion into myotubes.

### 3.2 | Caveolin-3 Is Expressed Early During Differentiation of Human Skeletal Muscle Cells

Given that caveolin-3 was expected to be the membrane repair protein absent in myoblasts for membrane resealing [12], we studied its expression by western-blotting during muscle cell differentiation. LHCN muscle cells, either undifferentiated or differentiated for 1, 6, 16, 24, and 72 h were thus analyzed. Our observations indicated that only cells differentiated for 72-h formed myotubes (Figure 2A). It was confirmed that undifferentiated LHCN myoblasts weakly expressed caveolin-3 and uncovered that caveolin-3 was significantly expressed in LHCN cells as early as 24 h after differentiation induction (Figure 2B and Supporting Information S1: Figure S1A). This finding was further validated in the skeletal muscle cell line KM1421, which is another human cell line established from a healthy control individual (Supporting Information S1: Figure S1B).

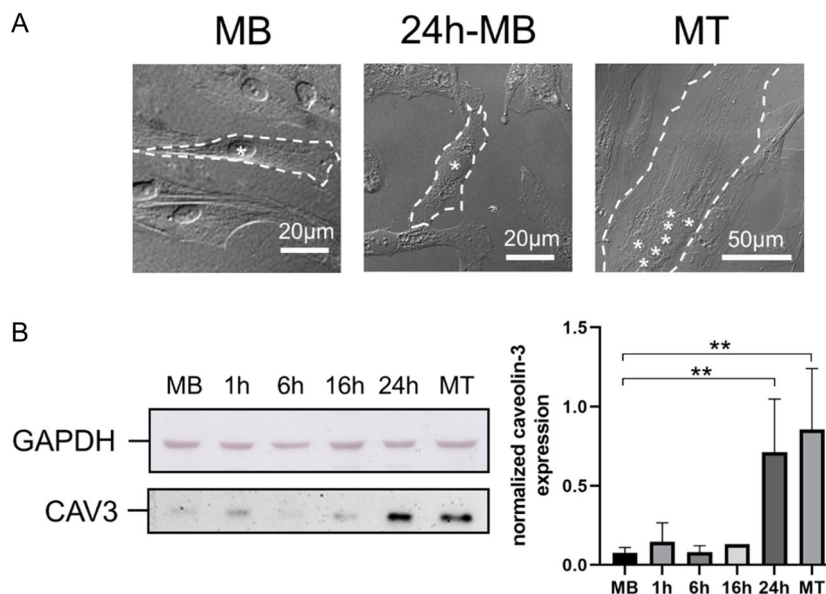
### 3.3 | Membrane Repair Machinery Is Functional in 24-h Differentiated Myoblasts

We submitted both undifferentiated and 24-h differentiated myoblasts to the muscle shear-stress assay. Quantitative analysis of the membrane repair assay was performed using fluorescence microscopy after staining with Hoechst and PI (Figure 3). When submitted to the shear-stress assay in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , undifferentiated myoblasts exhibited about 10% of damaged and unrepaired cells, a rate significantly higher than when untreated (Figure 3B, MB). This percentage dropped to  $1.2 (\pm 0.9)$  % for 24-h differentiated myoblasts under similar condition (Figure 3B, 24-h-MB, +stress, + $\text{Ca}^{2+}$ ), confirming that the molecular machinery responsible for membrane repair is gaining early during the muscle cell differentiation process. As expected, membrane resealing was compromised in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  since about 25% of 24-h differentiated myoblasts were PI-positive under this condition (Figure 3B, 24-h-

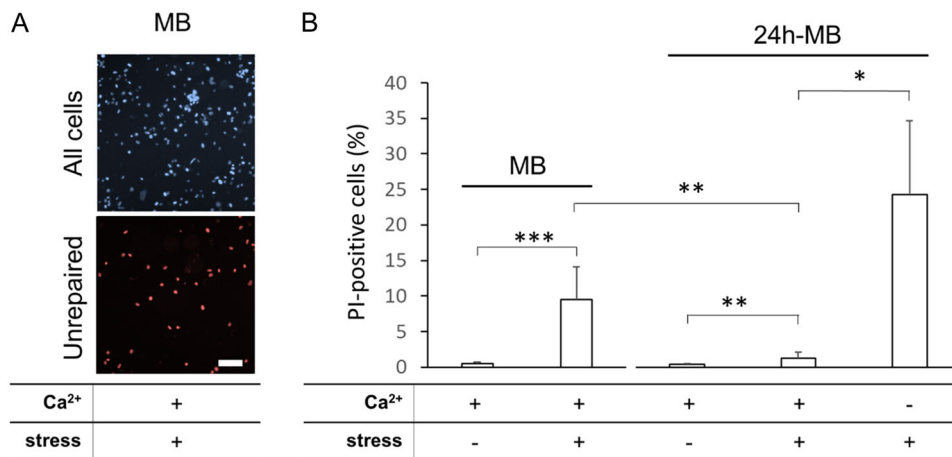


**FIGURE 1** | Principle of the muscle shear-stress assay. Myoblasts were split into two populations: the stressed population was passed 10 times through a needle, while the other population remained in resting condition and used as a control. An aliquot of cell suspension was incubated in a mixture of Hoechst and PI. PI-positive (damaged) and Hoechst-positive (total) cells were observed and counted with a fluorescence microscope. Adapted from [4] using Biorender.com.





**FIGURE 2** | Expression of caveolin-3 during myoblast differentiation. (A) Undifferentiated myoblasts (MB) or myoblasts differentiated for 24 h (24 h-MB) or 72 h (MT) were imaged by DIC microscopy. Myotubes were observed after 72 h of differentiation but not after 24 h. For the sake of clarity, the plasma membrane of one cell is drawn with dotted line on each image. Nuclei position is marked with a white asterisk. (B) Expression of caveolin-3 (CAV3) was analyzed by western-blotting in undifferentiated myoblasts (MB) or myoblasts differentiated for the indicated time. After antibodies incubation, the membrane was cut in half to reveal GAPDH (loading control) with a colorimetric detection kit and caveolin-3 by a chemiluminescent method. The entire membrane is presented in Supporting Information S1: Figure S1A. The histogram presents mean values ( $\pm$ SEM) of the ratio CAV3/GAPDH for MB ( $n = 6$ ), 1 h-MB ( $n = 2$ ), 6 h-MB ( $n = 2$ ), 16 h-MB ( $n = 2$ ), 24 h-MB ( $n = 6$ ) and MT ( $n = 4$ ) samples analyzed by the gel analysis plugging of ImageJ. Mann-Whitney test.  $**p < 0.01$ .

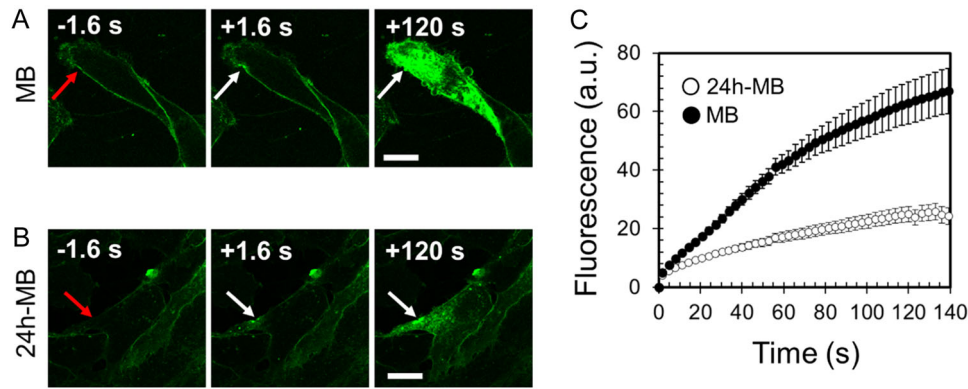


**FIGURE 3** | Unlike undifferentiated myoblasts, 24-h differentiated myoblasts are able to repair membrane damage created by the muscle shear-stress assay. The shear-stress treatment was performed (+) or not (-) on undifferentiated (MB) or 24-h differentiated myoblasts (24 h-MB) in the presence (+) or absence (-) of 2-mM Ca<sup>2+</sup>, as indicated. (A) Representative images of undifferentiated myoblasts submitted to the shear-stress assay in the presence of Ca<sup>2+</sup> and stained with Hoechst (all cells, blue) and PI (unrepaired cells, red). Images for the other conditions are presented in Supporting Information S1: Figure S2. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B) Histograms represent mean values ( $\pm$ SEM) from at least three independent experiments performed in triplicate. Mann-Whitney test.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ , and  $*p < 0.05$ .

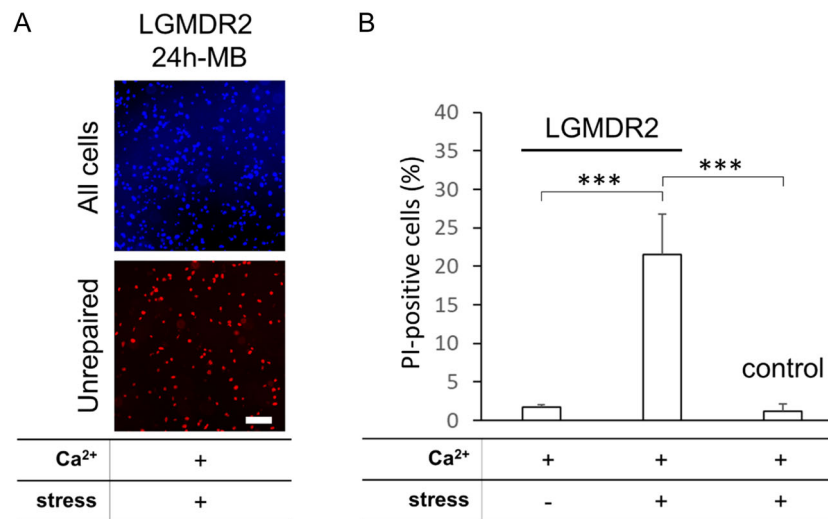
**MB, +stress, -Ca<sup>2+</sup>**), reaffirming that membrane repair is Ca<sup>2+</sup>-dependent. To further validate the membrane repair ability of 24-h differentiated myoblasts, we used the standard membrane repair assay using laser ablation [8, 12].

Undifferentiated and 24-h differentiated LHCN myoblasts were damaged by infrared laser irradiation in the presence of Ca<sup>2+</sup> and FM1-43. After laser injury, FM1-43 entered the cytosol where it

fluoresced upon incorporation into intracellular membranes. This fluorescence increased until the plasma membrane was resealed. In undifferentiated myoblasts, FM1-43 was observed entering the cells at the site of membrane irradiation within seconds post-injury, confirming the presence of membrane rupture (Figure 4A, +1.6 s, **arrow**). After 120 s, the fluorescent dye had diffused throughout the cell (Figure 4A, +120 s). The kinetics of the change in the fluorescence intensity revealed a continuous



**FIGURE 4** | Unlike undifferentiated myoblasts, 24-h differentiated myoblasts are able to repair membrane damage created by laser ablation. (A, B) Sequences of representative images showing the response of an undifferentiated (A) or 24-h differentiated (B) myoblast to a membrane damage performed by 110-mW infrared laser irradiation, in the presence of FM1-43 (green). In all figures, the area of membrane irradiation is marked with a red arrow before irradiation and a white arrow after irradiation. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (C) Kinetic data represent the FM1-43 fluorescence intensity for undifferentiated (black-filled circles) or 24-h differentiated (empty circles) myoblasts, integrated over whole cell sections, averaged for about 30 cells ( $\pm$ SEM).



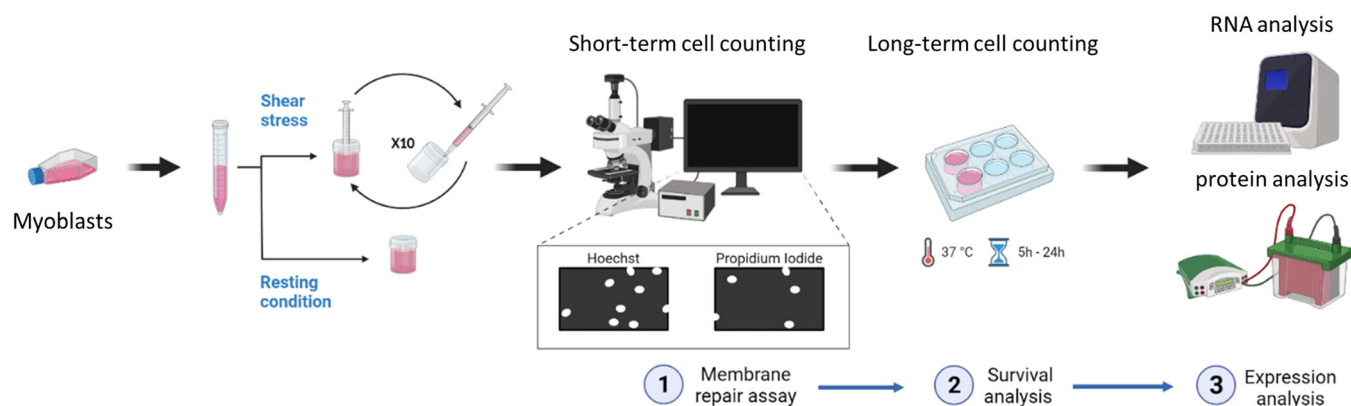
**FIGURE 5** | Unlike control myoblasts, 24-h differentiated LGMDR2 myoblasts are unable to repair membrane damage created by the muscle shear-stress assay. The shear-stress treatment was performed (+) or not (-) on 24-h differentiated control or LGMDR2 myoblasts in the presence of 2-mM  $\text{Ca}^{2+}$ , as indicated. (A) Representative images of 24-h differentiated LGMDR2 myoblasts submitted to the shear-stress assay in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and stained with Hoechst (all cells, blue) and PI (unrepaired cells, red). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (B) Histograms represent mean values ( $\pm$ SEM) from at least three independent experiments performed in triplicate. Mann-Whitney test. \*\*\* $p < 0.001$ .

increase following membrane damage (Figure 4C, filled circles), underscoring the lack or a major delay in membrane resealing in undifferentiated myoblasts. Conversely, in 24-h differentiated myoblasts subjected to irradiation, most damaged cells exhibited an increase of intracellular fluorescence confined to the vicinity of the disruption site (Figure 4B). The kinetics of the change in the fluorescence intensity showed that intracellular fluorescence intensity increased for about 100 s and then tended towards a plateau (Figure 4C, empty circles), suggesting resealing of the plasma membrane. Time required for membrane resealing was longer for 24-h differentiated myoblasts compared to myotubes (100 s vs. 70 s [12]), reflecting a superior resealing capacity of myotubes. Actually, single-cell analysis within each experiment showed that the mean curve observed for 24-h differentiated myoblasts was negatively impacted by a few myoblasts incapable of repairing their membrane (Supporting Information S1:

Figure S3). Hence, we concluded that 24-h differentiated myoblasts possessed a functional membrane repair machinery.

### 3.4 | The Muscle Shear-Stress Assay Identifies the Defect in Membrane Repair of Dysferlinopathic Muscle Cells

Lastly, we assessed the effectiveness of the muscle shear-stress assay to detect membrane repair defects in pathological muscle cells. As a positive control, we used the L578 cell line, which has been established from a patient affected by LGMDR2. When submitted to the shear-stress assay in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , 24-h differentiated L578 myoblasts displayed significantly more unrepaired cells than control cell lines (Figure 5), mirroring the value seen in undifferentiated myoblasts (Figure 3B). We have



**FIGURE 6** | Global insight of the applications based on the muscle shear-stress assay. Myoblasts are split into two populations: the stressed population is passed 10 times through 30 G needle, while the other remains in resting condition and used as a control. After performing the membrane repair assay (see legend of Figure 1), cells may be seeded back in growth condition for 5 or 24 h. The impact of mechanical constraints on cell survival rate may be assessed by counting adherent control (no stress) or shear-stressed cells 24 h after plating. Survival rate corresponds to the ratio of the number of living cells between the shear stressed population and the untreated population. Finally, the impact of mechanical stress on protein/RNA expression may be analyzed by western-blot or RTqPCR by comparing the expression of proteins or RNAs 5 or 24 h after shear-stress between stressed and untreated cells. Adapted from [4] using [Biorender.com](https://www.biorender.com).

previously shown that LGMDR2 L578 myotubes were indistinguishable from control LHCN cells in number and size after 72 h of differentiation [12]. To confirm that L578 myoblasts differentiated similarly to control cells, we observed using bright-field microscopy 24-h differentiated LHCN and L578 myoblasts submitted to shear-stress assay to validate the absence of multinucleated cells (Supporting Information S1: Figure S4). Besides, we also analyzed the expression of caveolin-3 during the differentiation process. We observed that caveolin-3 was significantly expressed in L578 cells as early as 24 h after differentiation induction (Supporting Information S1: Figure S5) as observed in control cells (Figure 2B). These results rule out the possibility that the differentiation of L578 myoblasts may be delayed compared to control cells and may explain the absence of membrane resealing. We concluded that the muscle shear-stress assay enables the detection of defective membrane repair associated with LGMDR2 muscle cells, as previously described [5].

## 4 | Discussion

In conclusion, our study demonstrates that the muscle shear-stress assay is a simple but efficient method for submitting a large number of cells to mechanical constraints in a brief period. Its application is limited to myoblasts, as myotubes or muscle fibers are cells too large to pass through the needle. Building on previous findings that undifferentiated myoblasts, unlike myotubes, cannot repair or present a major delay in repairing membrane damage [12], we investigated whether differentiating myoblasts acquire the ability to repair membrane damage before fusing into myotubes. Our results indicate that 24-h differentiated myoblasts exhibit a functional membrane repair machinery evidenced by expression of caveolin-3. At this stage, muscle cells do not yet form myotubes, revealing that the membrane repair machinery is set up early within the differentiation/fusion process. Sarcolemma repair in these cells depends on the presence of  $Ca^{2+}$ , as previously reported for myotubes [12]. Finally, we demonstrate that this method

effectively identifies the absence of membrane repair in muscle cells from patient suffering from LGMDR2, confirming earlier findings obtained using laser ablation assay [5]. This method not only rapidly highlights muscle cells with membrane repair deficiencies, but also geno- and pheno-typic consequences of sarcolemma damage. For instance, the muscle shear-stress assay facilitates the analysis of the impact of membrane damage on cell survival and gene/protein expression (Figure 6). Given its ability to affect a large number of cells quickly, this technique is arguably more appropriate than laser ablation for such studies. Our proposed workflow is as follows: after the muscle shear-stress assay, cells are immediately analyzed for membrane repair (application 1), and/or then plated for 24 h to evaluate survival rate (application 2) and/or gene/protein expression (application 3) analysis. Survival rate and gene/protein expression levels are assessed by quantifying number of cells and mRNA/protein levels (by RTqPCR or western-blotting) in myoblasts submitted or not to the muscle shear-stress assay.

### Author Contributions

Léna d'Agata and Anthony Bouter performed the majority of experiments with assistance from Céline Gounou and Flora Bouvet (cell culture and western-blot analysis) and Phoebe Rassinoux (shear-stress assays). Dounia Bouragba and Kamel Mamchaoui established the L578 and KM1421 cell lines, respectively. Anthony Bouter coordinated the entire project and designed the experiments. Anthony Bouter wrote the manuscript with the help of Léna d'Agata.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the AFM-Telethon Association for its financial support (Grant 23881 to Léna d'Agata and Grant 22442 and 24991 to Anthony Bouter). Christel Poujol and Sébastien Marais are acknowledged for the help in membrane repair assays that were done in the Bordeaux Imaging Center a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). Simone Spuler from the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC, 13125 Berlin,

Germany) is acknowledged for providing human skeletal muscle primary culture to establish the dysferlinopathic L578 cell line.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Data Availability Statement

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary Information.

### References

1. P. L. Mcneil and R. A. Steinhardt, "Plasma Membrane Disruption: Repair, Prevention, Adaptation," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (2003): 697–731, <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101>.
2. C. Croissant, R. Carmeille, C. Brévert, and A. Bouter, "Annexins and Membrane Repair Dysfunctions in Muscular Dystrophies," *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 10 (2021): 5276, <https://doi.org/10.3390/ijms22105276>.
3. J. K. Jaiswal, S. P. Lauritzen, L. Scheffer, et al., "S100A11 Is Required for Efficient Plasma Membrane Repair and Survival of Invasive Cancer Cells," *Nature Communications* 5 (2014): 3795, <https://doi.org/10.1038/ncomms4795>.
4. C. Gounou, L. Rouyer, G. Siegfried, et al., "Inhibition of the Membrane Repair Protein Annexin-A2 Prevents Tumor Invasion and Metastasis," *Cellular and Molecular Life Sciences* 81, no. 1 (2024): 7, <https://doi.org/10.1007/S00018-023-05049-3>.
5. D. Bansal, K. Miyake, S. S. Vogel, et al., "Defective Membrane Repair in Dysferlin-Deficient Muscular Dystrophy," *Nature* 423, no. 6936 (2003): 168–172, <https://doi.org/10.1038/nature01573>.
6. D. A. Griffin, R. W. Johnson, J. M. Whitlock, et al., "Defective Membrane Fusion and Repair in *Anoctamin5* -Deficient Muscular Dystrophy," *Human Molecular Genetics* 25, no. 10 (2016): 1900–1911, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw063>.
7. A. J. Bittel, S. C. Sreetama, D. C. Bittel, et al., "Membrane Repair Deficit in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy," *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 15 (2020): 5575, <https://doi.org/10.3390/IJMS21155575>.
8. R. Carmeille, C. Croissant, F. Bouvet, and A. Bouter, "Membrane Repair Assay for Human Skeletal Muscle Cells," *Methods in Molecular Biology* 1668 (2017): 195–207, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8_14).
9. C.-H. Zhu, V. Mouly, R. N. Cooper, et al., "Cellular Senescence in Human Myoblasts Is Overcome By Human Telomerase Reverse Transcriptase and Cyclin-Dependent Kinase 4: Consequences in Aging Muscle and Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies," *Aging Cell* 6, no. 4 (2007): 515–523, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x>.
10. S. Philippi, A. Bigot, A. Marg, V. Mouly, S. Spuler, and U. Zacharias, "Dysferlin-Deficient Immortalized Human Myoblasts and Myotubes as a Useful Tool to Study Dysferlinopathy," *PLoS Currents* 4 (2012): RRN1298, <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1298>.
11. C. Croissant, C. Gounou, F. Bouvet, S. Tan, and A. Bouter, "Annexin-A6 in Membrane Repair of Human Skeletal Muscle Cell: A Role in the Cap Subdomain," *Cells* 9, no. 7 (2020): 1742, <https://doi.org/10.3390/cells9071742>.
12. R. Carmeille, F. Bouvet, S. Tan, et al., "Membrane Repair of Human Skeletal Muscle Cells Requires Annexin-A5," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Cell Research* 1863, no. 9 (2016): 2267–2279, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.003>.
13. F. Bouvet, M. Ros, E. Bonedeau, et al., "Defective Membrane Repair Machinery Impairs Survival of Invasive Cancer Cells," *Scientific Reports* 10, no. 1 (2020): 21821, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77902-5>.

14. J. M. Barnes, J. T. Nauseef, and M. D. Henry, "Resistance to Fluid Shear Stress Is a Conserved Biophysical Property of Malignant Cells," *PLoS ONE* 7, no. 12 (2012): e50973, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050973>.

### Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL FOR:**

# **A novel assay reveals the early setting-up of membrane repair machinery in human skeletal muscle cells**

**Léna d'Agata<sup>1</sup>, Phoebe Rassinoux<sup>1,2</sup>, Céline Gounou<sup>1</sup>, Flora Bouvet<sup>1</sup>, Dounia Bouragba<sup>3</sup>, Kamel Mamchaoui<sup>3</sup> and Anthony Bouter<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

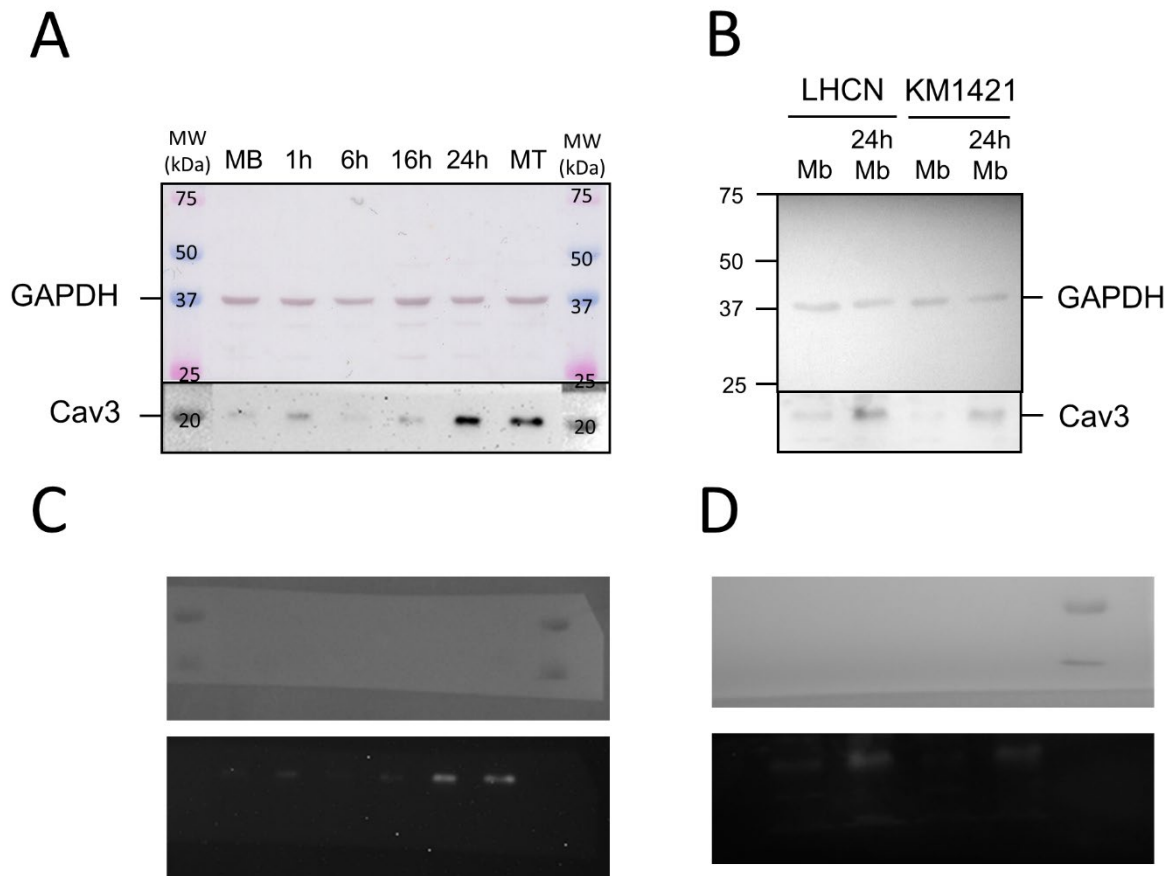
<sup>2</sup>present address: Institut NeuroMyogène (INMG) - Laboratoire Physiopathologie et Génétique du Neurone et du Muscle, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5261, INSERM U1315, Lyon, France.

<sup>3</sup>Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, F-75013, Paris, France.

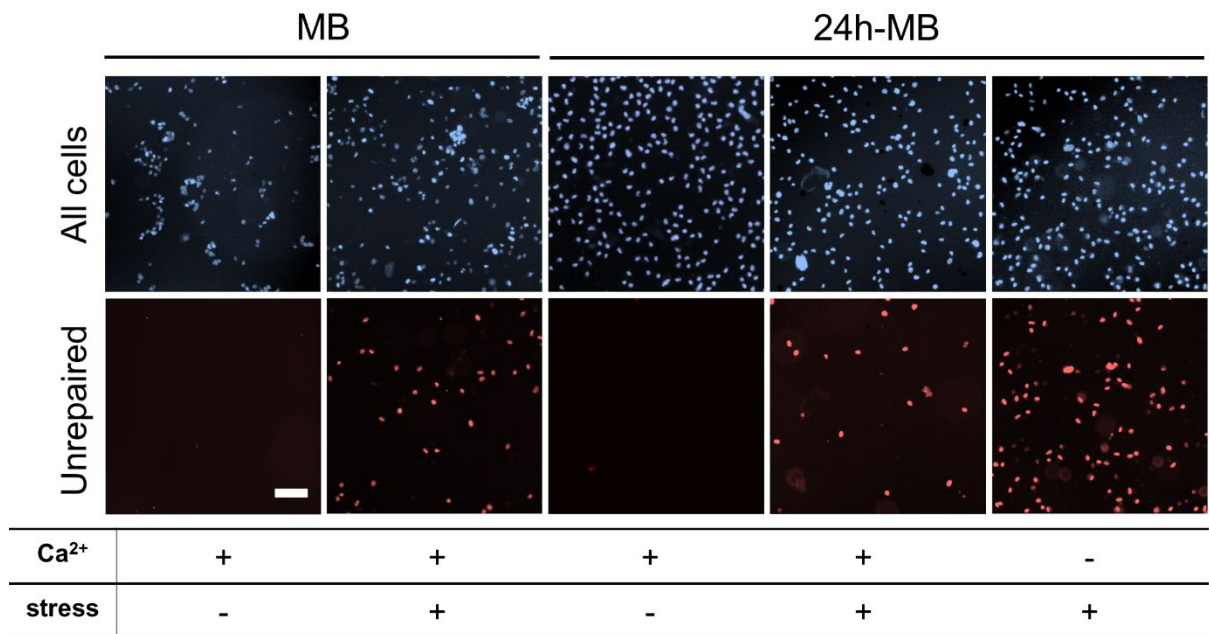
\*Corresponding author, e-mail: [anthony.bouter@u-bordeaux.fr](mailto:anthony.bouter@u-bordeaux.fr); phone: +33 540006860

**Running title: muscle shear-stress assay**

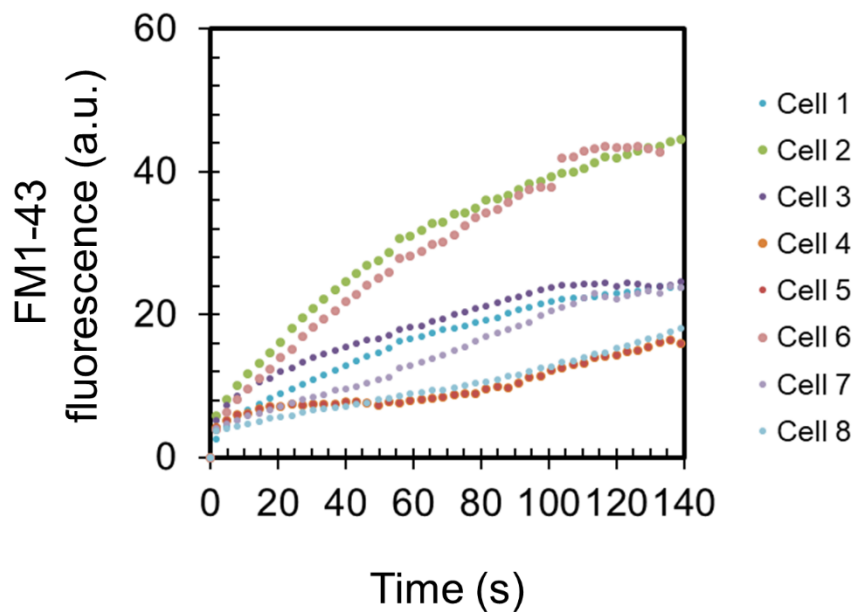




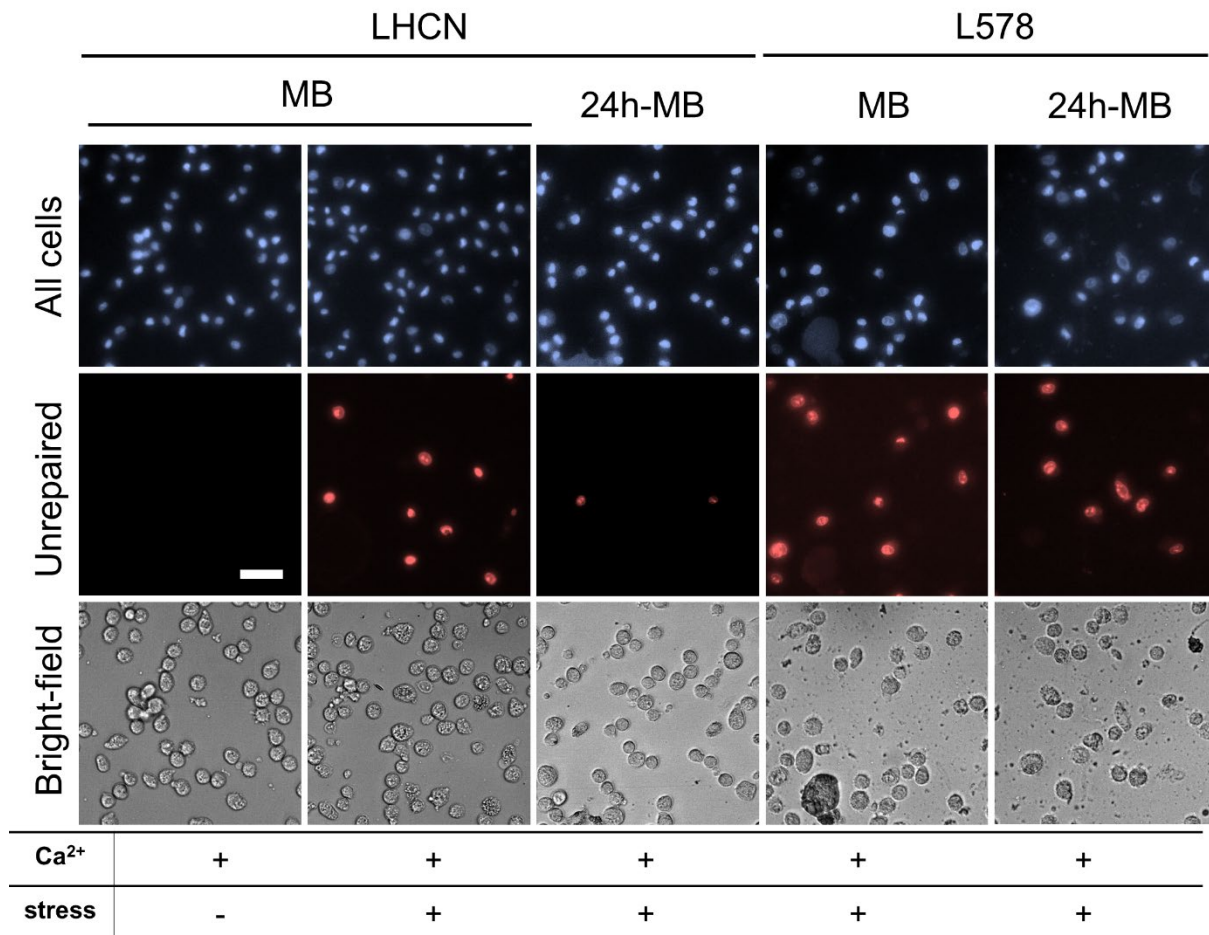
**Figure S1. Expression of caveolin-3 during LHCN myoblast differentiation.** **A.** Expression of caveolin-3 (Cav3) was analyzed by western-blotting in undifferentiated LHCN myoblasts (MB) or LHCN myoblasts differentiated for the indicated time. After antibodies incubation, the membrane was cut in half to reveal GAPDH (loading control) with a colorimetric detection kit and caveolin-3 by a chemiluminescent method. For Cav3 immunoblot, the figure was created from original images presented in C. **B.** Expression of caveolin-3 was analyzed in undifferentiated (MB) or 24-hour differentiated (24h-MB) myoblasts of the healthy control LHCN and KM1421 cell lines. For Cav3 immunoblot, the figure was created from original images presented in D. **C and D.** Original images of membrane observed with light illumination for displaying prestained molecular weight marker (upper panels) or observed using chemiluminescent detection (lower panels). These images were used to create the Cav3 immunoblots presented in A and B by inverting black and white values and adjusting brightness and contrast.



**Figure S2. Unlike undifferentiated myoblasts, 24-hour differentiated myoblasts are able to repair membrane damage performed by the muscle shear-stress assay.** Representative images of undifferentiated (MB) or 24-hour differentiated myoblasts (24h-MB) submitted (+) or not (-) to the shear-stress treatment in the presence (+) or absence (-) of 2 mM Ca<sup>2+</sup>, as indicated. Cells were stained with Hoechst (blue) while un repaired cells were stained with PI (red). Scale bar = 50  $\mu$ m.

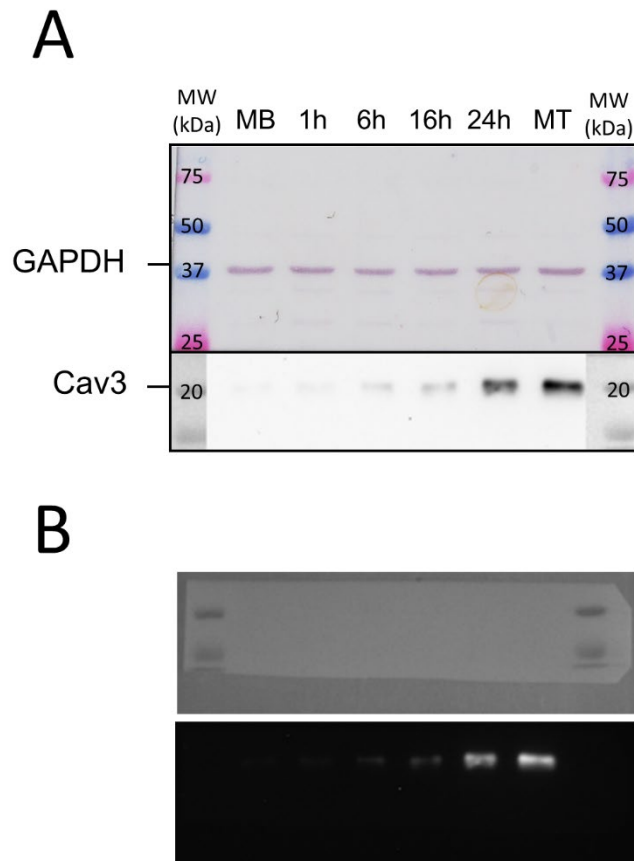


**Figure S3. Most 24-hour differentiated myoblasts are able to repair membrane damage created by laser ablation.** Representative experiment showing the response of eight 24-hour differentiated myoblasts to a membrane damage performed by laser ablation in the presence of FM1-43. The experiment was performed as described in the legend of Figure 4 and in the material and method section. Whereas most myoblasts exhibited a modest increase of the intracellular fluorescence intensity, two cells (cell 2 and cell 4) presented a large and continuous increase, indicating the absence of complete membrane resealing.



**Figure S4. Bright-field microscopy confirms that undifferentiated or 24-hour differentiated LHCN and L578 myoblasts used for the muscle shear-stress assay are mononucleated cells.** Representative images of undifferentiated (MB) or 24-hour differentiated myoblasts (24h-MB) submitted (+) or not (-) to the shear-stress treatment in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>, as indicated. Every cell was stained with Hoechst (blue) while unrepaired cells were stained with PI (red). Bright-field microscopy allowed to see plasma membrane and confirmed the absence of multinucleated cells whatever the condition. Scale bar = 50  $\mu$ m.





**Figure S5. Expression of caveolin-3 during L578 myoblast differentiation.** **A.** Expression of caveolin-3 (Cav3) was analyzed by western-blotting in undifferentiated L578 myoblasts (MB) or L578 myoblasts differentiated for the indicated time, as described in the legend of Figure 2B and S1. For Cav3 immunoblot, the figure was created from original images presented in B as described in the legend of Figure S1. **B.** Original images of membrane observed with light illumination for displaying prestained molecular weight marker (upper panel) or observed using chemiluminescent detection (lower panel).

### **3. Quelles dystrophies musculaires résultent d'un défaut de réparation membranaire ?**

#### **3.1. Test de réparation membranaire**

Afin d'identifier les cellules musculaires dystrophiques atteintes d'un défaut de réparation membranaire, nous avons utilisé la méthode du « shear stress » précédemment décrite.

Le test de réparation membranaire a été réalisé sur chaque lignée cellulaire, saine ou dystrophique, en présence de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 18). Les lignées cellulaires contrôles LHCN-M2 et KM1421 ont été utilisées comme témoins positifs.

Nous avons observé que 3,0 ( $\pm 2,0$ ) % des cellules saines contrôles étaient positives au PI après le « shear stress », définissant ainsi la proportion de cellules endommagées et non réparées dans des conditions normales. Il a été constaté que les lignées RMD et FSHD1 manifestaient une réponse similaire aux lignées saines contrôles. Au contraire, les lignées LGMDR2 et DMD présentaient un nombre significativement supérieur de cellules positives au PI, rappelant les taux précédemment observés dans les cellules saines non différenciées (Figure 3 de l'article d'Agata et al., 2024).

Concernant la LGMDR2, ces résultats confirment l'existence d'un défaut de réparation membranaire chez l'Homme, comme cela a déjà été observé dans des modèles murins (Bansal et al., 2003) et humains (Carmeille et al., 2016).

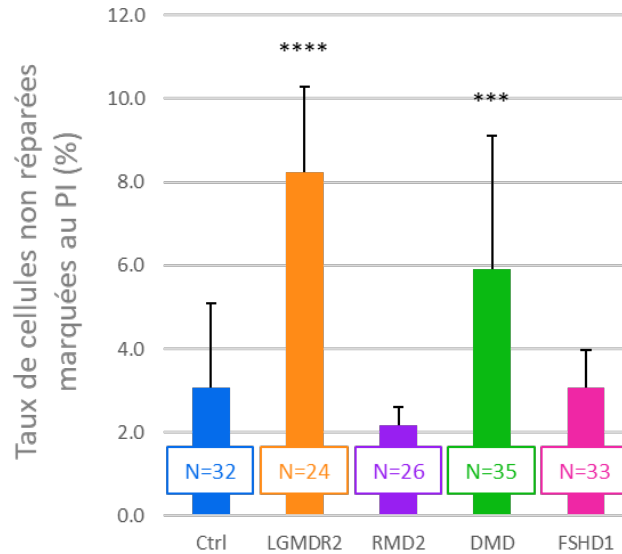
Pour la DMD, une étude avait déjà rapporté un défaut de réparation membranaire dans un modèle murin, mais pas encore chez l'Homme (Vila et al., 2017). En outre, compte tenu des conditions expérimentales, deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer nos résultats : soit les lignées dystrophinopathiques présentent effectivement un défaut de réparation membranaire, soit ces dernières présenteraient une fragilité accrue de la membrane plasmique, conduisant à une augmentation du taux de cellules endommagées lors de l'application du stress de cisaillement. L'hypothèse d'une fragilité accrue du sarcolemme repose sur le fait que la DMD est causée par une mutation du gène de la dystrophine. La dystrophine est une protéine essentielle qui assure le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Son absence compromet l'architecture cellulaire, la stabilisation du sarcolemme, et peut rendre la membrane plus vulnérable aux stress mécaniques.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré le taux d'endommagement membranaire des cellules en réalisant une expérience en présence d'EGTA, un chélateur d'ions calcium, permettant de mimer une situation sans calcium. Pour rappel, sans calcium, la réparation membranaire est inhibée, permettant d'évaluer uniquement la proportion de cellules

endommagées après application du shear stress. Les résultats obtenus (Figure 19) montrent que dans ces conditions, les lignées contrôles et DMD présentent un taux de cellules endommagées similaire, soit 24% pour les contrôles et 22% pour les DMD. Cette absence de différence indique que la fragilité mécanique du sarcolemme n'est pas un facteur déterminant dans les différences observées en présence de calcium (Figure 18).

