

► Les fibres du muscle squelettique sont des syncytia formés par la fusion de dizaines ou centaines de cellules progénitrices mononucléées. Au cours de la myogenèse, les noyaux arrivant des cellules progénitrices parcourent un long chemin avant d'être positionnés à la périphérie d'une myofibre mature. Une fois à la périphérie, ces noyaux sont régulièrement espacés et chacun est transcriptionnellement responsable de sa proportion de cytoplasme environnant, connue comme « domaine nucléaire ». La perturbation de ces domaines peut être observée dans différentes myopathies, suggérant leur importance pour la fonctionnalité du muscle squelettique. Cependant, les mécanismes régulant la stabilité des domaines nucléaires sont mal connus. Nous prenons ici l'exemple de MACF1, une protéine associée aux microtubules, comme une actrice essentielle dans l'organisation des domaines nucléaires, afin de mettre en lumière le rôle potentiel des microtubules et de leur réseau protéique associé pour la stabilité de ces domaines et donc pour la fonctionnalité des myofibres. ◀

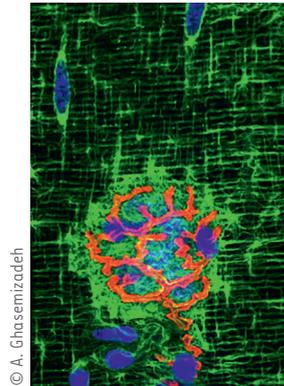
Répartition et façonnage des domaines nucléaires : les garants de la fonctionnalité des fibres musculaires

Le muscle strié squelettique est le tissu le plus abondant de notre corps, essentiel pour permettre tous les mouvements volontaires, assurer le maintien de la posture, la régulation thermique du corps, mais également le stockage d'énergie sous forme de glycogène [1]. Chaque muscle squelettique est composé de centaines ou milliers de cellules individuelles géantes, les fibres musculaires, qui sont agencées en faisceaux.

Vignette : Photo représentative (63X) du réseau de microtubules (en vert) organisé en grille le long de la myofibre ou concentré autour des noyaux (en bleu) et aux jonctions neuromusculaires (en rouge).

Contrôles des paramètres des domaines nucléaires par les microtubules et la protéine MACF1

Alireza Ghasemizadeh^{1,2}, Vincent Gache¹



© A. Ghasemizadeh

¹Pathophysiology and Genetics of Neuron and Muscle (PGNM), Institut NeuroMyoGène (INMG, CNRS UMR5261, Inserm U1315), Université Claude Bernard Lyon 1, France.

²Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB, Inserm U955), Université Paris-Est Créteil, France.

alireza.ghasemizadeh@inserm.fr
vincent.gache@inserm.fr

Chaque fibre est issue de la fusion de dizaines ou centaines de cellules progénitrices, les myoblastes. Elle contient donc des dizaines ou centaines de noyaux qui sont régulièrement ordonnés le long de l'axe longitudinal, à la périphérie des fibres, à l'exception de certaines zones comme celle de la jonction neuromusculaire (JNM) où plusieurs noyaux s'agrègent au niveau postsynaptique [2]. Cette distribution des noyaux le long des fibres a donné naissance à la notion de « domaine nucléaire » (Figure 1) qui représente schématiquement une portion de cytoplasme de la fibre soutenue transcriptionnellement par un noyau [3].

Au fil des années, diverses études ont contribué à comprendre les enjeux de ces domaines nucléaires. Des études ont montré la relation directe entre la taille des fibres et la quantité de noyaux qui les composent, et comment chaque noyau contribue à une activité transcriptionnelle homogène le long de la fibre en répondant localement aux besoins transcriptionnels de celle-ci [4, 5].

