



**HAL**  
open science

# Régulation du couplage excitation-contraction par le cholestérol et l'oxyde nitrique dans la fibre musculaire squelettique de souris

Sandrine Pouvreau

► **To cite this version:**

Sandrine Pouvreau. Régulation du couplage excitation-contraction par le cholestérol et l'oxyde nitrique dans la fibre musculaire squelettique de souris. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2005. Français. NNT: . tel-00011998

**HAL Id: tel-00011998**

**<https://theses.hal.science/tel-00011998>**

Submitted on 21 Mar 2006

**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.

THÈSE  
présentée  
devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD-LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 17 mai 2005

par

**Sandrine POUVREAU**

**RÉGULATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION  
PAR LE CHOLESTÉROL ET L'OXYDE NITRIQUE  
DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE SOURIS**

Directeur de thèse : M. Vincent JACQUEMOND, Chargé de recherche

JURY :	M. Michel DE WAARD, Directeur de recherche	Rapporteur
	M. Alain LACAMPAGNE, Chargé de recherche	Rapporteur
	M. Laszlo CSERNOCH, Professeur	Examineur
	M. Vincent JACQUEMOND, Chargé de recherche	Examineur
	M. Jean-Marc PÉQUIGNOT, Professeur	Examineur
	M <sup>elle</sup> Caroline STRUBE, Chargé de recherche	Examineur

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE INTÉGRATIVE, CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE  
UMR CNRS 5123  
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD-LYON 1

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

## Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur D. DEBOUZIE

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. J.P. BONHOTAL

## SECTEUR SANTE

### *Composantes*

UFR de Médecine Lyon R.T.H Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Département de Production et Réalisation Assistance Conseil en Technologie pour l'Education

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur L. COLLET

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Directeur : M. le Professeur M. HEYDE

## SECTEUR SCIENCES

### *Composantes*

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M.C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>HISTORIQUE</b> .....	<b>11</b>
<b>CHAPITRE 1. HISTOPHYSIOLOGIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE</b> .....	<b>11</b>
<b>I Le système musculaire squelettique</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1 Anatomie du muscle squelettique</b> .....	11
<b>I.2 La fibre musculaire squelettique</b> .....	12
I.2.1 Une structure syncytiale.....	12
I.2.2 Classification des fibres musculaires squelettiques .....	12
<b>I.3 Myogénèse et maturation du muscle squelettique</b> .....	13
<b>II Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique</b> .....	<b>14</b>
<b>II.1 L'appareil contractile</b> .....	14
II.1.1 Organisation générale des protéines contractiles .....	14
II.1.2 Protéines constituant l'appareil contractile .....	15
II.1.2.1 <i>Les myofilaments épais</i> .....	15
II.1.2.2 <i>Les myofilaments fins</i> .....	16
II.1.3 Importance du calcium lors de la contraction musculaire.....	16
<b>II.2 Systèmes membranaires spécifiques</b> .....	17
II.2.1 Sarcolemme et microdomaines sarcolemmaux .....	17
II.2.2 Le réticulum sarcoplasmique .....	18
II.2.3 Les triades.....	18
II.2.4 Développement des systèmes membranaires spécifiques .....	19
II.2.4.1 <i>Biogénèse du système tubulaire transverse</i> .....	19
II.2.4.2 <i>Biogénèse du réticulum sarcoplasmique</i> .....	19
<b>II.3 Cytosquelette non contractile ou exosarcomérique</b> .....	20
II.3.1 Le cytosquelette périmyofibrillaire .....	20
II.3.2 Le cytosquelette sous-sarcolemmal .....	20
II.3.2.1 <i>Les costamères</i> .....	21
II.3.2.2 <i>Les protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal : le groupe dystrophine/DAG</i> .....	21
<b>III Les microdomaines sarcolemmaux</b> .....	<b>22</b>
<b>III.1 Propriétés biochimiques des microdomaines sarcolemmaux</b> .....	22
<b>III.2 Biogénèse et maintien de l'intégrité structurale des microdomaines sarcolemmaux</b> .....	22
III.2.1 Rôle du cholestérol .....	22
III.2.2 Rôle de la cavéoline.....	23
<b>III.3 Les microdomaines sarcolemmaux : des carrefours de signalisation membranaires</b> .....	24
<b>III.4 L'oxyde nitrique (NO) : une voie de signalisation associée aux microdomaines sarcolemmaux</b> ....	24
III.4.1 La NO synthase, enzyme clé de la voie du NO.....	25
III.4.2 Localisation de la nNOS dans la fibre musculaire squelettique.....	26
III.4.3 Implication de la nNOS dans fonction du muscle squelettique.....	26
<b>CHAPITRE 2. SYSTEMES DE REGULATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE</b> .....	<b>28</b>
<b>I Le sarcolemme</b> .....	<b>28</b>
<b>I.1 Canaux calciques du sarcolemme</b> .....	29
I.1.1 Les canaux calciques voltage-dépendants.....	29
I.1.1.1 <i>Le canal calcique de type L ou récepteur des dihydropyridines</i> .....	30
I.1.1.1.1 Caractéristiques biophysiques.....	30
I.1.1.1.2 Caractéristiques pharmacologiques.....	32
I.1.1.1.3 Structure moléculaire .....	32
I.1.1.1.4 Maturation de I <sub>L</sub> au cours du développement.....	34
I.1.1.2 <i>Le canal calcique de type T</i> .....	35