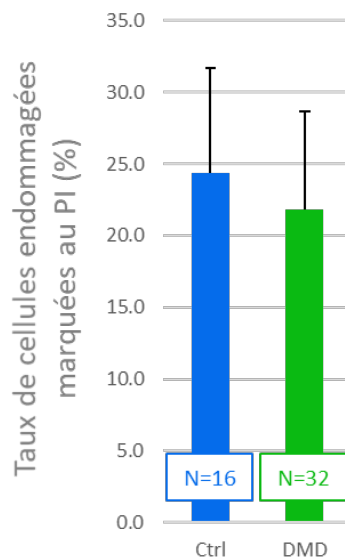
Ainsi, la proportion plus élevée de cellules DMD non réparées après lésion en présence de calcium ne peut être attribuée à une fragilité accrue mais traduit bien un défaut intrinsèque de réparation membranaire.

Dans l'hypothèse où le traitement induit un taux de lésions membranaires similaires dans l'ensemble des lignées, ce résultat suggère que les cellules FSHD1 et RMD2 ne souffrent pas d'un défaut de réparation membranaire. La capacité des cellules FSHD à réparer les dommages membranaires est surprenante étant donné que des travaux antérieurs ont signalé un défaut de réparation membranaire dans ces cellules (Bittel et al., 2020). Cela pourrait être dû à des spécificités propres aux patients ou à des différences méthodologiques pour induire des dommages membranaires. En ce sens, il serait pertinent de tester la réponse de ces cellules à des irradiations laser. Enfin, nous avons montré dans la section précédente (cf. Résultats, partie 2) que CAV3 pouvait constituer un élément limitant pour la réparation membranaire dans les myoblastes. Cependant, la capacité de réparation observée dans les cellules atteintes d'une mutation responsable de la RMD2, donc cavéolinopathiques, suggère que CAV3 n'est peut-être pas un élément limitant. Il est donc probable qu'un autre composant de la machinerie de réparation soit impliqué.



**Figure 18 : Identification des lignées dystrophiques atteintes d'un défaut de réparation membranaire par le test de réparation membranaire**

Les cellules ont été soumises à un stress de cisaillement (Figure 14, application 1). Les cellules qui ont échoué à réparer leur membrane ont été évaluées quantitativement par des tests de perméabilité au propidium iodide (PI). Les images ont été acquises au microscope à fluorescence Olympus XI81, puis analysées par ImageJ. Au moins trois champs ont été observés pour au moins 24 expériences indépendantes (N). Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie. Test de Mann-Whitney en utilisant le groupe contrôle comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  $N > 8$  pour toutes les lignées avec Ctrl : LHCN et KM1421 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578 et 107 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 : Cav69 et 650 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098 et 6594 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080 et KM1263.



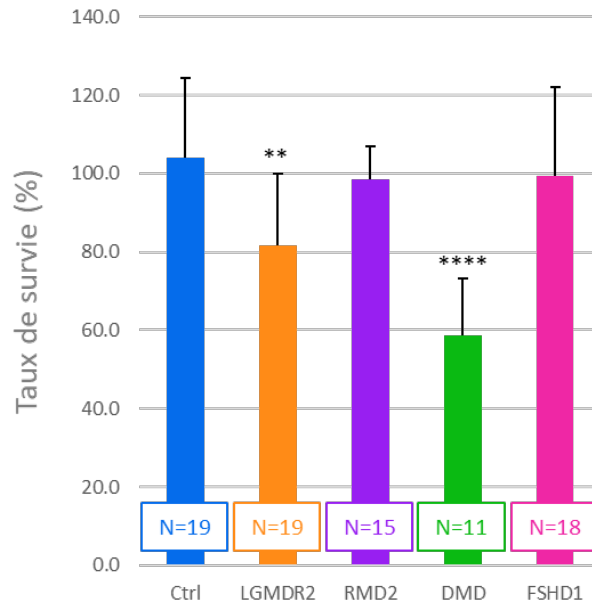
**Figure 19 : Identification des lignées dystrophiques atteintes d'un défaut de réparation membranaire par le test de réparation membranaire**

Les cellules ont été soumises à un stress de cisaillement (Figure 14, application 1) en présence d'un chélateur d'ions calcium (EGTA). Les cellules endommagées ont été évaluées quantitativement par des tests de perméabilité au propidium iodide (PI). Les images ont été acquises au microscope à fluorescence Olympus XI81, puis analysées par ImageJ. Au moins trois champs ont été observés pour au moins 16 expériences indépendantes (N). Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie. Test de Mann-Whitney en utilisant le groupe contrôle comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  $N > 8$  pour toutes les lignées avec Ctrl : LHCN et KM1421 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098 et 6594.

### 3.2. Analyse du taux de survie à 24h

Nous avons approfondi notre étude en étudiant le devenir des cellules soumises à un stress de cisaillement. Pour cela, nous avons évalué leur capacité de survie à 24 heures en les remettant en culture une fois le « shear stress » réalisé (Figure 14, application 2). Les résultats sont présentés dans la Figure 20.

Nous avons observé que les cellules contrôles avaient un taux de survie proche de 100%, indiquant que la quasi-totalité des cellules survit au stress de cisaillement. Nous en avons conclu que les cellules contrôles sont capables de faire face à des contraintes mécaniques. Nous avons également observé que les lignées cellulaires établies à partir de patients atteints de RMD et de FSHD1 répondent très bien aux dommages mécaniques, comme les cellules contrôles, avec un taux de survie proche de 100%. Ce résultat, complémentaire de notre précédente expérience, confirme que ces cellules dystrophiques ne présentent pas de défaut de réparation membranaire, contredisant les conclusions de travaux antérieurs dans le cas des FSHD1 (Bittel et al., 2020). En ce qui concerne les cellules musculaires déficientes en dysferline (LGMDR2), nous avons observé que le taux de survie était d'environ 80%, indiquant que le stress de cisaillement a entraîné la mort de 20% des cellules en 24 heures. Ce résultat confirme la présence d'un défaut de réparation du sarcolemme, en accord avec l'expérience de réparation membranaire et les travaux précédemment menés sur cette pathologie (Bansal et al., 2003). Pour ce qui est des lignées cellulaires établies à partir de patients atteints de DMD, nous avons observé que le traitement par stress de cisaillement entraînait une mortalité élevée de ces cellules. Elles présentaient un taux de survie moyen d'environ 60%, ce qui signifie que plus d'un tiers de ces cellules ne survivaient pas. Ce résultat révèle une fragilité accrue des cellules musculaires déficientes en dystrophine lorsqu'elles sont soumises à un stress mécanique. Cette fragilité pourrait provenir d'une susceptibilité plus élevée aux lésions membranaires (Wallace & McNally, 2009) et/ou d'un défaut de la réparation de la membrane (Vila et al., 2017). Ce résultat fait sens, la dystrophine et son complexe d'ancrage DAPC étant supposés contribuer à la stabilité du sarcolemme (Wallace & McNally, 2009). En somme, ces résultats mettent en évidence un défaut de réparation membranaire dans les cellules musculaires isolées de patients atteints de DMD et de LGMDR2.



**Figure 20 : Taux de survie des cellules dystrophiques après dommage membranaire**

Les cellules de chaque groupe ont été divisées en deux populations : l'une a subi un stress de cisaillement, tandis que l'autre est restée en condition de repos. Ensuite, les cellules ont été remises en culture et le comptage des cellules musculaires adhérentes a été effectué après 24 heures. Le taux de survie correspond au rapport du nombre de cellules vivantes entre la population soumise au stress de cisaillement et la population au repos. Le comptage a été effectué sous microscopie photonique avec une cellule de Thoma et un marquage au bleu de Trypan. Au moins onze expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque lignée (N). Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie. Test de Mann-Whitney en utilisant le groupe contrôle comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Ctrl : LHCN, N = 9 et KM1421, N = 10 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, N = 10 et 107, N = 9 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 : Cav69, N = 6 et 650, N = 9 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, N = 5 et 6594, N = 6 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, N = 8 et KM1263, N = 10.

En comparant les résultats des Figures 18 et 20, nous constatons que les pathologies présentant le nombre de cellules non réparées le plus élevé correspondent aux pathologies avec le taux de survie le plus faible. Cependant, les pourcentages ne sont pas parfaitement corrélés, le taux de cellules non réparées restant en-deçà du taux de mortalité (taux de mortalité = 100 - taux de survie). Cela suggère qu'un certain nombre de cellules, bien qu'ayant initialement réussi à se réparer, ont pu subir des dommages irréversibles, entraînant leur incapacité à survivre au cours des 24 heures suivantes ou que d'autres n'ayant pas présenté de ruptures membranaires au cours du test ont fini par mourir, fragilisées par les contraintes mécaniques subies.

## **4. Les dystrophies musculaires sont-elles associées à une dérégulation de l'expression des annexines ?**

Il a été établi que les mutations du gène de la dysferline provoquent une défaillance dans le mécanisme de réparation de la membrane plasmique. Une même mutation primaire entraîne toutefois une évolution variable de la maladie, la dystrophie LGMDR2 et la MM illustrant parfaitement ce concept (Bansal et al., 2003). L'existence de facteurs secondaires serait à l'origine de ces pronostics différents en influençant considérablement la gravité de la pathologie (Heydemann et al., 2005).

Nous avons émis l'hypothèse que les ANX étaient des facteurs secondaires des dystrophies musculaires. Pour évaluer notre hypothèse, nous avons évalué leur niveau d'expression dans les différentes dystrophies musculaires, puis l'impact de leur dérégulation potentielle sur le mécanisme de réparation membranaire. Pour ce faire, nous avons exploré l'expression des ANX dans les différentes lignées pathologiques en condition basale, puis en condition de stress mécanique.

Les ANX étudiées ont été les ANXA1, A2, A4, A5 et A6 et A7. En effet, les travaux précédents ont montré que l'ANXA3 était absente dans les cellules musculaires humaines (Croissant et al., 2022). Son implication dans la réparation membranaire est donc peu probable. Par ailleurs, ces six ANX sont les plus étudiées et celles ayant déjà été observées comme impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques (Croissant et al., 2022).

### **4.1. Expression des ANX dans les cellules musculaires contrôles et dystrophiques en condition basale**

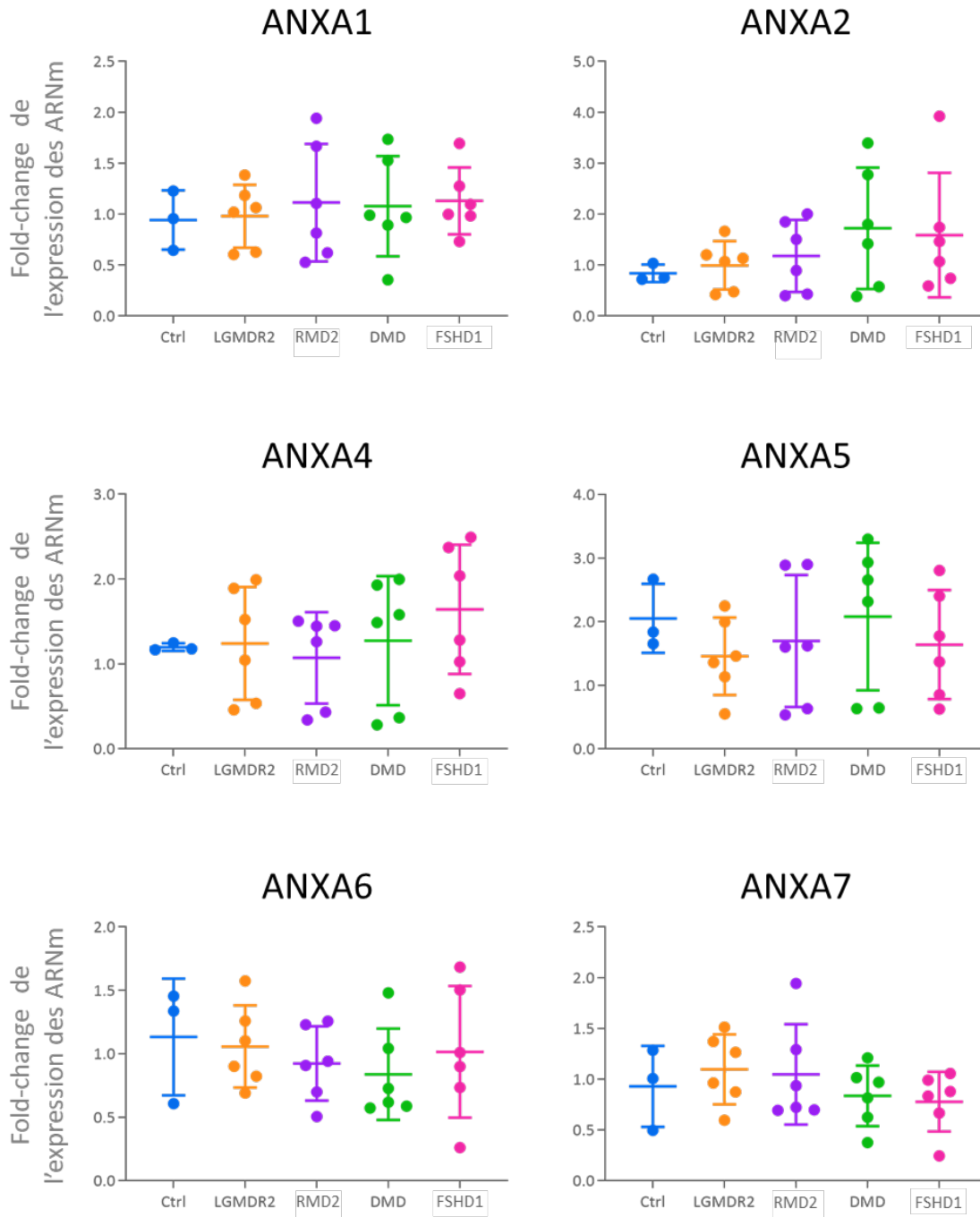
#### **4.1.1. Expression des ARNm**

Nous avons d'abord comparé l'expression des ANX au niveau transcriptionnel entre les myotubes contrôles et dystrophiques par RT-qPCR. Il est à noter que cette partie du travail a été réalisée en amont de la découverte sur la présentation d'une machinerie de réparation membranaire fonctionnelle des myoblastes différenciés 24h. Il apparaîtrait judicieux aujourd'hui de reproduire cette étude sur ce type de cellules. Les myotubes ont été formés en cultivant des myoblastes pendant 24 heures dans un milieu de croissance, puis pendant au moins trois jours dans un milieu de différenciation. La présence de myotubes a été vérifiée par microscopie à champ clair avant d'effectuer l'extraction des ARNm. Pour chaque série de mesures, la RT-qPCR a nécessité l'utilisation d'un contrôle interne pour normaliser les données et un étalon pour quantifier les résultats. Les amorces de qPCR ciblant la GAPDH et un extrait

cellulaire de la lignée cellulaire saine KM1421 ont été respectivement utilisés à ces fins. Chaque mesure a été réalisée trois fois de façon indépendante. Nous avons ensuite regroupé les résultats obtenus par pathologie, c'est-à-dire pour les lignées cellulaires LGMDR2, RMD, DMD et FSHD. Les résultats sont présentés dans la Figure 21.

En comparant, l'expression des ARNm de chaque ANX entre les lignées cellulaires saines et dystrophiques, nous constatons une grande variabilité des données intra-lignées et intra-pathologies. Aucune différence significative n'ayant été observée entre les différentes conditions testées, nous concluons que les lignées cellulaires dystrophiques ne diffèrent pas des lignées cellulaires saines en termes d'expression transcriptionnelle des ANX. La grande variabilité pourrait être imputable à des stades de différenciation différents malgré un temps d'incubation en milieu de différenciation identique. Une méthode d'estimation du stade de différenciation serait nécessaire avant d'envisager de reproduire cette expérience.





**Figure 21 : Analyse comparative de l'expression des ANXA1, A2, A4, A5, A6 et A7 dans les cellules musculaires issues de lignées cellulaires saines et dystrophiques par RT-qPCR**

Les myotubes ont été formés en cultivant des myoblastes pendant 24 heures dans un milieu de croissance KMEM, puis pendant au moins trois jours dans un milieu de différenciation KMEM Différenciation. La présence de myotubes a été vérifiée par microscopie à champ clair avant d'effectuer l'extraction de l'ARN à l'aide de Trizol. Les échantillons ont été normalisés par rapport au gène de ménage GAPDH et l'analyse a été réalisée avec le logiciel StepOne v2.3 (ThermoFisher). Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie et trois expériences indépendantes ont été menées pour chaque lignée. Ctrl : LHCN et KMI421 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578 et 107 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 : Cav695 et 650 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098 et 6594 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080 et KMI263.

#### 4.1.2. Expression protéique

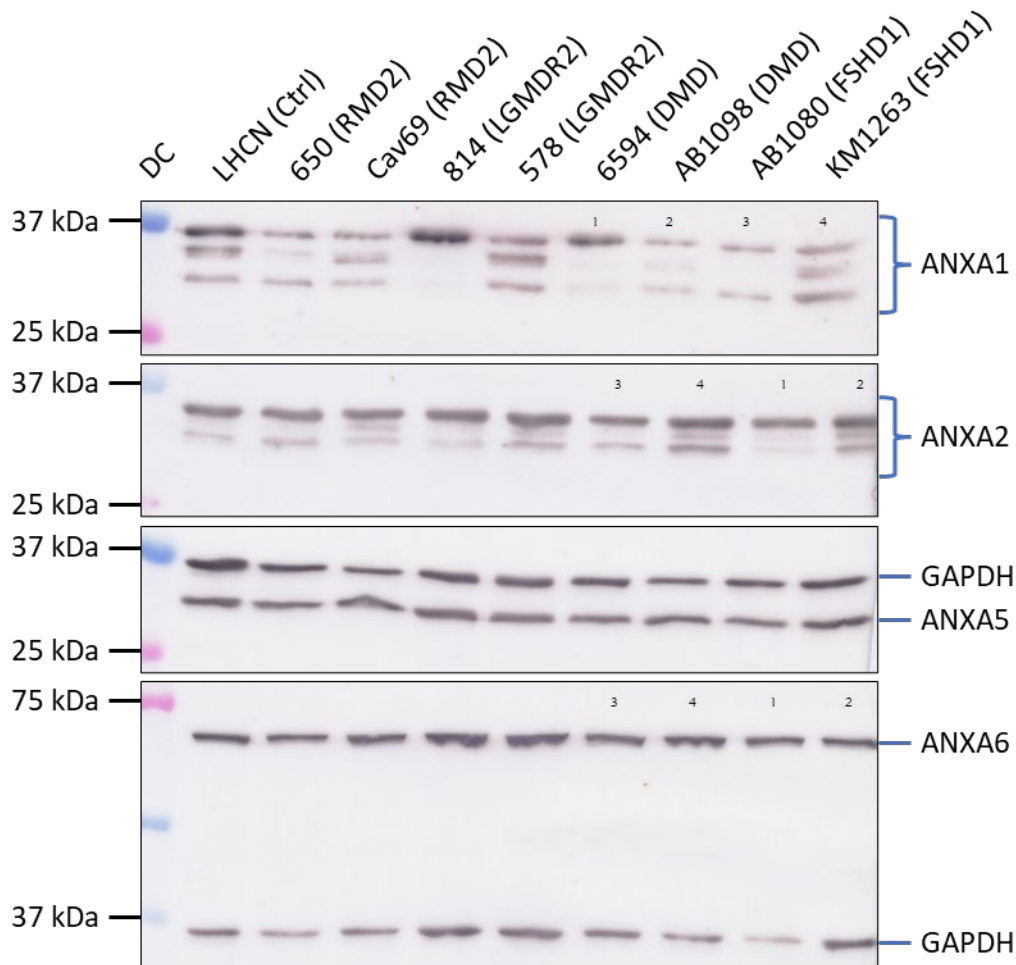
Pour déterminer si les ANX sont dérégulées dans les cellules musculaires des patients atteints de dystrophie musculaire, nous avons évalué l'expression des ANX au niveau protéique dans des myotubes sains contrôles ou dystrophiques. Cette analyse a été réalisée par Western-Blot, après électrophorèse sur SDS-PAGE avec un gel de polyacrylamide à 10 % (Figure 22 et 23). Les ANXA1 et A2 ont été analysées seules sur une membrane pour des raisons de résolution, leur poids moléculaire apparent étant similaire à celui de la GAPDH utilisée comme contrôle de charge. Une deuxième membrane strictement identique en termes d'échantillons a systématiquement été analysée pour la détection de la GAPDH, afin d'assurer une correcte charge des extraits protéiques. Les Western-Blot ont été réalisés en grande quantité pour éviter tout artefact. Comme observé précédemment (Croissant, 2019), l'ANXA4 n'a été détectée dans aucune des lignées cellulaires contrôles ou dystrophiques (données non montrées). En ce qui concerne l'ANXA7, les résultats obtenus suggèrent une dégradation de l'AC. Initialement, une faible détection de l'ANXA7 a été possible lors des premières expériences de Western-Blot. Toutefois, nous avons rapidement constaté l'absence de bandes, indépendamment des lignées cellulaires testées. En conséquence, ces résultats n'ont pas pu faire l'objet d'une analyse. L'équipe est actuellement en quête d'un AC d'une nouvelle référence, présentant une meilleure stabilité et une plus grande fiabilité.

Pour les ANXA5 et A6, nous avons observé une seule bande à des poids moléculaires apparents de 35 kDa et 68 kDa respectivement (Figure 22), comme attendu. En revanche, pour les ANXA1 et A2, nous avons observé jusqu'à trois bandes dans ces conditions expérimentales. Bien que plusieurs bandes aient déjà été observées en Western-Blot pour l'ANXA2 (Cagliani et al., 2005), jamais elles n'ont été constatées en de telles proportions. Leur présence pourrait s'expliquer par l'existence de modifications post-traductionnelles, l'ANXA2 étant réputée pour présenter des sites de phosphorylation. En effet, il a été démontré que la partie N-terminale de l'ANXA2 peut être clivée dans les cellules musculaires lisses humaines ou les fibroblastes (Babiychuk et al., 2002; C. Y. Wang & Lin, 2014) et être sujette à des modifications post-traductionnelles (Gabel et al., 2019; Grindheim et al., 2017).

Afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une hydrolyse des ANX liée à une dégradation des échantillons, des analyses de plusieurs extraits protéiques, obtenus indépendamment en présence d'inhibiteurs de protéases, ont été réalisées. Des résultats identiques ont été systématiquement obtenus (non montrés). Il convient de noter que différents profils ont été observés pour les différentes lignées cellulaires. Par exemple pour l'ANXA1, la lignée cellulaire

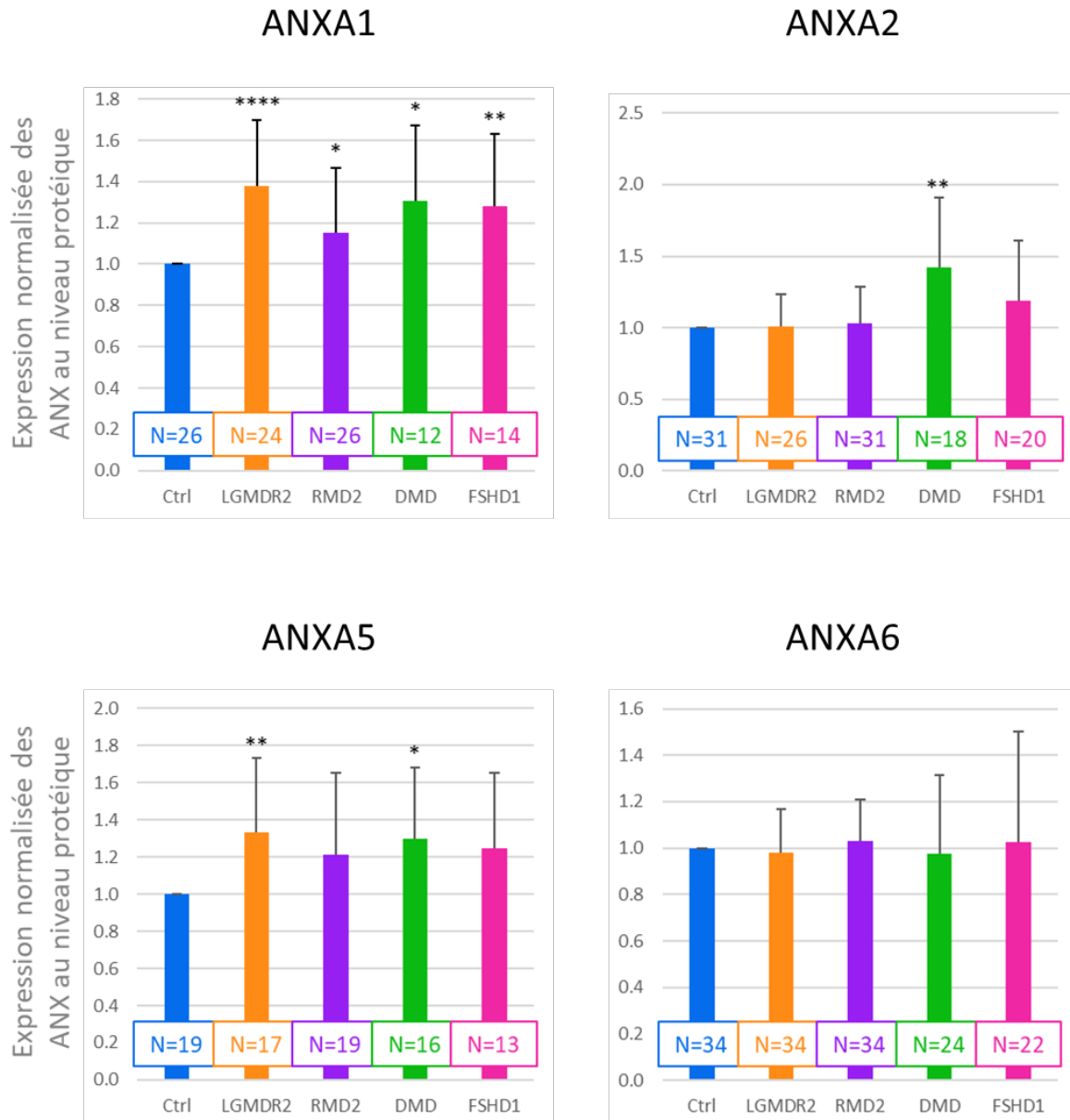
814 (LGMDR2) présentait une bande majeure, tandis que l'AB1080 (FSHD) montrait uniquement deux bandes principales sur les trois possibles.

Afin de quantifier le niveau d'expression des ANX dans les différentes lignées cellulaires, la taille et l'intensité des bandes ont été évaluées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour déterminer le niveau global d'expression des ANX présentant plusieurs bandes, ces dernières ont été regroupées (Figure 23).



**Figure 22 : Analyse de l'expression des ANXA1, A2, A5 et A6 dans les cellules musculaires des lignées cellulaires dystrophiques par Western-Blot**

10 µg d'extraits protéiques ont été séparés sur SDS-PAGE à 10 %. L'ANXA1 (37 kDa) et la GAPDH (37 kDa, contrôle de charge) ont été détectées via des AC primaires polyclonaux de lapin ; les ANXA2 (38 kDa), ANXA5 (35 kDa) et ANXA6 (68 kDa) ont été détectées via un AC primaire monoclonal de souris. Le marqueur de masse molaire Dual Color (DC, Biorad) a été utilisé. L'ordre des dépôts a été alterné dans toutes les expériences pour prévenir les artefacts de migration du dernier puits (sur la figure : 1 : 6594 ; 2 : AB1098 ; 3 : AB1080 ; 4 : KM1263). La révélation a été réalisée avec le kit Opti-4CN Substrate (Biorad). Un minimum de 12 répétitions pour chaque condition (lignée cellulaire et ANX) a été effectué. DC : dual color ; marqueur de taille. Charlotte Brévert, étudiante Master2 de janvier à juin 2020 a participé à ce travail. LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale. Phoebe Rassinoux, étudiante Master2 de janvier à juin 2021, a participé à ce travail.



**Figure 23 : Analyse de l'expression relative des ANXA1, A2, A5 et A6 dans les cellules musculaires des lignées cellulaires dystrophiques en condition basale**

Au moins douze expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque lignée (N). Pour chaque expérience de Western-Blot, l'intensité du signal des lignées cellulaires dystrophiques a été normalisée par rapport à la lignée cellulaire contrôle. Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie. Test de Wilcoxon en utilisant le groupe contrôle comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Ctrl : LHCN, N = 26 pour l'ANXA1, N = 31 pour l'ANXA2, N = 19 pour l'ANXA5, N = 34 pour l'ANXA6 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, N = 12 et 814, N = 12 pour l'ANXA1, 578, N = 14 et 814, N = 12 pour l'ANXA2, 578, N = 10 et 814, N = 7 pour l'ANXA5, 578, N = 18 et 814, N = 16 pour l'ANXA6 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 : Cav69, N = 14 et 650, N = 12 pour l'ANXA1, Cav69, N = 14 et 650, N = 17 pour l'ANXA2, Cav69, N = 8 et 650, N = 11 pour l'ANXA5, Cav69, N = 16 et 650, N = 18 pour l'ANXA6 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, N = 5 et 6594, N = 7 pour l'ANXA1, AB1098, N = 10 et 6594, N = 8 pour l'ANXA2, AB1098, N = 9 et 6594, N = 7 pour l'ANXA5, AB1098, N = 13 et 6594, N = 11 pour l'ANXA6 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, N = 7 et KM1263, N = 7 pour l'ANXA1, AB1080, N = 10 et KM1263, N = 10 pour l'ANXA2, AB1080, N = 6 et KM1263, N = 7 pour l'ANXA5, AB1080, N = 10 et KM1263, N = 12 pour l'ANXA6.

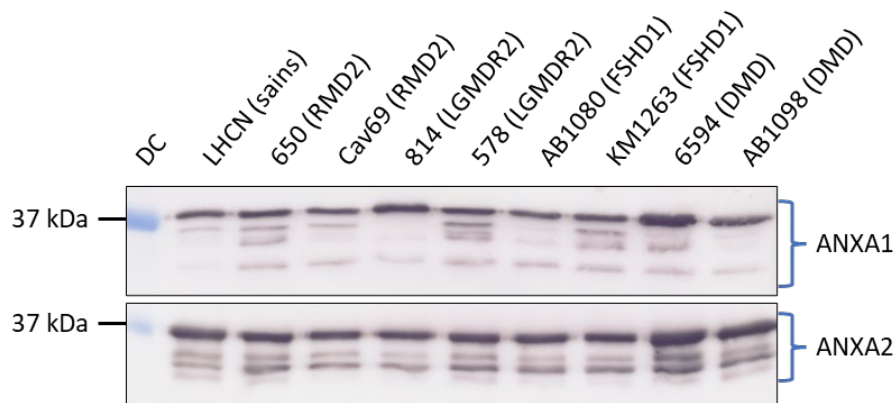
Nous avons observé que l'ANXA1 est surexprimée dans les cellules LGMDR2, RMD, DMD et FSHD1 tandis que l'ANXA2 est surexprimée dans les lignées cellulaires DMD (Figure 23). De précédents travaux avaient montré que les souris mdx déficientes en dystrophine exprimaient des niveaux significativement plus élevés d'ANXA1 et A2 que les sujets contrôles (Vila et al., 2017). En outre, une cohorte de patients italiens atteints de LGMDR2, RMD et DMD avaient présenté des résultats équivalents (Cagliani et al., 2005). Nos résultats concordent partiellement avec ces travaux en ce sens que dans le cas des pathologies LGMDR2 et RMD, nos lignées ne présentent pas de surexpression de l'ANXA2.

Bien que les lésions musculaires et la gravité de la maladie chez les patients LGMDR2 soient corrélées à une expression accrue de l'ANXA2 (Hogarth et al., 2019), nous n'avons pas observé de surexpression de l'ANXA2 dans les lignées cellulaires 578 et 814 par rapport au contrôle. Une surexpression de l'ANXA5 a, par contre, été mise en évidence dans les lignées cellulaires dystrophiques LGMDR2 et DMD. À notre connaissance, la surexpression de l'ANXA5 dans les cellules musculaires dystrophiques constitue un résultat nouveau qui n'a pas encore été rapporté dans la littérature. Il sera intéressant d'analyser quelles sont les conséquences de cette surexpression, en particulier dans la LGMDR2, où l'absence de réparation membranaire pourrait conduire à une présence d'ANXA5 dans le milieu extracellulaire.

Bien que l'ANXA6 a été identifiée comme facteur secondaire de la pathologie LGMDR5 chez la souris, son expression dans toutes les lignées cellulaires dystrophiques testées ne montre pas de différences significatives par rapport au contrôle.

Nous pouvons conclure que chaque pathologie présente au moins une ANX à l'expression accrue.

Pour approfondir notre analyse, nous avons par la suite choisi d'étudier les profils des ANXA1 et A2 qui, comme précédemment souligné, présentent de multiples bandes. Il a d'abord fallu améliorer la résolution. Des expériences en SDS-PAGE sur gel à 12% de polyacrylamide ont donc été effectuées (Figure 24). Ces dernières ont permis de révéler jusqu'à cinq bandes pour l'ANXA1 et quatre pour l'ANXA2. Les estimations des masses molaires apparentes sont présentées dans le tableau 7. Les bandes de l'ANXA1 présentent des masses molaires apparentes variant entre 32 et 41 kDa tandis que celles de l'ANXA2 s'échelonnent entre 32 et 38 kDa.

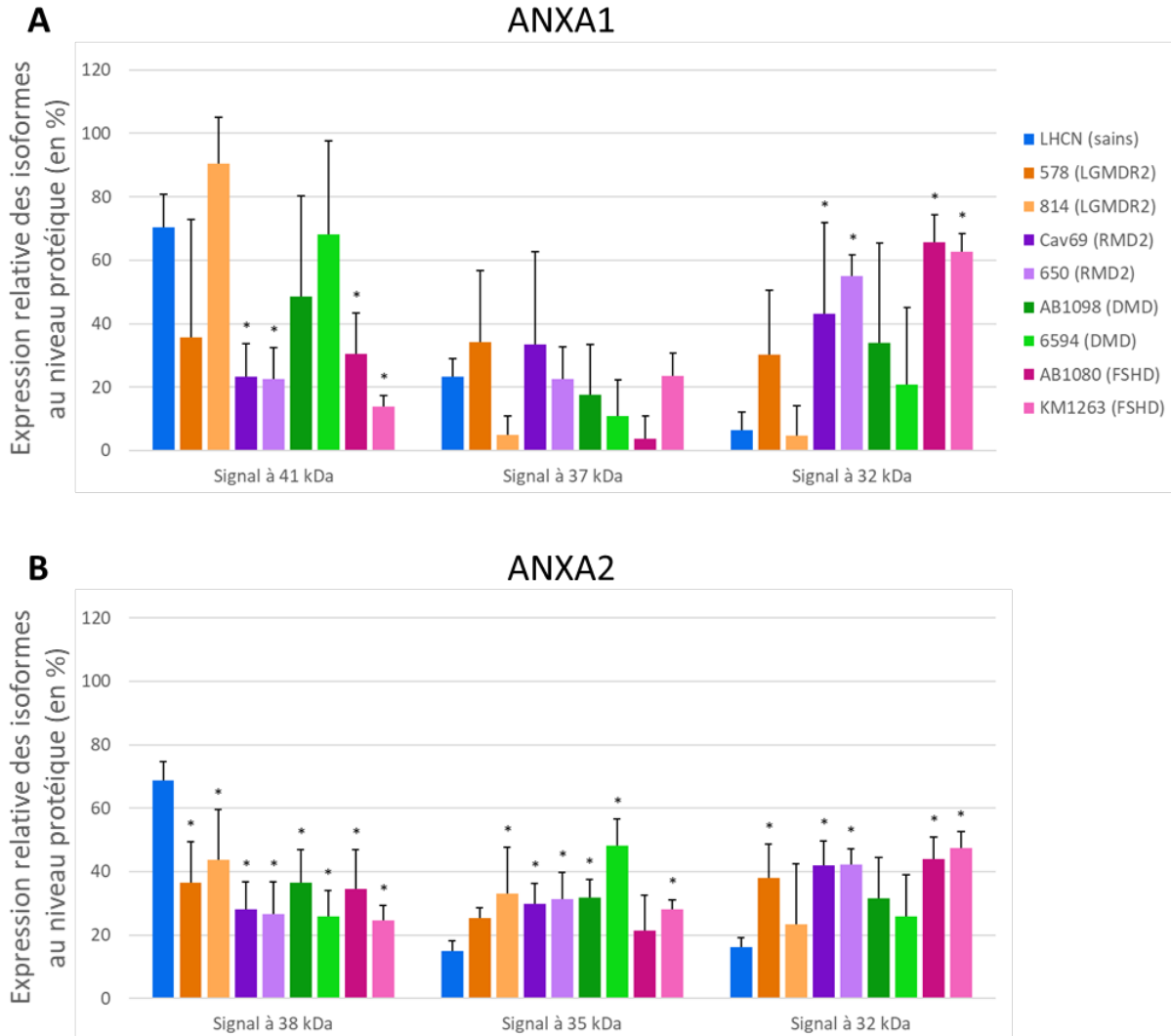


**Figure 24 : Analyse de l'expression des ANXA1 et A2 dans les cellules musculaires issues de lignées dystrophiques par SDS-PAGE sur gel à 12% de polyacrylamide**  
 Les traitements appliqués aux échantillons et les conditions de révélation sont identiques à ceux présentés en (Figure 22). Au minimum 4 expériences indépendantes ont été réalisées. Charlotte Brévert, étudiante Master2 de janvier à juin 2020 a participé à ce travail.

Masse molaire apparente (kDa)	Signal 1	Signal 2	Signal 3	Signal 4	Signal 5
ANXA1	41,4 ± 0,3	38,5 ± 0,1	36,5 ± 0,1	35,7 ± 0,3	32 ± 0,3
ANXA2	38 ± 1,4	34,9 ± 1,4	33,3 ± 1,6	31,6 ± 1,8	

**Tableau 7 : Masses molaires apparentes des bandes observées lors de la révélation des ANXA1 et A2 après analyse des échantillons protéiques en SDS-PAGE sur gel à 12% de polyacrylamide**

Le niveau d'expression de chacune des bandes a été quantifié pour l'ensemble des lignées étudiées (Figure 25). Bien que la résolution ait été améliorée, elle n'a pas permis de distinguer précisément les bandes intermédiaires, qui ont donc été regroupées. Trois signaux distincts ont ainsi été quantifiés.



**Figure 25 : Intensité relative des signaux multiples des ANXA1 et A2**  
**(A) ANXA1** : Pour une question de résolution lors de l'analyse, les signaux des bandes à 38,5 kDa, 36,5 kDa et 35,6 kDa ont été regroupés, et leur somme est présentée à une masse molaire apparente moyenne de 37 kDa. 5 expériences indépendantes ont été menées. **(B) ANXA2** : la somme des signaux des bandes à 33,3 kDa et 31,6 kDa est présentée à une masse molaire moyenne de 32 kDa. 7 expériences indépendantes ont été effectuées. **(A)(B)** Pour chaque expérience, l'intensité du signal des lignées dystrophiques a été pondérée par celle de la lignée contrôle. Chaque valeur constitue le rapport entre l'intensité du signal de la bande considérée et la somme de l'intensité du signal des bandes observées pour l'échantillon. Test ANOVA par rapport au contrôle, \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ . Charlotte Brévert, étudiante Master2 de janvier à juin 2020 a participé à ce travail.

L'ANXA1 exhibe une grande hétérogénéité dans la répartition du signal entre les différentes masses molaires apparentes et ce, en fonction des lignées. Les lignées issues de patients atteints de RMD et de FSHD contrastent fortement avec le contrôle, en affichant un signal autour de 41 kDa beaucoup plus faible et un signal autour de 32 kDa beaucoup plus intense que celui de la lignée LHCN. Pour une des lignées LGMDR2 (814), le signal de l'ANXA1 semble presque

exclusivement concentré à 41 kDa, les bandes à 37 et 32 kDa étant quasi inexistantes. Au contraire pour la seconde lignée LGMDR2 (578), la bande à 41 kDa présente une intensité du signal comparable au contrôle tandis que la bande autour de 32 kDa est beaucoup plus intense. Pour les lignées issues de patients atteints de DMD, le profil d'expression est similaire au contrôle avec néanmoins une grande variabilité des valeurs pour chacune des lignées.

Pour ce qui est de l'ANXA2, une tendance générale est observée, avec une baisse de l'intensité de la bande à 38 kDa dans les lignées dystrophiques par rapport au contrôle, en faveur d'une intensité plus forte des bandes à 35 et 32 kDa (Figure 25). Les lignées dystrophiques présentent donc un profil de répartition du signal similaire, profil qui contraste avec celui de la lignée contrôle pour laquelle le signal est concentré à 38kDa.

On peut conclure que l'expression des isoformes des ANXA1 et A2 est très différente entre les lignées dystrophiques et contrôle et entre les lignées dystrophiques d'une même pathologie. Cette analyse mériterait d'être poursuivie afin d'identifier le type de modifications post-traductionnelles subies par les ANXA1 et A2 et l'impact de ces modifications sur la fonction cellulaire de ces ANX dans les cellules musculaires squelettiques.

#### **4.2. Présence d'une isoforme tronquée d'ANXA6 dans les myotubes dystrophiques humains**

Dans le cadre de la recherche de facteurs secondaires des dystrophies musculaires, l'équipe de McNally avait identifié, en 2014, un variant du site d'épissage de l'ANXA6 donnant lieu à une forme tronquée de la protéine chez les souris déficientes en dystrophine (Demonbreun, Allen, et al., 2016; Swaggart et al., 2014). Ce variant compromettait la translocation de l'ANXA6 vers la membrane lésée.

Au cours de mon travail de thèse, de nombreuses expériences de Western-Blot ont été réalisées pour détecter l'ANXA6, aussi bien avec des myoblastes indifférenciés ou différenciés 24 heures ou encore des myotubes. Que ce soit chez les lignées saines ou dystrophiques, aucune bande correspondant à une isoforme tronquée de l'ANXA6 n'a été observée. Le recours à l'utilisation d'une plus grande quantité de protéines et à une méthode de détection plus sensible telle que la chimioluminescence n'a pas non plus abouti à sa détection. Nous en avons conclu que cette isoforme était probablement une spécificité du muscle squelettique murin, absente chez l'Homme.