Y a-t-il donc une importance fonctionnelle pour la fibre musculaire à maintenir les domaines nucléaires intègres et/ou à garder les noyaux en périphérie des fibres ? Une première réponse à cette question provient de la physiopathologie de différentes myopathies telles que les myopathies centronucléaires. Dans celles-ci, de nombreux noyaux sont mal positionnés, centralisés à l'intérieur des fibres, et ce phénotype nucléaire est souvent relié à une atrophie et/ou à une faiblesse musculaire [6]. Cette observation soulève une question fondamentale : les noyaux des fibres mal positionnés ont-ils un impact sur la fonctionnalité

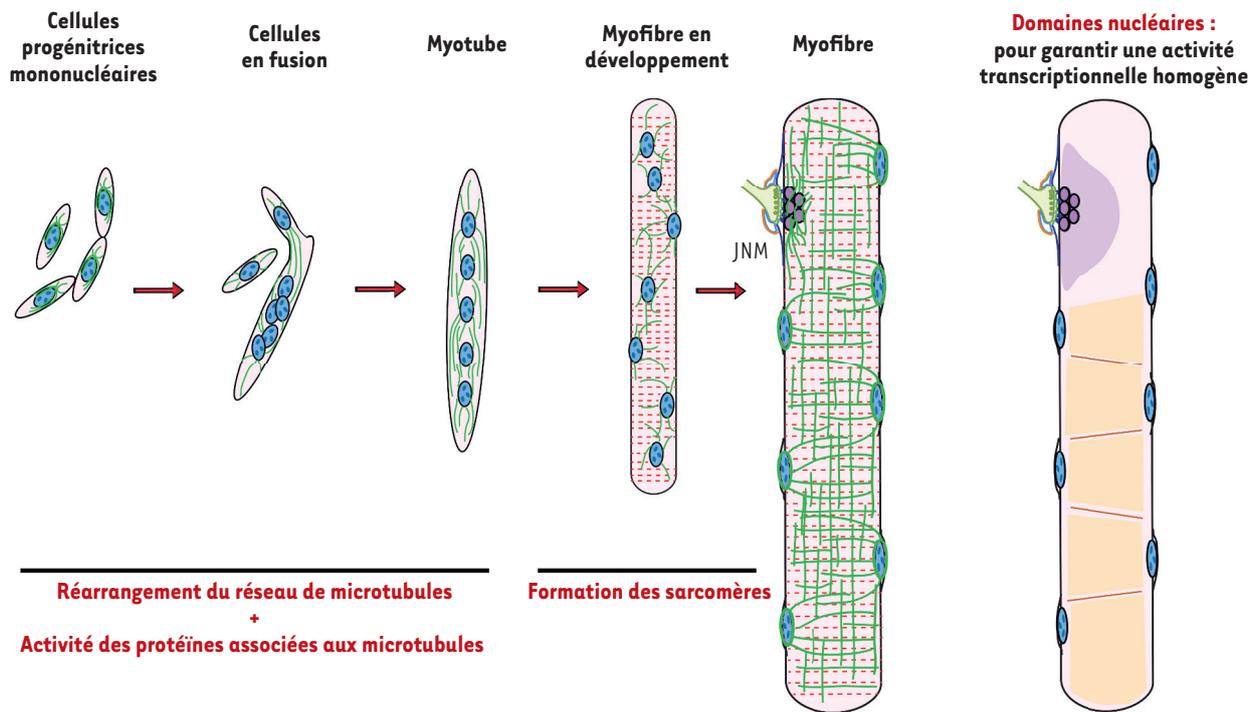


Figure 1. Illustration des mouvements nucléaires, étape par étape, pendant la myogenèse. Aperçu global du positionnement des noyaux, orchestré par les changements majeurs dans l'organisation des microtubules (en vert) et médié par les protéines associées aux microtubules durant les premières étapes de la myogenèse. Dans la phase latente, c'est la formation des sarcomères (en rouge) qui pousse les noyaux vers la périphérie des myofibres en développement.