I.1.1.2.1	Caractéristiques biophysiques .....	35
I.1.1.2.2	Caractéristiques pharmacologiques .....	36
I.1.1.2.3	Structure moléculaire .....	36
I.1.1.2.4	Maturation de IT au cours du développement .....	37
I.1.2	Les SOC (Store-Operated Channels) .....	38
<b>I.2</b>	<b>Systèmes d'extrusion du sarcolemme.....</b>	<b>39</b>
I.2.1	L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	39
I.2.1.1	Structure moléculaire .....	39
I.2.1.2	Implication de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans l'activité musculaire squelettique .....	40
I.2.2	La pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	40
I.2.3	Systèmes d'extrusion sarcolemmaux et régulation de l'homéostasie calcique .....	41
<b>II</b>	<b>Les compartiments intracellulaires.....</b>	<b>41</b>
<b>II.1</b>	<b>Le réticulum sarcoplasmique.....</b>	<b>42</b>
II.1.1	Le récepteur de la ryanodine .....	42
II.1.1.1	Propriétés électrophysiologiques .....	43
II.1.1.2	Structure moléculaire .....	43
II.1.1.2.1	Les différentes isoformes .....	43
II.1.1.2.2	Structure du RyR.....	44
II.1.1.3	Les protéines interagissant avec le RyR.....	45
II.1.1.3.1	Les protéines cytoplasmiques.....	45
II.1.1.3.2	Les protéines luminales.....	46
II.1.1.3.3	Les protéines de la membrane du RS .....	47
II.1.1.4	Développement des RyR.....	47
II.1.1.5	Régulation du RyR.....	48
II.1.1.5.1	Régulation par des facteurs endogènes.....	48
II.1.1.5.2	Régulation par des processus cellulaires .....	50
II.1.1.5.3	Pharmacologie du RyR .....	50
II.1.2	Récepteurs de l'inositol trisphosphate .....	52
II.1.3	La SERCA .....	52
II.1.3.1	Structure moléculaire .....	53
II.1.3.2	Mécanismes de transport du calcium .....	53
II.1.3.3	Implication de la SERCA dans l'activité musculaire squelettique .....	54
II.1.3.4	Régulation par les facteurs endogènes .....	55
II.1.3.5	Pharmacologie de la SERCA.....	55
II.1.4	Les protéines de stockage du calcium.....	56
II.1.4.1	La calséquestrine.....	56
II.1.4.1.1	Rôle de tampon calcique des citernes du RS.....	56
II.1.4.1.2	Implication dans la régulation de l'activité du RyR .....	57
II.1.4.2	Les autres protéines.....	57
<b>II.2</b>	<b>Les mitochondries.....</b>	<b>58</b>
II.2.1	Les systèmes de transport du calcium mitochondriaux.....	58
II.2.1.1	Mécanismes de l'influx calcique.....	58
II.2.1.2	Mécanismes de l'efflux calciques .....	59
II.2.2	Mitochondries et homéostasie calcique .....	59
II.2.2.1	Régulation du métabolisme intramitochondrial par le calcium .....	59
II.2.2.2	Régulation de la concentration cytoplasmique du calcium : rôle des mitochondries .....	60
<b>III</b>	<b>Les protéines cytoplasmiques jouant le rôle de tampon calcique.....</b>	<b>61</b>
<b>III.1</b>	<b>La troponine C .....</b>	<b>61</b>
<b>III.2</b>	<b>Les chaînes légères de la myosine .....</b>	<b>62</b>
<b>III.3</b>	<b>La parvalbumine.....</b>	<b>62</b>
III.3.1	La PV comme tampon calcique .....	63
III.3.2	Implications de la PV dans la relaxation du muscle squelettique .....	63