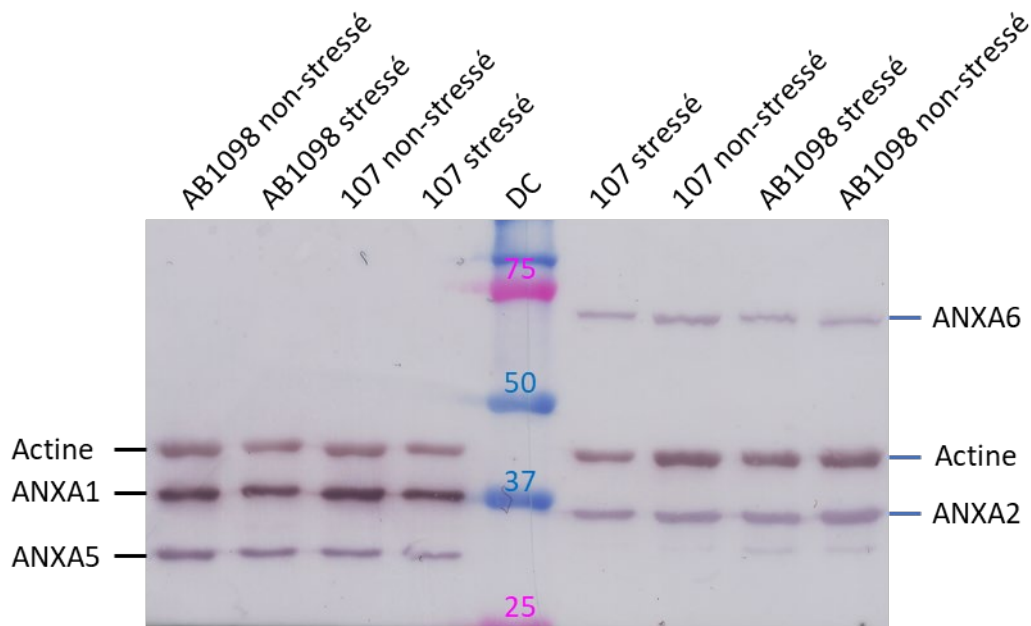


### **4.3. Influence des contraintes mécaniques sur l'expression des ANX**

Nous avons examiné l'expression relative des ANX dans des myoblastes différenciés 24 heures soumis ou non à des contraintes de cisaillement, par analyse en Western-blot. Notre hypothèse était double : les cellules musculaires soumises à des contraintes mécaniques pourraient renforcer leur machinerie de réparation membranaire afin de faire face à de futures lésions du sarcolemme (1) et la dystrophie musculaire pourrait perturber l'homéostasie de cette réparation (2). Concernant la première hypothèse, il a en effet été observé que les propriétés invasives des cellules cancéreuses, qui subissent des contraintes mécaniques fortes, sont associées à une surexpression de nombreuses annexines (Bouvet et al., 2020; Gounou et al., 2023).

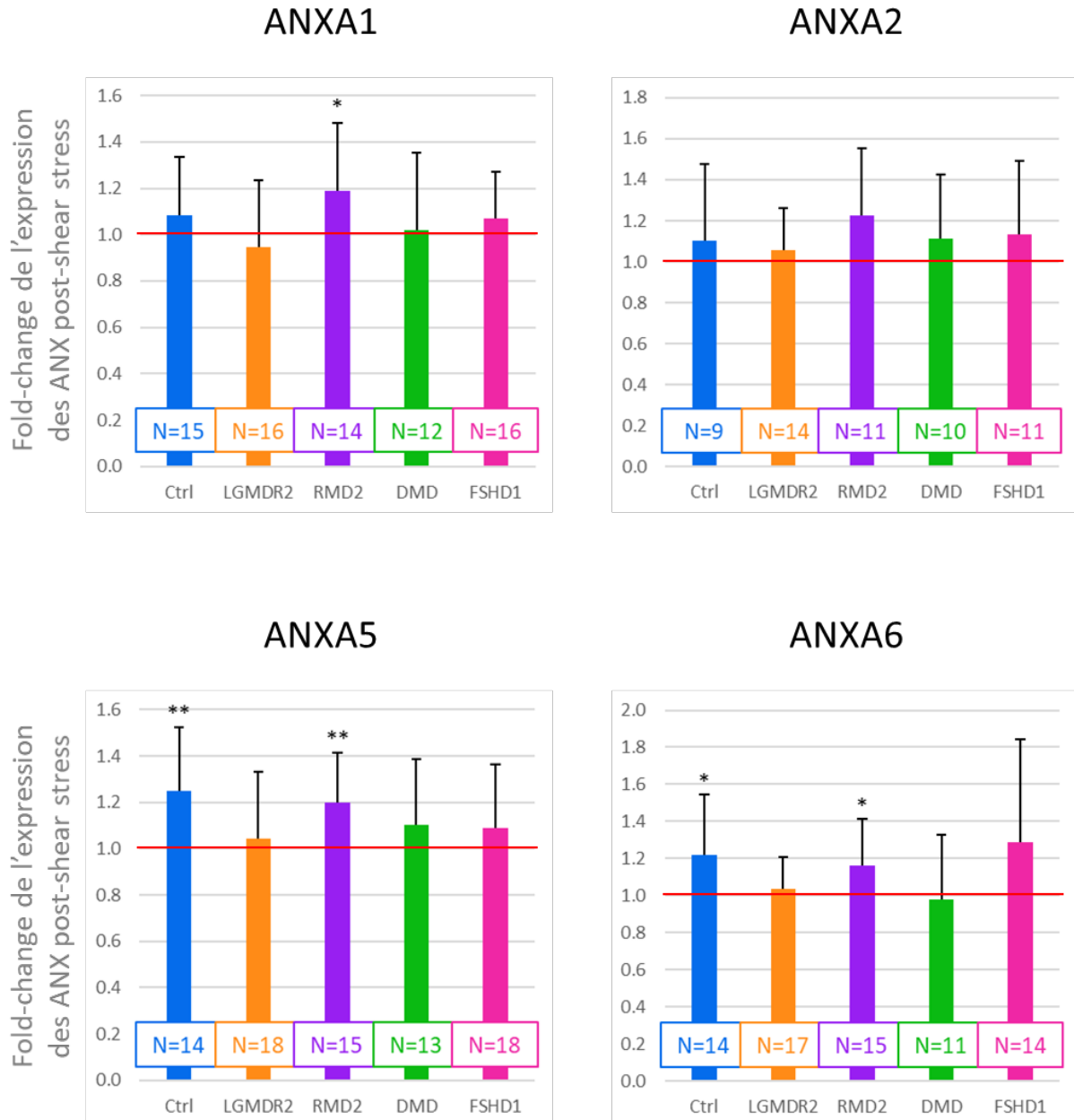
Nous avons donc quantifié l'expression des ANXA1, A2, A5 et A6 dans les lignées cellulaires contrôle et dystrophiques 24 heures après le traitement par « shear stress » (Figure 14, application 3), en les comparant à la condition sans contrainte. Les résultats sont présentés dans les Figures 26 et 27. Nous avons observé que le traitement par contrainte de cisaillement a conduit à une augmentation significative d'environ 20% de l'expression des ANXA5 et A6 dans les cellules contrôles, tandis que celle des ANXA1 et A2 n'a montré aucun changement (Figure 27, Ctrl). Étant donné que les ANXA5 et A6 jouent un rôle crucial dans la réparation du sarcolemme (Carmeille et al., 2016; Croissant et al., 2020), ce résultat confirme partiellement notre hypothèse d'un renforcement de la machinerie de réparation membranaire dans les cellules soumises à des contraintes mécaniques. Cela pourrait correspondre à une adaptation cellulaire visant à anticiper de futures lésions membranaires.

À l'exception des cellules RMD, l'augmentation de l'expression des ANX après des contraintes mécaniques est absente dans la plupart des cellules dystrophiques étudiées. Si dans le cas des ANXA1 et A2, ce résultat est conforme à la situation contrôle, dans le cas des ANXA5 et A6, ce résultat suggère un défaut de la capacité de ces cellules à adapter leur phénotype à un environnement stressant. Nous avons également constaté une augmentation de l'expression de l'ANXA1 « post-shear stress » dans les cellules RMD, absente dans les cellules contrôles. Concernant l'ANXA2, nous confirmons ne pas observer de surexpression dans les cellules LGMDR2, contrairement à ce qui est rapporté dans certaines études (Hogarth et al., 2019). Nous avons observé le plus souvent une seule bande majoritaire pour les ANXA1 et A2 dans les myoblastes différenciés 24h et non les profils multi-bandes retrouvés dans les myotubes. Les modifications post-traductionnelles pourraient intervenir tardivement dans le processus de différenciation.



**Figure 26 : Expression des ANXA1, A2, A5 et A6 dans les cellules musculaires des lignées cellulaires dystrophiques soumises à un stress de cisaillement**

Exemple de Western-Blot réalisé sur les lignées cellulaires AB1098 et 107. 10  $\mu$ g d'extraits protéiques ont été séparés sur SDS-PAGE à 10 %. L'ANXA1 (37 kDa) et l'actine (37 kDa, contrôle de charge) ont été détectées via des AC primaires polyclonaux de lapin ; les ANXA2 (37 kDa), ANXA5 (32 kDa) et ANXA6 (68 kDa) ont été détectées via un AC primaire monoclonal de souris. Le marqueur de masse molaire Dual Color (DC, Biorad) a été utilisé. La révélation a été réalisée avec le kit Opti-4CN Substrate (Biorad). DC : dual color : marqueur de taille.



**Figure 27 : Analyse semi-quantitative de l'expression relative des ANXA1, A2, A5 et A6 dans les cellules musculaires des lignées cellulaires dystrophiques soumises à un stress de cisaillement**

Au moins onze expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque lignée (N). Pour chaque expérience de Western-Blot, l'intensité du signal des lignées cellulaires dystrophiques a été normalisée par rapport à la condition basale (non-stressée) des lignées cellulaires contrôles. Les résultats des lignées ont été poolés par pathologie. Test de Wilcoxon en utilisant le groupe contrôle comme référence. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $< 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Ctrl : LHCN, N = 7 et KMI421, N = 8 pour l'ANXA1, LHCN, N = 4 et KMI421, N = 7 pour l'ANXA2, LHCN, N = 7 et KMI421, N = 7 pour l'ANXA5, LHCN, N = 8 et KMI421, N = 6 pour l'ANXA6 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, N = 8 et 107, N = 8 pour l'ANXA1, 578, N = 7 et 107, N = 7 pour l'ANXA2, 578, N = 9 et 107, N = 9 pour l'ANXA5, 578, N = 8 et 107, N = 9 pour l'ANXA6 ; RMD2 : maladie des muscles ondulants 2 : Cav69, N = 6 et 650, N = 8 pour l'ANXA1, Cav69, N = 4 et 650, N = 7 pour l'ANXA2, Cav69, N = 6 et 650, N = 9 pour l'ANXA5, Cav69, N = 5 et 650, N = 10 pour l'ANXA6 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, N = 6 et 6594, N = 6 pour l'ANXA1, AB1098, N = 5 et 6594, N = 5 pour l'ANXA2, AB1098, N = 7 et 6594, N = 6 pour l'ANXA5, AB1098, N = 5 et 6594, N = 6 pour l'ANXA6 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, N = 9 et KMI263, N = 7 pour l'ANXA1, AB1080, N = 5 et KMI263, N = 6 pour l'ANXA2, AB1080, N = 9 et KMI263, N = 9 pour l'ANXA5, AB1080, N = 6 et KMI263, N = 8 pour l'ANXA6.

#### **4.4. Quel est le comportement des ANX lors de dommages membranaires dans les cellules musculaires dystrophiques ?**

Hormis l'ANXA2, l'expression de toutes les ANX est dérégulée dans au moins une pathologie, dans les cellules musculaires soumises à un stress mécanique. Bien que nos résultats ne le confirment pas, il a été montré qu'un stress dérégulait à la hausse l'expression de l'ANXA2 qui fuitait dans le milieu interstitiel depuis les cellules murines endommagées, non-réparées et concourrait au remplacement des myocytes par des adipocytes (Hogarth et al., 2019).

Les dérégulations d'expression des ANX pourraient également s'accompagner d'une dynamique perturbée de leur recrutement au niveau du site de rupture lors d'un dommage membranaire. La question du comportement des ANX lors d'un dommage membranaire dans les cellules musculaires dystrophiques a donc été étudiée.

Pour étudier le trafic des ANX dans les cellules en cours de réparation, nous avons opté pour l'expérience de dommage membranaire par irradiation laser. Initialement développé en 2008 sur des cellules périvasculaires (Bouter et al., 2011), le protocole d'irradiation a été par la suite adapté pour explorer la réparation membranaire dans les cellules musculaires (Carmeille et al., 2017). Le protocole consiste en l'utilisation d'un laser infrarouge Titanium:Sapphire à 820 nm couplé à un microscope confocal pour induire une rupture sur une zone de 1  $\mu\text{m}^2$ . Pour les cellules musculaires, la puissance du laser a été ajustée à 110 mW, générant une rupture du sarcolemme d'environ 1  $\mu\text{m}$  qu'un myotube sain est capable de réparer (Carmeille et al., 2016). Il est nécessaire de viser la périphérie des cellules musculaires, dépourvu d'organites essentiels, et que la rupture soit confirmée par l'apparition d'une petite bulle visualisée en contraste de phase lors de l'irradiation (Carmeille et al., 2017).

Dans le cadre de ma thèse, ce protocole, déjà abouti, a été ajusté pour des raisons de praticité et d'efficacité expérimentales. Les myotubes, bien que physiologiquement pertinents, présentent en effet une fragilité intrinsèque qui les rend susceptibles au décollement lors des transfections, du transport ou même des irradiations. La découverte de la mise en place précoce de la machinerie de réparation membranaire lors du processus de différenciation a permis la substitution des myotubes par les myoblastes différenciés 24h, beaucoup plus résistants.

Afin d'observer les ANX, les myoblastes différenciés 24 heures ont été transfectés afin d'exprimer des ANX recombinantes couplées à des protéines fluorescentes. Lors de l'induction du dommage, nous avons pu ainsi observer la dynamique des ANX pendant et immédiatement après la rupture de la membrane, avec une précision temporelle proche de la seconde (1.6 secondes). Cette approche nous a permis d'étudier la réponse des ANXA1-GFP, ANXA2-GFP, ANXA4-GFP, ANXA5-GFP et ANXA6-GFP dans les deux lignées saines et huit lignées

dystrophiques, permettant ainsi de comparer les réponses des ANX dans un contexte pathologique. Il avait été précédemment établi que les ANX recombinantes adoptaient la même localisation que les ANX endogènes en amont (Carmeille et al., 2016; Croissant et al., 2022) et à la suite d'un dommage membranaire dans des myotubes sains (Carmeille et al., 2016; Croissant et al., 2020 et Croissant, 2019).

Bien que porteur d'informations visuelles essentielles, ce type d'expériences, réalisées sur cellule unique, souffre d'un manque de profondeur statistique, étant donné qu'il est très difficile par condition de dépasser  $N=5$  et  $n=100$ .

#### **4.4.1. ANXA1**

##### **4.4.1.1. Lignées saines : LHCN et KM1421**

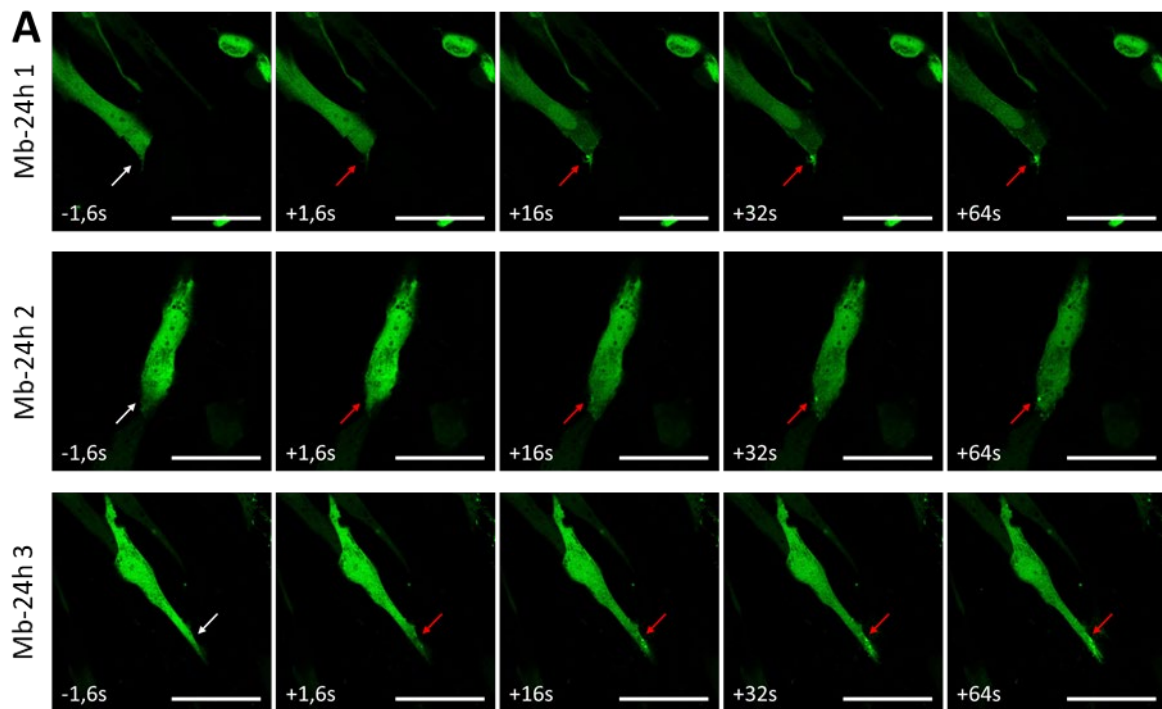
Chez les lignées saines, le recrutement de l'ANXA1-GFP après le dommage a été quasi-immédiat (+1,6 secondes) (Figure 28 et 29) et s'est accompagné d'une baisse visible de la fluorescence intracellulaire globale de la cellule irradiée (Figure 28). Ce recrutement a varié légèrement en intensité selon le dommage, sans doute lié à la variabilité expérimentale.

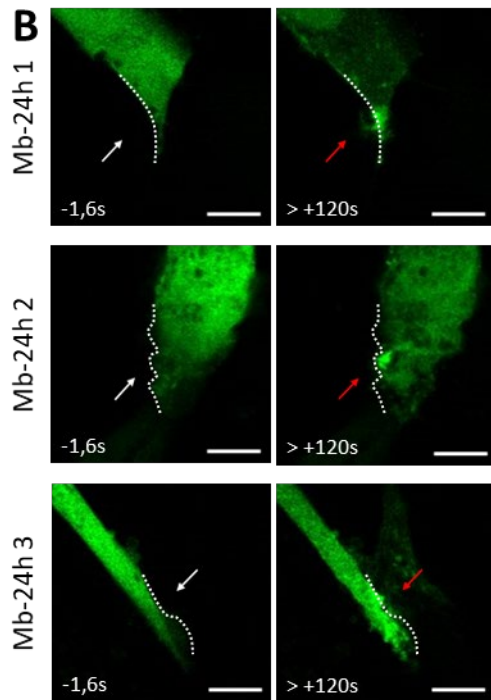
L'ANXA1-GFP s'est accumulée progressivement au niveau du site de rupture, suggérant sans que nous puissions l'affirmer son association à la membrane plasmique endommagée. Elle s'est accumulée en une structure bien délimitée et localisée à la zone endommagée, ce qui va dans le sens des précédentes observations (Croissant et al., 2022; Demonbreun, Quattrocchi, et al., 2016).

Cette structure pouvait soit être contenue dans les limites de la cellule (Figure 28, Mb-24h 2) soit faire saillie (Figure 28, Mb-24h 1). Dans ce dernier cas, la structure bourgeonnante, positionnée au-delà de la limite initiale du sarcolemme, avait été qualifiée de « cap », dans de précédentes publications (Demonbreun, Quattrocchi, et al., 2016). D'après nos observations, la forme du « cap » n'a pas de géométrie régulière contrairement à ce qui avait été rapporté dans les fibres musculaires de souris (Demonbreun, Quattrocchi, et al., 2016), laissant penser à un simple amas de matériel cellulaire comme observé précédemment (Croissant et al., 2020). Dans tous les cas, indépendamment de la présence d'un cap ou non, le cluster d'ANXA1-GFP a demeuré bien après la réparation de la membrane plasmique (80-90s chez les LHCN), comme on peut le constater sur la courbe d'évolution de la fluorescence au niveau du site de rupture avec l'atteinte d'un plateau (Figure 29)

Parfois, nous avons pu observer l'apparition éparse de spots fluorescents (Figure 28, Mb-24h 3). Ce phénomène déjà observé avait été attribué à des vésicules intracellulaires associées à l'ANXA1-GFP (Croissant et al., 2022).

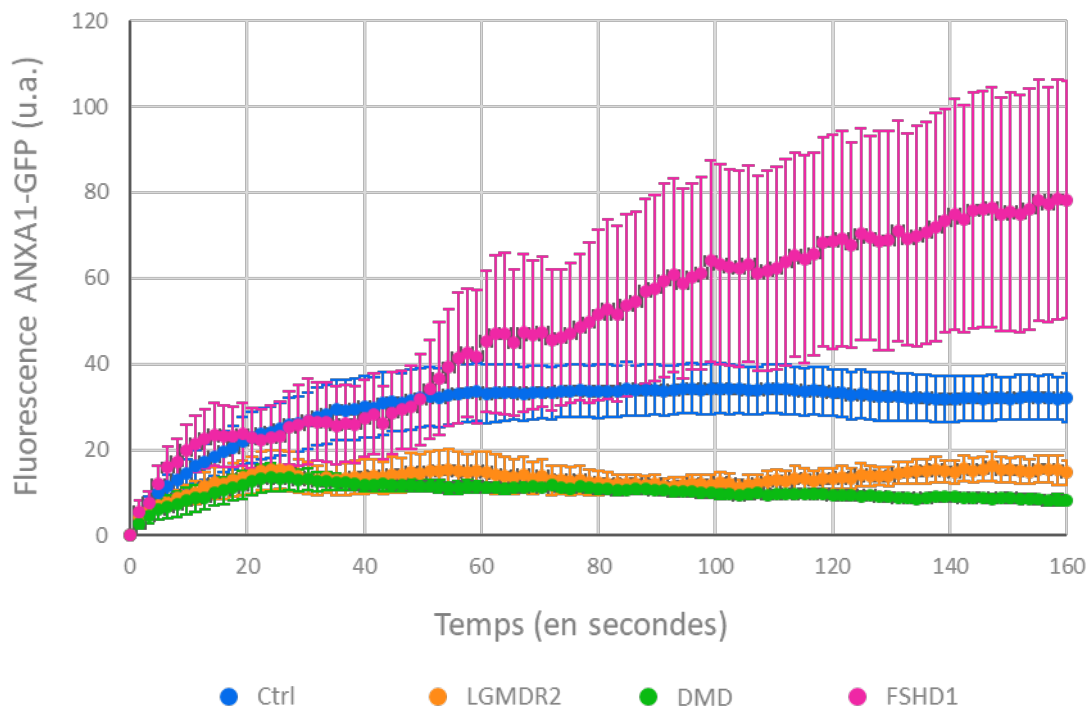
En conclusion, nos données vont dans le sens des observations recueillies précédemment sur les myotubes (Croissant, 2019). L'ANXA1-GFP semble donc se comporter de façon similaire dans les myoblastes différenciés 24h et les myotubes après un dommage induit par ablation. Mes résultats laissent penser à une interaction de l'ANXA1-GFP avec la membrane endommagée, ainsi que son association avec des vésicules intracellulaires. Des expériences de microscopie électronique seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.





**Figure 28 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes sains différenciés 24 heures exprimant l'ANXA1-GFP**

Trois exemples de myoblastes différenciés 24 heures (Mb-24h) LHCN-M2 ou KMI421, transfectés avec le plasmide pA1-GFP, et soumis à ablation laser 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1, 2 et 3 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 et 3 : KMI421 ; Mb-24h 2 : LHCN.



**Figure 29 : Evolution du recrutement de l'ANXA1-GFP au site de rupture**

Les séquences acquises lors des expériences d'ablation laser ont été analysées avec ImageJ. Pour minimiser la variabilité due aux paramètres du microscope et à l'efficacité de la transfection, la fluorescence de la première image a été soustraite de chaque image du stack. Une Region of Interest (ROI) de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre a été positionnée au site de rupture, et l'évolution de la fluorescence a été mesurée. Chaque condition a été réalisée une à deux fois (N). Ctrl : LHCN, n = 2 et KMI421, n = 4 avec un total (toutes lignées confondues) de N = 3 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, n = 2 et 107, n = 2 avec un total de N = 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, n = 2 et 6594, n = 3 avec un total de N = 2 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, n = 1 et KMI263, n = 5 avec un total de N = 3.

#### **4.4.1.2. Lignées LGMDR2 : 578 et 107**

Pour rappel, les lignées dysferlinopathiques 578 et 107 présentent un défaut de réparation du sarcolemme, dû respectivement à l'absence ou à l'expression réduite de la dysferline. L'objectif a été ici d'étudier quel est le comportement des ANX dans ce cas, en particulier les ANXA1 et A2 qui interagissent normalement avec la dysferline (Lennon et al., 2003).

Chez la lignée 578, pour laquelle l'expression de la dysferline est totalement inhibée, nous avons systématiquement observé un recrutement immédiat de l'ANXA1 (Figure 30, Mb-24h 1) comme observé dans les cellules contrôles. En revanche pour la lignée 107, dans laquelle la dysferline est exprimée mais présente sous forme d'agrégats cytoplasmiques (Phillippi et al., 2012), la cinétique de recrutement de l'ANXA1-GFP a souvent été retardée avec une survenue au-delà de 30 secondes (Figure 30, Mb-24h 2). Tout comme dans les cellules saines, le recrutement dans les cellules LGMDR2 s'est accompagné d'une baisse visible de la fluorescence intracellulaire globale de la cellule irradiée. Le cluster d'ANXA1-GFP au site de rupture a perduré tout au long de l'observation (+160 secondes) avec une intensité parfois amoindrie à partir de 80 secondes post-irradiation. Le cluster soit restait dans les limites initiales du sarcolemme, soit s'étendait au-delà (Figure 30, Mb-24h 1 et 2). Nous avons également pu observer quelques spots fluorescents au sein de la cellule lors du recrutement indiquant à nouveau l'intervention de vésicules intracellulaires associées à de l'ANXA1.

L'analyse de l'évolution de la fluorescence au niveau du site de rupture (Figure 29) nous a permis de confirmer un retard dans le recrutement de l'ANXA1-GFP dans les cellules LGMDR2 par rapport aux cellules contrôles. Nous avons également constaté que le plateau atteint présente une intensité divisée par deux, ce qui suggère un recrutement plus faible.

Somme toute, nous pouvons en déduire que dans cette pathologie, en dehors d'un recrutement parfois retardé et amoindrie, la destination cible demeure similaire à celle observée dans les cellules contrôles. Ce retard pourrait être lié à la présence faible voire nulle de la dysferline, qui normalement interagit avec l'ANXA1 (Lennon et al., 2003).

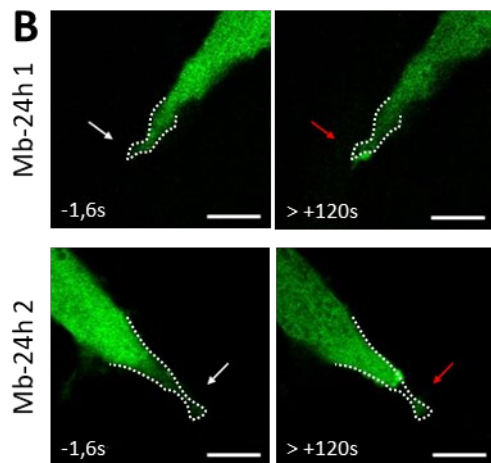
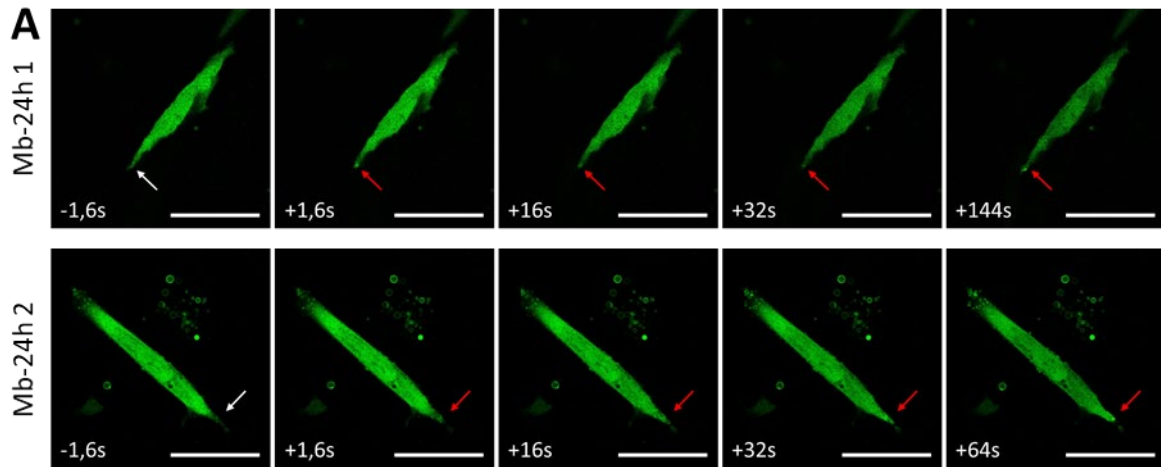
#### **4.4.1.3. Lignées RMD : Cav69 et 650**

Malgré plusieurs optimisations du protocole de transfection, les myoblastes différenciés 24 heures des lignées cavéolinopathiques n'ont jamais survécu aux transfections des ANXA1-, A2-, A4-, A5- et A6-GFP (Figure 31).

La morphologie des cellules et l'aspect ponctiforme de la fluorescence intracellulaire ont suggéré la présence de cellules mourantes qui ne réagissaient pas à l'irradiation. Leur

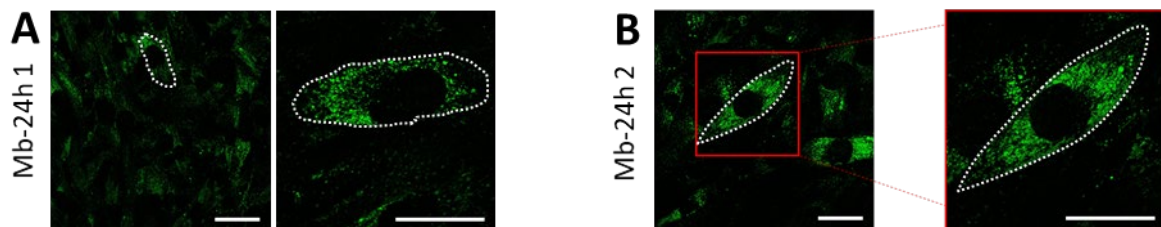


fluorescence cytoplasmique apparaissait sous forme de spots suggérant l'association de l'ANXA1-GFP à des vésicules intracellulaires.



**Figure 30 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes LGMDR2 différenciés 24 heures exprimant l'ANXA1-GFP**

Les myoblastes 578 et 107 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA1-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 578 ; Mb-24h 2 : 107.



**Figure 31 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes RMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA1-GFP**

Deux exemples de myoblastes 650 différenciés 24 heures transfectés avec les plasmides pA1-GFP (A) ou pA2-GFP (B). Un résultat identique a été observé pour les plasmides pA4-GFP, pA5-GFP et pA6-GFP. Ligne blanche, limite supposée du sarcolemme. Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ .

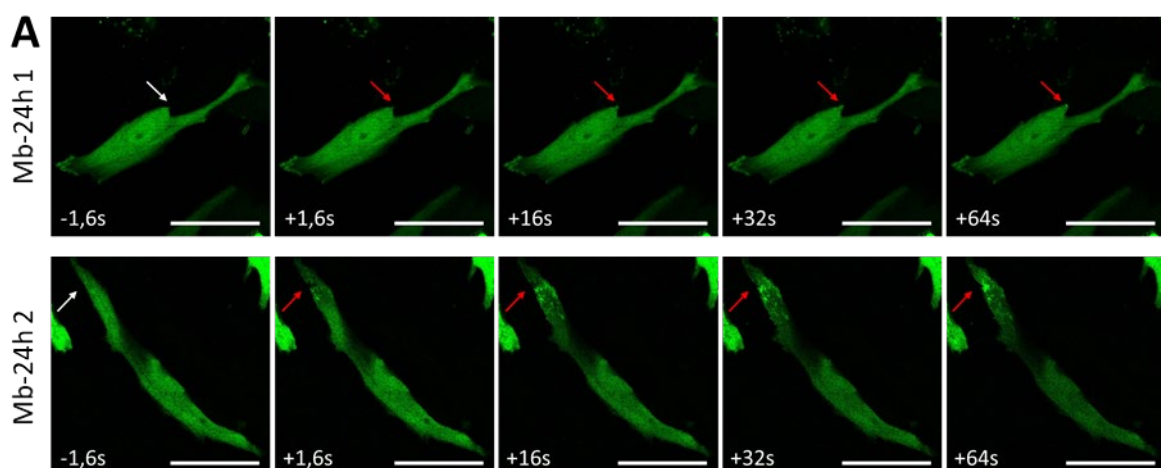
#### 4.4.1.4. Lignées DMD : AB1098 et 6594

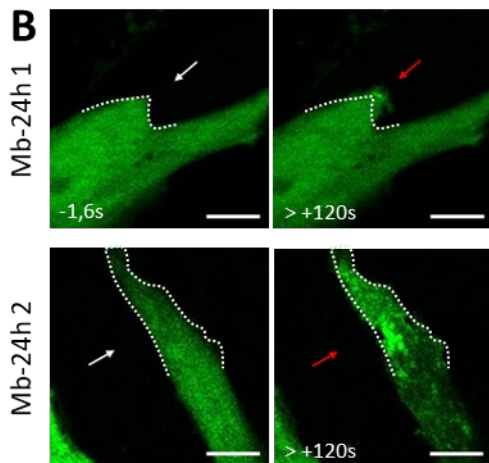
Dans le chapitre précédent (Résultats, partie 3.1.), nous avons démontré que les lignées dystrophinopathiques AB1098 et 6594 présentaient un défaut de réparation membranaire. L'objectif a donc été d'observer si cela induisait un changement dans le trafic des ANX lors d'un dommage membranaire.

A l'instar des lignées saines, nous avons retrouvé chez les lignées déficientes en dystrophine, un recrutement précoce de l'ANXA1-GFP au site de rupture (de +3,2 à +10 secondes), bien que le cluster formé a été d'intensité plus faible (Figure 32, Mb-24h 1). L'analyse de l'évolution de fluorescence au niveau du site de rupture a mis en évidence un recrutement toutefois légèrement retardé et amoindri par rapport aux cellules contrôles (Figure 29). Une baisse graduelle de la fluorescence intracellulaire globale de la cellule irradiée a été observée en parallèle.

Le cluster d'ANXA1-GFP a perduré tout au long de l'observation (+160 secondes) avec une intensité faiblissant à partir de 80 secondes post-irradiation (Figure 29). Le cluster soit restait dans les limites initiales du sarcolemme (Figure 32, Mb-24h 2), soit s'étendait au-delà (Figure 32, Mb-24h 1).

Nous soulignons que des spots indiquant le recrutement d'ANXA1-GFP vésiculaires ont été visualisés dans certains cas où le dommage était plus étendu que prévu (Figure 32, Mb-24h 2). En conclusion, la dynamique de recrutement de l'ANXA1-GFP semble perturbée chez les DMD, avec un retard léger mais notable, mais surtout une quantité d'ANXA1-GFP recrutée visiblement amoindrie.





**Figure 32 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes DMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA1-GFP**

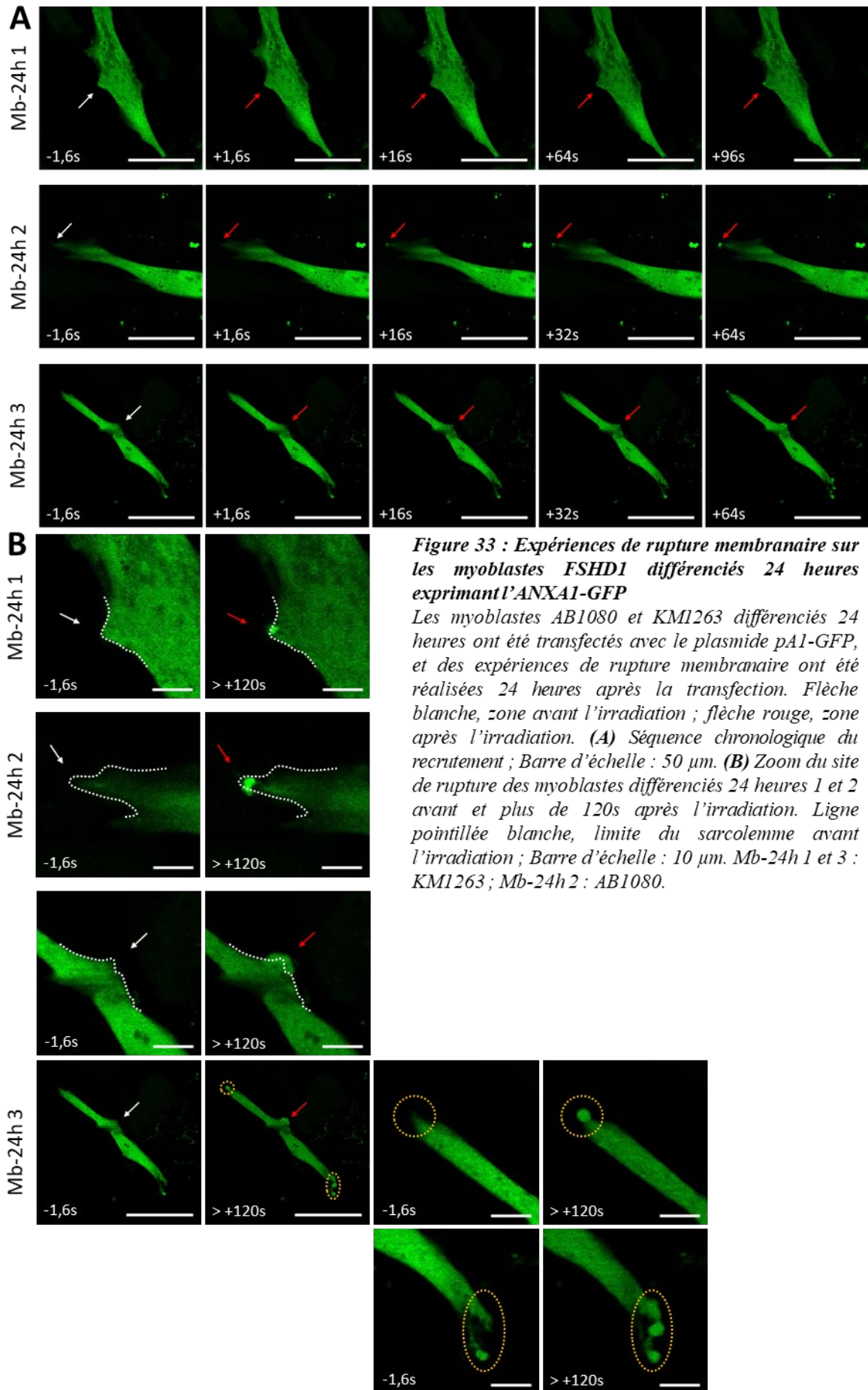
Les myoblastes AB1098 et 6594 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA1-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 6594 ; Mb-24h 2.

#### 4.4.1.5. Lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263

La dynamique de recrutement de l'ANXA1-GFP dans les cellules atteintes d'une mutation responsable de FSHD1 a été semblable à celle ayant cours dans les cellules saines, avec un recrutement quasi-immédiat systématique après irradiation. Ce processus de recrutement a été associé à une diminution notable de la fluorescence intracellulaire globale dans la cellule irradiée. L'accumulation de l'ANXA1-GFP au site de rupture a été visible et a persisté tout au long de la période d'observation (+160 secondes) (Figure 29). L'analyse de l'évolution de la fluorescence au site de rupture démontre en effet que la courbe n'atteint pas un plateau dans les cellules FSHD1, contrairement aux contrôles. Enfin, le cluster soit restait confiné aux limites initiales du sarcolemme, soit s'étendait au-delà (Figure 33, Mb-24h 1 et 2).

De manière particulièrement surprenante, nous avons observé des bourgeonnements que nous avons qualifié de paradoxaux car présents à d'autres endroits que le site d'irradiation laser (Figure 33, Mb-24h 3). Cela pourrait être des blebs caractéristiques de cellules stressées ou apoptotiques. Il a été surprenant de constater un recrutement supérieur d'ANXA1-GFP dans ces structures comparées à la zone irradiée. Ce recrutement suggère une rupture membranaire spontanée, qui pourrait traduire une fragilité accrue du sarcolemme.

En conclusion, au regard de toutes ces observations, le recrutement de l'ANXA1-GFP dans les cellules FSHD1 ne semble pas fondamentalement différer des situations contrôles. En revanche, ces cellules pourraient présenter une fragilité accrue du sarcolemme.



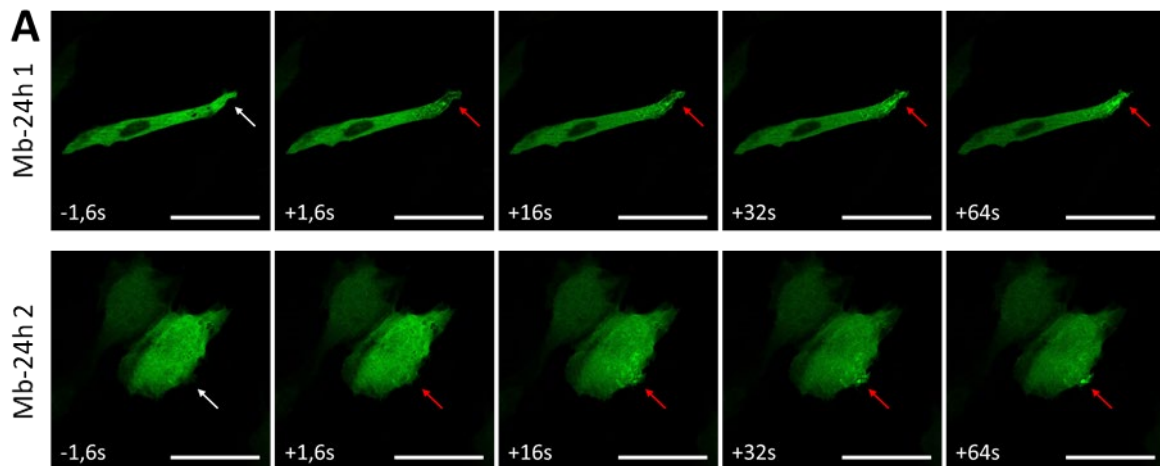
## 4.4.2. ANXA2

### 4.4.2.1. Lignées saines : LHCN et KM1421

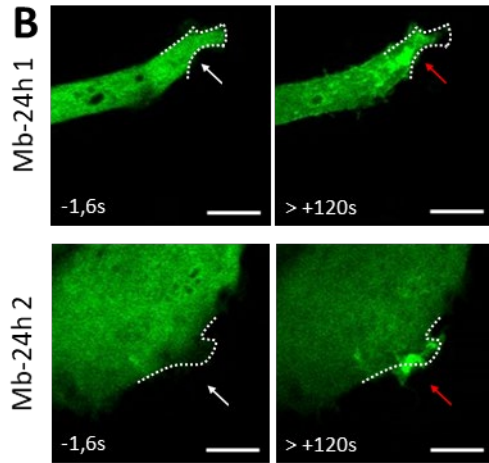
A l'instar de l'ANXA1-GFP, l'ANXA2-GFP a été recrutée au site de rupture quasi-immédiatement après le dommage membranaire (Figure 34, Figure 35). La fluorescence intracellulaire globale de la cellule irradiée baissait à mesure que l'ANXA2-GFP s'accumulait au site de rupture. Le cluster d'ANXA2-GFP formé au site de rupture a persisté au-delà du délai de réparation de la cellule (120 secondes, Figure 34B) et l'analyse de l'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure 35) confirme l'atteinte d'un plateau. Contrairement à l'ANXA1-GFP, ce dernier s'est étendu quasiment toujours au-delà de la limite initiale du sarcolemme (Figure 34, Mb-24h 2). En outre, nous avons eu le sentiment d'une large zone d'accumulation qui s'enfonçait en profondeur dans le cytoplasme (Figure 34, Mb-24h 1).