lité musculaire et donc un rôle dans le développement/la progression des myopathies présentant un défaut de localisation nucléaire ? Il est très difficile de répondre à cette question chez les patients, car les analyses histologiques sont essentiellement réalisées après le développement de phénotypes cliniques remarquables. Cependant, en 2012, une étude menée chez la drosophile a montré que l'interaction de deux protéines associées aux microtubules, les protéines MAP7 et Kif5B, est responsable de l'alignement des noyaux lors de la formation initiale des fibres musculaires. Or, l'étude a également montré que l'absence de ces deux protéines entraînait la formation d'agrégats nucléaires dans les fibres musculaires et que cette désorganisation nucléaire était corrélée avec une réduction de la fonctionnalité musculaire. Cette dernière était reflétée par une réduction de la vitesse de déplacement des larves de drosophiles ayant des noyaux agrégés [7]. De plus, ces phénotypes étaient « sauvables » en réexprimant l'une ou l'autre des protéines. Cela montre que le phénomène de positionnement nucléaire dans les fibres musculaires est un mécanisme dynamique et que les noyaux dans les fibres sont « mobilisables ». Les mécanismes régulant la formation et/ou l'organisation des domaines nucléaires sont donc potentiellement des leviers permettant de contrôler la physiologie des fibres musculaires et sont donc potentiellement altérés dans les myopathies présentant des noyaux « mal positionnés ».

Le réseau microtubulaire dans la formation des domaines nucléaires

Les microtubules sont des structures dynamiques composées d'enchaînement d' α - et de β -tubulines. Ils ont la capacité de se former et/ou de se désassembler dans le cytoplasme de la cellule. L'organisation du réseau microtubulaire varie en fonction du type cellulaire et/ou de l'état cellulaire. Il sert de squelette pour le maintien de la forme cellulaire, mais aussi de support dynamique pour le transport subcellulaire du noyau, des mitochondries ou même des ARNs [8]. Dans le muscle squelettique, l'organisation des microtubules est fortement modifiée pendant la myogenèse, passant d'une projection astrale dans les cellules progénitrices mononucléées (les myoblastes), à une organisation parallèle dans les myotubes nouvellement formés (issus de la fusion des myoblastes), et enfin à un réseau dense en forme de grille dans les myofibres contractiles (Figure 1). Des études *in vitro* ont montré que différentes protéines associées aux microtubules (MAPs pour *Microtubule associated proteins*) tirent parti des changements de l'organisation des microtubules pour réguler le positionnement des noyaux durant les premiers

stades de la myogenèse [9]. Plus tard, lors de la maturation des fibres, la formation des sarcomères composés d'actine et de myosine pousse les noyaux vers la périphérie des fibres en formation [10]. Cependant, on observe la présence d'une « cage dense » autour des noyaux de la fibre musculaire mature, composée essentiellement de microtubules (Figure 2), suggérant que ceux-ci peuvent participer au maintien des noyaux à la périphérie de la fibre et donc à la stabilité des domaines nucléaires. Mais quelles sont les MAPs présentes dans les fibres musculaires et lesquelles contrôlent cette stabilité/ancrage des noyaux ?

Identification des MAPs spécifiques des fibres musculaires

Pour répondre à cette question, une identification à grande échelle du protéome lié aux microtubules a été réalisée dans l'équipe, à partir de myotubes immatures *in vitro* (avec des noyaux alignés au centre) et de myotubes contractiles « matures » (avec des noyaux majoritairement positionnés en périphérie). Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les MAPs [11]. La plus abondante des protéines présentes dans le protéome partagé était la protéine MACF1 (pour *Microtubule actin cross-linking factor 1*) et pour laquelle une mutation génétique qui avait déjà été identifiée, conduisait au développement d'une maladie neuromusculaire [12]. Son orthologue chez la drosophile avait été décrit comme maintenant les microtubules périnucléaires dans les fibres musculaires [13], suggérant que les phénotypes observés chez les patients présentant cette mutation dans le gène *MACF1* pourraient être liés au rôle de cette protéine dans l'organisation des microtubules et des noyaux dans les fibres.

MACF1, une protéine clef dans la stabilité des domaines nucléaires

L'immunomarquage de la protéine MACF1 montre une forte accumulation autour des noyaux dans les fibres et une colocalisation avec le réseau microtubulaire. Nos données ont mis en évidence que MACF1 participe à l'organisation des domaines nucléaires, car la diminution de son expression entraîne une augmentation de la dynamique des noyaux dans les fibres matures, une augmentation de la dynamique microtubulaire et une réduction de la distance entre les noyaux adjacents dans les fibres musculaires formées *in vitro*. Si la protéine MACF1 pouvait contrôler le positionnement nucléaire *in vitro*, dans quelle mesure son absence pourrait-elle affecter ce dernier dans un modèle murin ? Et surtout, quelles conséquences seraient observables sur la fonctionnalité de ces fibres musculaires ?