<b>CHAPITRE 3. LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION .....</b>	<b>65</b>
<b>I Signaux associés au couplage excitation-contraction .....</b>	<b>66</b>
<b>I.1 Mouvements de charges intramembranaires .....</b>	<b>66</b>
I.1.1 Mouvements de charges et couplage excitation-contraction.....	66
I.1.1.1 <i>Définition des mouvements de charges .....</i>	66
I.1.1.2 <i>Implication dans le couplage excitation-contraction .....</i>	67
I.1.2 Propriétés des mouvements de charges.....	67
I.1.2.1 <i>Caractéristiques générales .....</i>	67
I.1.2.2 <i>Charges 1 et 2 .....</i>	68
I.1.2.3 <i>Modèle de fonctionnement du détecteur de potentiel .....</i>	69
I.1.2.4 <i>Calcium extracellulaire et site promoteur.....</i>	70
I.1.2.4.1 Effet du calcium extracellulaire .....	70
I.1.2.4.2 Le site promoteur .....	70
I.1.2.4.3 Rôle des antagonistes calciques .....	71
I.1.3 Le DHPR comme détecteur de potentiel du couplage excitation-contraction.....	71
I.1.3.1 <i>Identification moléculaire du détecteur de potentiel .....</i>	71
I.1.3.2 <i>Détecteur de potentiel et canal de type L : une même structure pour deux fonctions ?</i>	72
<b>I.2 Transitoires calciques et flux de libération de calcium.....</b>	<b>73</b>
I.2.1 Transitoire calcique voltage-dépendant .....	73
I.2.2 Le flux de libération de calcium .....	74
<b>I.3 Les événements calciques élémentaires (ECE).....</b>	<b>75</b>
I.3.1 Caractérisation des sparks dans le muscle squelettique d'amphibien .....	75
I.3.1.1 <i>Sparks et transitoire calcique.....</i>	75
I.3.1.2 <i>Propriétés des sparks .....</i>	76
I.3.2 Caractérisation des ECE dans le muscle squelettique de mammifère.....	76
<b>I.4 Maturation des signaux au cours du développement.....</b>	<b>77</b>
<b>II Structures impliquées : les unités de libération de calcium .....</b>	<b>78</b>
<b>II.1 Systèmes membranaires et protéines associées .....</b>	<b>78</b>
<b>II.2 Unité fonctionnelle : le couplon .....</b>	<b>79</b>
<b>II.3 Implication des protéines dans l'organisation des unités de libération de calcium (ULC).....</b>	<b>80</b>
<b>II.4 RyR1, RyR3 et unités de libération de calcium.....</b>	<b>80</b>
<b>III Mécanismes du couplage excitation-contraction .....</b>	<b>81</b>
<b>III.1 Aspects fonctionnels.....</b>	<b>81</b>
III.1.1 Couplage mécanique.....	82
III.1.2 Libération autocatalytique de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ induit $\text{Ca}^{2+}$ release, CICR).....	82
III.1.3 Implications de RyR1 et RyR3 dans le couplage EC.....	84
III.1.4 Rôle des récepteurs à l'inositol triphosphate .....	85
III.1.5 Implication des mitochondries dans le couplage excitation-contraction.....	85
<b>III.2 Interactions structurales .....</b>	<b>86</b>
III.2.1 Le DHPR .....	86
III.2.2 La sous-unité $\alpha_{1s}$ .....	86
III.2.3 Les sous-unités auxiliaires .....	86
III.2.4 Le RyR.....	87
<b>III.3 Microdomaines sarcolemmaux et couplage excitation-contraction.....</b>	<b>87</b>
III.3.1 Cholestérol membranaire et couplage excitation-contraction .....	87
III.3.2 Oxyde nitrique et couplage excitation-contraction .....	88
III.3.2.1 <i>Effets du NO sur la contraction musculaire.....</i>	89
III.3.2.2 <i>Effets du NO sur les acteurs du couplage EC.....</i>	90
III.3.2.2.1 Le DHPR .....	90
III.3.2.2.2 La pompe SERCA.....	90
III.3.2.2.3 Le RyR.....	90