Comme pour l'ANXA1-GFP, des patchs fluorescents sont apparus au sein de la cellule à mesure que le recrutement se produisait, ce qui est en accord avec l'hypothèse que l'ANXA2 joue un rôle dans le recrutement des vésicules intracellulaires au site de rupture des cellules musculaires squelettiques (Lennon et al., 2003).

En conclusion, nos expériences indiquent que l'ANXA2-GFP se comporte dans les myoblastes différenciés 24h comme dans les myotubes avec un recrutement précoce et durable suggérant la présence d'ANXA2 dans le patch lipidique utilisé pour colmater la rupture (Croissant, 2019).

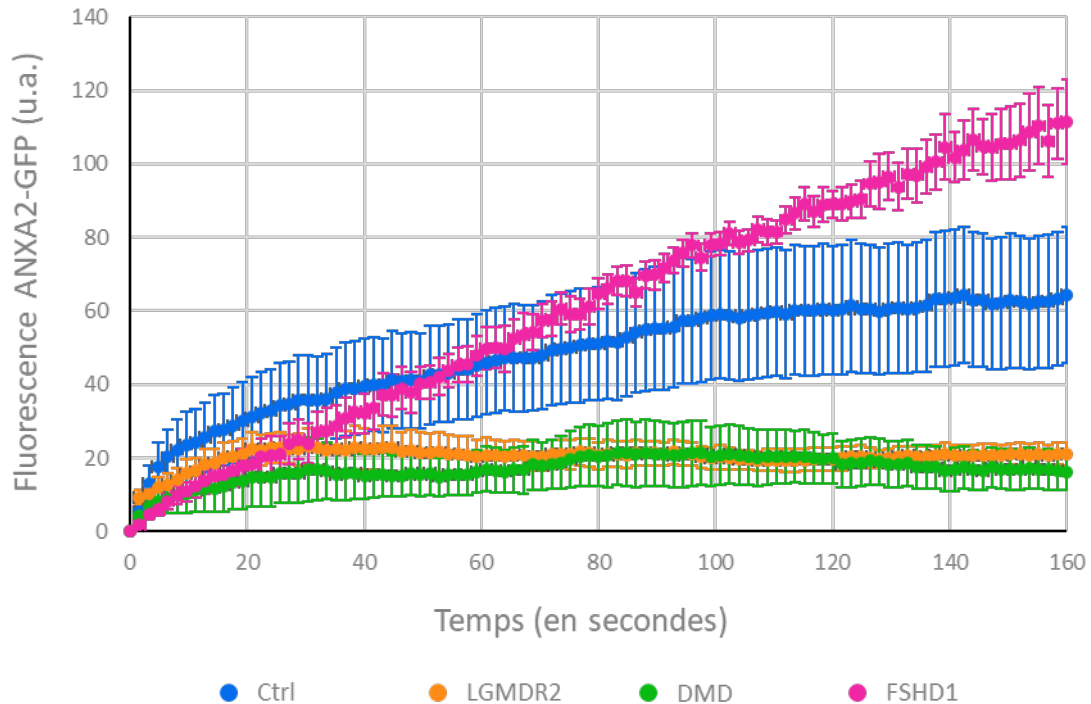






**Figure 34 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes sains différenciés 24 heures exprimant l'ANXA2-GFP**

Les myoblastes LHCN et KM1421 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : LHCN ; Mb-24h 2 : KM1421.



**Figure 35 : Evolution du recrutement de l'ANXA2-GFP au site de rupture**

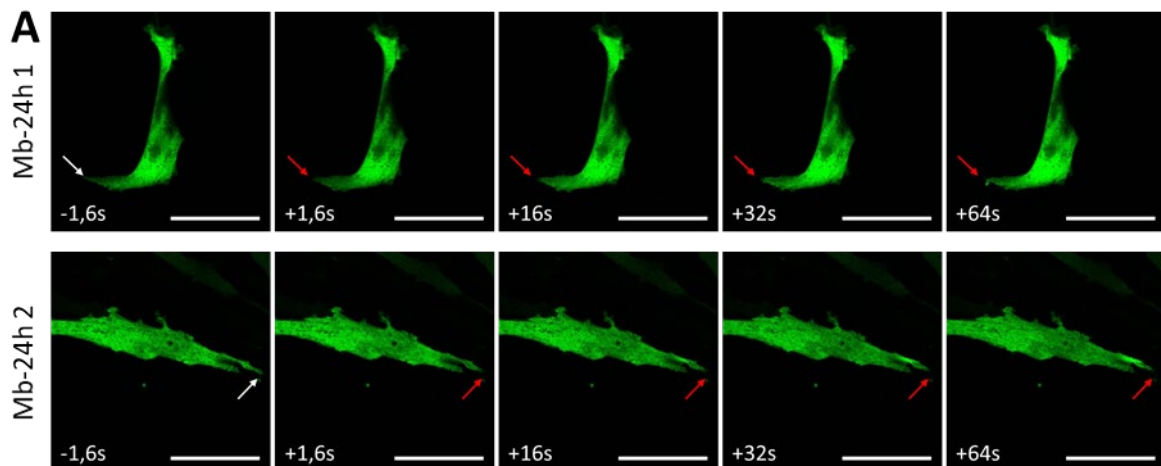
Les séquences acquises lors des expériences d'ablation laser ont été analysées avec ImageJ. Pour minimiser la variabilité due aux paramètres du microscope et à l'efficacité de la transfection, la fluorescence de la première image a été soustraite de chaque image du stack. Une ROI de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre a été positionnée dans le cytoplasme sous le site de rupture, et l'évolution de la fluorescence a été mesurée. Chaque condition a été réalisée une à deux fois (N). Ctrl : LHCN, n = 3 et KM1421, n = 2 avec un total (toutes lignées confondues) de N = 3 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, n = 3 et 107, n = 2 avec un total de N = 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, n = 4 et 6594, n = 2 avec un total de N = 2 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, n = 1 et KM1263, n = 2 avec un total de N = 2.

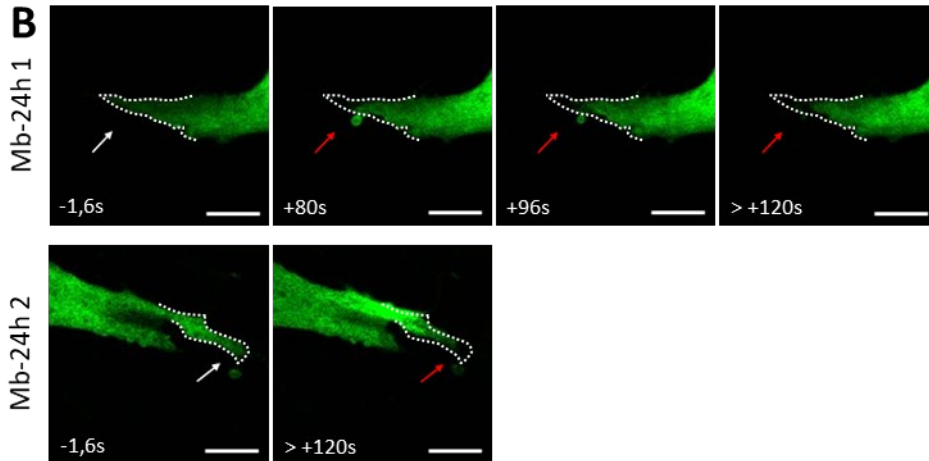
#### 4.4.2.2. Lignées LGMDR2 : 578 et 107

Dans les lignées dysferlinopathiques, l'ANXA2-GFP a été généralement mobilisée immédiatement après le dommage (dès +1,6 secondes) (Figure 36). En revanche, contrairement aux cellules saines, la fluorescence intracellulaire globale de la cellule irradiée demeurait souvent inchangée, suggérant la mobilisation d'une proportion d'ANXA2 au site de rupture (Figure 36A).

Le cluster formé au site de rupture a semblé à nouveau plus large et plus profondément étendu que pour l'ANXA1-GFP. Il a persisté souvent au-delà de 80-90 secondes, bien que son intensité a décliné régulièrement à partir de 50 à 85 secondes post-irradiation (Figure 36, Mb-24h 1). Dans certains cas, le cluster se résorbait totalement. Cela a été confirmé par l'analyse de l'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure 35)

Cette durée de persistance du cluster, qui était amoindrie dans le cas des cellules dysferlinopathiques, pourrait s'expliquer par l'expression réduite voire nulle en dysferline qui empêcherait alors l'accrochage du patch lipidique (riche en ANXA2) à la membrane endommagée et sa fuite dans le milieu extracellulaire.





**Figure 36 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes LGMDR2 différenciés 24 heures exprimant l'ANXA2-GFP**

Les myoblastes 578 et 107 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 107 ; Mb-24h 2 : 578.

#### 4.4.2.3. Lignées DMD : AB1098 et 6594

Le recrutement de l'ANXA2-GFP a commencé généralement immédiatement après la lésion (Figure 37, + 1,6 secondes). Ce recrutement a été accompagné d'une diminution globale de la fluorescence dans la cellule affectée.

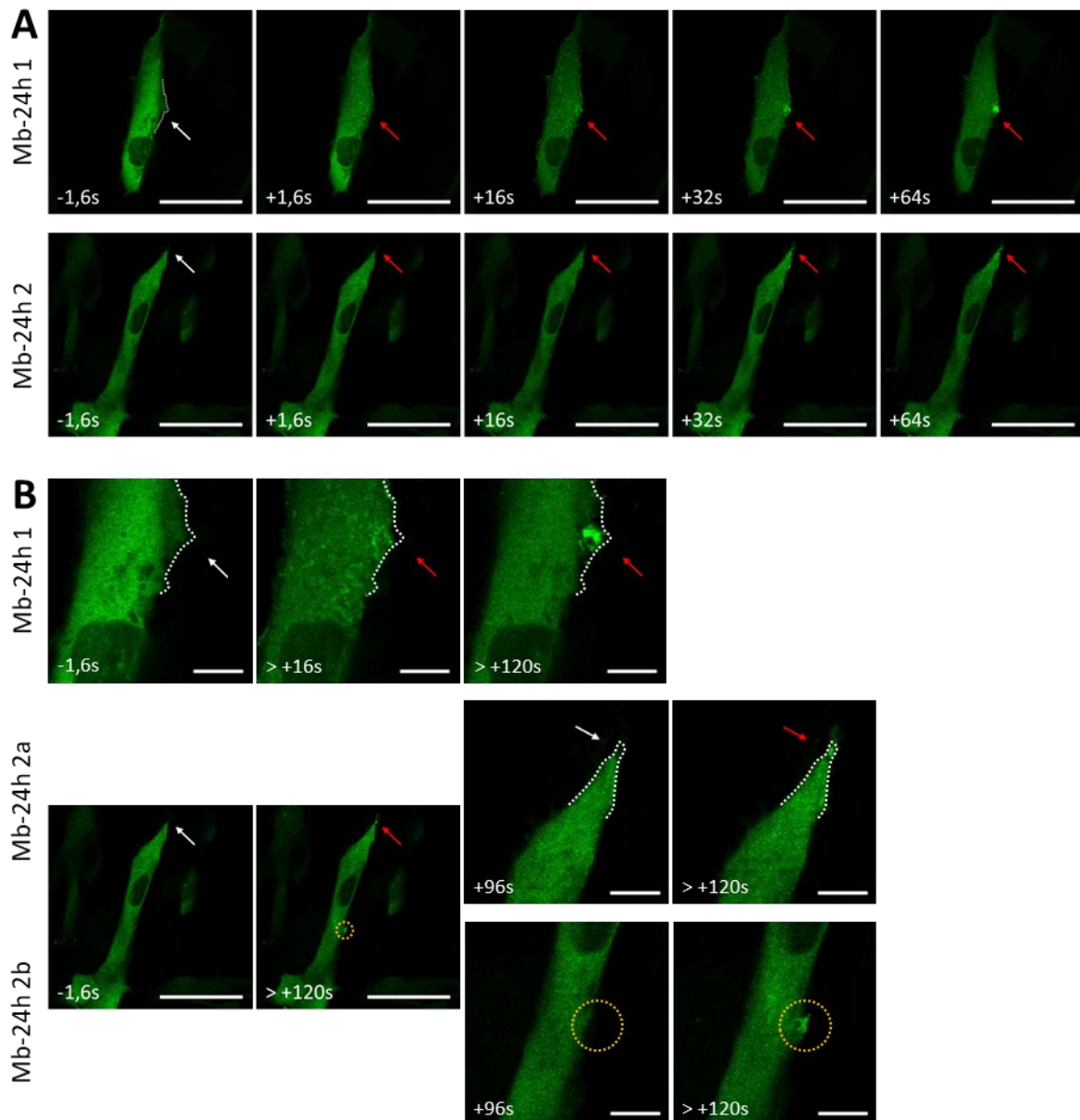
Concernant les caractéristiques du cluster, celui-ci a été souvent plus large et plus profondément ancré dans le cytoplasme comparé à celui formé par l'ANXA1-GFP, comme dans les cellules saines. En outre, on constate que ce dernier présente une intensité de fluorescence trois fois plus faible que dans les cellules contrôles, indiquant une présence moindre d'ANXA2-GFP (Figure 35) au site de rupture dans les cellules DMD.

Comme observé dans les lignées FSHD1 pour l'ANXA1-GFP, nous avons également noté la formation paradoxale de clusters à d'autres endroits que le site irradié (Figure 37, Mb-24h 2b). Le recrutement de l'ANXA2-GFP laisse penser que la membrane s'est spontanément rompue, suggérant une fragilité accrue du sarcolemme. Cela concorde avec le fait que les cellules déficientes en dystrophine sont beaucoup plus fragiles, la connexion mécanique entre le cytosquelette d'actine et la membrane, normalement assurée par cette protéine étant rompue.

Parfois, nous avons détecté la fluorescence d'ANXA2-GFP associée à des vésicules au début du processus de recrutement (Figure 37, Mb-24h 1).



Comparées à la situation contrôle, nos observations du trafic de l'ANXA2-GFP dans les DMD ne nous permettent pas de conclure sur une altération chronologique mais seulement quantitative. Le recrutement est précoce et l'interaction avec la membrane endommagée ainsi que celle avec les vésicules extracellulaires semblent effectives. L'absence de dystrophine ne semble donc pas perturber le trafic d'ANXA2-GFP. En revanche, le sarcolemme semble plus fragile avec l'apparition de ruptures spontanées consécutives à l'ablation laser.



**Figure 37 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes DMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA2-GFP**

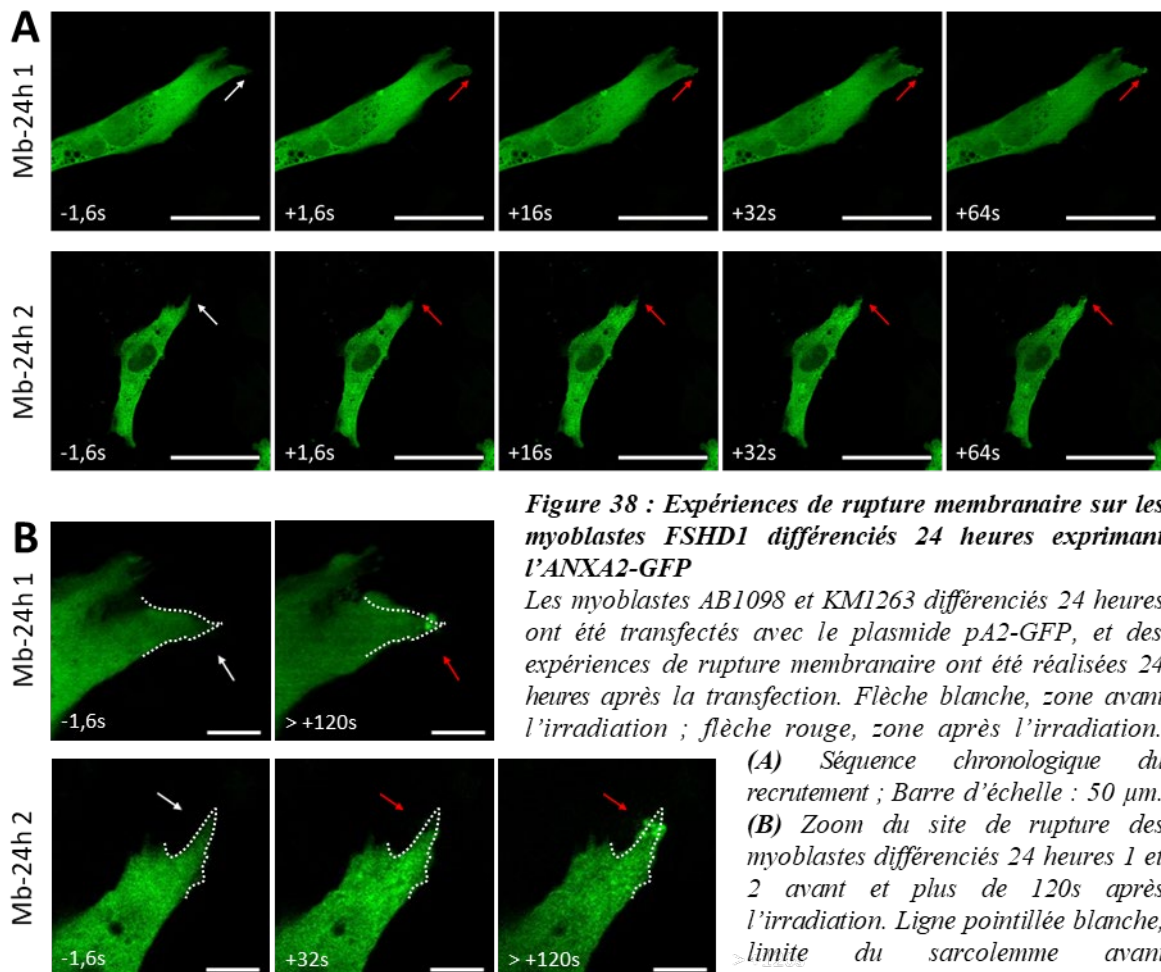
Les myoblastes AB1098 et 6594 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50 μm. (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2a et de la zone paradoxale 2b avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Cercle jaune : cluster paradoxal ; Barre d'échelle : 50 μm sans zoom et 10 μm avec zoom. Mb-24h 1 : AB1098 ; Mb-24h 2 : 6594.

#### 4.4.2.4. Lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263

La cinétique de recrutement de l'ANXA2-GFP dans les cellules atteintes d'une mutation responsable de FSHD1 est retardée par rapport à celle des cellules contrôles, comme on peut l'observer avec un décalage à gauche de la courbe d'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure 38A, Figure 35). Ce processus a été accompagné d'une réduction de la fluorescence intracellulaire globale dans la cellule irradiée. Le regroupement de l'ANXA2-GFP au site de rupture a été localisé, a persisté et s'est intensifié durant toute la période d'observation (Figure 38B, +160 secondes, Figure 35). À l'instar des lignées contrôles, le cluster a dépassé systématiquement les limites initiales du sarcolemme et l'absence d'ANXA2-GFP à sa base n'a jamais été constatée (Figure 38, Mb-24h 1 et 2).

Nous avons pu observer la présence de spots fluorescents (Figure 38, Mb-24h 2), indiquant le recrutement de vésicules par l'ANXA2.

En conclusion, les observations dans la lignée FSHD1 ressemblent à celles de la lignée contrôle. Nous ne notons pas de différence particulière.



**Figure 38 : Experiences de rupture membranaire sur les myoblastes FSHD1 différenciés 24 heures exprimant l'ANXA2-GFP**

Les myoblastes AB1098 et KM1263 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA2-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation.

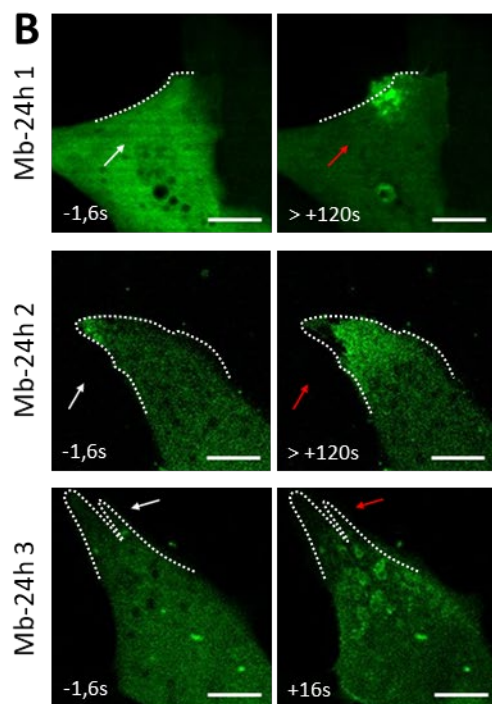
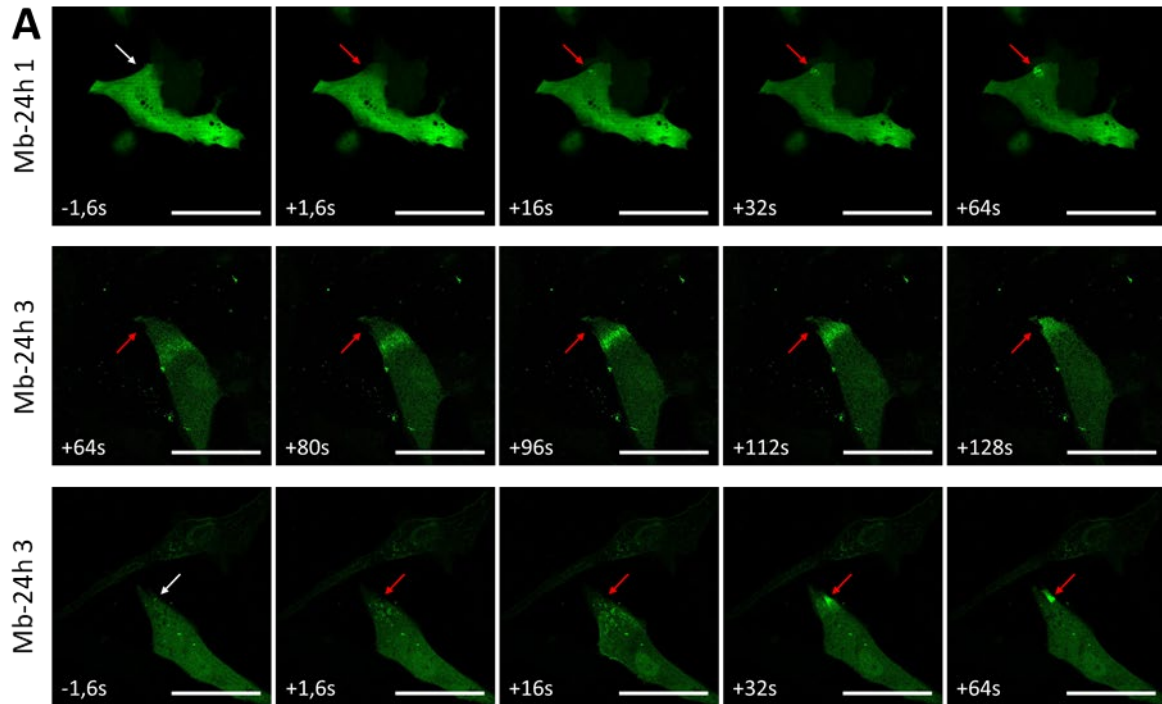
(A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. Mb-24h 1 AB1080 ; Mb-24h 2 : KM1263.

### **4.4.3. ANXA4**

#### **4.4.3.1. Lignées saines : LHCN et KM1421**

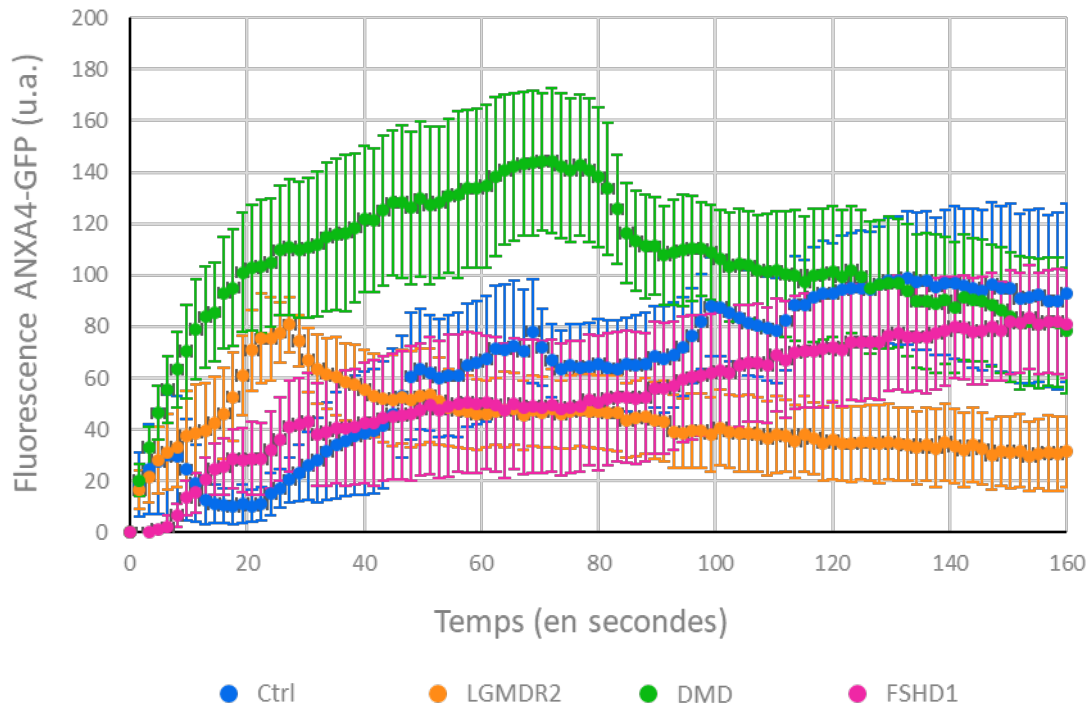
Dans le cas de l'ANXA4, la cinétique de recrutement a été beaucoup plus variable. Tantôt le recrutement a débuté précocement après le dommage (Figure 39, Mb- 24h 1 et 3), tantôt plus tardivement (+45 secondes) (Figure 39, Mb-24h 2). L'allure de la courbe d'analyse de l'évolution de fluorescence au site de rupture est représentative de cette variabilité (Figure 40). Une perte de fluorescence générale de la cellule irradiée a été généralement observée au cours du recrutement. Souvent le recrutement se réalisait sous forme de vague en débutant par l'apparition de spots fluorescents se mouvant vers le site de rupture (Figure 39, Mb-24h 2 et 3), comme rapporté dans les myotubes (Croissant et al. 2022). Indépendamment du processus de recrutement, un cluster d'ANXA4 a perduré tout le long de l'observation, en se localisant soit dans les limites initiales du sarcolemme (Figure 39, Mb-24h 2 et 3), soit au-delà (Figure 39, Mb-24h 1).

En conclusion, nos données vont dans le sens des résultats obtenus précédemment dans les myotubes, confirmant la pertinence de travailler sur des myoblastes différenciés 24h (Croissant et al., 2022). On note néanmoins que dans les myoblastes différenciés 24 heures, le recrutement de l'ANXA4-GFP « sans vague » peut se produire, ce qui n'avait pas été observé dans les myotubes. Encore maintenant, nous ne savons pas quel mécanisme entraîne le recrutement de l'ANXA4 au site de rupture. Coralie Croissant et collaborateurs avaient proposé que l'ANXA4 se propageait le long du feuillet interne du sarcolemme jusqu'au site de rupture pour induire un remodelage de la membrane et favoriser la réparation de cette dernière (Croissant et al., 2022).



**Figure 39 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes sains différenciés 24 heures exprimant l'ANXA4-GFP**

Les myoblastes LHCN et KM1421 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA4-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1, 2 et 3 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : KM1421 ; Mb-24h 2 et 3 : LHCN.



**Figure 40 : Evolution du recrutement de l'ANXA4-GFP au site de rupture**

Les séquences acquises lors des expériences d'ablation laser ont été analysées avec ImageJ. Pour minimiser la variabilité due aux paramètres du microscope et à l'efficacité de la transfection, la fluorescence de la première image a été soustraite de chaque image du stack. Une ROI de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre a été positionnée dans le cytoplasme sous le site de rupture, et l'évolution de la fluorescence a été mesurée. Chaque condition a été réalisée une à deux fois (N). Ctrl : LHCN, n = 4 et KM1421, n = 3 avec un total (toutes lignées confondues) de N = 3 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, n = 2 et 107, n = 3 avec un total de N = 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, n = 1 et 6594, n = 2 avec un total de N = 2 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, n = 1 et KM1263, n = 3 avec un total de N = 2.

#### 4.4.3.2. Lignées LGMDR2 : 578 et 107

Dans le cadre de la dynamique de l'ANXA4 chez les lignées dysferlinopathiques, nous avons observé à nouveau une initiation précoce du recrutement (Figure 41, de +1,6 à +15 secondes). Contrairement aux cellules saines, une diminution globale de la fluorescence intracellulaire a rarement été observée, suggérant un recrutement plus faible d'ANXA4.

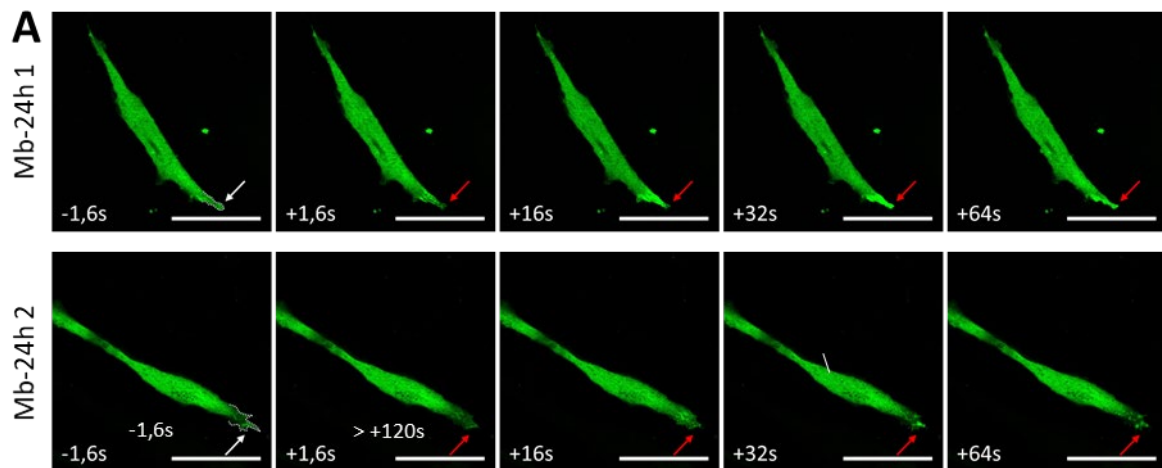
Le recrutement sous forme de vague a été observé de façon majoritaire, avec l'apparition préalable de petits spots avant le mouvement de la vague.

Le cluster demeurait exclusivement confiné aux limites initiales du sarcolemme (Figure 41, Mb-24h 1 et 2). Étonnamment, il n'a pas toujours été uni et s'est présenté parfois sous la forme de multiples petits clusters. Nous avons également observé que certains clusters initialement uniques se fragmentaient au cours du temps, avec une perte d'intensité des fragments (Figure 41B, Mb-24h 2a) qui se répercutait sur l'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure

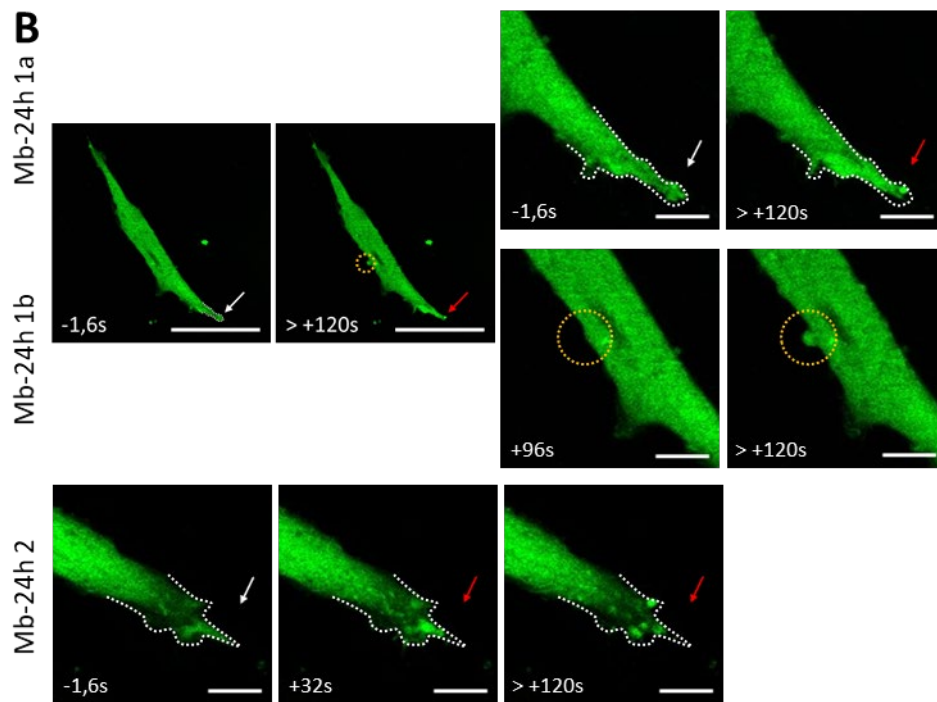
40). Ce résultat est probablement lié à l'absence de réparation membranaire dans ces cellules et la déchirure du sarcolemme.

A l'instar de l'ANXA1-GFP pour les lignées FSHD1 et de l'ANXA2-GFP pour les lignées DMD, nous avons noté la présence de bourgeonnements paradoxaux (Figure 41, Mb-24h 1b). Le recrutement de l'ANXA4-GFP dans ces excroissances suppose une rupture spontanée et suggère de ce fait une fragilité accrue du sarcolemme.

En conclusion, si le trafic de l'ANXA4-GFP chez les lignées dysferlinopathiques est similaire aux lignées contrôles, une plus faible quantité d'ANXA4 semble perdurée au site de rupture. L'absence de dysferline pourrait expliquer ce recrutement plus faible.





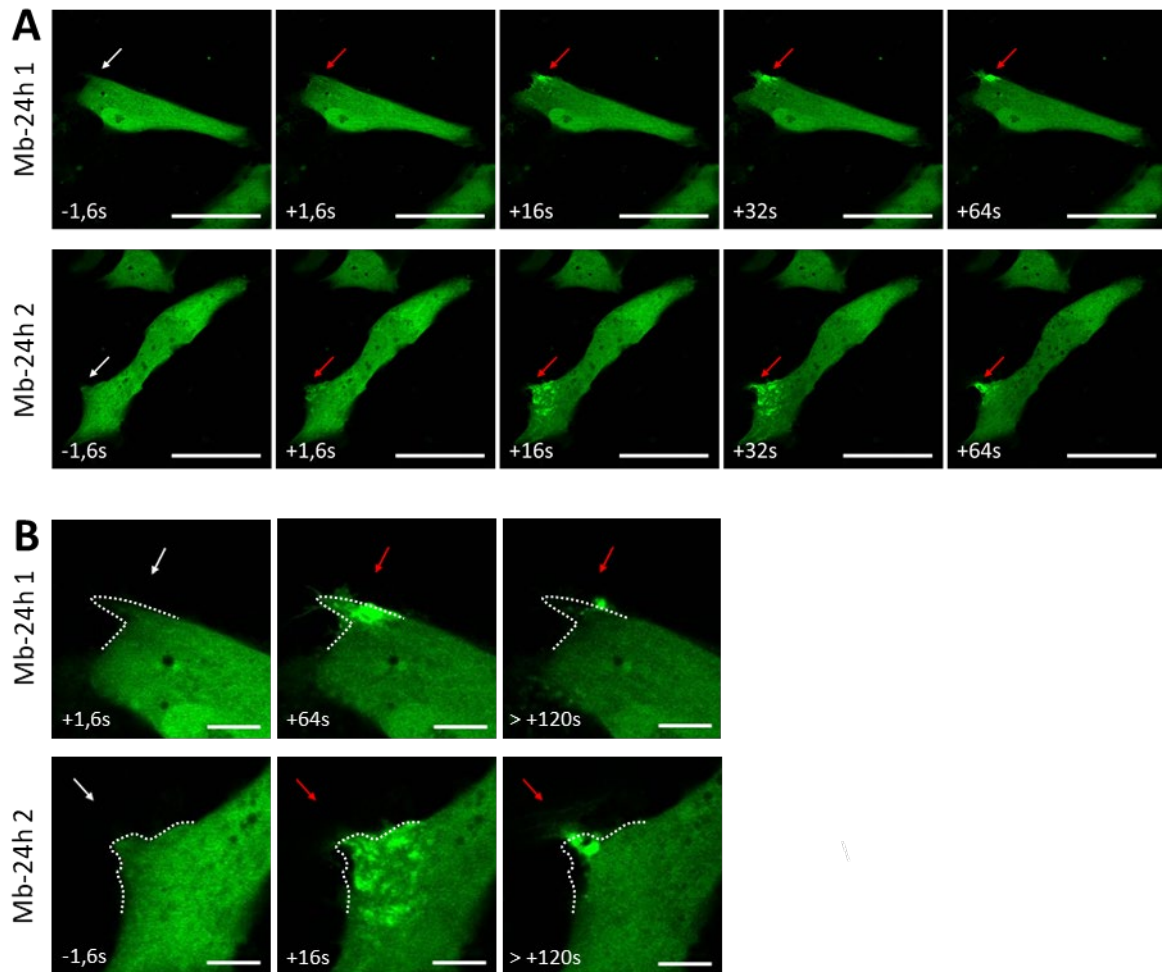


**Figure 41 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes LGMDR2 différenciés 24 heures exprimant l'ANXA4-GFP**

Les myoblastes 578 et 107 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA4-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 578 ; Mb-24h 2 : 107.

#### 4.4.3.3. Lignées DMD : AB1098 et 6594

Dans le cadre des lignées dystrophinopathiques, le recrutement s'est manifesté le plus souvent par une accumulation de fluorescence au site de rupture sous forme de vague (Figure 42). Nous avons d'abord observé l'apparition de spots fluorescents quelques secondes après le dommage, puis un mouvement de recrutement au site de rupture intense (Figure 42, Mb-24h 1 et 2, Figure 40). Une diminution de la fluorescence intracellulaire de la cellule irradiée a accompagné systématiquement le recrutement.



**Figure 42 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes DMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA4-GFP**

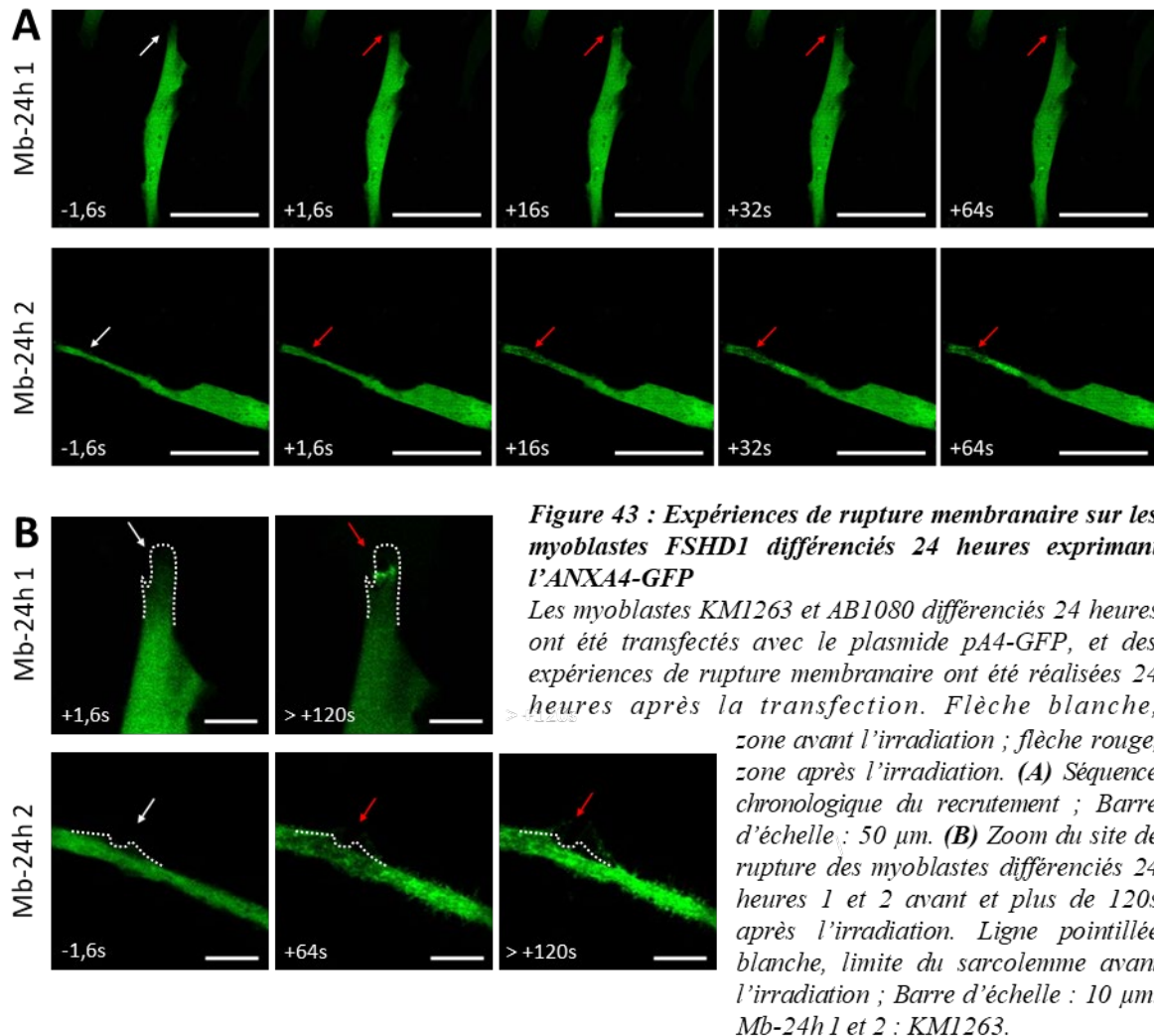
Les myoblastes AB1098 et 6594 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA4-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 6594 et Mb-24h 2 : AB1098.