Pour répondre à ces questions, nous avons analysé les noyaux des fibres musculaires dans un modèle de souris invalidées pour le gène *Macf1* exclusivement dans les myofibres (Figure 3). Nous avons observé que l'absence de MACF1 entraîne une désorganisation du réseau de microtubules, des noyaux plus ronds, moins dispersés et internalisés dans les fibres, une réduction du regroupement des noyaux post-synaptiques et une fragmentation des jonctions neuro-musculaires entraînant une atrophie musculaire. Alors que ces phénotypes pouvaient être observés dans des souris jeunes

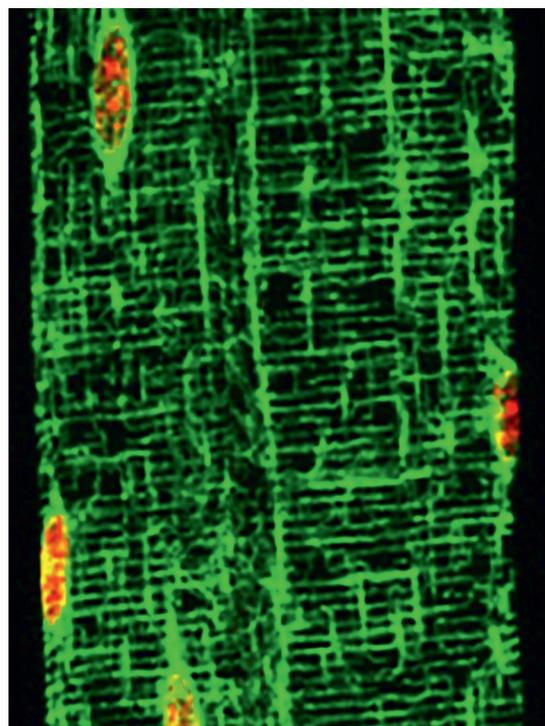


Figure 2. Organisation des microtubules et des noyaux dans les myofibres. Photo représentative (63X) du réseau de microtubules (en vert) organisé soit en grille le long de la myofibre, soit en cages denses autour des noyaux (en rouge), à la périphérie d'une myofibre saine.

(âgées de 2 mois) et s'aggraver avec l'âge, l'observation de noyaux internalisés et/ou mal positionnés n'apparaissait que chez des souris plus âgées (autour de 12 mois). En combinant nos résultats d'immunomarquage et une approche par microscopie électronique, nous avons montré que les souris invalidées pour le gène *Macf1* souffraient d'une accumulation progressive des mitochondries à l'intérieur des fibres, entraînant une mauvaise cohésion des myofibrilles entre elles et conduisant à l'internalisation de noyaux dans la fibre musculaire. L'augmentation du contenu mitochondrial est liée à l'expression aberrante de marqueurs de la biogenèse mitochondriale, probablement due à une réinitialisation de la mécano-transduction dans les fibres : changement de forme des noyaux, d'organisation de la chromatine et donc de l'expression de gènes dans les souris déficientes. En conséquence, nous avons pu montrer que les souris déficientes pour *Macf1* ont une capacité réduite de production de force, soulignant l'importance de l'organisation des microtubules et du positionnement nucléaire pour le maintien d'une fonctionnalité optimum des myofibres (Figure 3) [14].

