

MASTER 2 BMC PARCOURS GENOPATH ANNEE 2018-19

Titre du sujet de stage : Identification des mécanismes de positionnement nucléaire et de fonctionnalité mitochondriale contrôlés par la protéine MACF1 dans les fibres musculaires

Nom, adresse de l'Unité d'accueil / Nom du responsable de l'unité :

Unité d'accueil: INMG

Nom du Directeur de l'équipe d'accueil : Laurent Schaeffer

CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - UCBL1-Université de Lyon
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon

Nom, adresse de l'Equipe d'accueil / Nom du responsable d'équipe :

Equipe d'accueil : équipe « Architecture nucléaire et du cytosquelette

CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - UCBL1-Université de Lyon
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon

Nom du Directeur de l'équipe d'accueil : Vincent GACHE

Nom, tel, adresse e-mail de l'encadrant de stage :

Nom du directeur de thèse (HDR) : Vincent GACHE

Email : vincent.gache@univ-lyon1.fr

Tel fix: +33 4 78 77 70 31

Sujet de stage :

Au cours du développement musculaire, les noyaux des fibres musculaires se positionnent activement et précisément afin de façonner les domaines nucléaires. Cette organisation des noyaux permet l'établissement des domaines nucléaires dans les fibres musculaires squelettiques où chaque noyau garantit l'intégrité d'un volume limité dans la fibre musculaire. Récemment, l'intégrité de ces domaines a émergé comme un facteur impliqué dans certaines faiblesses musculaires. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le positionnement des noyaux au cours de la myogenèse, ainsi que les conséquences d'un mauvais positionnement des noyaux dans les fibres musculaires restent encore peu connus.

D'autre part, le réseau microtubulaire a émergé comme essentiel à la régulation des positionnements nucléaires dans les muscles squelettiques.

Notre équipe a identifié au cours d'un criblage siRNA, la protéine MACF1 (Microtubule Actin Cross Factor 1) comme affectant la localisation ainsi que la forme des noyaux dans un modèle cellulaire de fibres musculaires matures. Un nouveau modèle murin a été développé consistant en un « knock-out » du gène de MACF1, spécifiquement dans les fibres musculaires (Macf1-muscle-KO). Ce modèle présente une altération de la fonctionnalité musculaire traduite par une plus grande fatigabilité, typiquement observé dans des myopathies neuromusculaires. Ce modèle exhibe (1) une désorganisation de l'architecture nucléaire dans les fibres musculaires associé à un déficit d'agencement des noyaux spécifiquement au niveau des jonctions neuromusculaires et (2) une désorganisation globale de la forme et de la localisation des mitochondries dans les fibres musculaires. Ce modèle est le premier modèle présentant une désorganisation des noyaux sous-synaptiques, non associé à des défauts de protéines membranaires du noyau (complexe LINC pour «linker of nucleoskeleton and cytoskeleton») et en lien avec à la fois les cytosquelettes d'actines et de microtubules.

Objectif: Identification des mécanismes sous le contrôle de MACF1 régulant l'architecture/localisation nucléaire.

Dans notre modèle pathogénique (in vitro et in vivo), nous observons une délocalisation des noyaux avec une altération de la forme des noyaux. La protéine MACF1 est capable d'interagir avec différents réseaux cytosquelettiques dans les cellules (actine, microtubules et filaments intermédiaires). Premièrement, nous nous attacherons à comprendre les modifications liées à l'absence de MACF1 dans les fibres musculaires en terme de dynamique des cytosquelettes (Actine et microtubules). Des approches in vivo sur des fibres musculaires matures ou in vitro dans des fibres musculaires en développement seront transfectées avec des marqueurs spécifiques de la dynamique des microtubules (EB-1(-3)-GFP, CLIP170-mCherry et SiR-tubulin®) et du réseau d'actine (actin-Chromobody®, actin-RFP, SiR-Actin®). Cette méthode, couplée à de la vidéo-microscopie, permettra de quantifier différents paramètres inhérents à la dynamique de ces réseaux de cytosquelettes. Cette étude sur l'organisation des cytosquelettes, nous permettra de comprendre comment l'inactivation du gène MACF1 perturbe le positionnement nucléaire. Nous exprimerons des portions de MACF1 dans les fibres musculaires in vivo et in vitro afin de déterminer les domaines de la protéine conduisant à des effets positifs/négatifs sur le l'organisation des cytosquelettes et des noyaux. Nous déterminerons les partenaires spécifiques de ces domaines spécifiquement dans le muscle par différentes techniques biochimiques (techniques d'immunoprécipitation couplées à une identification par spectrométrie de masse). Ces études nous permettront de déterminer ainsi les voies moléculaires responsables des altérations de forme/localisation des noyaux dans les fibres musculaires.

Mots clés : Microtubule, muscle, vidéomicroscopie, culture de cellules primaires

Publications d'intérêt :

1. *SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of LMNA mutated cells.* Janin A, Bauer D, Ratti F, Valla C, Bertrand A, Christin E, Chopin E, Streichenberger N, Bonne G, Gache V, Cohen T, Méjat A. **Sci Rep.** 2018 Apr 4;8(1):5618.
2. *Myonuclear domain and microtubule proteome during skeletal muscle maturation.* Couturier N, **Gache V.** Med Sci (Paris). 2017 Nov;33 Hors série n°1:63-66.
3. *Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle formation.* **Gache V, Gomes ER, Cadot. MBoC.** 2017.Apr 1;28(7):865-874.
4. *Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time.* Cadot B, **Gache V, Gomes ER. Nucleus.** 2015 Sep 3;6(5):373-81.
5. *Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3.* Gache V*, Cadot B*, Vasyutina E, Falcone S, Birchmeier C, Gomes ER. **EMBO Rep.** 2012 Aug;13(8):741-9.

6. *MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function.* **Gache V***, Metzger T*, Xu M, Cadot B, Folker ES, Richardson BE, Gomes ER, Baylies