Nous avons noté la présence de bourgeonnements paradoxaux avec accumulation de l'ANXA4-GFP (non montré), ce qui laisse supposer une rupture spontanée de la membrane et une fragilité accrue du sarcolemme.

En conclusion, nos résultats chez les lignées dystrophinopathiques ne semblent pas différer de ce qui se déroule dans les lignées contrôles, hormis pour ce qui est de la quantité d'ANXA4-GFP recrutée, bien supérieure. L'absence de dystrophine ne semble donc pas perturber le recrutement de l'ANXA4-GFP au site de rupture.



#### 4.4.3.4. Lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263

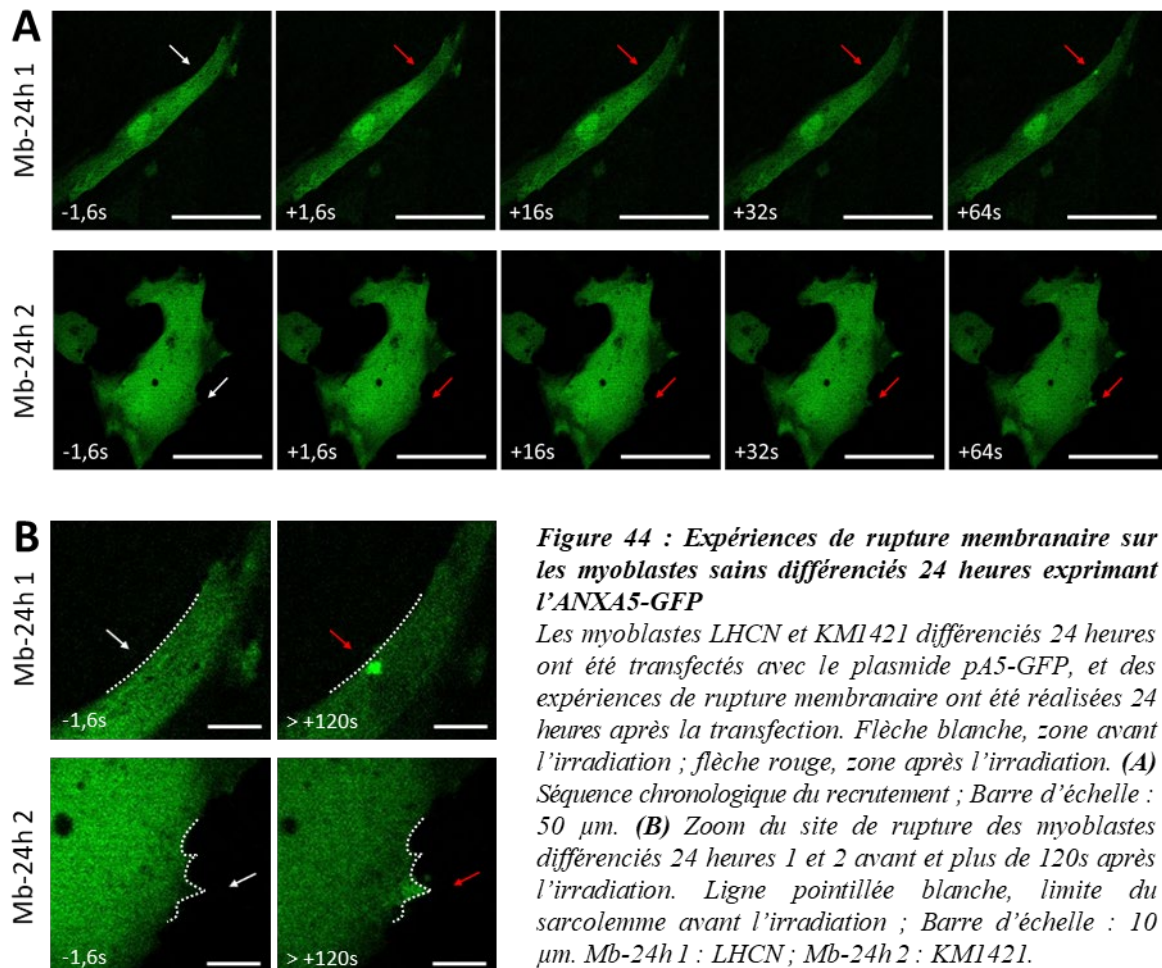


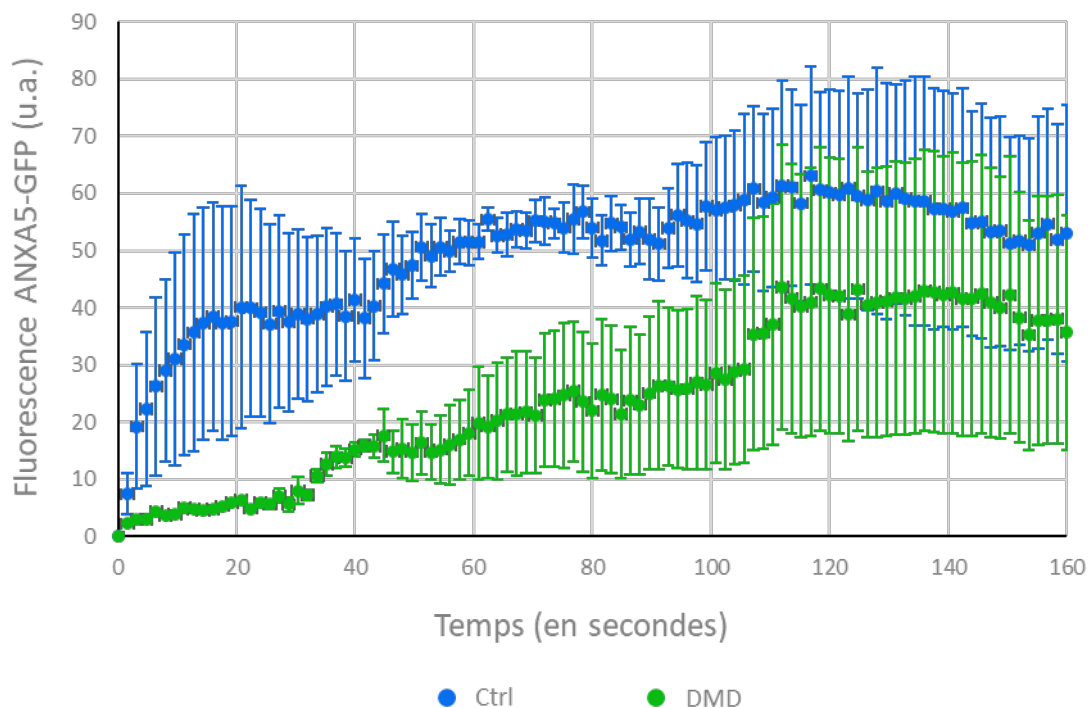
Pour les lignées FSHD1, le recrutement s'est présenté systématiquement sous la forme d'une vague (Figure 43, Mb-24h 1 et 2). Nous avons observé généralement en premier lieu l'apparition de spots fluorescents quelques secondes après l'irradiation suivie d'un mouvement de recrutement vers le site de rupture (Figure 43, Mb-24h 1 et 2). Le mouvement de vague s'est soldé systématiquement par la formation d'un cluster au site de rupture qui a perduré jusqu'à la fin de l'observation comme en témoigne la courbe de l'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure 40). En conclusion, nous ne notons pas de différence fondamentale par rapport aux situations contrôles.

#### 4.4.4. ANXA5

##### 4.4.4.1. Lignées saines : LHCN et KM1421

Concernant l'ANXA5-GFP, son recrutement était visiblement tardivement dans la majorité des expériences avec une accumulation localisée au site de rupture plusieurs dizaines de secondes post-irradiation (Figure 44A). L'analyse de la courbe de l'évolution de fluorescence au site de rupture indique toutefois que cette accumulation débute dès les premières secondes (Figure 45). Cette accumulation a été, comme pour les ANX recombinantes précédentes, accompagnée d'une baisse générale de la fluorescence intracellulaire de la cellule endommagée. Le cluster formé a persisté tout le long de l'observation (160 secondes, Figure 44A, Figure 45). Mes expériences, réalisées chez les myoblastes différenciés 24 heures, sont en accord avec les résultats précédemment publiés par l'équipe chez les myotubes (Carneille et al., 2016).





**Figure 45 : Evolution du recrutement de l'ANXA5-GFP au site de rupture**

Les séquences acquises lors des expériences d'ablation laser ont été analysées avec ImageJ. Pour minimiser la variabilité due aux paramètres du microscope et à l'efficacité de la transfection, la fluorescence de la première image a été soustraite de chaque image du stack. Une ROI de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre a été positionnée dans le cytoplasme sous le site de rupture, et l'évolution de la fluorescence a été mesurée. Chaque condition a été réalisée une à deux fois (N). Ctrl : LHCN, n = 2 et KM1421, n = 2 avec un total (toutes lignées confondues) de N = 3 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, n = 2 et 6594, n = 0 avec un total de N = 2.

#### 4.4.4.2. Lignées LGMDR2 : 578 et 107

Etonnamment, les transfections de plasmide se sont soldées par des échecs dans ces deux lignées et aucun résultat n'a pu être obtenu.

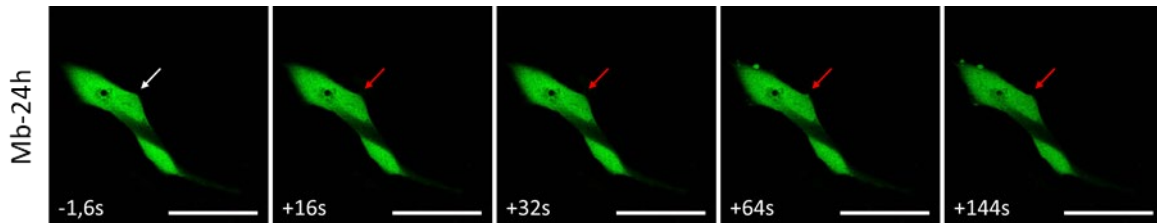
#### 4.4.4.3. Lignées DMD : AB1098 et 6594

Contrairement aux lignées saines, le recrutement de l'ANXA5 a débuté tardivement avec une accumulation localisée au site de rupture environ 30 secondes post-irradiation (Figure 46). Le décalage vers la droite de la courbe d'évolution de fluorescence est représentatif de ce retard (Figure 45). Cette accumulation a été accompagnée d'une légère baisse de la fluorescence intracellulaire de la cellule endommagée. Le cluster formé s'est résorbé au bout de 120 secondes post-irradiation (Figure 46) ou a persisté tout le long de l'observation (160 secondes).

Le plus souvent, l'ablation laser a conduit à la formation de dommages paradoxaux, suggérant des ruptures spontanées du sarcolemme, liées à la fragilité exacerbée de ce dernier (Figure 46).

Ces événements ont déjà été observés dans ces lignées pour l'étude du trafic de l'ANXA2 et A4. Ce qui a été surprenant, c'est le recrutement d'ANXA5-GFP dans ces structures, supérieur à la zone irradiée.

En conclusion, mes résultats ne mettent pas en évidence une altération du comportement de cette ANX dans les cellules dystrophinopathiques.



**Figure 46 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes DMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA5-GFP**

Les myoblastes AB1098 et 6594 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA5-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection quand cela était possible. Séquence chronologique du recrutement ; Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation ; Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. Mb-24h : AB1098.

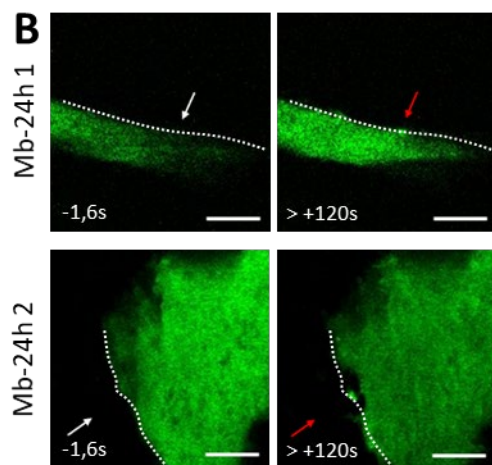
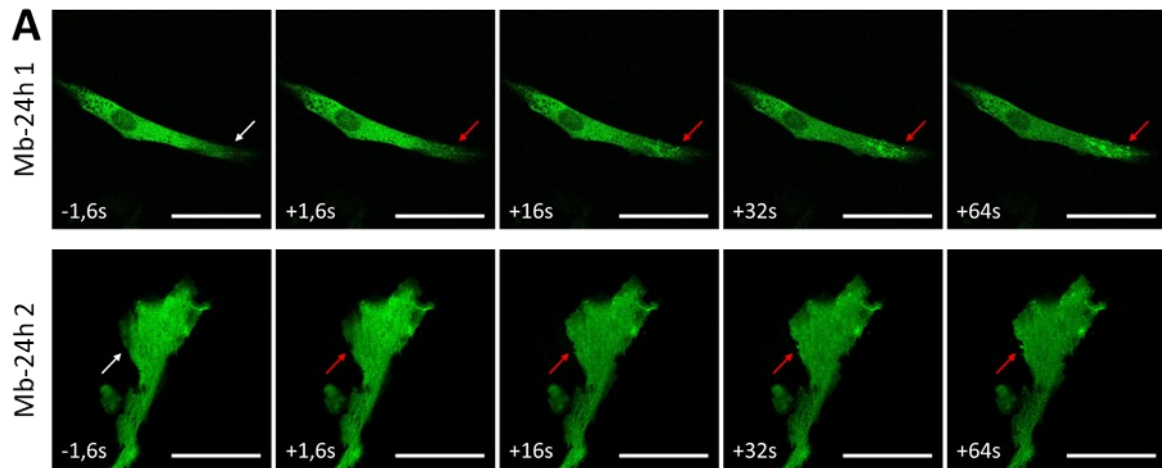
#### 4.4.4.4. Lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263

Comme les lignées LGMDR2, les cellules des lignées AB1080 et KM1263 transfectées par le plasmide pA5-GFP n'ont jamais survécu et n'ont pu être analysées.

#### 4.4.5. ANXA6

##### 4.4.5.1. Lignées saines : LHCN et KM1421

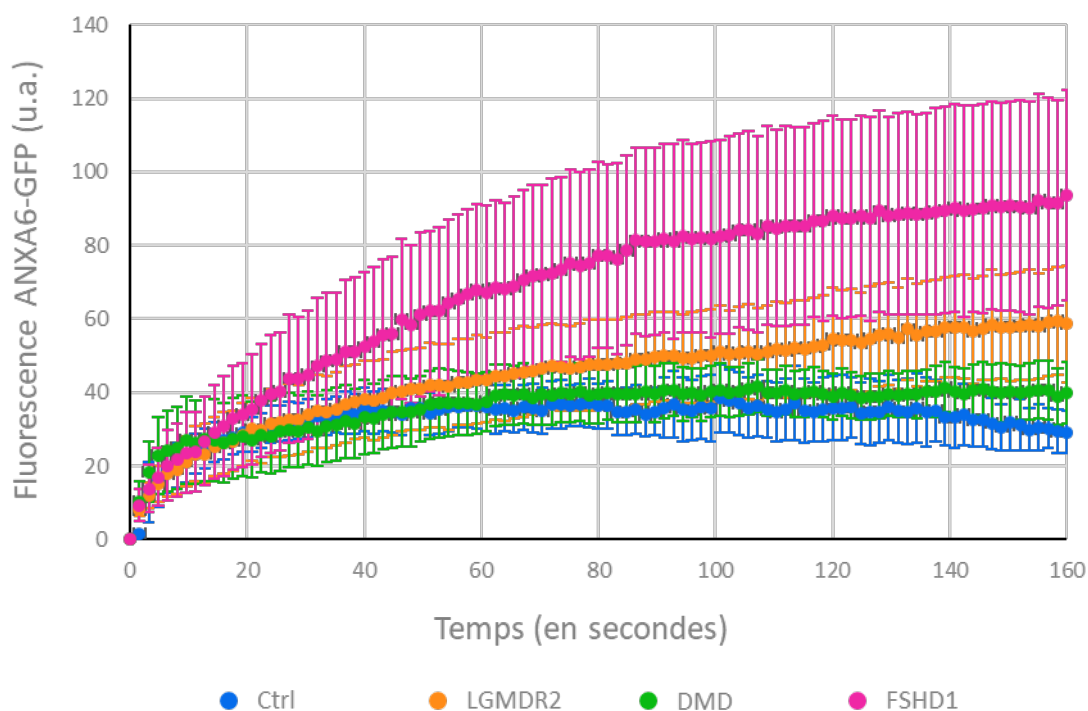
Nos expériences ont montré que l'ANXA6-GFP a été recrutée au site de rupture immédiatement après la lésion membranaire dans les cellules différenciées 24h (Figure 47, Figure 48), comme précédemment observé dans les myotubes (Croissant et al., 2020). L'observation de petits spots fluorescents dans le cytoplasme a suggéré également son association à des vésicules intracellulaires. Le recrutement de l'ANXA6-GFP a été localisé majoritairement au sarcolemme et a été accompagné rarement d'une baisse générale de la fluorescence de la cellule irradiée (Figure 47), suggérant qu'une faible proportion de molécules d'ANXA6 a été utilisée, avec une zone d'action qui s'est limitée au sarcolemme, comme proposé précédemment (Croissant et al., 2020). L'ANXA6-GFP a fini par se concentrer en un cluster qui ne s'est pas systématiquement étendu au-delà des limites initiales du sarcolemme. Ce cluster a persisté tout le long de l'expérience, comme en témoigne l'atteinte d'un plateau par la courbe de l'évolution de la fluorescence au site de rupture (Figure 47B, > +120s, Figure 48).



**Figure 47 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes sains différenciés 24 heures exprimant l'ANXA6-GFP**

Les myoblastes LHCN et KM1421 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA6-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : LHCN ; Mb-24h 2 : KM1421.





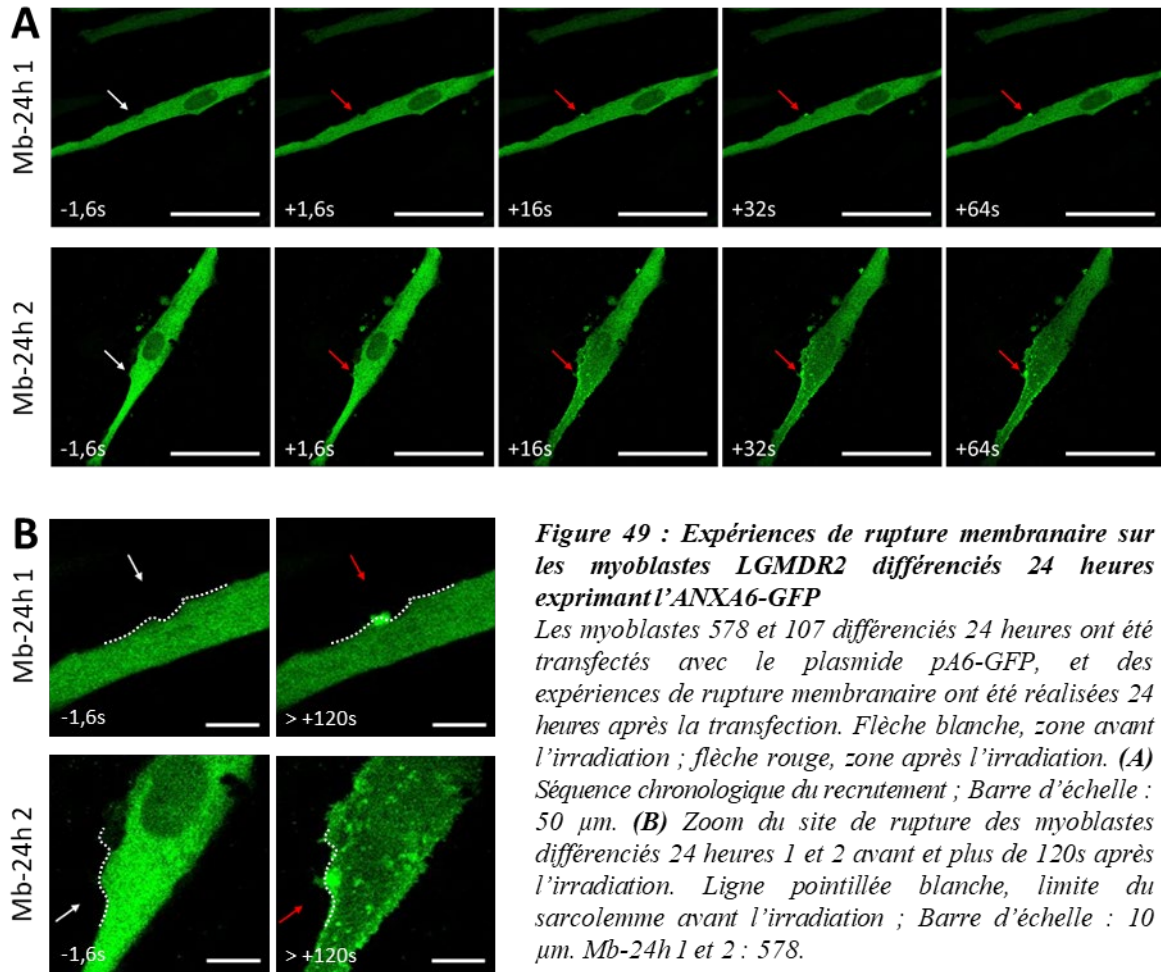
**Figure 48 : Evolution du recrutement de l'ANXA6-GFP au site de rupture**

Les séquences acquises lors des expériences d'ablation laser ont été analysées avec ImageJ. Pour minimiser la variabilité due aux paramètres du microscope et à l'efficacité de la transfection, la fluorescence de la première image a été soustraite de chaque image du stack. Une ROI de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre a été positionnée dans le cytoplasme sous le site de rupture, et l'évolution de la fluorescence a été mesurée. Chaque condition a été réalisée une à deux fois (N). Ctrl : LHCN, n = 2 et KM1421, n = 2 avec un total (toutes lignées confondues) de N = 3 ; LGMDR2 : dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : 578, n = 3 et 107, n = 3 avec un total de N = 2 ; DMD : dystrophie musculaire de Duchenne : AB1098, n = 5 et 6594, n = 2 avec un total de N = 4 ; FSHD1 : dystrophie facio-scapulo-humérale 1 : AB1080, n = 1 et KM1263, n = 6 avec un total de N = 4.

#### 4.4.5.2. Lignées LGMDR2 : 578 et 107

Chez les lignées dysferlinopathiques, le recrutement de l'ANXA6-GFP à la membrane endommagée a été immédiat après la formation du dommage (Figure 49). Comme pour la lignée saine, nous avons constaté que l'ANXA6-GFP a été à la fois associée au sarcolemme et aux vésicules intracellulaires (Figure 49, Mb-24h 2). Le recrutement pouvait s'accompagner d'une baisse générale de fluorescence (Figure 49, Mb-24h 2), suggérant l'implication d'un grand nombre de molécules d'ANXA6. Ces observations peuvent signifier un recrutement massif et continu d'ANXA6 au site de rupture qui n'est pas réparé. Les données quantitatives fournies par l'analyse de l'évolution de la fluorescence au site de rupture confirment la formation d'un cluster dont la fluorescence est deux fois supérieure à celle des contrôles à la fin de l'observation (Figure 48, +160s).

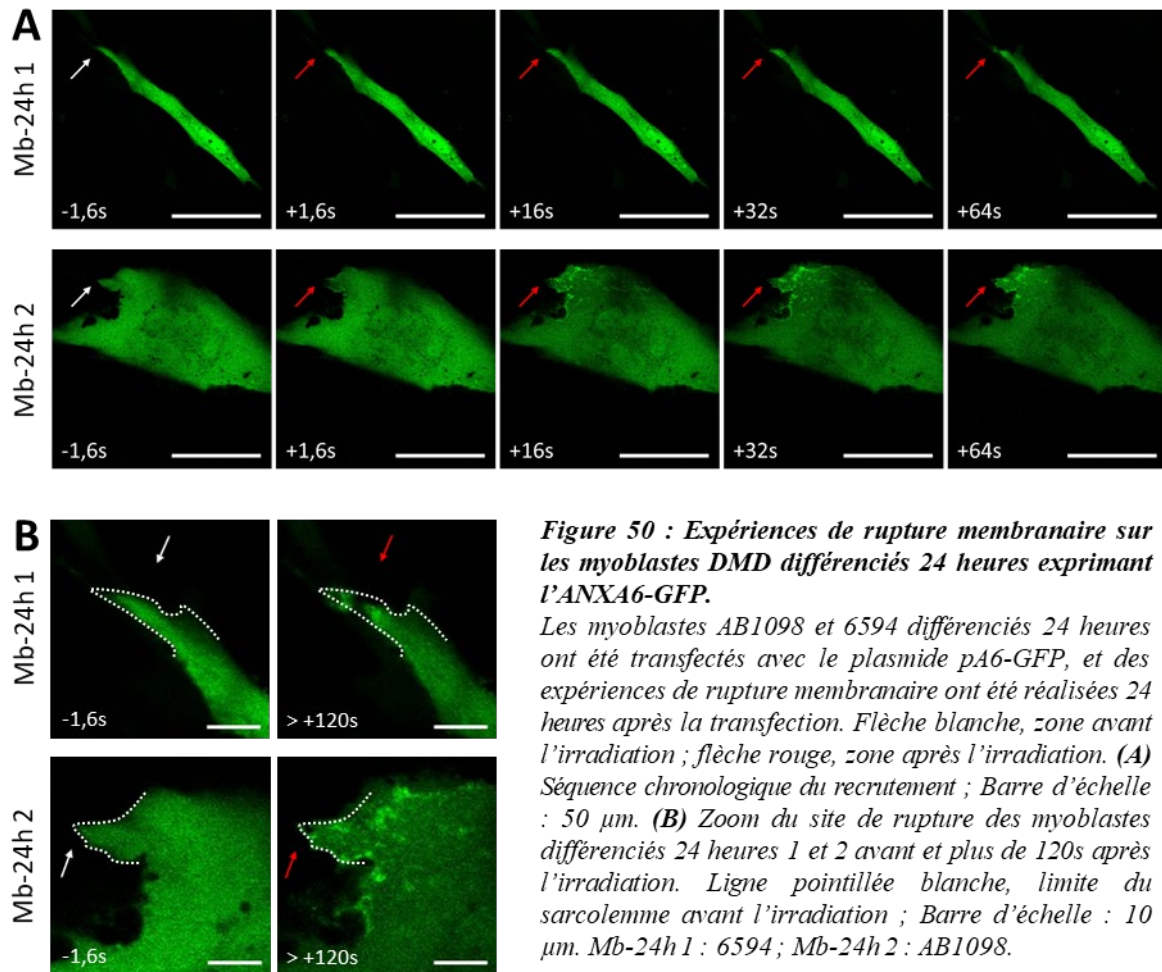
Nous concluons que le recrutement de l'ANXA6-GFP chez les myoblastes dysferlinopathiques est effectif mais diffère quantitativement de celui observé chez les lignées saines.



#### 4.4.5.3. Lignées DMD : AB1098 et 6594

Dans les lignées dystrophinopathiques, le recrutement de l'ANXA6-GFP vers la membrane endommagée s'est opéré immédiatement après la survenue de la lésion (Figure 50, Mb-24h 1, Figure 48). Au contraire des lignées saines, l'ANXA6-GFP s'est localisée majoritairement au niveau cytoplasmique, probablement sur des vésicules intracellulaires, et très peu au niveau du sarcolemme (Figure 50, Mb-24h 2).

En conclusion, le recrutement de l'ANXA6-GFP dans les myoblastes dystrophinopathiques semble perturbé, avec des difficultés à se concentrer au site de rupture. Il faut garder en mémoire que ces cellules souffrent d'un défaut de réparation membranaire, qui peut s'accompagner par une déchirure du sarcolemme expliquant cette dispersion du marquage de l'ANXA6.



**Figure 50 : Expériences de rupture membranaire sur les myoblastes DMD différenciés 24 heures exprimant l'ANXA6-GFP.**

Les myoblastes AB1098 et 6594 différenciés 24 heures ont été transfectés avec le plasmide pA6-GFP, et des expériences de rupture membranaire ont été réalisées 24 heures après la transfection. Flèche blanche, zone avant l'irradiation ; flèche rouge, zone après l'irradiation. (A) Séquence chronologique du recrutement ; Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . (B) Zoom du site de rupture des myoblastes différenciés 24 heures 1 et 2 avant et plus de 120s après l'irradiation. Ligne pointillée blanche, limite du sarcolemme avant l'irradiation ; Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Mb-24h 1 : 6594 ; Mb-24h 2 : AB1098.

#### 4.4.5.4. Lignées FSHD1 : AB1080 et KM1263

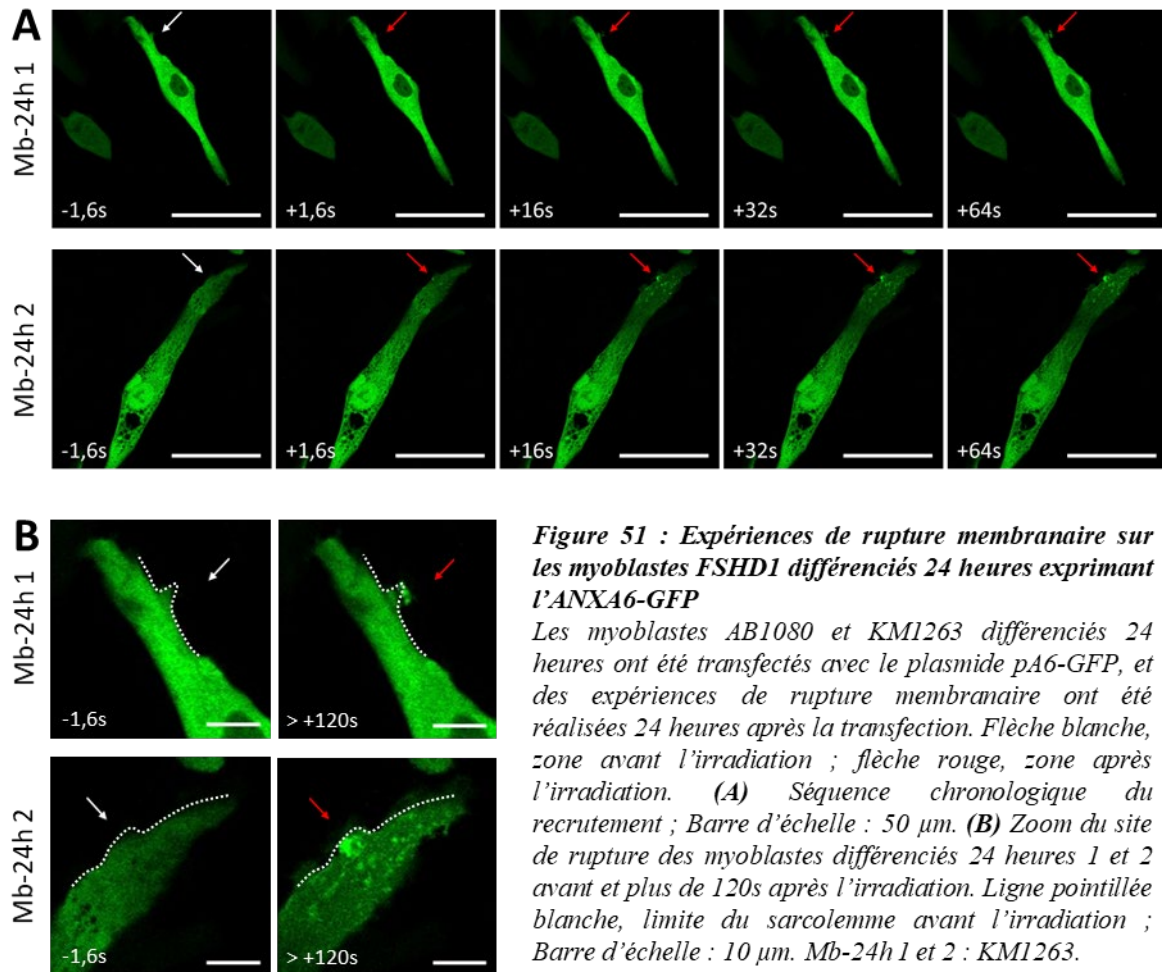
Dans les lignées FSHD, l'ANXA6-GFP a été recrutée au niveau de la membrane lésée immédiatement après la survenue du dommage (Figure 51).

De manière analogue aux lignées saines, l'ANXA6-GFP s'est localisée aussi bien au niveau du sarcolemme qu'au niveau des vésicules intracellulaires (Figure 51, Mb-24h 1).

Un cluster d'ANXA6-GFP a été observé au niveau du site de rupture (Figure 51B). L'absence d'ANXA6-GFP à la base du cluster a été fréquemment notée. Enfin, ce processus de recrutement a été accompagné d'une diminution faible de la fluorescence globale de la cellule irradiée. L'analyse de l'évolution de la fluorescence au site de rupture démontre un fort recrutement de l'ANXA6, près de trois fois plus intense que celui des contrôles (Figure 48, +160s).

Ainsi, nous concluons que la pathologie ne semble pas impacter significativement le recrutement de l'ANXA6-GFP dans les myoblastes FSHD1 différenciés 24 heures.





## 5. Des cellules auxiliaires sont-elles impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires ?

Jusqu'à récemment, le modèle de réparation membranaire ne prenait pas en considération l'implication d'éventuelles cellules auxiliaires dans le processus. Toutefois, il est avancé que les macrophages et les FAPs participeraient au remodelage de la membrane plasmique réparée, notamment en éliminant l'excès de membrane requis à l'obturation de la fissure (Hogarth et al., 2019; Novak et al., 2014). Ces cellules participent également à la régulation de la réparation tissulaire, notamment par le contrôle de la prolifération et de la fusion des cellules satellites par les macrophages (Juban & Chazaud, 2017).

Il a été rapporté que l'ANXA2 établissait un lien entre les myocytes dysferlinopathiques endommagés et les cellules auxiliaires (Defour et al., 2017; Hogarth et al., 2019). L'ANXA2 interstitielle libérée par les myofibres pathologiques lésées conduirait à une inflammation musculaire, attirerait les FAPs et participerait à la conversion de ces derniers en adipocytes,

concourant au remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux. En outre, dans des modèles murins déficients en ANXA2, il a été montré que les cellules musculaires présentaient un défaut de réparation membranaire sans pour autant que la nécrose tissulaire du muscle squelettique ne conduise à une inflammation chronique (Defour et al., 2017).

Alors que les études précédentes ont été réalisées majoritairement avec des cellules musculaires murines, nous avons souhaité savoir ce qu'il en était pour des cellules humaines, en conditions normale et pathologique. L'objectif à terme est de confirmer ou infirmer la participation des macrophages au processus de réparation membranaire et/ou au rétablissement de l'intégrité membranaire des myocytes humains. Il est également d'analyser l'impact de l'absence de réparation membranaire des cellules musculaires sur le phénotype des macrophages.

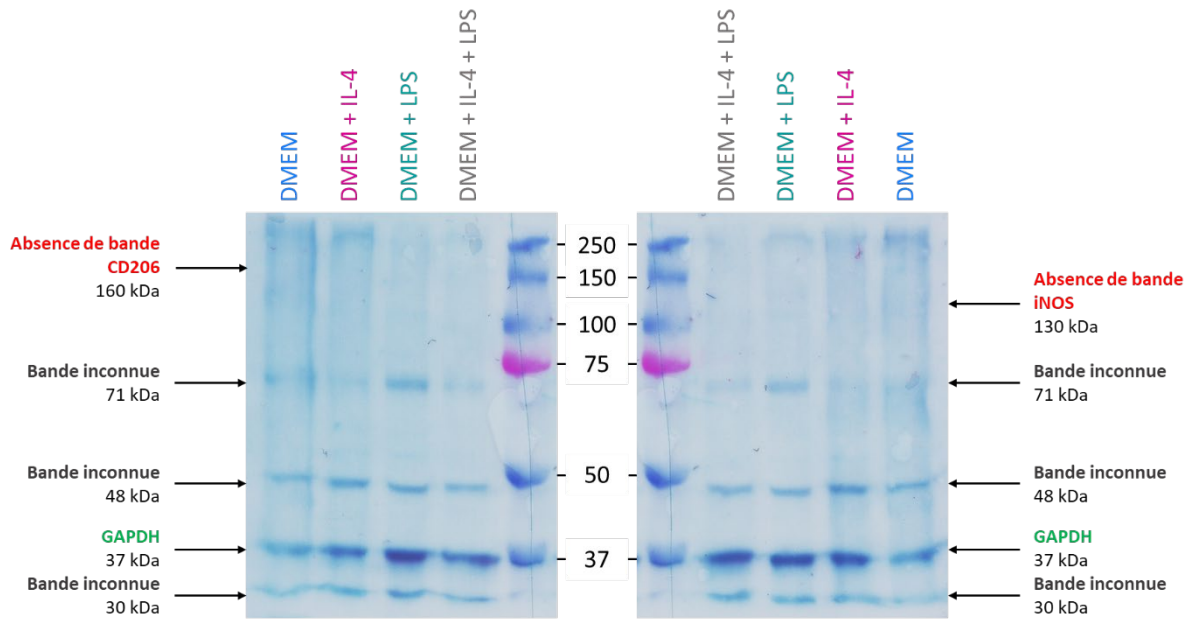
Pour étudier ce phénomène, nous avons d'abord entrepris le développement d'un modèle de coculture associant des macrophages à des cellules musculaires. Si notre expertise des cellules musculaires était effective, les macrophages étaient une nouveauté. Le défi a donc été de les étudier dans un premier temps.

Nous avons ainsi décidé de commencer cette série d'expériences avec la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7, gracieusement fournie par l'équipe de Frédéric Saltel (U1312, BRIC, Bordeaux), avant de travailler sur des cellules murines primaires ou des macrophages humains.

## **5.1. Macrophages RAW 264.7**

### **5.1.1. Sélection de marqueurs de polarisation des RAW 264.7**

Les propriétés des macrophages sont dictées par leur phénotype pro- (M1) ou anti-inflammatoire (M2). Nous avons donc d'abord étudié la capacité d'induire chacun de ces phénotypes en utilisant respectivement du LPS (100 ng.mL<sup>-1</sup>, Liu et al., 2020) et de l'IL-4 (5 ng.mL<sup>-1</sup>, Zhu et al., 2017) pendant 24 heures, et d'identifier des marqueurs capables de les distinguer spécifiquement. Le LPS induit le phénotype M1, tandis que l'IL-4 induit le phénotype M2. « L'Inducible Nitric Oxide Synthase » (iNOS) a été rapporté comme un marqueur spécifique des macrophages M1. En effet, il a été démontré que l'oxyde nitrique produit par les macrophages était largement induit par iNOS et que cette dernière augmentait fortement lors d'une stimulation au LPS chez les RAW 264.7 (Liu et al., 2020; Palmieri et al., 2020). Ce profil est aussi caractérisé par une forte production de cytokine pro-inflammatoire telle que « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ) (Liu et al., 2020). « Le Cluster of Differentiation 206 » (CD206) est un récepteur transmembranaire au mannose présent à la surface des macrophages. Ce dernier présente une expression augmentée chez les RAW 264.7 stimulés au LPS (Jia et al., 2023).



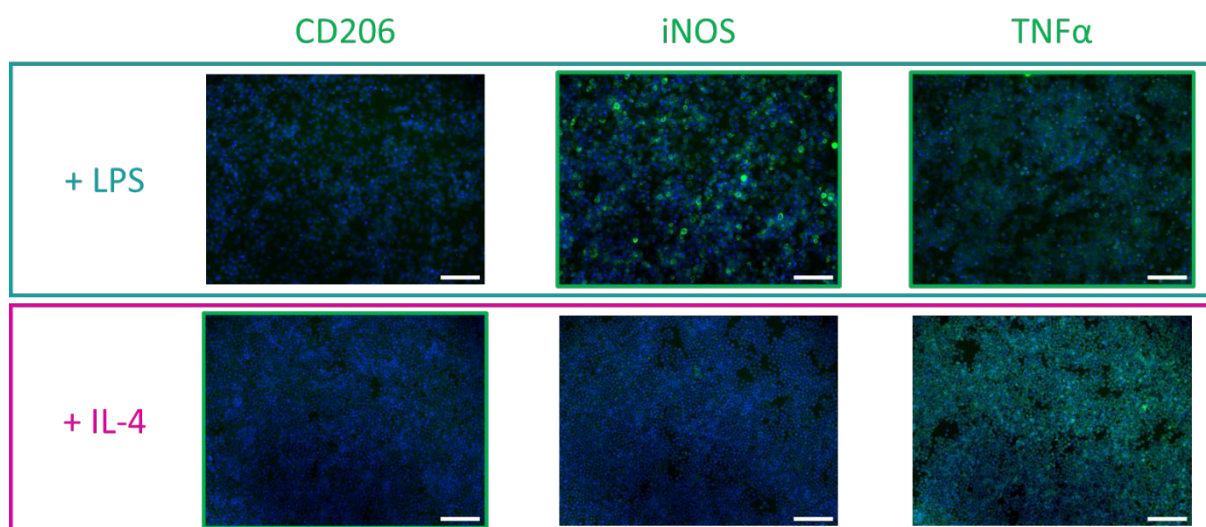
**Figure 52 : Tentative de détection des marqueurs phénotypiques des macrophages murins RAW 264.7 par Western-Blot**

Un résultat typique obtenu avec des échantillons témoins stimulés par IL-4, LPS ou IL-4-LPS de RAW 264.7. Les macrophages murins RAW 264.7 ont été ensemencés pendant 3 jours dans le DMEM. Une stimulation avec l'IL-4 à 5 ng/mL et le LPS à 100 ng/mL a été réalisée 24 heures avant l'extraction. 20 µg d'extrait protéique ont été séparés sur un gel SDS-PAGE à 8 %. La membrane a été clivée et chaque côté a été incubé soit avec un AC monoclonal anti-CD206 de souris (160-170 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA) (à gauche), soit avec un AC monoclonal anti-iNOS de souris (130 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA) (à droite). Le gène de ménage GAPDH (contrôle de charge, 37 kDa) a été détecté avec un AC polyclonal anti-GAPDH de lapin (Sigma). Le Dual Color (Bio-rad) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Nous avons donc cultivé les macrophages pendant 3 jours et avons préparé des extraits protéiques. Malgré plusieurs optimisations du protocole (nombre et durée des stimulations ou augmentation des concentrations des stimulateurs), nous n'avons jamais détecté le CD206, l'iNOS ou le TNF $\alpha$  par Western-Blot (Figure 52).