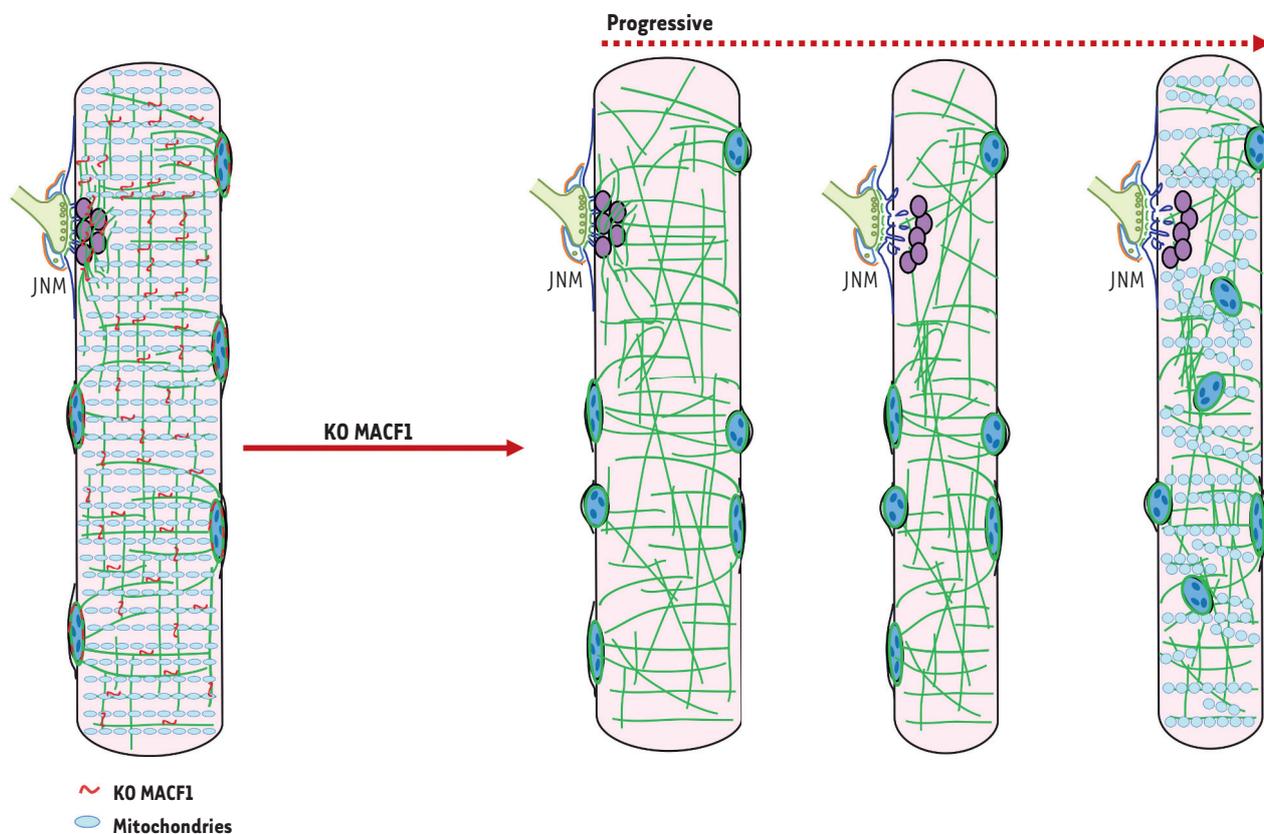


Figure 3. Modèle proposé du rôle de MACF1 dans le muscle squelettique. Dans les myofibres saines (à gauche), MACF1 contribue à l'organisation du réseau des microtubules, au maintien de la forme et du positionnement des noyaux, mais également à la stabilité des jonctions neuromusculaires. Suite à la suppression spécifique de *Macf1* dans les muscles squelettiques, ce sont les microtubules qui sont d'abord désorganisés, ce qui entraîne une altération du positionnement et de la forme des noyaux à la périphérie des myofibres. Avec l'âge, tandis que l'atrophie est observée suite à l'instabilité des jonctions neuromusculaires et des noyaux post-synaptiques, une augmentation globale des mitochondries est observée dans les myofibres, probablement en raison de l'altération de la forme des noyaux et de l'expression génique. En conséquence, l'organisation subcellulaire des myofibres est perturbée, ce qui entraîne une internalisation des noyaux dans les myofibres âgées.