La détection des marqueurs par Western-Blot ayant échoué, nous nous sommes tournés vers une détection par immunomarquage (Figure 53).

Pour les macrophages stimulés avec LPS, le profil attendu M1 a été confirmé par une détection de l'iNOS et une détection plus faible et diffuse du TNF $\alpha$ , sans détection de CD206. Pour ceux stimulés avec IL-4, nous avons observé une absence de CD206 et une détection inattendue de TNF $\alpha$ , bien que iNOS ne soit pas détectée.



**Figure 53 : Détection de marqueurs phénotypiques des macrophages murins RAW 264.7 par immunomarquage**  
 Les macrophages murins RAW 264.7 ont été ensemencés en DMEM à  $2.2.10^5$  cellules par puits dans un ibidi pendant 3 jours en DMEM. Une stimulation avec l'IL-4 à 10 ng/mL et le LPS à 200 ng/mL a été induite 24 heures avant fixation. Les cellules ont été fixées avec du PFA à 4 %, saturées avec de la BSA à 2 %. Elles ont ensuite été incubées avec un AC monoclonal de souris anti-CD206 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA) ou anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA), suivi d'un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa488 (Invitrogen) ou un AC polyclonal de lapin anti-TNF $\alpha$  (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, USA) suivi d'un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa488 (vert) (Invitrogen) et du DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie à fluorescence au grossissement 20X. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

Ces derniers résultats peuvent être partiellement expliqués par la nature non stricte de la dichotomie M1/M2 chez les macrophages. En général, les macrophages présentent des tendances vers les phénotypes M1 ou M2 plutôt qu'une catégorisation rigide. En conclusion, l'absence de détection de CD206 dans les macrophages stimulés à l'IL-4, ainsi que les niveaux inattendus d'iNOS et de TNF $\alpha$ , démontrent les limites de ce modèle expérimental. Il serait nécessaire de changer les inducteurs de phénotypes M1 et M2. L'induction du profil M1 pourrait se réaliser par IFN $\gamma$   $\pm$  LPS (Liu et al., 2022). En outre, le profil M2 se départage en 4 sous-types : M2a, M2b, M2c et M2d. Une induction couplée IL-4 et IL-10 qui induisent respectivement le profil M2a et M2c pourrait permettre une meilleure caractérisation du profil anti-inflammatoire (Makita et al., 2015) et l'analyse pourrait être réalisée en cytométrie en flux (Liu et al., 2022), une technique déjà maîtrisée par notre équipe.

### 5.1.2. Développement d'un modèle de coculture de macrophages et de cellules musculaires

En parallèle, nous avons entrepris le développement d'un modèle de coculture associant des macrophages et des cellules musculaires.

La première étape a été d'évaluer la capacité de croissance des macrophages dans les milieux spécifiques aux cellules musculaires squelettiques, que ce soit le milieu de croissance (KMEM) ou de différenciation (KMEM Différenciation). Recommandé par l'ATCC et diverses publications (Kwon et al., 2013; Park et al., 2017), le milieu DMEM a été utilisé comme milieu contrôle. Nous avons observé une capacité de croissance similaire en DMEM et KMEM sur trois jours de culture (Figure 54). Cette capacité a été divisée par cinq lorsque les RAW 264.7 étaient cultivés dans le KMEM Différenciation, l'absence de sérum réduisant leur capacité de prolifération comme attendu.

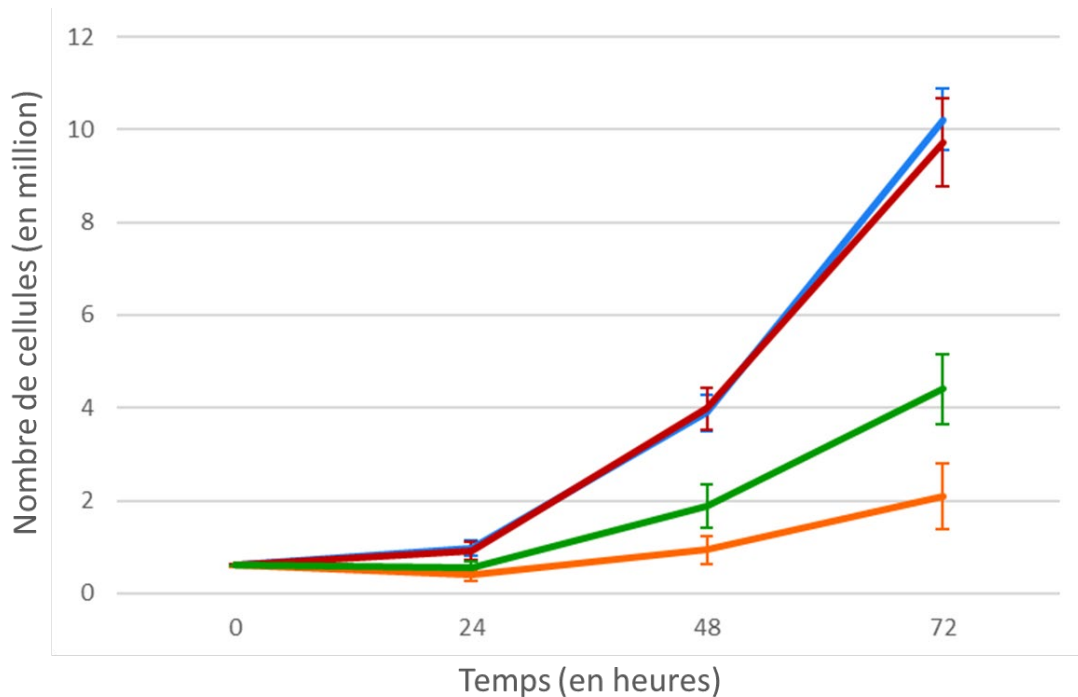
Etant donné que le protocole classique pour obtenir des myotubes consiste à ensemercer les cellules musculaires en KMEM et à les maintenir dans ce milieu pendant 24h avant de les différencier en KMEM différenciation, nous avons décidé de déterminer la courbe de croissance des cellules RAW 264.7 ensemençées d'abord dans le KMEM pendant 24 heures, puis cultivées dans le KMEM Différenciation pour les 48 heures suivantes. Les résultats montrent que le modèle d'association KMEM-KMEM Différenciation induit une capacité de croissance intermédiaire, entre celle observée en milieu de croissance et celle observée en milieu de différenciation (Figure 54). Ce procédé expérimental, idéal pour la différenciation des cellules musculaires et plus propice à la prolifération des RAW 264.7, a été choisi pour poursuivre nos futures expériences de coculture.

Il est à noter que les caractéristiques physiques des cellules RAW 264.7 varient en fonction du milieu dans lequel elles sont cultivées. Les RAW 264.7 associées au DMEM ou au KMEM présentent une forme arrondie, tandis que celles associées au KMEM Différenciation ont majoritairement une forme étoilée, ce qui suggérerait une plus forte adhésion au support de culture (non montré).

La littérature rapporte en outre que les macrophages murins cultivés dans le DMEM présentent une expression plus élevée de l'iNOS que ceux cultivés dans le milieu de culture F-12, suggérant que la composition du milieu influence la polarisation des macrophages (Kawakami et al., 2016). En plus du DMEM, les additifs présents dans le milieu de culture des cellules musculaires, tels que la fétuine (Chatterjee et al., 2013; Trepanowski et al., 2015), l'EGF (Lian et al., 2019), le  $\beta$ FGF (Im et al., 2020) et la dexaméthasone (Caratti et al., 2023; Vogel et al., 2014), ont été identifiés comme influençant le phénotype des macrophages.

Étant donné que la polarisation des macrophages est associée à la forme des cellules (McWhorter et al., 2013), les changements d'apparence des macrophages observés au cours des expériences de courbe de croissance peuvent s'expliquer. Différentes polarisations entraînant

différentes capacités, il est important de contrôler ces paramètres pour éviter des biais lors d'expériences de réparation membranaire.



**Figure 54 : Capacité de croissance des macrophages murins RAW 264.7 dans différents milieux de culture**  
6.10<sup>5</sup> cellules ont étéensemencés et les courbes de croissance des macrophages RAW 264.7 sur trois jours en DMEM (bleu), en KMEM (rouge) ou KMEM Différenciation (orange) ont été déterminées. Des expériences de croissance ont été réalisées en utilisant le KMEM comme milieu d'ensemencement pendant les premières 24 heures et le KMEM Différenciation comme milieu de croissance pour les 48 heures suivantes (vert). Pour chaque condition, trois expériences indépendantes (N) ont été menées. L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été ajoutée.

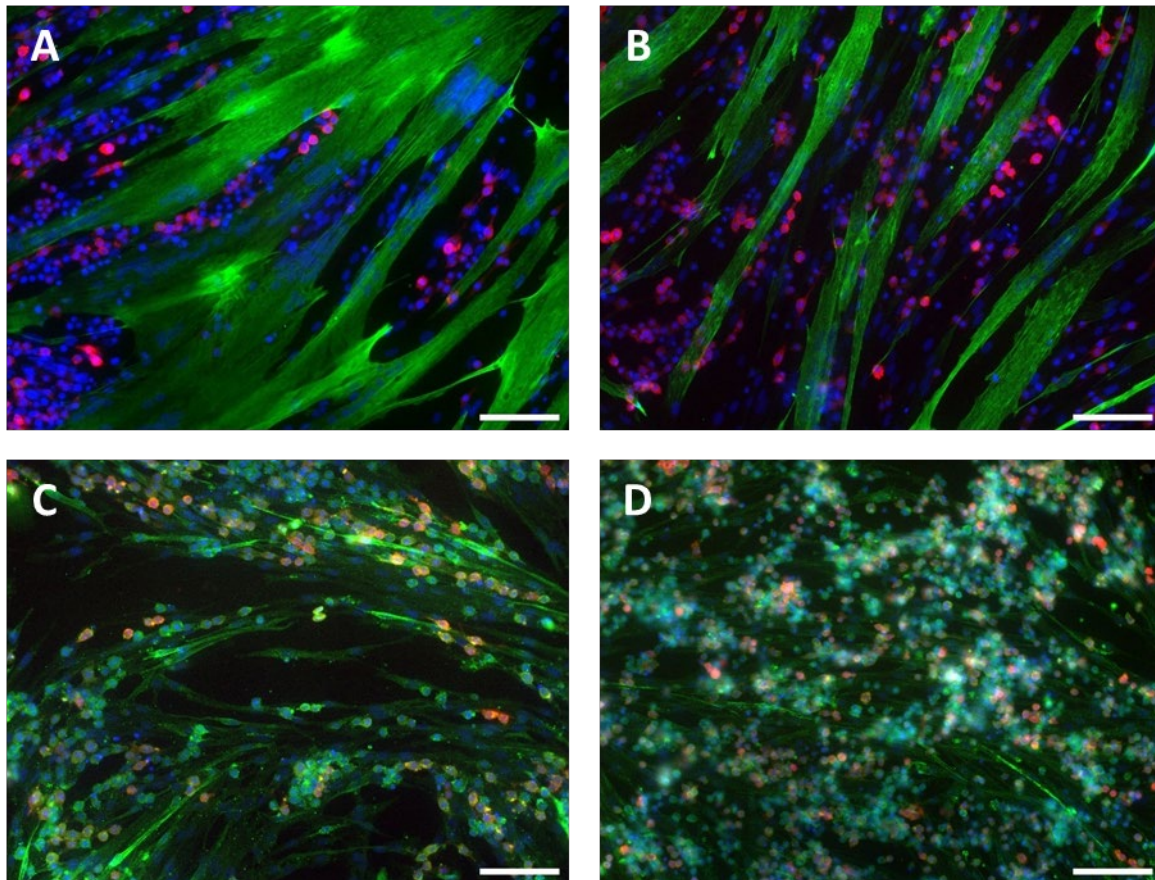
### 5.1.3. Effet des macrophages sur la capacité de différenciation des myoblastes

Notre objectif a d'abord été d'analyser l'effet des macrophages sur la capacité des myoblastes à former des myotubes.

De manière empirique nous avons choisi de travailler sur quatre ratios myoblastes/macrophages 1:0,5 ; 1:1, 1:3 et 1:5. Une proportion de macrophages inférieure à celle des cellules musculaires (Figure 55A) ne produit pas de résultat significativement différent par rapport à la condition sans macrophage. En revanche, une concentration de macrophages supérieure à trois fois celle des cellules musculaires est préjudiciable à l'observation : des macrophages agglomérés dans le milieu et gênent l'analyse des résultats (Figure 55D). Toutefois, sachant que



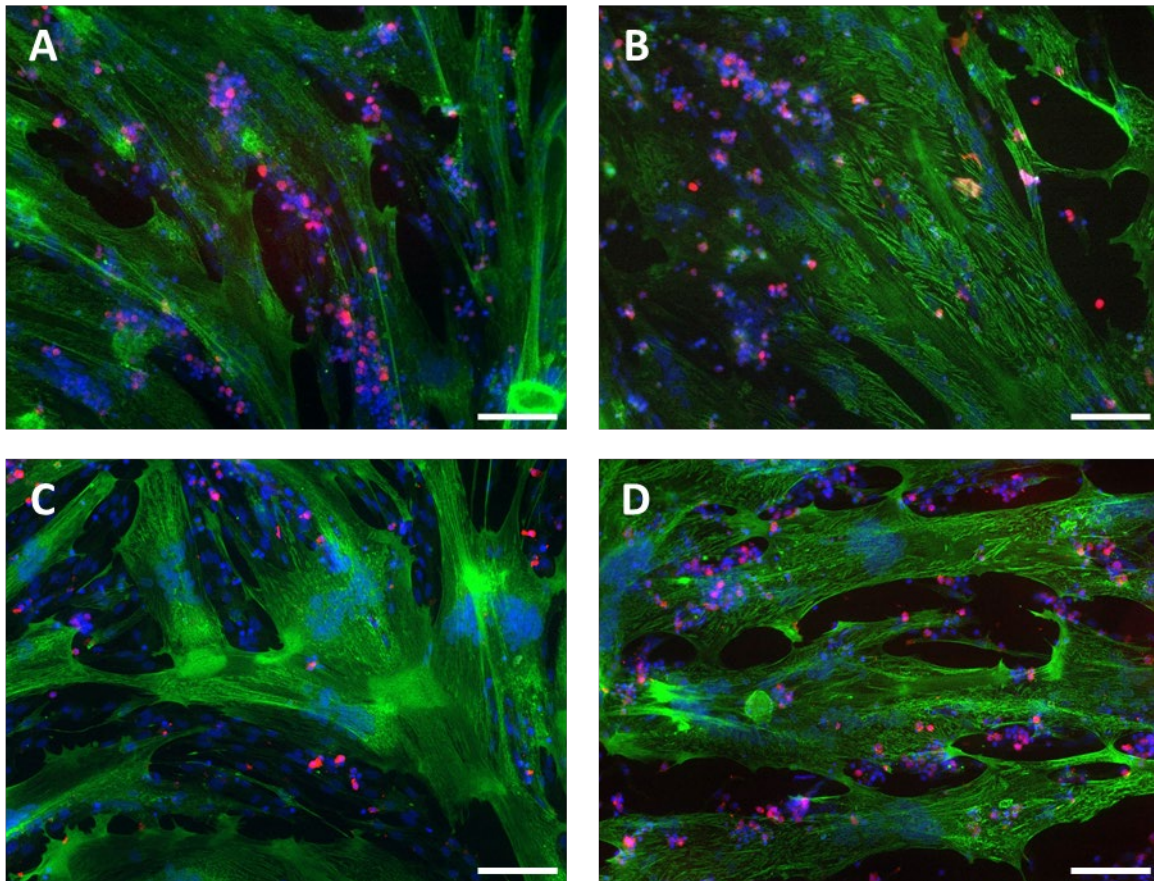
les cellules 578 et AB1098 ont de base des indices de fusion supérieurs aux contrôles, il serait intéressant d'analyser les indices de fusion après coculture.



**Figure 55 : L'augmentation de la concentration de macrophages retarde la différenciation des cellules musculaires et entraîne un amincissement des myotubes sains**

Les cellules musculaires saines LHCN ont été d'abordensemencées dans le KMEM. Les macrophages RAW 264.7 ont été ajoutés 24 heures plus tard dans le KMEM Différenciation avec un ratio Myoblastes/Macrophages de 1:0,5 (A), 1:1 (B), 1:3 (C) et 1:5 (D). Les cellules ont été fixées avec du PFA à 4 %, saturées avec de la BSA à 2 %, puis incubées avec un AC monoclonal anti- $\alpha$ -Actinine de souris (Sigma), un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa488 (Invitrogen) (vert) et du DAPI (Sigma) (bleu). Les cellules sont observées en microscopie à fluorescence. L'actine des macrophages est marquée avec de la mCherry (rouge). Échelle : 100  $\mu$ m.

Nos résultats préliminaires montrent que la présence de macrophages ralentit le processus de différenciation des cellules musculaires saines et conduit à la formation de myotubes plus fins, en accord avec la littérature (Merly et al., 1999). Ce retardement du profil de différenciation et de maturation des myoblastes sains suggère un profil macrophagique de type pro-inflammatoire M1. En effet, les macrophages pro-inflammatoire favorisent la prolifération des cellules satellites quand les macrophages anti-inflammatoires stimulent la différenciation et la fusion de ces dernières et la maturation des fibres musculaires (Arnold et al., 2007).



**Figure 56 : L'ajout précoce des macrophages en grand nombre ne perturbe pas la fusion des cellules musculaires dysferlinopathiques et dystrophinopathiques in vitro**

Les cellules musculaires dystrophiques 578 ou AB1098 et les macrophages RAW 264.7 ont été ensemencés simultanément avec un ratio Myoblastes/Macrophages de 1:1 (578 : A ; AB1098 : C) et 1:3 (578 : B ; AB1098 : D). Les cellules musculaires et les macrophages ont été cultivés pendant 4 jours, d'abord pendant 24 heures dans le KMEM, puis pendant 72 heures dans le KMEM Différenciation. Les cellules ont été fixées avec du PFA à 4 %, saturées avec de la BSA à 2 %, puis incubées avec un AC monoclonal anti- $\alpha$ -Actinine de souris (Sigma), un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa488 (Invitrogen) (vert) et du DAPI (Sigma) (bleu). Les cellules sont observées en microscopie à fluorescence. L'actine des macrophages est marquée avec de la mCherry (rouge). Échelle : 100  $\mu$ m.

En revanche, les cellules musculaires dysferlinopathiques 578 (Figure 56A et B) et dystrophinopathiques AB1098 (Figure 56C et D) cocultivées avec des macrophages ne semblent pas être affectées dans leur processus de différenciation. Les lignées 578, connue pour ne pas se réparer, et AB1098, dont nous venons de démontrer un déficit de réparation, ont été choisies car elles présentaient des capacités de fusion proches des contrôles. Cette différence majeure des cellules dystrophiques avec les cellules saines peut s'expliquer de deux façons : soit les cellules musculaires dystrophiques ne promeuvent pas le phénotype M1 des macrophages, soit les macrophages de type M1 ne parviennent pas à impacter la différenciation/fusion des myoblastes dystrophiques.



## 5.2. Macrophages dérivés de moelle osseuse murine

Grâce à une collaboration avec Gaëtan Juban (équipe de Bénédicte Chazaud, U1315, Lyon), nous avons eu la possibilité de travailler avec des macrophages dérivés de moelle osseuse murine (« Bone-Marrow Derived Macrophages », BMDM). Ces cellules, bien que plus délicates à manipuler, n'ont pas subi de processus d'immortalisation et présentent donc un comportement que l'on peut qualifier de « plus physiologique ». De plus, la littérature scientifique est abondante à leur sujet, et notre collaborateur nous a fourni des indications précieuses sur leurs caractéristiques.

Nous avons donc repris nos expérimentations en utilisant ces cellules, avec l'objectif de déterminer des marqueurs phénotypiques spécifiques. Après une période d'exploration expérimentale et plusieurs échecs, nous avons remplacé l'inducteur de profil M2, initialement l'IL-4, par la dexaméthasone (DEX) (100 nM) et l'inducteur de profil M1, initialement LPS, par des DAMPS (« damage-associated molecular patterns »,  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), des extraits musculaires endommagés. Nous avons étudié la capacité du « Chemokine (C-C motif) Ligand » (CCL3) et iNOS à détecter le profil M1 et du « Cluster Differentiation 163 » (CD163) et du CD206 à marquer le profil M2.

Nous avons procédé à différents temps de stimulation par l'inducteur M2 (DEX) de 6h à 72h (Figure 57C). Le CCL3, marqueur du profil M1 (Caratti et al., 2023), n'est détecté que faiblement tout au long de l'augmentation du temps de stimulation avec systématiquement moins de 10% de cellules marquées à l'anti-CCL3. Le pourcentage de cellules marquées au CD163, marqueur du profil M2 (Caratti et al., 2023), augmente jusqu'à 48 heures (45% des cellules marquées) avant de diminuer drastiquement. Il est probable que cette diminution soit due à une stimulation en cloche, 48 heures représentant un seuil au-delà duquel la présence de l'inducteur devient délétère pour les cellules.

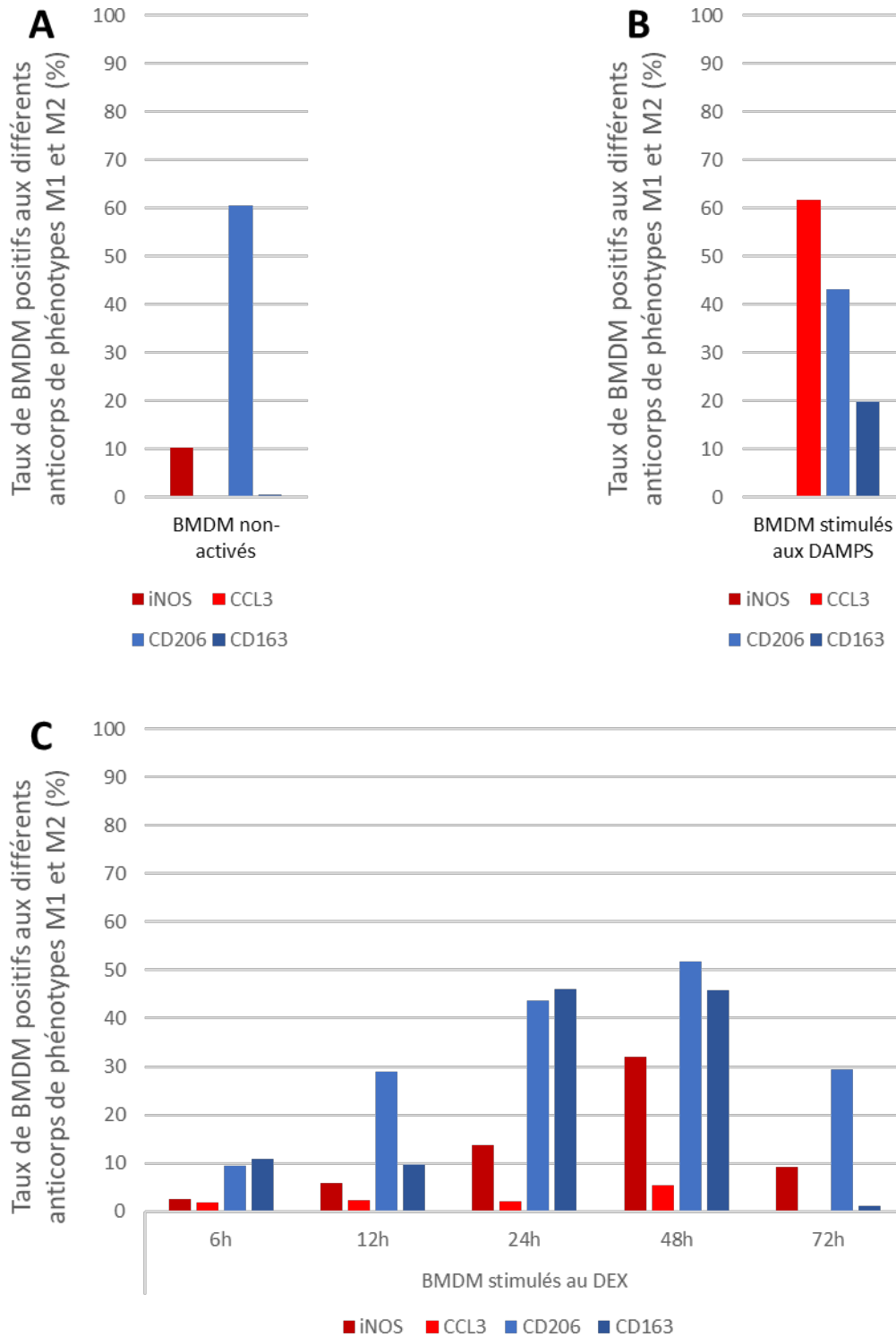
Sur conseils de Gaëtan Juban, nous avons procédé à une stimulation de 24h par les DAMPS pour induire le profil M1 (Figure 57B). Cette fois-ci, nous avons constaté que près de 60% des cellules sont marquées à l'anti-CCL3 et seulement 20% à l'anti-CD163.

De manière surprenante, le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-iNOS a cru avec l'augmentation du temps de stimulation au DEX. De plus, aucune cellule stimulée au DAMPS n'a été détectée par cet AC. Dans l'hypothèse où le marquage observé était tout ou partiellement aspécifique, nous avons testé une autre référence de l'AC anti-iNOS (d'une référence Santa Cruz pour une référence Abcam) (Figure 58). Cette fois-ci, nous avons constaté une meilleure détection par l'anti-iNOS des cellules stimulées au DAMPS. Toutefois nous

avons continué à observer une forte propension de cellules détectées lors d'une stimulation au DEX (plus de 50%). Des optimisations sont donc encore nécessaires.

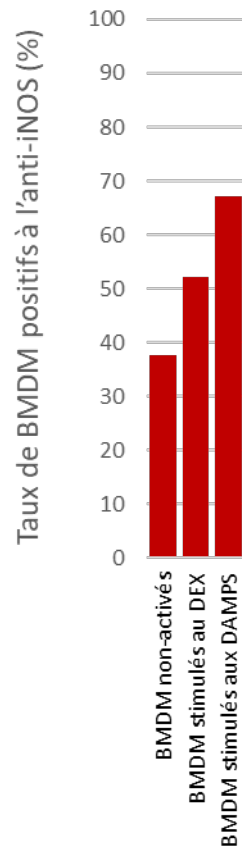
Le pourcentage de cellules marquées par l'anti-CD206 reste constamment élevé, quelle que soit la stimulation ou l'absence de celle-ci. Nous considérons donc ce dernier AC comme non discriminant.

En conclusion, les marqueurs CCL3 et CD163 sont validés, et seront utilisés dans de futures expériences de coculture. L'effet des BMDM sur la capacité des cellules musculaires à se différencier et fusionner reste à analyser.



**Figure 57 : Les profils pro-inflammatoire (M1) et anti-inflammatoire (M2) des BMDM, induits par la DEX et les DAMPS sont respectivement détectés par les AC anti-CCL3 et anti-CD163**

$6 \cdot 10^4$  macrophages BMDM ont étéensemencées en DMEM dans des Ibidi. Le lendemain le milieu a été changé et a été additionné ou non (A) de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DAMPS (B), ou de  $100 \text{ nM}$  DEX (C). Après différentes durées de stimulation, les cellules ont été immunomarquées pour iNOS ou CCL3 et CD206 ou CD163. Les cellules ont été observées en microscopie à fluorescence et les comptages ont été réalisés sur ImageJ.



**Figure 58 : L'anti-iNOS détecte le profil pro-inflammatoire des BMDM induit par les DAMPS**

6.10<sup>4</sup> macrophages BMDM ont étéensemencées en DMEM dans des Ibidi. Le lendemain le milieu a été changé et 100 nM de DEX ou 1 µg.mL<sup>-1</sup> de DAMPS () ont été ajoutés. Après différentes durées de stimulation, les cellules ont été fixées avec du PFA à 4 %, saturées avec de la BSA à 2 %, puis incubées avec un AC monoclonal de souris anti-iNOS (Abcam lpc, Cambridge, UK), suivi d'un AC secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorochrome Alexa488 (Invitrogen). Les cellules ont été observées en microscopie à fluorescence et les comptages ont été réalisés sur ImageJ.



# V. Discussions

Ce travail de thèse s'articulait autour de 4 questions :

1. Quelles dystrophies musculaires résultent d'un défaut de réparation membranaire ?
2. Les dystrophies musculaires sont-elles associées à une dérégulation de l'expression des ANX ?
3. Le trafic des ANX lors du processus de réparation est-il altéré dans le cas des dystrophies musculaires ?
4. Des cellules auxiliaires sont-elles impliquées dans la réparation membranaire des cellules musculaires ?

Mon travail de thèse a d'abord permis de développer une nouvelle méthode d'étude de la réparation membranaire. Cette partie du travail est discutée dans une première partie. Cette technique a permis d'identifier les pathologies associées à un défaut de réparation membranaire. Mon travail de thèse a aussi révélé une dérégulation de l'expression des annexines dans certaines de ces pathologies ainsi qu'une perturbation de leur trafic dans des cellules pathologiques endommagées par ablation laser.

Les résultats obtenus sont discutés ci-dessous par pathologie afin de mettre en relation défaut de réparation membranaire et dérégulation de l'expression et/ou du trafic des ANX. Un dernier chapitre discute de l'implication des cellules auxiliaires.

## **1. Développement d'une nouvelle méthode dans l'étude de la réparation membranaire**

Les méthodes pour induire des dommages membranaires sont nombreuses, mais leurs limitations ne permettent pas nécessairement une évaluation pertinente de la réparation membranaire. Les toxines formeuses de pores, les ionophores de  $Ca^{2+}$  ou encore les détergents doux perturbent la membrane, mais leur application conduit à la formation de multiples ruptures nanométriques, ce qui diffère des lésions uniques micrométriques normalement attendues dans le cas d'une cellule musculaire soumise à des contraintes mécaniques. A titre d'exemple, notre équipe a souligné une différence dans la séquentialité du recrutement des ANX chez des cellules soumises à un traitement à l'ionomycine, un ionophores de  $Ca^{2+}$  (Skrahina et al., 2008), et celles soumises à une irradiation laser (Croissant et al., 2022).

La méthode d'endommagement par des billes de verre offre l'avantage de traiter rapidement un grand nombre de cellules et de générer des lésions mécaniques proches de celles rencontrées

dans le corps, mais elle manque de précision et, mal contrôlée, peut induire des dommages variables en nombre et en taille (Heitmann et al., 2021). Enfin, les techniques de compression ou d'étirement cellulaire reproduisent mieux les contraintes mécaniques naturelles, mais elles nécessitent des dispositifs spéciaux onéreux (CellScale MicroSquisher, BioTester ou Flexcell FX-6000TM tension cell) et peuvent être difficiles à standardiser.

Jusqu'à présent, l'évaluation de la réparation du sarcolemme par notre équipe se faisait principalement par des techniques d'ablation laser. Cette méthode consiste à induire des dommages sur un myotube unique à l'aide d'un laser dans le proche infrarouge, permettant d'observer la réponse cellulaire en temps réel à l'aide d'un microscope confocal (Carmeille et al., 2017). Bien que cette approche permette un endommagement parfaitement contrôlé, elle reste complexe, coûteuse et chronophage, chaque cellule nécessitant une analyse individuelle. Le processus est alors fastidieux lorsqu'il s'agit de collecter des données à l'échelle d'une population cellulaire. Ces limites nous ont poussés à développer une méthode plus rapide et plus accessible pour étudier la réparation du sarcolemme, tout en conservant la sensibilité nécessaire pour détecter les déficits de réparation membranaire.

La nouvelle méthode, appelée *muscle shear-stress assay*, présente plusieurs avantages par rapport à l'ablation laser. Elle permet de soumettre un grand nombre de cellules musculaires à des contraintes mécaniques en un temps très court, en forçant le passage de la suspension cellulaire au travers d'une aiguille hypodermique fine. Cette approche offre un moyen simple et rapide d'identifier les cellules musculaires présentant des défauts de réparation du sarcolemme. En outre, elle permet d'appliquer rigoureusement les mêmes contraintes mécaniques à l'ensemble de la population. En plus de révéler un déficit de réparation du sarcolemme, cette méthode permet également d'explorer les conséquences génotypiques et phénotypiques des dommages membranaires. Comme présenté au cours de ce travail de thèse, elle s'est avérée particulièrement efficace pour identifier des anomalies de réparation dans des cellules de patients atteints de dystrophies et la dérégulation de protéines impliquées dans la réparation membranaire. Elle a ainsi permis de valider la déficience de réparation membranaire obtenue chez des modèles murins pour la LMGDR2 (Bansal et al., 2003) et la DMD (Vila et al., 2017).

Cependant, cette méthode présente aussi des limitations. Elle n'est applicable qu'à des cellules mononucléées, en l'occurrence des myoblastes différenciés, car les myotubes et les fibres musculaires, trop volumineuses, ne peuvent pas passer à travers l'aiguille utilisée pour induire les contraintes mécaniques.

Malgré cela, la méthode est extrêmement avantageuse pour étudier les premiers stades de la différenciation musculaire. Par ailleurs, son développement a permis de démontrer que les myoblastes acquièrent leur capacité de réparation membranaire précocement, dès les premières étapes de la différenciation. Nos résultats montrent que les myoblastes différenciés pendant 24 heures présentent un système de réparation du sarcolemme fonctionnel, comme en témoigne l'expression de la CAV3. Cette découverte est cruciale, car elle suggère que les myoblastes sont équipés pour réparer leur membrane bien avant leur fusion pour former des myotubes et des fibres musculaires matures.

En somme, le *muscle shear-stress assay* constitue une avancée significative dans l'étude de la réparation membranaire, offrant une alternative plus rapide et plus accessible à l'ablation laser.

## **2. La dystrophie musculaire des ceintures de type R2 : une dysferlinopathie**

La LGMDR2 est la première dystrophie musculaire qui a été montrée comme résultant d'un défaut de réparation membranaire dans des modèles murins déficients en dysferline (Bansal et al., 2003). Dans ces cellules musculaires squelettiques dysferlinopathiques, il a été observé une surexpression de l'ANXA2 (Hogarth et al., 2019). Cet excès, qui fuit des myofibres endommagées vers le milieu extracellulaire, active des FAPs résidents et participe à leur conversion en adipocytes, aboutissant à la dégénérescence du tissu musculaire et à son remplacement par du tissu adipeux (Hogarth et al., 2019).

L'analyse de biopsies humaines provenant de cohortes de patients italiens (Cagliani et al., 2005) et australiens (Waddell et al., 2011) a mis en avant la surexpression protéique des ANXA1 et A2 chez les patients de LMGDR2. Il a également été rapporté la surexpression transcriptionnelle de l'ANXA1 chez des patients américains (Kesari et al., 2008). En outre, des expériences d'ablation laser ont permis de confirmer l'absence de réparation membranaire chez des myotubes humains provenant de myoblastes immortalisés déficients en dysferline (Carneille et al., 2016; Philippi et al., 2012).

Dans le cadre de mon projet, j'ai étudié cette pathologie au travers de trois lignées dysferlinopathiques provenant de patients atteints de LGMDR2. Du fait de mutations génétiques différentes, deux cas de figure se présentaient : soit une expression drastiquement réduite de la dysferline (107 et 814), soit totalement abolie (578) (Carneille et al., 2016; Philippi et al., 2012).



Mon travail a d'abord permis de confirmer l'absence de réparation membranaire dans les cellules musculaires humaines de patients atteints de la LGMDR2. Nos résultats ont montré que le taux de survie des cellules dysferlinopathiques soumises à des contraintes de cisaillement était fortement diminué par rapport aux cellules contrôles, bien au-delà du taux de cellules endommagées/non réparées. Ce résultat laisse supposer qu'un certain nombre de cellules stressées a fini par mourir.

Notre travail a également mis en évidence une surexpression des ANXA1 et A5 dans les myotubes dysferlinopathiques comparées aux contrôles, en condition de repos. Pour rappel, la surexpression de l'ANXA1 avait déjà été démontrée sur des biopsies humaines dans cette pathologie (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011). Toutefois, une biopsie présentant divers types cellulaires en son sein (fibroblastes, macrophages résidents, cellules endothéliales), il restait à déterminer si cette surexpression était spécifique aux cellules musculaires. Grâce à notre étude, nous avons pu confirmer que l'ANXA1 est effectivement surexprimée. L'ANXA1 interagit avec la dysferline dans le processus de réparation membranaire et permet l'agrégation des vésicules intracellulaires afin de combler la rupture (Lennon et al., 2003). Nous pouvons supposer que la surexpression de l'ANXA1 est une adaptation de la cellule qui tente de compenser l'absence de dysferline et le défaut de réparation qui s'ensuit. Cette hypothèse est soutenue par l'existence d'une corrélation significative entre l'expression des ANX et la sévérité de la pathologie (Cagliani et al., 2005). Nos résultats vont en revanche à l'encontre des données de la littérature qui présentent une surexpression de l'ANXA2 (Cagliani et al., 2005; Waddell et al., 2011). On peut supposer que cette surexpression est spécifique des cohortes sélectionnées, provient d'autre(s) cellules des biopsies que des cellules musculaires ou encore vient de la différence entre une analyse histologique *ex-vivo* et une analyse cellulaire *in vitro*. Enfin, nous avons démontré la surexpression de l'ANXA5 dans les cellules dysferlinopathiques comparées aux contrôles, qui, à notre connaissance n'avait pour le moment jamais été rapportée.

Les résultats différents obtenus pour les lignées cellulaires et les biopsies peuvent aussi provenir du fait que les cellules musculaires dans les biopsies ont été stimulées mécaniquement. De ce fait, nous avons poursuivi nos analyses d'expression avec des myoblastes différenciés soumis à des contraintes de cisaillement.

De façon originale, la nouvelle méthode d'étude de la réparation membranaire que nous avons mise en place nous a ainsi permis d'étudier l'impact de contraintes mécaniques répétées sur l'expression des ANX des cellules musculaires squelettiques. Dans les cellules contrôles,

l'expression des ANXA1 et A2 demeure inchangée. Au contraire, l'expression des ANXA5 et A6 est revue à la hausse suite à un stress, suggérant une adaptation dans les cellules endommagées du profil d'expression de certaines protéines impliquées dans la réparation du sarcolemme. Les ANXA5 et A6 interagissent avec le sarcolemme endommagé, tandis que les ANXA1 et A2 interviennent plus profondément dans le cytoplasme en permettant l'agrégation des vésicules intracellulaires (Croissant et al., 2021).

Dans les cellules dysferlinopathiques, une dérégulation de cette adaptation apparaît au niveau des ANXA5 et A6. L'expression de ces ANX n'est pas revue à la hausse, laissant penser que l'absence de dysferline empêche l'adaptation des cellules à un environnement stressant. Il faut toutefois garder en tête que l'ANXA5, comme l'ANXA1, est déjà surexprimée en condition basale. On peut supposer, qu'en condition basale, la cellule dysferlinopathique est déjà adaptée à une situation qui ne devrait apparaître qu'en cas de stress, avec une expression de l'ANXA5 exacerbée pour faire face aux futurs dommages. Cela soutiendrait l'hypothèse que la surexpression des ANX en condition basale est en réalité une réponse à une fragilité intrinsèque des sarcolemmes dysferlinopathiques.

J'ai complété notre étude par l'analyse du trafic des ANX en temps réel après endommagement par irradiation laser. Chez les lignées LGMDR2, le recrutement de l'ANXA1, normalement première à être recrutée au site de rupture (Croissant et al., 2022), est retardé. Pour l'ANXA2, nous constatons que la durée de vie du cluster formé au site de rupture est amoindrie chez les lignées dysferlinopathiques par rapport aux lignées contrôles, bien que sa localisation profonde ne semble pas impactée. Ces altérations du comportement des ANXA1 et A2 pourraient s'expliquer par l'absence voire la faible présence de dysferline qui interagit normalement avec l'ANXA1 et l'ANXA2 (Lennon et al., 2003). Elles peuvent aussi être associées à l'absence de réparation membranaire qui conduit à une fuite de l'ANXA2 dans le milieu extracellulaire. L'altération de l'expression de la dysferline ne semble toutefois pas perturber le recrutement des ANXA4 et A6 laissant supposer que cette dernière n'interagit pas avec ces deux ANX. Seules les ANX impliquées dans le recrutement des vésicules et interagissant avec la dysferline seraient donc impactées (Bitto & Cho, 1999; Blackwood & Ernst, 1990; Lambert et al., 1997). Du fait du retard de l'ANXA1, on peut supposer que l'ordre de recrutement est modifié. Il avait été rapporté que l'ordre séquentiel d'arrivée au site de rupture était : ANXA1, ANXA5/ANXA6, ANXA4, ANXA2 (Croissant et al., 2022).

Enfin, nous avons constaté des altérations des capacités myogéniques des lignées expérimentées. Ces altérations se traduisaient soit par une exacerbation (578) soit par une inhibition partielle ou totale (814 et 107) de la fusion par rapport aux lignées contrôles,

traduisant une perturbation dans le processus de différenciation. Il faut rappeler que l'expression de la dysferline est totalement inhibée dans la lignée 578 alors qu'elle est présente dans les lignées 814 et 107, où la protéine apparaît comme agrégée dans le cytoplasme (Philippi et al., 2012). De manière générale, l'activation même du processus de fusion est dérégulée, la lignée 578 fusionnant précocement et spontanément en absence d'induction de la différenciation. Des propriétés myogéniques altérées représentent un facteur nécessairement aggravant pour la maladie, car elles compromettent la régénération du tissu musculaire en cas de lésion.

Ces fortes variabilités peuvent être liées soit à une variabilité inhérente à l'individu et donc indépendante de la pathologie, soit à une variabilité mutation-dépendante pathologie-indépendante. Dans ce dernier cas, nous savons que les mutations respectives de ses lignées aboutissent à des niveaux d'expression de la dysferline différents, laissant supposer que ces niveaux seraient à l'origine des altérations constatées. Ces problèmes de fusion n'avaient cependant pas été rapportés par Philippi et collaborateurs qui ont étudié des myotubes formés par les lignées 578 et 107 (Philippi et al., 2012).

### **3. La maladie des muscles ondulants 2: une cavéolinopathie**

La RMD, anciennement LGMD1C, n'a, jusqu'à présent, été que peu étudiée sous l'angle de la réparation membranaire.

CAV3 est principalement localisée au niveau du sarcolemme, en association avec le DAPC (Song et al., 1996) dont elle contribue à l'intégrité. En effet, une réduction de l'expression de CAV3 perturbe ce complexe, entraînant une diminution de l'accumulation de dystrophine (Herrmann et al., 2000). De manière intéressante, la surexpression de CAV3 est associée à une réduction sévère de l'expression de la dystrophine et des glycoprotéines qui lui sont associées (Galbiati et al., 2000; Volonte et al., 2003). On peut donc supposer que, à l'instar de la DMD, la RMD2 présente une membrane fragilisée, plus sujette aux ruptures membranaires.

Il a également été rapporté que la réduction de l'expression de CAV3 chez des patients atteints de RMD2 est associée à une altération de la localisation de la dysferline, avec laquelle elle interagit (Matsuda et al., 2001; Tagawa et al., 2003). La déficience en CAV3 pourrait conduire indirectement à un déficit de réparation membranaire en perturbant le trafic de la dysferline.

Nos résultats expérimentaux n'ont cependant révélé aucun défaut de réparation membranaire dans la RMD2, et la survie cellulaire, mesurée après des stress mécaniques répétés, était

comparable à celle des cellules contrôles. Ces observations suggèrent que la mutation de CAV3 dans les lignées 650 et 107 maintient une expression résiduelle de CAV3 fonctionnelle permettant la réparation membranaire des cellules soumises à des contraintes de cisaillement. Dans le cadre de l'étude de la dérégulation des ANX, nous avons constaté qu'au niveau protéique, les lignées RMD exhibaient une surexpression d'ANXA1, renforcée lorsque les cellules étaient soumises à des contraintes mécaniques. Ce résultat concorde avec la littérature, bien que nous ne constatons pas de surexpression de l'ANXA2 (Cagliani et al., 2005). À ce jour, il est difficile d'établir un lien direct entre l'élévation de l'expression de l'ANXA1 et la déficience en CAV3. Nous pouvons cependant supposer que le sarcolemme de ces lignées est plus fragile, en accord avec l'instabilité du DAPC (Herrmann et al., 2000), ce qui pourrait entraîner une augmentation compensatoire de l'expression de l'ANXA1 pour soutenir une sollicitation plus forte du processus de réparation membranaire, comme c'est le cas dans les biopsies de patients DMD (Cagliani et al., 2005). Le fait que nous n'ayons pas réussi à transfecter ces cellules pour des expériences d'irradiation laser, malgré l'optimisation des protocoles, soutient cette hypothèse. Néanmoins, il convient de rappeler que nous n'avons pas observé de défaut de réparation membranaire dans ces lignées.

Pour finir, l'analyse de l'indice de fusion a révélé une altération des capacités myogéniques des cellules RMD2. Une diminution significative est constatée pour la lignée Cav69, tandis que la lignée 650 présente un indice de fusion légèrement supérieur aux lignées contrôles. Sachant que l'expression de CAV3 est abolie dans la lignée 650, il est difficile d'établir un lien entre CAV3 et la différenciation/fusion des myoblastes (Carneille, 2015). En outre, il a été montré que CAV3 joue un rôle dans le remodelage du cytosquelette pendant la différenciation et dans la fusion des myocytes (Volonte et al., 2003), ce qui pourrait expliquer ce résultat.

Dans l'ensemble, il semblerait que la pathologie RMD2 causée par la mutation CAV3 ne soit pas directement liée à un défaut de réparation membranaire. On sait que CAV3 est surexprimée lors de l'activation des cellules satellites (Ganassi & Zammit, 2022), et que sa mutation pourrait affecter la capacité des cellules satellites à régénérer les myofibres, bien que l'état et l'activité des cellules satellites chez les patients atteints de RMD n'aient pas encore été rapportés. Nos résultats suggèrent donc que la mutation CAV3 pourrait avoir un impact sur la régénération musculaire plutôt que sur la réparation membranaire. Ces conclusions concordent partiellement avec les résultats que nous avons obtenus lors des tests de fusion.

#### **4. La dystrophie musculaire de Duchenne**

L'absence de dystrophine entraîne une rupture de la connexion mécanique médié par le DAPC, rendant le sarcolemme plus vulnérable aux dommages. La fuite de  $Ca^{2+}$  résultante perturbe l'homéostasie calcique, déclenchant une cascade de signalisation déstabilisant le DAPC et aboutissant à la dégénérescence des fibres musculaires (Gailly et al., 2007; Jungbluth et al., 2018; Mareedu et al., 2021)

A l'instar de la LGMDR2, il a été démontré que la DMD présente un défaut de réparation membranaire chez les modèles murins. Seulement cette déficience a été proposée en lien avec des dysfonctionnements mitochondriaux (Vila et al., 2017), et non avec la machinerie de réparation membranaire à proprement parler, impliquant la dysferline et les ANX.

Mon travail de thèse a permis d'établir que cette pathologie résultait d'un défaut de réparation membranaire chez l'Homme. Les cellules dystrophinopathiques soumises à des contraintes mécaniques exhibent un taux de survie fortement diminué par rapport aux cellules contrôles, indiquant une incapacité à réparer les dommages subis et une mort cellulaire subséquente.

De plus, nous avons observé la surexpression des ANXA1, A2 et A5 dans les myotubes en condition basale. Cette observation est en accord avec les résultats précédents montrant la surexpression d'ANXA1 et A2 chez les souris mdx (Vila et al., 2017) et dans les biopsies de patients DMD (Cagliani et al., 2005), ainsi que la surexpression d'ANXA5 chez les modèles murins (Matsumura et al., 2013) et les patients atteints de dystrophie musculaire (Capitanio et al., 2020). Cependant, contrairement à certaines études rapportant une perte de fonction des ANXA1 et A6 dans la DMD (Foltz et al., 2021; Quattrocelli et al., 2017), nos résultats ne montrent aucune sous-expression de ces protéines. Par ailleurs, bien que des isoformes tronquées d'ANXA6 aient été rapportées chez les souris mdx (Demonbreun, Allen, et al., 2016; Swaggart et al., 2014), nous n'avons pas détecté de telles isoformes dans nos expériences.

Face à un stress mécanique répété, les lignées DMD montrent un profil d'expression des ANX similaire à celui des lignées LGMDR2, sans modification significative. Comparées aux cellules contrôles, les ANXA1, A2 et A5 sont surexprimées en condition basale et leur expression reste inchangée après le stress. Pour rappel, les ANXA5 et A6 voient leur expression augmentée après un stress mécanique répété dans les lignées contrôles. Pour le cas de l'ANXA5, on peut supposer que le niveau élevé en condition basale explique l'absence de variation suite à un stress, la surexpression d'ANXA5 suffisant pour faire face aux dommages causés.

L'analyse du trafic des ANX dans le cadre d'irradiation laser a révélé que seule l'ANXA1 présentait une altération dans son recrutement qui est à la fois retardé et de plus faible intensité. Cela est surprenant si l'on considère que l'ANXA1 est surexprimée en condition basale et qu'un stress lui fait conserver cette surexpression. On pourrait s'attendre à ce que l'ANXA2, au vu de

sa surexpression en condition basale, présente un recrutement plus important. Mais ce n'est pas le cas. Cela pourrait s'expliquer par le sarcolemme mécaniquement plus fragile et des dommages nombreux à réparer, nécessitant la répartition de cette protéine en différents sites de lésion. Globalement, l'absence de dystrophine ne semble donc pas perturber le recrutement des ANXA2, A4 et A6.

Enfin, les lignées DMD étudiées exhibent des capacités myogéniques variables, soit plus élevées que dans les contrôles soit réduites. Cependant, étant donné que les deux lignées DMD présentent des mutations similaires (délétion des exons 48 à 50), ces variations pourraient être dues à des facteurs individuels plutôt qu'à des différences mutationnelles. Il faut rappeler que la lignée 578 a été établie à partir d'un adolescent de 14 ans alors que la lignée 6594, à partir d'un nourrisson de 20 mois. Cette différence peut expliquer la plus grande capacité myogénique de la lignée 578, qui est même supérieure aux cellules contrôles. Des études antérieures ont montré une augmentation du nombre de cavéoles dans les muscles des patients atteints de DMD, associée à une surexpression de CAV3 (Bonilla et al., 1981). Or, comme précédemment stipulé, cette dernière, participe au remodelage du cytosquelette pendant la différenciation et la fusion des myocytes (Volonte et al., 2003), ce qui pourrait expliquer ce résultat. En outre, il a été montré que la surexpression de CAV3 dans les fibres musculaires squelettiques était suffisante pour induire un phénotype de DMD (Galbiati et al., 2000).

Ainsi, la physiopathologie de la DMD semble résulter à la fois d'un défaut de réparation membranaire au niveau cellulaire, comme observé dans la LGMDR2, et d'une altération des processus de régénération musculaire au niveau tissulaire, comme dans la RMD.

## **5. La dystrophie facio-scapulo-humérale**

Comme la RMD2, la FSHD1 a fait l'objet de relativement peu d'études sous l'angle de la réparation membranaire. En 2020, Bittel et collaborateurs ont établi un lien entre la FSHD1 et un déficit de réparation membranaire *in vivo* dans des myofibres murines, ainsi qu'*in vitro* dans des cellules musculaires humaines (Bittel et al., 2020). Cependant, nos résultats n'ont pas permis de confirmer ce défaut de réparation du sarcolemme dans les cellules humaines FSHD1. L'étude de l'expression des ANX a mis en évidence la surexpression significative de l'ANXA1 au niveau protéique, en condition basale dans cette pathologie, une observation qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été rapportée dans la littérature.

Dans le cadre de la FSHD1, nous observons, comme dans les pathologies LGMDR2 et DMD, une absence d'adaptation des niveaux d'expression protéique des ANX après un stress

mécanique répété. Ce profil est similaire à celui des cellules contrôles pour l'ANXA1 et l'ANXA2, bien qu'il faille rappeler que l'ANXA1 est déjà surexprimée en condition basale dans les cellules FSHD1.

L'analyse du trafic des ANX n'a révélé aucune altération significative du recrutement des annexines par rapport aux contrôles. La surexpression au niveau basale de l'ANXA1 pourrait, à nouveau, s'expliquer par la fragilité du sarcolemme, comme suggéré par les ruptures spontanées observées lors de nos expériences d'irradiation, indiquant que le sarcolemme des cellules FSHD1 pourrait subir des dommages récurrents et nombreux. L'absence d'un recrutement significatif au site de rupture induit par irradiation laser s'expliquerait par de multiples sollicitations de l'ANXA1 ailleurs dans la cellule. La surexpression d'ANXA1 serait une réponse à ce contexte physiopathologique.

La pathologie FSHD1 est la seule pathologie étudiée dont les lignées cellulaires présentent des résultats homogènes en termes de capacité myogénique. En effet, les deux lignées montrent une exacerbation significative du processus de différenciation par rapport aux contrôles. Cette homogénéité laisse penser que les différences observées sont liées à la pathologie plutôt qu'à des variabilités intra-individuelles, bien que cette dernière possibilité ne soit pas à exclure.

## **6. L'implication des cellules auxiliaires dans le processus de réparation membranaire**

Jusqu'à présent, seules les études sur les macrophages ont exploré l'implication des cellules auxiliaires dans le processus de réparation membranaire, ce qui nous a conduit à concentrer nos efforts sur ces cellules.

Comme mentionné précédemment, lorsque le sarcolemme subit une lésion, un "patch" lipidique se forme pour colmater la brèche. Ce patch, constitué de membranes provenant de diverses vésicules intracellulaires, doit ensuite être éliminé afin de restaurer l'intégrité de la membrane. Le rôle des macrophages dans cette phase de réparation a été rapporté (Middel et al., 2016). Ce processus est facilité par l'enrichissement sélectif de la phosphatidylsérine (PS) au site de la lésion, la PS servant de signal pour la phagocytose par les macrophages (Borisenko et al., 2003). Il est bien établi que l'orchestration de la réponse inflammatoire par les macrophages passe par l'activation séquentielle des phénotypes M1 et M2, qui dictent leurs différents comportements et aptitudes. Dans un premier temps, il était donc essentiel de générer ces profils distincts. L'optimisation du protocole et la recherche des AC appropriés ont été laborieuses et fastidieuses. Les AC, initialement inefficaces en Western-Blot, ont dû être testés en immunomarquage, ce

qui a nécessité des ajustements constants en fonction des succès et des échecs. La dichotomie M1/M2 étant théorique, l'interprétation des résultats s'avère complexe. Les macrophages activés par les DAMPS ou par la DEX présentent plutôt des tendances M1 ou M2, avec des ratios de cellules marquées aux différents AC plutôt qu'un profil clair et sans équivoque.

Concernant les expériences de coculture, l'absence d'anticorps fonctionnels à ce moment-là nous a empêchés de caractériser précisément le phénotype des macrophages, responsables d'un retard de fusion chez les myoblastes sains mais pas les myoblastes dysferlinopathiques et dystrophinopathiques. Cependant, étant donné que les macrophages M1 stimulent la prolifération des cellules satellites (Fuchs & Blau, 2020; Tidball, 2017) et que les macrophages M2 favorisent la différenciation des myoblastes dérivés de ces cellules (Cantini & Carraro, 1995; Dumont & Frenette, 2010), nous avons supposé que les macrophages impliqués tendaient vers un phénotype M1. Toutefois, le milieu de culture utilisé dans nos cocultures, préalablement à l'induction de la différenciation, contenait du DEX, inducteur du profil M2, compliquant ainsi l'interprétation.

La conclusion principale de nos expériences est la validation de marqueurs spécifiques pour chaque profil macrophagique. Ces marqueurs seront utiles pour caractériser le phénotype des macrophages en interaction avec des cellules musculaires endommagées. Ce travail ouvre donc la voie à une compréhension plus fine des interactions entre macrophages et cellules musculaires, et offre des outils précieux pour l'analyse des macrophages dans des conditions pathologiques spécifiques, comme les dystrophies musculaires



## 7. Conclusion générale

	Repair assay	Survie	Expression basale				Expression post-stress				Trafic lors d'un dommage					
			A1	A2	A5	A6	A1	A2	A5	A6	A1	A2	A4	A5	A6	
Ctrl	✓	✓							↑	↑	✓	✓	✓	✓	✓	
RMD2	✓	✓	↑				↑		↑	↑						
LGMDR2	X	X	↑		↑						X	X	X		X	
DMD	X	X	↑	↑	↑						X	X	X	X	X	
FSHD1	✓	✓	↑								X	X	✓		X	

**Tableau 8 : Récapitulatif des principaux résultats obtenus par pathologie**

Test de réparation membranaire : ✓ : réparation fonctionnelle ; X rouge : défaut de réparation ; survie cellulaire : ✓ vert = survie optimale ; X rouge = mortalité significative ; expression basale : ↑ = expression accrue par rapport au contrôle ; expression post-stress : ↑ = expression accrue par rapport à la condition sans stress ; trafic lors d'un dommage : différence significative dans le comportement et/ou la quantité de protéines recrutées.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent une meilleure compréhension de l'implication de la réparation membranaire et des annexines dans le contexte des dystrophies musculaires. Si un défaut de réparation membranaire ne semble pas être un mécanisme commun à l'ensemble des dystrophies musculaires, il touche deux dystrophies musculaires majeures, i.e. la DMD et LGMDR2. Nous avons observé en revanche qu'une dérégulation de l'expression et/ou du trafic des ANX dans les cellules musculaires de patients atteints de dystrophies musculaires est systématiquement observé (Tableau 8). Dans le détail ce travail a permis de :

### Progrès méthodologiques

- Développement de la méthode innovante du muscle *shear-stress assay*, une alternative rapide et peu onéreuse qui, comparée à l'ablation laser, permet d'appliquer des contraintes mécaniques à une population cellulaire plutôt qu'à une cellule unique.
- Démonstration que les myoblastes acquièrent la capacité de réparer leur membrane dès les premières 24h de la différenciation.

### Dystrophies musculaires et dérégulation des ANX

- Confirmation que la LGMDR2 et découverte que la DMD sont associées à un défaut de réparation membranaire chez l'Homme.
- Mise en évidence de la surexpression des ANXA1, A2 et A5 dans des contextes pathologiques, mais avec des nuances interpathologiques et interindividuelles. De manière globale, ces surexpressions pourraient correspondre à une réponse des cellules

musculaires à plus grande fragilité membranaire ou un défaut de réparation membranaire

- Identification que la RMD2 n'entraîne pas de défaut de réparation membranaire malgré une expression altérée des ANX. Nous considérons désormais la CAV3 comme un indicateur de différenciation et non comme un élément clé de la machinerie de réparation.
- Démonstration que les cellules FSHD1 présentent une surexpression basale de l'ANXA1 mais une résistance aux dommages membranaires.
- Identification que l'absence d'adaptation des ANXA5 et A6 dans la LGMDR2, la DMD et la FSHD n'est pas corrélé à un défaut de réparation, la FSHD1 ne présentant pas de défaut de réparation dans nos expériences.

#### Trafic et fonction des annexines

- Identification d'altérations dans le recrutement séquentiel des ANX, notamment le retard et/ou l'affaiblissement de l'ANXA1, A2 et A6 dans la LGMDR2 et la DMD, deux pathologies associées à un défaut de réparation membranaire.
- Identification dans la FSHD1, d'un recrutement accru pour l'ANXA1, A2 et A6.
- Découverte que l'ANXA2, qui interagit avec la dysferline, semble peu impactée par son absence dans les dysferlinopathies lors de son recrutement au site de rupture.



## VI. Perspectives

L'ensemble de ce travail de thèse a permis d'explorer, les interrelations entre réparation membranaire et expression des ANX pour 4 pathologies différentes. Ce travail nécessiterait toutefois une investigation plus poussée. Il serait pertinent dans un premier temps d'évaluer le niveau d'expression (ARNm et protéines) des ANX dans les myoblastes différenciés 24 heures, afin de permettre un continuum cohérent vis-à-vis des expériences de stress par cisaillement qui ne peuvent être effectuées que sur ce modèle cellulaire. Il pourrait notamment s'avérer plus simple d'analyser le contenu en ARNm sur ces cellules. L'analyse des ARNm sur myotubes a en effet fourni des résultats très disparates, même entre les clones d'une même lignée. L'utilisation de la microscopie corrélative (CLEM) pourrait permettre de déterminer la localisation précise des ANX lors d'un dommage chez les lignées dystrophiques et d'évaluer si le mode d'action de ces ANX est altéré dans ces pathologies.

Il faudrait poursuivre l'optimisation de la détection des profils macrophagiques. Une fois ce prérequis rempli, il pourra être intéressant d'évaluer quel profil est présent dans les milieux de culture des lignées dysferlinopathiques et étendre ce protocole de cocultures aux autres lignées cellulaires dystrophiques. Des milieux conditionnés de macrophages stimulés au DEX ou aux DAMPS ont été produits et congelés en fin de thèse. La prochaine étape serait d'incuber des myoblastes dans ces milieux, d'analyser leur capacité myogénique. A l'inverse, des milieux conditionnés de myoblastes pathologiques pourront être placés au contact des macrophages afin de déterminer le phénotype promu.



## VII. Bibliographie

- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., & Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(5), 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Atanassoff, A. P., Wolfmeier, H., Schoenauer, R., Hostettler, A., & Ring, A. (2014). Microvesicle Shedding and Lysosomal Repair Fulfill Divergent Cellular Needs during the Repair of Streptolysin O-Induced Plasmalemmal Damage. *PLoS ONE*, *9*(2), 89743. <https://doi.org/10.7892/boris.50032>
- Audhya, I. F., Cheung, A., Szabo, S. M., Flint, E., Wehl, C. C., & Gooch, K. L. (2022). Progression to Loss of Ambulation Among Patients with Autosomal Recessive Limb-girdle Muscular Dystrophy: A Systematic Review. In *Journal of Neuromuscular Diseases* (Vol. 9, Issue 4, pp. 477–492). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JND-210771>
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S., & Draeger, A. (2002). Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *FASEB Journal*, *16*, 1177–1184. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0070com>
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2009). Intracellular Ca<sup>2+</sup> operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation*, *16*(8), 1126–1134. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.30>
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation*, *18*(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.81>
- Ballouhey, O., Courrier, S., Kergourlay, V., Gorokhova, S., Cerino, M., Krahn, M., Lévy, N., & Bartoli, M. (2021). The Dysferlin Transcript Containing the Alternative Exon 40a is Essential for Myocyte Functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.754555>
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P. L., & Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, *423*(6936), 168–172. <https://doi.org/10.1038/nature01604>

- Barnes, J. M., Nauseef, J. T., & Henry, M. D. (2012). Resistance to Fluid Shear Stress Is a Conserved Biophysical Property of Malignant Cells. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050973>
- Barthélémy, F., Defour, A., Lévy, N., Krahn, M., & Bartoli, M. (2018). Muscle Cells Fix Breaches by Orchestrating a Membrane Repair Ballet. In *Journal of Neuromuscular Diseases* (Vol. 5, Issue 1, pp. 21–28). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JND-170251>
- Bergsma-Schutter, W., Govorukhina, N. I., Mazeret-Dubut, C., Mazeret, S., Drakapoulou, E., Bystrykh, L., Oling, F., Mukhopadhyay, A., Reviakine, I., Lai Kee Him, J., & Brisson, A. (2003). Self-assembly of annexin A5 on lipid membranes. In . (pp. 61 - 78). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9214-74>
- Bez Batti Angulski, A., Hosny, N., Cohen, H., Martin, A. A., Hahn, D., Bauer, J., & Metzger, J. M. (2023). Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1183101>
- Biferali, B., Proietti, D., Mozzetta, C., & Madaro, L. (2019). Fibro–Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01074>
- Bittel, A. J., Sreetama, S. C., Bittel, D. C., Horn, A., Novak, J. S., Yokota, T., Zhang, A., Maruyama, R., Lim, K. R. Q., Jaiswal, J. K., & Chen, Y. W. (2020). Membrane repair deficit in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21155575>
- Bittel, & Jaiswal, J. K. (2019). Contribution of extracellular vesicles in rebuilding injured muscles. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00828>
- Bitto, E., & Cho, W. (1999). Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry*, 38(42), 14094–14100. <https://doi.org/10.1021/bi990457p>
- Blackwood, R. A., & Ernst, J. D. (1990). Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *The Biochemical Journal*, 266(1), 195–200. <https://doi.org/10.1042/bj2660195>
- Blain, A. M., & Straub, V. W. (2011).  $\delta$ -Sarcoglycan-deficient muscular dystrophy: from discovery to therapeutic approaches. In *Skeletal Muscle* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-13>
- Blouin, C. M. (2013). Endocytose sans clathrine: La voie est libre! In *Medecine/Sciences* (Vol. 29, Issue 10, pp. 890–896). <https://doi.org/10.1051/medsci/20132910017>

- Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K. M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., Itakura, M., Robitaille, Y., Parent, L., Baas, F., Mizuta, K., Kamata, N., Richard, I., Linssen, W. H. J. P., Mahjneh, I., de Visser, M., Bashir, R., & Brais, B. (2010). Recessive Mutations in the Putative Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 5 Cause Proximal LGMD2L and Distal MMD3 Muscular Dystrophies. *American Journal of Human Genetics*, *86*(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.013>
- Bonilla, E., Fischbeck, K., & Schotland, D. L. (1981). Freeze-Fracture Studies of Muscle Caveolae in Human Muscular Dystrophy. *The American Journal of Pathology*.
- Borgonovo, B., Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Bachi, A., & Meldolesi, J. (2002). Regulated exocytosis: A novel, widely expressed system. In *Nature Cell Biology* (Vol. 4, Issue 12, pp. 955–962). <https://doi.org/10.1038/ncb888>
- Borisenko, G. G., Matura, T., Liu, S. X., Tyurin, V. A., Jianfei, J., Serinkan, F. B., & Kagan, V. E. (2003). Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells - Existence of a threshold. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *413*(1), 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00083-3)
- Bouter, A., Gounou, C., Bérat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., D'Estaintot, B. L., Pöschl, E., Brachvogel, B., & Brisson, A. R. (2011). Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature Communications*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1270>
- Bouvet, F., Ros, M., Bonedeau, E., Croissant, C., Frelin, L., Saltel, F., Moreau, V., & Bouter, A. (2020). Defective membrane repair machinery impairs survival of invasive cancer cells. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77902-5>
- Boye, T. L., Jeppesen, J. C., Maeda, K., Pezeshkian, W., Solovyeva, V., Nylandsted, J., & Simonsen, A. C. (2018). Annexins induce curvature on free-edge membranes displaying distinct morphologies. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28481-z>
- Boye, T. L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sønder, S. L., Haeger, S. C., Gerke, V., Simonsen, A. C., & Nylandsted, J. (2017). Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01743-6>
- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). XA Special Population of regulatory T Cells Potentiates muscle repair. *Cell*, *155*(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054>



- Cagliani, R., Magri, F., Toscano, A., Merlini, L., Fortunato, F., Lamperti, C., Rodolico, C., Prelle, A., Sironi, M., Aguenouz, M., Ciscato, P., Uncini, A., Moggio, M., Bresolin, N., & Comi, G. P. (2005). Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Human Mutation*, 26(3), 283. <https://doi.org/10.1002/humu.9364>
- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J. K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H., & Ma, J. (2009). MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature Cell Biology*, 11(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/ncb1812>
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J. K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., & Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15894–15902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009589>
- Cantini, M., & Carraro, U. (1995). Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 54(1), 121–128. <https://doi.org/10.1097/00005072-199501000-00014>
- Capitanio, D., Moriggi, M., Torretta, E., Barbacini, P., De Palma, S., Viganò, A., Lochmüller, H., Muntoni, F., Ferlini, A., Mora, M., & Gelfi, C. (2020). Comparative proteomic analyses of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy muscles: changes contributing to preserve muscle function in Becker muscular dystrophy patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(2), 547–563. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12527>
- Caratti, G., Desgeorges, T., Juban, G., Stifel, U., Fessard, A., Koenen, M., Caratti, B., Théret, M., Skurk, C., Chazaud, B., Tuckermann, J. P., & Mounier, R. (2023). Macrophagic AMPK $\alpha$ 1 orchestrates regenerative inflammation induced by glucocorticoids. *EMBO Reports*, 24(2). <https://doi.org/10.15252/embr.202255363>
- Carmeille, R. (2015). Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire du muscle strié squelettique et du placenta humains. [Thèse de doctorat, Université de Bordeaux]. <https://theses.fr/2015BORD0354>
- Carmeille, R., Bouvet, F., Tan, S., Croissant, C., Gounou, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Brisson, A. R., & Bouter, A. (2016). Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(9), 2267–2279. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.003>

- Carmeille, R., Croissant, C., Bouvet, F., & Bouter, A. (2017). Membrane repair assay for human skeletal muscle cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1668, pp. 195–207). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8_14)
- Carmeille, R., Degrelle, S. A., Plawinski, L., Bouvet, F., Gounou, C., Evain-Brion, D., Brisson, A. R., & Bouter, A. (2015). Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(9), 2033–2044. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.038>
- Castro-Gomes, T., Corrotte, M., Tam, C., & Andrews, N. W. (2016). Plasma membrane repair is regulated extracellularly by proteases released from lysosomes. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152583>
- Ceafalan, L. C., Fertig, T. E., Popescu, A. C., Popescu, B. O., Hinescu, M. E., & Gherghiceanu, M. (2018). Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. *Cell Adhesion and Migration*, *12*(3), 228–235. <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1346774>
- Chandra, G., Sreetama, S. C., Mázala, D. A. G., Charton, K., VanderMeulen, J. H., Richard, I., & Jaiswal, J. K. (2021). Endoplasmic reticulum maintains ion homeostasis required for plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, *220*(5). <https://doi.org/10.1083/JCB.202006035>
- Chatterjee, P., Seal, S., Mukherjee, S., Kundu, R., Mukherjee, S., Ray, S., Mukhopadhyay, S., Majumdar, S. S., & Bhattacharya, S. (2013). Adipocyte fetuin-a contributes to macrophage migration into adipose tissue and polarization of macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(39), 28324–28330. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.495473>
- Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., & Chretien, F. (2009). Dual and Beneficial Roles of Macrophages During Skeletal Muscle Regeneration. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *37*(1), 18–22. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318190ebdb>
- Chiara Nascimbeni, A., Fanin, M., Tasca, E., & Angelini, C. (2008). Molecular pathology and enzyme processing in various phenotypes of acid maltase deficiency. *Neurology*, *70*(8), 617–626. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000299892.81127.8e>
- Choi, C. H., Chung, J. Y., Chung, E. J., Sears, J. D., Lee, J. W., Bae, D. S., & Hewitt, S. M. (2016). Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer. *BMC Cancer*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2459-y>
- Christiansen, J., Güttsches, A. K., Schara-Schmidt, U., Vorgerd, M., Heute, C., Preusse, C., Stenzel, W., & Roos, A. (2022). ANO5-related muscle diseases: From clinics and genetics

- to pathology and research strategies. In *Genes and Diseases* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1506–1520). Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.01.001>
- Contreras, O., Rossi, F. M. V., & Theret, M. (2021). Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors—time for new definitions. In *Skeletal Muscle* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00265-6>
- Cooper, S. T., & Mcneil, P. L. (2015). Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol Rev*, *95*, 1205–1240. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2014>.-Eukaryotic
- Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Maugel, T. K., & Andrews, N. W. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *ELife*, *2013*(2). <https://doi.org/10.7554/eLife.00926>
- Creutz, C. E., Pazoles, C. J., & Pollard, H. B. (1978). Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, *253*(8), 2858–2866. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40901-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40901-x)
- Crisafulli, S., Sultana, J., Fontana, A., Salvo, F., Messina, S., Messina, S., & Trifirò, G. (2020). Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: An updated systematic review and meta-analysis. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>
- Croissant, C. (2019). Le rôle des annexines dans la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines [Thèse de doctorat, Université de Bordeaux]. <https://theses.fr/2019BORD0316>
- Croissant, C., Carneille, R., Brévar, C., & Bouter, A. (2021). Annexins and membrane repair dysfunctions in muscular dystrophies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22105276>
- Croissant, C., Gounou, C., Bouvet, F., Tan, S., & Bouter, A. (2020). Annexin-a6 in membrane repair of human skeletal muscle cell: A role in the cap subdomain. *Cells*, *9*(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells9071742>
- Croissant, C., Gounou, C., Bouvet, F., Tan, S., & Bouter, A. (2022). Trafficking of Annexins during Membrane Repair in Human Skeletal Muscle Cells. *Membranes*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/membranes12020153>
- Crosbie, R. H., Straub, V., Yun, H.-Y., Lee, J. C., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Campbell, K. P. (1998). mdx muscle pathology is independent of

- nNOS perturbation. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/hmg/7.5.823>.
- Crosby, K. C., Postma, M., Hink, M. A., Zeelenberg, C. H. C., Adjobo-Hermans, M. J. W., & Gadella, T. W. J. (2013). Quantitative analysis of self-association and mobility of Annexin A4 at the plasma membrane. *Biophysical Journal*, *104*(9), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.057>
- Cubells, L., Vilà De Muga, S., Tebar, F., Wood, P., Evans, R., Ingelmo-torres, M., Calvo, M., Gaus, K., Pol, A., Grewal, T., & Enrich, C. (2007). Annexin a6-Induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex. *Traffic*, *8*(11), 1568–1589. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00640.x>
- Cui, C.-Y., & Ferrucci, L. (2020). Macrophages in skeletal muscle aging. *Aging*, *12*(1), 3–4. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>
- D’Acquisto, F., Perretti, M., & Flower, R. J. (2008). Annexin-A1: A pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 155, Issue 2, pp. 152–169). <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.252>
- d’Agata, L., Rassinoux, P., Gounou, C., Bouvet, F., Bouragba, D., Mamchaoui, K., & Bouter, A. (2024). A Novel Assay Reveals the Early Setting-Up of Membrane Repair Machinery in Human Skeletal Muscle Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.30662>
- Dalli, J., Norling, L. V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K. Y., & Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, *112*(6), 2512–2519. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140533>
- Dassah, M. A., Almeida, D., Hahn, R., Bonaldo, P., Worgall, S., & Hajjar, K. A. (2014). Annexin A2 mediates secretion of collagen VI, pulmonary elasticity and apoptosis of bronchial epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *127*(4), 828–844. <https://doi.org/10.1242/jcs.137802>
- Davenport, N. R., Sonnemann, K. J., Eliceiri, K. W., & Bement, W. M. (2016). Membrane dynamics during cellular wound repair. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(14), 2272–2285. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0223>
- Davis, D. B., Doherty, K. R., Delmonte, A. J., & McNally, E. M. (2002). Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(25), 22883–22888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201858200>
- De Bruyn, A., Montagnese, F., Holm-Yildiz, S., Scharff Poulsen, N., Stojkovic, T., Behin, A., Palmio, J., Jokela, M., De Bleeker, J. L., De Visser, M., Van Der Kooi, A. J., Ten Dam,

- L., Domínguez González, C., Maggi, L., Gallone, A., Kostera-Pruszczyk, A., Macias, A., Łusakowska, A., Nedkova, V., ... Claeys, K. G. (2023). Anoctamin-5 related muscle disease: clinical and genetic findings in a large European cohort. *Brain*, *146*(9), 3800–3815. <https://doi.org/10.1093/brain/awad088>
- De La Fuente, M., & Parra, A. V. (1995). Vesicle Aggregation by Annexin I: Role of a Secondary Membrane Binding Site? In *Biochemistry* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1021/bi00033a010>
- Defour, A., Medikayala, S., Van der Meulen, J. H., Hogarth, M. W., Holdreith, N., Malatras, A., Duddy, W., Boehler, J., Nagaraju, K., & Jaiswal, J. K. (2017). Annexin A2 links poor myofiber repair with inflammation and adipogenic replacement of the injured muscle. *Human Molecular Genetics*, *26*(11), 1979–1991. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx065>
- Defour, A., Van Der Meulen, J. H., Bhat, R., Bigot, A., Bashir, R., Nagaraju, K., & Jaiswal, J. K. (2014). Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death and Disease*, *5*(6). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.272>
- Demonbreun, A. R., Allen, M. V., Warner, J. L., Barefield, D. Y., Krishnan, S., Swanson, K. E., Earley, J. U., & McNally, E. M. (2016). Enhanced Muscular Dystrophy from Loss of Dysferlin Is Accompanied by Impaired Annexin A6 Translocation after Sarcolemmal Disruption. *American Journal of Pathology*, *186*(6), 1610–1622. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.005>
- Demonbreun, A. R., Bogdanovic, E., Vaught, L. A., Reiser, N. L., Fallon, K. S., Long, A. M., Oosterbaan, C. C., Hadhazy, M., Page, P. G., Raj Joseph, P. B., Cowen, G., Telenson, A. M., Khatri, A., Sadleir, K. R., Vassar, R., & McNally, E. M. (2022). A conserved annexin A6-mediated membrane repair mechanism in muscle, heart, and nerve. *JCI Insight*, *7*(14). <https://doi.org/10.1172/jci>
- Demonbreun, A. R., Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., Allen, M. V., Swanson, K. E., & McNally, E. M. (2016). An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *Journal of Cell Biology*, *213*(6), 705–718. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512022>
- Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y., & Tidball, J. G. (2012). IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. *Journal of Immunology*, *189*(7), 3669–3680. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103180>

- Deng, S., Wang, J., Hou, L., Li, J., Chen, G., Jing, B., Zhang, X., & Yang, Z. (2012). Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncology Letters*, 5(1), 107–112. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.959>
- Desguerre, I., Arnold, L., Vignaud, A., Cuvellier, S., Yacoub-youssef, H., Gherardi, R. K., Chelly, J., Chretien, F., Mounier, R., Ferry, A., & Chazaud, B. (2012). A new model of experimental fibrosis in hindlimb skeletal muscle of adult mdx mouse mimicking muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*, 45(6), 803–814. <https://doi.org/10.1002/mus.23341>
- Dort, J., Fabre, P., Molina, T., & Dumont, N. A. (2019). Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. In *Stem Cells International* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4761427>
- Draeger, A., Monastyrskaya, K., & Babiychuk, E. B. (2011). Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 81, Issue 6, pp. 703–712). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.12.027>
- Dumont, N., & Frenette, J. (2010). Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: A mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *American Journal of Pathology*, 176(5), 2228–2235. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090884>
- Echigoya, Y., Lim, K. R. Q., Melo, D., Bao, B., Trieu, N., Mizobe, Y., Maruyama, R., Mamchaoui, K., Tanihata, J., Aoki, Y., Takeda, S., Mouly, V., Duddy, W., & Yokota, T. (2019). Exons 45–55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene. *Molecular Therapy*, 27(11), 2005–2017. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.07.012>
- Eddleman, C. S., Ballinger, M. L., Smyers, M. E., Fishman, H. M., & Bittner, G. D. (1998). Endocytotic Formation of Vesicles and Other Membranous Structures Induced by Ca<sup>2+</sup> and Axolemmal Injury. *Journal of Neuroscience*, 18(11), 4029–4041. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-11-04029.1998>
- Eden, E. R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T. P., & Futter, C. E. (2016). Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport. *Developmental Cell*, 37(5), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.005>
- Enrich, C., Rentero, C., de Muga, S. V., Reverter, M., Mulay, V., Wood, P., Koese, M., & Grewal, T. (2011). Annexin A6-Linking Ca<sup>2+</sup> signaling with cholesterol transport. In

- Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1813, Issue 5, pp. 935–947). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.015>
- Enrich, C., Rentero, C., Hierro, A., & Grewal, T. (2015). Role of cholesterol in SNARE-mediated trafficking on intracellular membranes. In *Journal of Cell Science* (Vol. 128, Issue 6, pp. 1071–1081). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.164459>
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1991). Membrane Organization of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. In *Cell* (Vol. 66). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90035-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90035-w)
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1993). Dystrophin and the membrane skeleton. In *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(05\)80012-2](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(05)80012-2)
- Fankhaenel, M., Hashemi, F. S. G., Mourao, L., Lucas, E., Hosawi, M. M., Skipp, P., Morin, X., Scheele, C. L. G. J., & Elias, S. (2023). Annexin A1 is a polarity cue that directs mitotic spindle orientation during mammalian epithelial morphogenesis. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35881-x>
- Feng, Q., Snider, L., Jagannathan, S., Tawil, R., van der Maarel, S. M., Tapscott, S. J., & Bradley, R. K. (2015). A feedback loop between nonsense-mediated decay and the retrogene DUX4 in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *ELife*, *2015*(4). <https://doi.org/10.7554/eLife.04996>
- Flanigan, K. M., Ceco, E., Lamar, K. M., Kaminoh, Y., Dunn, D. M., Mendell, J. R., King, W. M., Pestronk, A., Florence, J. M., Mathews, K. D., Finkel, R. S., Swoboda, K. J., Gappmaier, E., Howard, M. T., Day, J. W., McDonald, C., McNally, E. M., & Weiss, R. B. (2013). LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, *73*(4), 481–488. <https://doi.org/10.1002/ana.23819>
- Florentsen, C. D., Kamp-Sonne, A., Moreno-Pescador, G., Pezeshkian, W., Hakami Zanjani, A. A., Khandelia, H., Nylandsted, J., & Bendix, P. M. (2021). Annexin A4 trimers are recruited by high membrane curvatures in giant plasma membrane vesicles. *Soft Matter*, *17*(2), 308–318. <https://doi.org/10.1039/d0sm00241k>
- Flower, R. J. (1988). Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *The British Journal of Pharmacology*, *94*, 987–1015. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11614.x>
- Foltz, S. J., Cui, Y. Y., Choo, H. J., & Hartzell, H. C. (2021). ANO5 ensures trafficking of annexins in wounded myofibers. *Journal of Cell Biology*, *220*(3). <https://doi.org/10.1083/JCB.202007059>
- Forcina, L., Cosentino, M., & Musarò, A. (2020). Mechanisms regulating muscle regeneration: Insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing. In *Cells* (Vol. 9,

Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).  
<https://doi.org/10.3390/cells9051297>

- Froehner, S. C., Reed, S. M., Anderson, K. N., Huang, P. L., & Percival, J. M. (2015). Loss of nNOS inhibits compensatory muscle hypertrophy and exacerbates inflammation and eccentric contraction-induced damage in mdx mice. *Human Molecular Genetics*, 24(2), 492–505. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu469>
- Fuchs, E., & Blau, H. M. (2020). Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches. In *Cell Stem Cell* (Vol. 27, Issue 4, pp. 532–556). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.011>
- Fulizio, L., Nascimbeni, A. C., Fanin, M., Piluso, G., Politano, L., Nigro, V., & Angelini, C. (2005). Molecular and muscle pathology in a series of caveolinopathy patients. *Human Mutation*, 25(1), 82–89. <https://doi.org/10.1002/humu.20119>
- Gabel, M., Delavoie, F., Royer, C., Tahouly, T., Gasman, S., Bader, M. F., Vitale, N., & Chasserot-Golaz, S. (2019). Phosphorylation cycling of Annexin A2 Tyr23 is critical for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(7), 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.013>
- Gailly, P., De Backer, F., Van Schoor, M., & Gillis, J. M. (2007). In situ measurements of calpain activity in isolated muscle fibres from normal and dystrophin-lacking mdx mice. *Journal of Physiology*, 582(3), 1261–1275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.132191>
- Galbiati, F., Volonté, D., Chu, J. B., Li, M., Fine, S. W., Fu, M., Bermudez, J., Pedemonte, M., Weidenheim, K. M., Pestell, R. G., Minetti, C., & Lisanti, M. P. (2000). Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *PNAS*, 97(17), 9689–9694. <https://doi.org/10.1073/pnas.160249097>
- Ganassi, M., & Zammit, P. S. (2022). Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cell-opathies. *European Journal of Translational Myology*, 32(1). <https://doi.org/10.4081/ejtm.2022.10064>
- Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M. P., & Minetti, C. (2010). Caveolinopathies: From the biology of caveolin-3 to human diseases. In *European Journal of Human Genetics* (Vol. 18, Issue 2, pp. 137–145). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.103>
- Geng, L. N., Yao, Z., Snider, L., Fong, A. P., Cech, J. N., Young, J. M., vanderMaarel, S. M., Ruzzo, W. L., Gentleman, R. C., Tawil, R., & Tapscott, S. J. (2012). DUX4 Activates Germline Genes, Retroelements, and Immune Mediators: Implications for



- Facioscapulohumeral Dystrophy. *Developmental Cell*, 22(1), 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.013>
- Gerke, V., Creutz, C. E., & Moss, S. E. (2005). Annexins: Linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 6, pp. 449–461). <https://doi.org/10.1038/nrm1661>
- Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 82(2), 331–371. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001.-Annexins>
- Gotow, T., Sakata, S. M., Funakoshi, T., & Uchiyama, Y. (1996). Preferential localization of Annexin V to the axon terminal. *Neuroscience*, 75(2), 507–521. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00295-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00295-3)
- Gounou, C., Bouvet, F., Liet, B., Prouzet-Mauléon, V., d’Agata, L., Harté, E., Argoul, F., Siegfried, G., Iggo, R., Khatib, A. M., & Bouter, A. (2023). Annexin-A5 and annexin-A6 silencing prevents metastasis of breast cancer cells in zebrafish. *Biology of the Cell*, 115(6). <https://doi.org/10.1111/boc.202200110>
- Gounou, C., Rouyer, L., Siegfried, G., Harté, E., Bouvet, F., d’Agata, L., Darbo, E., Lefeuvre, M., Derieppe, M. A., Bouton, L., Mélane, M., Chapeau, D., Martineau, J., Prouzet-Mauleon, V., Tan, S., Souleyreau, W., Saltel, F., Argoul, F., Khatib, A. M., ... Bouter, A. (2024). Inhibition of the membrane repair protein annexin-A2 prevents tumor invasion and metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81(1). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05049-3>
- Gozen, I., & Dommersnes, P. (2014). Pore dynamics in lipid membranes. *European Physical Journal: Special Topics*, 223(9), 1813–1829. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2014-02228-5>
- Grewal, T., & Enrich, C. (2009). Annexins - Modulators of EGF receptor signalling and trafficking. In *Cellular Signalling* (Vol. 21, Issue 6, pp. 847–858). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.031>
- Griffin, D. A., Johnson, R. W., Whitlock, J. M., Pozsgai, E. R., Heller, K. N., Grose, W. E., Arnold, W. D., Sahenk, Z., Hartzell, H. C., & Rodino-Klapac, L. R. (2016). Defective membrane fusion and repair in Anoctamin5-deficient muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 25(10), 1900–1911. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw063>
- Grindheim, A. K., Saraste, J., & Vedeler, A. (2017). Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1861, Issue 11, pp. 2515–2529). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>