Conclusions et perspectives pour le domaine

Les recherches menées sur le modèle murin invalidé pour le gène *Macf1* spécifiquement dans les fibres musculaires confirment l'importance du réseau microtubulaire et des MAPs dans la régulation des domaines nucléaires, mais également soulèvent plusieurs questions. En effet, d'une part, parmi toutes les autres MAPs qui ont été identifiées dans les myotubes matures, on peut s'interroger sur le potentiel de dérèglement de l'expression ou du fonctionnement de certaines d'entre elles dans d'autres myopathies présentant des noyaux mal positionnés. D'autre part, dans quelle mesure le déplacement et le changement de forme des noyaux dans certaines myopathies contribuent-ils à l'aggravation et/ou au développement de phénotypes observés chez ces patients ? Et enfin, peut-on imaginer que certains régulateurs du mouvement et du positionnement nucléaires soient un jour ciblés afin d'améliorer partiellement la fonctionnalité des fibres musculaires chez certains des patients ? ◇

SUMMARY

Myonuclear domain settings by microtubules and MACF1

Skeletal myofibers are syncytia made from the fusion of dozens or hundreds of mononuclear progenitor cells. Along myogenesis, the arriving nuclei from the progenitor cells have a long journey before being positioned at the periphery of a mature myofiber. Once at the periphery, nuclei are regularly spaced and each nucleus is transcriptionally responsible for its surrounding proportion of cytoplasm, known as the myonuclear domain. Disruption of these domains can be observed in various myopathies, suggesting their importance for skeletal muscle functionality. However, little is known about mechanisms regulating the myonuclear domain stability and organization. Here we take the example of MACF1, a microtubule-associated protein, as an essential actor in myonuclear domain organization, to highlight the

potential role of microtubules and their associated proteome network for the stability of these domains and hence for proper myofiber functionality. \diamond

PRIX SFM

Alireza Ghasemizadeh a reçu le prix du Meilleur poster lors des journées de la Société française de myologie (SFM) 2021.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 2015 ; 96 (3) : 183-95.
2. Cadot B, Gache V, Gomes ER. Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle – one step at a time. *Nucleus* 2015 ; 6 (5) : 373-81.
3. Hall ZW, Ralston E. Nuclear domains in muscle cells. *Cell* 1989 ; 59 (5) : 771-2.
4. Hansson KA, Eftedal E, Bruusgaard JC, et al. Myonuclear content regulates cell size with similar scaling properties in mice and humans. *Nat Commun* 2020 ; 11 (1) : 6288.
5. Denes LT, Kelley CP, Wang ET. Microtubule-based transport is essential to distribute RNA and nascent protein in skeletal muscle. *Nat Commun* 2021 ; 12 (1) : 6079.
6. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2008 ; 3 : 26.
7. Metzger T, Gache V, Xu M, et al. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* 2012 ; 484 (7392) : 120-4.
8. Goodson HV, Jonsson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018 ; 10 (6) : a022608.
9. Gache V, Gomes ER, Cadot B. Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation. *Mol Biol Cell* 2017 ; 28 (7) : 865-874.
10. Roman W, Martins JP, Carvalho FA, et al. Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2017 ; 19 (10) : 1189-1201.
11. Couturier N, Gache V. Prix Master 2016 de la SFM : Domaine nucléaire et protéome microtubulaire au cours de la maturation des fibres musculaires. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 Hors série n° 1 : 63-66.
12. Jørgensen LH, Mosbech MB, Færgeman NJ, et al. Duplication in the Microtubule-Actin Cross-linking Factor 1 gene causes a novel neuromuscular condition. *Sci Rep* 2015 ; 4 : 5180.
13. Wang S, Reuveny A, Volk T. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by cooperating with spectraplaklin and EB1. *J Cell Biol* 2015 ; 209 (4) : 529-38.
14. Ghasemizadeh A, Christin E, Guiraud A, et al. MACF1 controls skeletal muscle function through the microtubule-dependent localization of extra-synaptic myonuclei and mitochondria biogenesis. *eLife* 2021 ; 10 : e70490.

TIRÉS À PART

A. Ghasemizadeh



FSSCR
French Society for Stem Cell Research

7th Annual Meeting - LYON
17-19 November 2025

SAVE THE DATE!

Keynote speakers

- Denis Duboule (Collège de France)
- Maria-Elena Torres-Padilla (Helmholtz Munich)

www.fsscr-meeting.org