- Hack, A. A., Ly, C. T., Jiang, F., Clendenin, C. J., Sigrist, K. S., Wollmann, R. L., & McNally, E. M. (1998). Sarcoglycan Deficiency Leads to Muscle Membrane Defects and Apoptosis Independent of Dystrophin. *Journal of Cell Biology*, 142(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.142.5.1279>
- Hamanaka, K., Šikrová, D., Mitsuhashi, S., Masuda, H., Sekiguchi, Y., Sugiyama, A., Shibuya, K., Lemmers, R. J. L. F., Goossens, R., Ogawa, M., Nagao, K., Obuse, C., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Kuwabara, S., Balog, J., Nishino, I., & Van Der Maarel, S. M. (2020). Homozygous nonsense variant in LRIF1 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 94(23), E2441–E2447. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009617>
- Han, R. (2011). Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. In *Skeletal Muscle* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-10>
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., Gavins, F. N. E., Perretti, M., Morris, J. F., Buckingham, J. C., & Flower, R. J. (2003). Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1<sup>-/-</sup> mouse. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2), 253–255. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0239fje>
- Hartzell, H. C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L. T., & Qu, Z. (2009). Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Journal of Physiology*, 587(10), 2127–2139. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163709>
- Hayes, M. J., Rescher, U., Gerke, V., & Moss, S. E. (2004). Annexin-Actin interactions. In *Traffic* (Vol. 5, Issue 8, pp. 571–576). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00210.x>
- Heitmann, A. S. B., Zanjani, A. A. H., Klenow, M. B., Mularski, A., Sønder, S. L., Lund, F. W., Boye, T. L., Dias, C., Bendix, P. M., Simonsen, A. C., Khandelia, H., & Nylandsted, J. (2021). Phenothiazines alter plasma membrane properties and sensitize cancer cells to injury by inhibiting annexin-mediated repair. *Journal of Biological Chemistry*, 297(2). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101012>
- Heredia, J. E., Mukundan, L., Chen, F. M., Mueller, A. A., Deo, R. C., Locksley, R. M., Rando, T. A., & Chawla, A. (2013). Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*, 153(2), 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053>
- Hernández-Deviez, D. J., Howes, M. T., Laval, S. H., Bushby, K., Hancock, J. F., & Parton, R. G. (2008). Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6476–6488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708776200>

- Hernández-Deviez, D. J., Martin, S., Laval, S. H., Lo, H. P., Cooper, S. T., North, K. N., Bushby, K., & Parton, R. G. (2006). Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Human Molecular Genetics*, *15*(1), 129–142. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi434>
- Herrmann, R., Straub, V., Blank, M., Kutzick, C., Franke, N., Jacob, E. N., Lenard, H.-G., Kröger, S., & Voit, T. (2000). Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 9, Issue 15). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018926>
- Heydemann, A., Huber, J. M., Demonbreun, A., Hadhazy, M., & McNally, E. M. (2005). Genetic background influences muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, *15*(9–10), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.05.004>
- Hoffman, J. F. (1992). On red blood cells, hemolysis and resealed ghosts. *Adv Exp Med Biol*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3030-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3030-5_1)
- Hofhuis, J., Bersch, K., Büssenschütt, R., Drzymalski, M., Liebetanz, D., Nikolaev, V. O., Wagner, S., Maier, L. S., Gärtner, J., Klinge, L., & Thoms, S. (2017). Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *Journal of Cell Science*, *130*(5), 841–852. <https://doi.org/10.1242/jcs.198861>
- Hogarth, M. W., Defour, A., Lazarski, C., Gallardo, E., Manera, J. D., Partridge, T. A., Nagaraju, K., & Jaiswal, J. K. (2019). Fibroadipogenic progenitors are responsible for muscle loss in limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10438-z>
- Holopainen, J. M., Angelova, M. I., & Kinnunen, P. K. J. (2000). Vectorial Budding of Vesicles by Asymmetrical Enzymatic Formation of Ceramide in Giant Liposomes. *Biophysical Journal*, *78*(2), 830–838. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76640-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76640-9)
- Horn, A., & Jaiswal, J. K. (2018). Cellular mechanisms and signals that coordinate plasma membrane repair. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 75, Issue 20, pp. 3751–3770). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2888-7>
- Huang, Y., de Morrée, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R. R., Dunnen, J. T., & van der Maarel, S. M. (2008). Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, *17*(12), 1855–1866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn081>
- Huber, R., Römisch, J., & Paques, E. P. (1990). The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *The EMBO Journal*, *9*(12), 3867–3874. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07605.x>

- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup> dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology*, *180*(5), 905–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708010>
- Im, J. H., Buzzelli, J. N., Jones, K., Franchini, F., Gordon-Weeks, A., Markelc, B., Chen, J., Kim, J., Cao, Y., & Muschel, R. J. (2020). FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17914-x>
- Jaiswal, J. K., Lauritzen, S. P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S. M., Kallunki, T., Jäättelä, M., & Nylandsted, J. (2014). S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4795>
- Jia, J., Bissa, B., Brecht, L., Allers, L., Choi, S. W., Gu, Y., Zbinden, M., Burge, M. R., Timmins, G., Hallows, K., Behrends, C., & Deretic, V. (2020). AMPK, a Regulator of Metabolism and Autophagy, Is Activated by Lysosomal Damage via a Novel Galectin-Directed Ubiquitin Signal Transduction System. *Molecular Cell*, *77*(5), 951-969.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.028>
- Jia, L., Wang, Y., Ma, X., Wang, H., & Fu, R. (2023). A Study on the Role of Wip1 in Renal Fibrosis by Modulating Macrophage Phenotype. *Archives of medical research*, *54*(4), 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2023.04.003>
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, *343*(6174). <https://doi.org/10.1126/science.1247136>
- Jin, M., Smith, C., Hsieh, H. Y., Gibson, D. F., & Tait, J. F. (2004). Essential role of B-helix calcium binding sites in annexin V-membrane binding. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40351–40357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405846200>
- Juban, G., & Chazaud, B. (2017). Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. In *FEBS Letters* (Vol. 591, Issue 19, pp. 3007–3021). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12703>
- Juban, G., Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Kernou, A., Arnold, L., Boisson, C., Ben Larbi, S., Magnan, M., Cuvellier, S., Théret, M., Petrof, B. J., Desguerre, I., Gondin, J., Mounier, R., & Chazaud, B. (2018). AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF-β1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Reports*, *25*(8), 2163-2176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.077>

- Jungbluth, H., Treves, S., Zorzato, F., Sarkozy, A., Ochala, J., Sewry, C., Phadke, R., Gautel, M., & Muntoni, F. (2018). Congenital myopathies: Disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 151–167). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.191>
- Kaetzel, M. A., Mo, Y. D., Mealy, T. R., Campos, B., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Dedman, J. R., & Seaton, B. A. (2001). Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry*, *40*(13), 4192–4199. <https://doi.org/10.1021/bi002507s>
- Kawakami, T., Kawamura, K., Fujimori, K., Koike, A., & Amano, F. (2016). Influence of the culture medium on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages in vitro. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *5*, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.006>
- Kesari, A., Fukuda, M., Knobloch, S., Bashir, R., Nader, G. A., Rao, D., Nagaraju, K., & Hoffman, E. P. (2008). Dysferlin deficiency shows compensatory induction of Rab27A/Slp2a that may contribute to inflammatory onset. *American Journal of Pathology*, *173*(5), 1476–1487. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080098>
- Kim, S. W., Rhee, H. J., Ko, J., Kim, Y. J., Kim, H. G., Yang, J. M., Choi, E. C., & Na, D. S. (2001). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I: Specific interaction model and mapping of the interaction site. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(19), 15712–15719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009905200>
- Klenow, M. B., Heitmann, A. S. B., Nylandsted, J., & Simonsen, A. C. (2021). Timescale of hole closure during plasma membrane repair estimated by calcium imaging and numerical modeling. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82926-6>
- Knopp, P., Krom, Y. D., Banerji, C. R. S., Panamarova, M., Moyle, L. A., den Hamer, B., van der Maarel, S. M., & Zammit, P. S. (2016). DUX4 induces a transcriptome more characteristic of a less-differentiated cell state and inhibits myogenesis. *Journal of Cell Science*, *129*(20), 3816–3831. <https://doi.org/10.1242/jcs.180372>
- Koerdt, S. N., & Gerke, V. (2017). Annexin A2 is involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(6), 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.007>
- Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K. K., Jang, Y. C., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in

- Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*, 44(2), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.009>
- Kwon, D. J., Ju, S. M., Youn, G. S., Choi, S. Y., & Park, J. (2013). Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.031>
- Kyrychenko, V., Poláková, E., Janíček, R., & Shirokova, N. (2015). Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy. *Cell Calcium*, 58(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.04.006>
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M.-F., Porte, E., & Brisson, A. (1997). Structural Analysis of Junctions Formed between Lipid Membranes and Several Annexins by Cryo-electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 272(1), 42–55. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1183>
- Leikina, E., Defour, A., Melikov, K., Van Der Meulen, J. H., Nagaraju, K., Bhuvanendran, S., Gebert, C., Pfeifer, K., Chernomordik, L. V., & Jaiswal, J. K. (2015). Annexin A1 deficiency does not affect myofiber repair but delays regeneration of injured muscles. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18246>
- Lek, A., Evesson, F. J., Lemckert, F. A., Redpath, G. M. I., Lueders, A. K., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., North, K. N., & Cooper, S. T. (2013). Calpains, cleaved mini-dysferlin72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *Journal of Neuroscience*, 33(12), 5085–5094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3560-12.2013>
- Lemmers, R. J. L. F., Tawil, R., Petek, L. M., Balog, J., Block, G. J., Santen, G. W. E., Amell, A. M., Van Der Vliet, P. J., Almomani, R., Straasheijm, K. R., Krom, Y. D., Klooster, R., Sun, Y., Den Dunnen, J. T., Helmer, Q., Donlin-Smith, C. M., Padberg, G. W., Van Engelen, B. G. M., De Greef, J. C., ... Van Der Maarel, S. M. (2012). Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nature Genetics*, 44(12), 1370–1374. <https://doi.org/10.1038/ng.2454>
- Lemos, D. R., Babaeijandaghi, F., Low, M., Chang, C. K., Lee, S. T., Fiore, D., Zhang, R. H., Natarajan, A., Nedospasov, S. A., & Rossi, F. M. V. (2015). Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nature Medicine*, 21(7), 786–794. <https://doi.org/10.1038/nm.3869>

- Lemos, D. R., Paylor, B., Chang, C., Sampaio, A., Underhill, T. M., & Rossi, F. M. V. (2012). Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. *Stem Cells*, *30*(6), 1152–1162. <https://doi.org/10.1002/stem.1082>
- Lennon, N. J., Kho, A., Bacskai, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., & Brown, R. H. (2003). Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-healing. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(50), 50466–50473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307247200>
- Lian, G., Chen, S., Ouyang, M., Li, F., Chen, L., & Yang, J. (2019). Colon Cancer Cell Secretes EGF to Promote M2 Polarization of TAM Through EGFR/PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Technology in Cancer Research and Treatment*, *18*, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1533033819849068>
- Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. L., Hempstead, B., Mark, W. H., & Hajjar, K. A. (2004). Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(1), 38–48. <https://doi.org/10.1172/jci200419684>
- Liu, L., Guo, H., Song, A., Huang, J., Zhang, Y., Jin, S., Li, S., Zhang, L., Yang, C., & Yang, P. (2020). Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-κB and MAPK pathways. *BMC Immunology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00355-y>
- Liu, L., Stokes, J. V., Tan, W., & Pruett, S. B. (2022). An optimized flow cytometry panel for classifying macrophage polarization. *Journal of immunological methods*, *511*, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113378>
- Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F., & Turnay, J. (2013). Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 2, pp. 2652–2683). <https://doi.org/10.3390/ijms14022652>
- Los, F. C. O., Kao, C. Y., Smitham, J., McDonald, K. L., Ha, C., Peixoto, C. A., & Aroian, R. V. (2011). RAB-5- and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin. *Cell Host and Microbe*, *9*(2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.005>
- Lukyanenko, V., Muriel, J. M., & Bloch, R. J. (2017). Coupling of excitation to Ca<sup>2+</sup> release is modulated by dysferlin. *Journal of Physiology*, *595*(15), 5191–5207. <https://doi.org/10.1113/JP274515>
- Ma, Y., Schwager Karpukhina, A., Dib, C., Gautier, C., Hermine, O., Allemand, E., & Vassetzky, Y. S. (2024). Exchange of subtelomeric regions between chromosomes 4q and

- 10q reverts the FSHD genotype and phenotype. *Science advances*, 10(18), ead11922. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ad11922>
- Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M., & Hayashi, Y. (2015). IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *International Immunology*, 27(3), 131–141. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu090>
- Mareedu, S., Million, E. D., Duan, D., & Babu, G. J. (2021). Abnormal Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy: Mechanisms and Potential Therapies. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.647010>
- Mathieu, M., Girousse, A., & Sengenès, C. (2023). What if the origin of FAPs was contributing to their heterogeneity in muscle? *Medecine/Sciences*, 39, 15–21. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023129>
- Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K., & Brown, R. H. (2001). The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, 10, 1761–1766. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.17.1761>
- Matsuda, C., Miyake, K., Kameyama, K., Keduka, E., Takeshima, H., Imamura, T., Araki, N., Nishino, I., & Hayashi, Y. (2012). The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLoS Currents*, NOVEMBER 2012. <https://doi.org/10.1371/5035add8caff4>
- Matsumura, C. Y., Menezes de Oliveira, B., Durbeej, M., & Marques, M. J. (2013). Isobaric Tagging-Based Quantification for Proteomic Analysis: A Comparative Study of Spared and Affected Muscles from mdx Mice at the Early Phase of Dystrophy. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065831>
- McArthur, S., Juban, G., Gobbetti, T., Desgeorges, T., Theret, M., Gondin, J., Toller-Kawahisa, J. E., Reutelingsperger, C. P., Chazaud, B., Perretti, M., & Mounier, R. (2020). Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *Journal of Clinical Investigation*, 130(3), 1156–1167. <https://doi.org/10.1172/JCI124635>
- McNeil, P. L., & Khakee, R. (1992). Disruptions of Muscle Fiber Plasma Membranes Role in Exercise-induced Damage. In *American Journal of Pathology* (Vol. 140, Issue 5).
- McNeil, P. L., & Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 499–505. <https://doi.org/10.1038/nrm1665>



- McNeil, P. L., & Steinhardt, R. A. (2003). Plasma Membrane Disruption: Repair, Prevention, Adaptation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 697–731. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101>
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., & Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science*, 113(1), 1891–1902. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1891>
- McWhorter, F. Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., & Liu, W. F. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17253–17258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308887110>
- Mellgren, R. L., Miyake, K., Kramerova, I., Spencer, M. J., Bourg, N., Bartoli, M., Richard, I., Greer, P. A., & McNeil, P. L. (2009). Calcium-dependent plasma membrane repair requires m- or  $\mu$ -calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(12), 1886–1893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.013>
- Mellgren, R. L., Zhang, W., Miyake, K., & McNeil, P. L. (2007). Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2567–2575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604560200>
- Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., & Gardahaut, M. F. (1999). Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle & Nerve*, 22(6). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199906\)22:6<724::aid-mus9>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199906)22:6<724::aid-mus9>3.0.co;2-o)
- Middel, V., Zhou, L., Takamiya, M., Beil, T., Shahid, M., Roostalu, U., Grabher, C., Rastegar, S., Reischl, M., Nienhaus, G. U., & Strähle, U. (2016). Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12875>
- Mizuta, K., Tsutsumi, S., Inoue, H., Sakamoto, Y., Miyatake, K., Miyawaki, K., Noji, S., Kamata, N., & Itakura, M. (2007). Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.108>
- Moe, A. M., Golding, A. E., & Bement, W. M. (2015). Cell healing: Calcium, repair and regeneration. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 45, pp. 18–23). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.09.026>

- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Rescher, U., & Draeger, A. (2007). Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium*, *41*(3), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.06.008>
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Wood, P., Grewal, T., & Draeger, A. (2009). Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca<sup>2+</sup> entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(25), 17227–17242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004457>
- Moraes, L. A., Ampomah, P. B., & Lim, L. H. K. (2018). Annexin A1 in inflammation and breast cancer: a new axis in the tumor microenvironment. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 12, Issue 5, pp. 417–423). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1486143>
- Mortal, C., Arrighi, N., Dechesne, C. A., & Dani, C. (2019). Control of muscle fibro-adipogenic progenitors by myogenic lineage is altered in aging and Duchenne muscular dystrophy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *53*(6), 1029–1045. <https://doi.org/10.33594/000000196>
- Morel, E., & Gruenberg, J. (2007). The p11/S100A10 light chain of annexin A2 is dispensable for annexin A2 association to endosomes and functions in endosomal transport. *PLoS ONE*, *2*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001118>
- Moss, S. E., & Morgan, R. O. (2004). The annexins. *Genome Biology*, *5*(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-219>
- Mozzetta, C., Consalvi, S., Saccone, V., Tierney, M., Diamantini, A., Mitchell, K. J., Marazzi, G., Borsellino, G., Battistini, L., Sassoon, D., Sacco, A., & Puri, P. L. (2013). Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(4), 626–639. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202096>
- Mularski, A., Sønder, S. L., Heitmann, A. S. B., Nylandsted, J., & Simonsen, A. C. (2021). Simultaneous membrane binding of Annexin A4 and A5 suppresses 2D lattice formation while maintaining curvature induction. *Journal of Colloid and Interface Science*, *600*, 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.05.067>
- Muriel, J., Lukyanenko, V., Kwiatkowski, T., Bhattacharya, S., Garman, D., Weisleder, N., & Bloch, R. J. (2022). The C2 domains of dysferlin: roles in membrane localization, Ca<sup>2+</sup> signalling and sarcolemmal repair. *Journal of Physiology*, *600*(8), 1953–1968. <https://doi.org/10.1113/JP282648>

- Naidu, D. G., Raha, A., Chen, X. L., Spitzer, A. R., & Chander, A. (2005). Partial truncation of the NH<sub>2</sub>-terminus affects physical characteristics and membrane binding, aggregation, and fusion properties of annexin A7. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1734*(2), 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.03.007>
- Nawaz, A., Bilal, M., Fujisaka, S., Kado, T., Aslam, M. R., Ahmed, S., Okabe, K., Igarashi, Y., Watanabe, Y., Kuwano, T., Tsuneyama, K., Nishimura, A., Nishida, Y., Yamamoto, S., Sasahara, M., Imura, J., Mori, H., Matzuk, M. M., Kudo, F., ... Tobe, K. (2022). Depletion of CD206<sup>+</sup> M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34191-y>
- Negrone, E., Kondili, M., Muraine, L., Bensalah, M., Butler-Browne, G. S., Mouly, V., Bigot, A., & Trollet, C. (2022). Muscle fibro-adipogenic progenitors from a single-cell perspective: Focus on their “virtual” secretome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.952041>
- Ning, Y., Li, Y., & Wang, H. (2023). ANXA2 is a potential biomarker for cancer prognosis and immune infiltration: A systematic pan-cancer analysis. *Frontiers in Genetics*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1108167>
- Novak, M. L., Weinheimer-Haus, E. M., & Koh, T. J. (2014). Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *Journal of Pathology*, *232*(3), 344–355. <https://doi.org/10.1002/path.4301>
- Palmieri, E. M., McGinity, C., Wink, D. A., & McVicar, D. W. (2020). Nitric oxide in macrophage immunometabolism: Hiding in plain sight. In *Metabolites* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1–34). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo10110429>
- Parente, L., & Solito, E. (2004). Annexin 1: More than an anti-phospholipase protein. In *Inflammation Research* (Vol. 53, Issue 4, pp. 125–132). <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1235-z>
- Park, J. C., Yoo, H., Kim, C. E., Shim, S. Y., & Lee, M. (2017). Hispidulin-7-O-neohesperidoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* attenuates the production of inflammatory mediators in LPS-induced raw 264.7 cells and HT-29 cells. *Pharmacognosy Magazine*, *13*(52), 707–711. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.218116>
- Parton, R. G., Tillu, V. A., & Collins, B. M. (2018). Caveolae. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R402–R405). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.075>

- Patil, S. S., Panchal, V., Røstbø, T., Romanyuk, S., Hollås, H., Brenk, R., Grindheim, A. K., & Vedeler, A. (2023). RNA-binding is an ancient trait of the Annexin family. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1161588>
- Pedemonte, N., & Galietta, L. J. V. (2014). Structure and Function of TMEM16 Proteins (Anoctamins). *Physiol Rev*, *94*, 419–459. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2011.-TMEM16>
- Perretti, M. (2003). The annexin 1 receptor(s): Is the plot unravelling? In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 24, Issue 11, pp. 574–579). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.010>
- Philippi, S., Bigot, A., Marg, A., Vincent, M., Spuler, S., & Zacharias, U. (2012). Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS Currents*. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1298>
- Piljic, A., & Schultz, C. (2006). Annexin A4 Self-Association Modulates General Membrane Protein Mobility in Living Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *17*, 3318–3328. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Pin, A. L., Houle, F., Fournier, P., Guillonneau, M., Paquet, É. R., Simard, M. J., Royal, I., & Huot, J. (2012). Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(36), 30541–30551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393561>
- Potez, S., Luginbühl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., & Babiychuk, E. B. (2011). Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca<sup>2+</sup> sensitivities. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17982–17991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187625>
- Pradhan, B. S., & Prószyński, T. J. (2020). A role for caveolin-3 in the pathogenesis of muscular dystrophies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228736>
- Quattrocelli, M., Capote, J., Ohiri, J. C., Warner, J. L., Vo, A. H., Earley, J. U., Hadhazy, M., Demonbreun, A. R., Spencer, M. J., & McNally, E. M. (2017). Genetic modifiers of muscular dystrophy act on sarcolemmal resealing and recovery from injury. *PLoS Genetics*, *13*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007070>
- Ramirez, M. P., Anderson, M. J. M., Kelly, M. D., Sundby, L. J., Hagerty, A. R., Wenthe, S. J., Odde, D. J., Ervasti, J. M., & Gordon, W. R. (2022). Dystrophin missense mutations alter

- focal adhesion tension and mechanotransduction. *PNAS*, *119*(25).  
<https://doi.org/10.1073/pnas>
- Rand, J. H., Wu, X. X., Lapinski, R., Van Heerde, W. L., Reutelingsperger, C. P., Chen, P. P., & Ortel, T. L. (2004). Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. *Blood*, *104*(9), 2783–2790. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0203>
- Rand, J. H., & Wu, X.-X. (2006). Annexins in Antiphospholipid Syndrome. *Springer*.  
[https://doi.org/10.1007/1-84628-009-5\\_36](https://doi.org/10.1007/1-84628-009-5_36)
- Randolph, G. J. (2008). Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 462–468). <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32830d5f09>
- Rashed, H. R., & Milone, M. (2025). The spectrum of rippling muscle disease. *Muscle & nerve*, *71*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1002/mus.28270>
- Ratnayake, D., Nguyen, P. D., Rossello, F. J., Wimmer, V. C., Tan, J. L., Galvis, L. A., Julier, Z., Wood, A. J., Boudier, T., Isiaku, A. I., Berger, S., Oorschot, V., Sonntag, C., Rogers, K. L., Marcelle, C., Lieschke, G. J., Martino, M. M., Bakkers, J., & Currie, P. D. (2021). Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature*, *591*(7849), 281–287. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03199-7>
- Raynal, P., & Pollard, H. B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1197*, 63–93. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90019-1)
- Razani, B., & Lisanti, M. P. (2001). Caveolins and caveolae: Molecular and functional relationships. *Experimental Cell Research*, *271*(1), 36–44.  
<https://doi.org/10.1006/excr.2001.5372>
- Reddy, A., Caler, E. V., & Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, *106*(2), 157–169.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00421-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00421-4)
- Redpath, G. M. I., Woolger, N., Piper, A. K., Lemckert, F. A., Lek, A., Greer, P. A., North, K. N., & Cooper, S. T. (2014). Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(19), 3037–3048. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0947>
- Rescher, U., & Gerke, V. (2004). Annexins - Unique membrane binding proteins with diverse functions. In *Journal of Cell Science* (Vol. 117, Issue 13, pp. 2631–2639).  
<https://doi.org/10.1242/jcs.01245>

- Rescher, U., Ludwig, C., Konietzko, V., Kharitonov, A., & Gerke, V. (2008). Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *Journal of Cell Science*, *121*(13), 2177–2185. <https://doi.org/10.1242/jcs.028415>
- Réty, S., Osterloh, D., Arié, J.-P., Tabaries, S., Seeman, J., Russo-Marie, F., Gerke, V., & Lewit-Bentley, A. (2000). Structural basis of the Ca<sup>2+</sup>-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure*, *8*(2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00093-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00093-9)
- Réty, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., & Lewit-Bentley, A. (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nature Structural Biology*, *6*, 89–95. <https://doi.org/10.1038/4965>
- Rintala-Dempsey, A. C., Rezvanpour, A., & Shaw, G. S. (2008). S100-annexin complexes - Structural insights. In *FEBS Journal* (Vol. 275, Issue 20, pp. 4956–4966). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06654.x>
- Roche, J. A., Lovering, R. M., & Bloch, R. J. (2008). Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *NeuroReport*, *19*(16), 1579–1584. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328311ca35>
- Roostalu, U., & Strähle, U. (2012). In Vivo Imaging of Molecular Interactions at Damaged Sarcolemma. *Developmental Cell*, *22*(3), 515–529. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.008>
- Rosengarth, A., & Luecke, H. (2003). A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *Journal of Molecular Biology*, *326*(5), 1317–1325. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00027-5)
- Sabran, A., Kumolosasi, E., & Jantan, I. (2019). Effects of annexin A1 on apoptosis and cell cycle arrest in human leukemic cell lines. *Acta Pharmaceutica*, *69*(1), 75–86. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0005>
- Salameh, A., Daquinag, A. C., Staquicini, D. I., An, Z., Hajjar, K. A., Pasqualini, R., Arap, W., & Kolonin, M. G. (2016). Prohibitin/annexin 2 interaction regulates fatty acid transport in adipose tissue. *JCI Insight*, *1*(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86351>
- Scheffer, L. L., Sreetama, S. C., Handra, Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K. J., Defour, A., & Jaiswal, J. K. (2014). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature Communications*, *5*, 5646. <https://doi.org/10.1038/ncomms6646>

- Schlaepfer, D. D., & Haigler, H. T. (1987). Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *Journal of Biological Chemistry*, 262(14), 6931–6937. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48333-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48333-0)
- Schlaepfer, D. D., & Haigler, H. T. (1990). Expression of Annexins as a Function of Cellular Growth State. *Journal of Cell Biology*, 111, 229–238. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.1.229>
- Schoewel, V., Marg, A., Kunz, S., Overkamp, T., Siegert Carrazedo, R., Zacharias, U., Daniel, P. T., & Spuler, S. (2012). Dysferlin-Peptides Reallocate Mutated Dysferlin Thereby Restoring Function. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049603>
- Selbert, S., Fischer, P., Menke, A., Jockusch, H., Pongratz, D., & Noegel, A. A. (1996). Annexin VII Relocalization as a Result of Dystrophin Deficiency. *Experimental Cell Research*, 222(1), 199–208. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0025>
- Selbert, S., Fischer, P., Pongratz, D., Stewart, M., & Noegel, A. A. (1995). Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *Journal of Cell Science*, 118, 85–95. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.1.85>
- Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., & Muñoz-Cánoves, P. (2008). Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metabolism*, 7(1), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.011>
- Sharma, & Jain. (2020). Important role of annexin A2 (ANXA2) in new blood vessel development in vivo and human triple negative breast cancer (TNBC) growth. *Experimental and Molecular Pathology*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104523>
- Sharma, N., Medikayala, S., Defour, A., Rayavarapu, S., Brown, K. J., Hathout, Y., & Jaiswal, J. K. (2012). Use of quantitative membrane proteomics identifies a novel role of mitochondria in healing injured muscles. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30455–30467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354415>
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>
- Skrahina, T., Piljić, A., & Schultz, C. (2008). Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins. *Experimental Cell Research*, 314(5), 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.015>

- Sønder, S. L., Boye, T. L., Tölle, R., Dengjel, J., Maeda, K., Jäätelä, M., Simonsen, A. C., Jaiswal, J. K., & Nylandsted, J. (2019). Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane repair. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43143-4>
- Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S., & Lisanti, M. P. (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells: Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(25), 15160–15165. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15160>
- Sopkova, J., Raguene-Nicol, C., Vincent, M., Chevalier, A., Lewit-Bentley, A., Russo-Marie, F., & Gallay, J. (2002). Ca<sup>2+</sup> and membrane binding to annexin 3 modulate the structure and dynamics of its N terminus and domain III. *Protein Science*, *11*(7), 1613–1625. <https://doi.org/10.1110/ps.4230102>
- Srivastava, M., Bera, A., Eidelman, O., Tran, M. B., Jozwik, C., Glasman, M., Leighton, X., Caohuy, H., & Pollard, H. B. (2023). A Dominant-Negative Mutant of ANXA7 Impairs Calcium Signaling and Enhances the Proliferation of Prostate Cancer Cells by Downregulating the IP3 Receptor and the PI3K/mTOR Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms24108818>
- Štefl, M., Takamiya, M., Middel, V., Tekpınar, M., Nienhaus, K., Beil, T., Rastegar, S., Strähle, U., & Nienhaus, G. U. (2024). Caveolae disassemble upon membrane lesioning and foster cell survival. *IScience*, *27*(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108849>
- Straub, V., Murphy, A., & Udd, B. (2018). 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscular Disorders*, *28*(8), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>
- Sveeggen, T. M., Abbey, C. A., Smith, R. L., Salinas, M. L., Chapkin, R. S., & Bayless, K. J. (2023). Annexin A2 modulates phospholipid membrane composition upstream of Arp2 to control angiogenic sprout initiation. *FASEB Journal*, *37*(1). <https://doi.org/10.1096/fj.202201088R>
- Swaggart, K. A., Demonbreun, A. R., Vo, A. H., Swanson, K. E., Kim, E. Y., Fahrenbach, J. P., Holley-Cuthrell, J., Eskin, A., Chen, Z., Squire, K., Heydemann, A., Palmer, A. A., Nelson, S. F., & McNally, E. M. (2014). Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(16), 6004–6009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324242111>



- Tagawa, K., Ogawa, M., Kawabe, K., Yamanaka, G., Matsumura, T., Goto, K., Nonaka, I., Nishino, I., & Hayashi, Y. K. (2003). Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *Journal of the Neurological Sciences*, *211*(1–2), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(03\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(03)00041-8)
- Tajbakhsh, S. (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *Journal of Internal Medicine*, *266*(4), 372–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x>
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., & Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, *189*(6), 1027–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003053>
- Tasca, F., Brescia, M., Liu, J., Janssen, J. M., Mamchaoui, K., & Gonçalves, M. A. F. V. (2023). High-capacity adenovector delivery of forced CRISPR-Cas9 heterodimers fosters precise chromosomal deletions in human cells. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, *31*, 746–762. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.025>
- Terasaki, M., Miyake, K., & McNeil, P. L. (1997). Large Plasma Membrane Disruptions Are Rapidly Resealed by Ca<sup>2+</sup>-dependent Vesicle-Vesicle Fusion Events. *Journal of Cell Biology*, *139*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.63>
- Theret, M., Rossi, F. M. V., & Contreras, O. (2021). Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.673404>
- Therrien, C., Fulvio, S. Di, Pickles, S., & Sinnreich, M. (2009). Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*, *48*(11), 2377–2384. <https://doi.org/10.1021/bi802242r>
- Tidball, J. G. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Comprehensive Physiology*, *1*(4), 2029–2062. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>
- Tidball, J. G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 165–178). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>
- Tidball, J. G., & St. Pierre, B. A. (1996). Apoptosis of macrophages during the resolution of muscle inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *59*(3), 380–388. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.3.380>

- Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *Journal of Physiology*, *578*(1), 327–336. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118265>
- Timmel, T., Kunz, S., Seifert, F., Schuelke, M., & Spuler, S. (2015). Cavin 1 function does not follow caveolar morphology. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *308*(12). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2014.-The>
- Togo, T., Krasieva, T. B., & Steinhardt, R. A. (2000). A Decrease in Membrane Tension Precedes Successful Cell-Membrane Repair. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4339>
- Trepanowski, J. F., Mey, J., & Varady, K. A. (2015). Fetuin-A: A novel link between obesity and related complications. In *International Journal of Obesity* (Vol. 39, Issue 5, pp. 734–741). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.203>
- Tripodi, L., Villa, C., Molinaro, D., Torrente, Y., & Farini, A. (2021). The immune system in duchenne muscular dystrophy pathogenesis. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101447>
- Tsuda, T. (2018). Clinical manifestations and overall management strategies for duchenne muscular dystrophy. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1687, pp. 19–28). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7374-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7374-3_2)
- Tsutsumi, S., Kamata, N., Vokes, T. J., Maruoka, Y., Nakakuki, K., Enomoto, S., Omura, K., Amagasa, T., Nagayama, M., Saito-Ohara, F., Inazawa, J., Moritani, M., Yamaoka, T., Inoue, H., & Itakura, M. (2004). The Novel Gene Encoding a Putative Transmembrane Protein Is Mutated in Gnathodiaphyseal Dysplasia (GDD). *The American Journal of Human Genetics*, *74*, 1255–1261. <https://doi.org/10.1086/421527>
- Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M., & Tsuchida, K. (2014). Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. In *Frontiers in Physiology: Vol. 5 FEB*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00068>
- Umbrecht-Jenck, E., Demais, V., Calco, V., Bailly, Y., Bader, M. F., & Chasserot-Golaz, S. (2010). S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic*, *11*(7), 958–971. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01065.x>
- Valls, M. D., Soldado, M., Arasa, J., Perez-Aso, M., Williams, A. J., Cronstein, B. N., Noguera, M. A., Terencio, M. C., & Montesinos, M. C. (2021). Annexin A2-Mediated Plasminogen

- Activation in Endothelial Cells Contributes to the Proangiogenic Effect of Adenosine A2A Receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.654104>
- Van Den Boogaard, M. L., Lemmers, R. J. L. F., Balog, J., Wohlgemuth, M., Auranen, M., Mitsuhashi, S., Van Der Vliet, P. J., Straasheijm, K. R., Van Den Akker, R. F. P., Kriek, M., Laurence-Bik, M. E. Y., Raz, V., Van Ostaijen-Ten Dam, M. M., Hansson, K. B. M., Van Der Kooi, E. L., Kiuru-Enari, S., Udd, B., Van Tol, M. J. D., Nishino, I., ... Van Der Maarel, S. M. (2016). Mutations in DNMT3B Modify Epigenetic Repression of the D4Z4 Repeat and the Penetrance of Facioscapulohumeral Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 98(5), 1020–1029. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.013>
- Van Der Maarel, S. M., Miller, D. G., Tawil, R., Filippova, G. N., & Tapscott, S. J. (2012). Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Consequences of chromatin relaxation. In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 25, Issue 5, pp. 614–620). <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328357f22d>
- Van Deutekom, J. C. T., Wljmenga, C., Van Tlenhoven, E. A. E., Grater, A.-M., Hewitt, J. E., Padberg, G. W., Van Ommen, G.-J. B., Hofker, M. H., & Frants, R. R. (1993). FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 2, Issue 12). <https://doi.org/10.1093/hmg/2.12.2037>
- Vicic, N., Guo, X., Chan, D., Flanagan, J. G., Sigal, I. A., & Sivak, J. M. (2022). Evidence of an Annexin A4 mediated plasma membrane repair response to biomechanical strain associated with glaucoma pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 237(9), 3687–3702. <https://doi.org/10.1002/jcp.30834>
- Vila, M. C., Rayavarapu, S., Hogarth, M. W., Van Der Meulen, J. H., Horn, A., Defour, A., Takeda, S., Brown, K. J., Hathout, Y., Nagaraju, K., & Jaiswal, J. K. (2017). Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death and Differentiation*, 24(2), 330–342. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.127>
- Vilchez, J. J., Gallano, P., Gallardo, ; Eduard, Lasa, A., Rojas-García, R., Freixas, A., Noemí, B. ; Luna, D., Calafell, F., Sevilla, T., Mayordomo, F., Baiget, M., & Illa, I. (2005). Identification of a Novel Founder Mutation in the DYSF Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. *Archives of Neurology*, 62(8), 1256–1259. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.8.1256>
- Vogel, D. Y. S., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W. D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C. D., & Beelen, R. H. J. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and

- activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9), 695–703.  
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
- Volonte, D., Peoples, A. J., & Galbiati, F. (2003). Modulation of myoblast fusion by caveolin-3 in dystrophic skeletal muscle cells: Implications for Duchenne muscular dystrophy and Limb-girdle muscular dystrophy-1C. *Molecular Biology of the Cell*, 14(10), 4075–4088.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E03-03-0161>
- Waddell, L. B., Lemckert, F. A., Zheng, X. F., Tran, J., Evesson, F. J., Hawkes, J. M., Lek, A., Street, N. E., Lin, P., Clarke, N. F., Landstrom, A. P., Ackerman, M. J., Weisleder, N., Ma, J., North, K. N., & Cooper, S. T. (2011). Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(4), 302–313.  
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31821350b0>
- Walev, I., Tappe, D., Gulbins, E., & Bhakdi, S. (2000). Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(6), 865–872.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.68.6.865>
- Wallace, G. Q., & McNally, E. M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 71, pp. 37–57). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163216>
- Wang, C. Y., & Lin, C. F. (2014). Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Disease Markers*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/308976>
- Wang, Y., Cheng, Y.-S., Yin, X.-Q., Yu, G., Jia, B.-L., & Anxa, J. B. (2019). Anxa2 gene silencing attenuates obesity-induced insulin resistance by suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 316, 223–234. <https://doi.org/10.1152/ajp>
- Wei, L., Li, L., Liu, L., Yu, R., Li, X., & Luo, Z. (2021). Knockdown of Annexin-A1 Inhibits Growth, Migration and Invasion of Glioma Cells by Suppressing the PI3K/Akt Signaling Pathway. *ASN Neuro*, 13. <https://doi.org/10.1177/17590914211001218>
- Wijmenga, C., Hewitt, J. E., Lodewijk, S. A., Clark, L. N., Wright, T. J., Dauwerse, H. G., Gruter, A.-M., & Hofker Marten H. (1992). Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 2, 26–30.  
<https://doi.org/10.1038/ng0992-26>
- Williams, J. K., Ngo, J. M., Lehman, I. M., & Schekman, R. (2023). Annexin A6 mediates calcium-dependent exosome secretion during plasma membrane repair. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.86556>

- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *The Biochemical Journal*, 294, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2940001>
- Zhai, H., Acharya, S., Gravanis, I., Mehmood, S., Seidman, R. J., Shroyer, K. R., Hajjar, K. A., & Tsirka, S. E. (2011). Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *Journal of Neuroscience*, 31(40), 14346–14360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-11.2011>
- Zhao, Y., Yang, Q., Wang, X., Ma, W., Tian, H., Liang, X., & Li, X. (2018). AnnexinA7 down-regulation might suppress the proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells via MAPK/ERK pathway. *Cancer Biomarkers*, 23(4), 527–537. <https://doi.org/10.3233/CBM-181651>
- Zhen, Y., Radulovic, M., Vietri, M., & Stenmark, H. (2021). Sealing holes in cellular membranes. *The EMBO Journal*, 40(7). <https://doi.org/10.15252/embj.2020106922>
- Zhu, C. H., Mouly, V., Cooper, R. N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J. W., Di Santo, J. P., Butler-Browne, G. S., & Wright, W. E. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: Consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell*, 6(4), 515–523. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x>
- Zhu, L., Fu, X., Chen, X., Han, X., & Dong, P. (2017). M2 macrophages induce EMT through the TGF- $\beta$ /Smad2 signaling pathway. *Cell Biology International*, 41(9), 960–968. <https://doi.org/10.1002/cbin.10788>



## **L'implication des annexines dans le développement des dystrophies musculaires humaines**

La rupture de la membrane plasmique est un événement physiologique survenant dans les cellules exposées à des stress mécaniques fréquents (cellules musculaires squelettiques ou cardiaques, cellules épithéliales...). Une cellule normale est capable de réparer ces ruptures à l'échelle de la minute. Selon le modèle actuel, la réparation de la membrane plasmique est un processus actif  $Ca^{2+}$ -dépendant basé sur la fusion de vésicules cytoplasmiques et le recrutement du patch lipidique formé à l'endroit de la rupture. La machinerie protéique de réparation membranaire commence à être identifiée et comprend notamment la dysferline, la cavéoline-3, mitsugumine 53, Neuroblast differentiation-associated protein ou encore certaines annexines (ANX). L'équipe d'accueil a ainsi montré que les ANXA5 (Carmeille et al., 2016, 2017) et ANXA6 (Croissant et al., 2020) sont indispensables pour la réparation membranaire des cellules musculaires squelettiques humaines.

Alors qu'une cellule normale est capable de réparer une rupture membranaire rapidement, l'absence ou un défaut de réparation conduit à la mort cellulaire et peut contribuer au développement de maladies dégénératives. Certaines dystrophies musculaires, qui sont caractérisées par une faiblesse et une atrophie progressive des muscles squelettiques, résultent ainsi d'un défaut de réparation membranaire. C'est le cas de la dystrophie musculaire des ceintures de type R2 (LGMDR2) ou de la myopathie de Miyoshi (MM). Nous émettons l'hypothèse que d'autres dystrophies musculaires pourraient résulter d'un défaut de réparation membranaire. De plus, si la LGMDR2 et la MM résultent d'abord d'une anomalie génétique liée à la dysferline, des études ont montré que des variants génétiques secondaires, dont font partie les ANX, sont dérégulés dans ces dystrophies musculaires et que ces dérégulations impactent de façon très négative l'évolution de la maladie.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la relation entre réparation membranaire et dystrophies musculaires. A partir de cellules musculaires squelettiques collectées de patients atteints de LGMDR2, de la maladie des muscles ondulants, de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale ou de dystrophie musculaire de Duchenne, j'ai identifié celles atteintes d'un défaut de réparation membranaire. J'ai également mesuré le niveau d'expression et la distribution subcellulaire des principaux composants de la machinerie de réparation membranaire dans ces cellules. Enfin, j'ai initié un travail visant à étudier l'implication de cellules auxiliaires (macrophages et précurseurs fibro-adipogéniques) dans la réparation membranaire des myocytes. Ce travail participe à apporter les connaissances fondamentales essentielles pour guider les futures stratégies thérapeutiques. L'existence d'une corrélation entre ANX et sévérité clinique des dystrophies musculaires pourrait aussi servir d'indicateur pronostic de la maladie.

---

**Mots-clés :** Cellule musculaire squelettique, Dystrophies musculaires, Annexine, Réparation membranaire, Microscopie à fluorescence