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>92</b>
<b>I Matériel biologique.....</b>	<b>92</b>
<b>I.1 Préparation des cellules musculaires squelettiques fœtales.....</b>	<b>92</b>
<b>I.2 Préparation des fibres musculaires squelettiques adultes.....</b>	<b>93</b>
<b>II Électrophysiologie.....</b>	<b>93</b>
<b>II.1 Cellules musculaires squelettiques fœtales : la technique de patch-clamp.....</b>	<b>93</b>
II.1.1 Principe de la technique.....	93
II.1.2 Montage expérimental.....	94
II.1.3 Analyse des résultats.....	94
<b>II.2 Fibres musculaires squelettiques adultes : la technique de silicone clamp.....</b>	<b>96</b>
II.2.1 Principe de la technique.....	96
II.2.2 Montage expérimental.....	97
II.2.3 Analyse des résultats.....	97
<b>III La détection de calcium intracellulaire.....</b>	<b>97</b>
<b>III.1 Les indicateurs fluorescents.....</b>	<b>98</b>
<b>III.2 Cellules musculaires squelettiques fœtales : le fluo-4.....</b>	<b>98</b>
III.2.1 Principe de la technique.....	98
III.2.2 Montage expérimental.....	99
<b>III.3 Fibres musculaires squelettiques adultes : l'indo-1.....</b>	<b>100</b>
III.3.1 Principe de la technique.....	100
<i>III.3.1.1 Liaison du calcium à l'indo-1.....</i>	<i>100</i>
<i>III.3.1.2 Calcul de la concentration de calcium à partir de l'indo-1.....</i>	<i>101</i>
III.3.2 Montage expérimental.....	103
<i>III.3.2.1 Injection de l'indo-1.....</i>	<i>103</i>
<i>III.3.2.2 Dispositif de fluorescence.....</i>	<i>103</i>
<i>III.3.2.3 Calibrations de l'indicateur in vivo.....</i>	<i>104</i>
III.3.3 Analyse des résultats.....	104
<b>IV Solutions et traitements pharmacologiques.....</b>	<b>105</b>
<b>V Statistiques.....</b>	<b>106</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>107</b>
<b>SECTION 1. ÉTUDE DE LA REGULATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION PAR LE CHOLESTEROL MEMBRANAIRE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE FŒTUS DE SOURIS : Article 1.....</b>	<b>107</b>
<b>SECTION 2.ÉTUDE DE LA REGULATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION PAR L'OXYDE NITRIQUE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE SOURIS : .....</b>	<b>107</b>
<b>Article 2 :</b> Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse.	
<b>Article 3 :</b> Nitric Oxide synthase inhibition affects sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> release in skeletal muscle fibres from mouse.	
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>116</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>120</b>
<b>Article 4 :</b> Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under « Silicone Voltage-clamp » conditions.	
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>121</b>

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

verso

Figure 1. Myogenèse du muscle squelettique .....	12
Figure 2. Relations entre le réticulum sarcoplasmique, les tubules T et les myofibrilles du muscle squelettique de mammifère .....	13
Figure 3. Filaments fins et filaments épais.....	14
Figure 4. Bases moléculaires de la contraction musculaire.....	15
Figure 5. Différenciations du sarcolemme .....	16
Figure 6. Structure du complexe protéique associé à la dystrophine .....	20
Figure 7. La NO synthase .....	24
Figure 8. Localisation de la NO synthase dans la fibre musculaire squelettique .....	25
Figure 9. Cibles potentielles du NO dans le muscle squelettique .....	26
Figure 10. Les canaux calciques voltage-dépendants et le récepteur des dihydropyridines.....	31
Figure 11. Courants calciques de type T et de type L obtenus sur culture primaire de myotubes de souris .....	35
Figure 12. Le récepteur de la ryanodine.....	42
Figure 13. Interactions protéiques et régulations du RyR.....	44
Figure 14. Structure de la protéine SERCA .....	52
Figure 15. Modélisation des changements structuraux présumés de la calséquestrine en fonction de la concentration de calcium .....	55
Figure 16. Structures mises en jeu dans le cycle excitation-contraction-relaxation du muscle squelettique.....	64
Figure 17. Signaux associés au couplage excitation-contraction .....	65
Figure 18. Voltage-dépendance des mouvements de charges intramembranaires de type 1 ou 2.....	67
Figure 19. Voltage-dépendance des transitoires calciques et du flux de libération de calcium enregistrés chez le mammifère et l'amphibien .....	72
Figure 20. Calcium <i>sparks</i> et <i>embers</i> dans la fibre musculaire squelettique de souris.....	74
Figure 21. Différentes hypothèses concernant l'origine des <i>sparks</i> .....	75
Figure 22. Structure des triades dans les fibres musculaires squelettiques .....	77
Figure 23. Modèle mécanique du couplage excitation-contraction.....	81
Figure 24. Représentation schématique des deux composantes de la libération de calcium.....	82
Figure 25. Structures impliquées dans le couplage excitation-contraction .....	84
Figure 26. Effet de la $M\beta CD$ sur la force développée en réponse à une dépolarisation des tubules T dans la fibre musculaire squelettique pelée d'amphibien .....	87
Figure 27. Modulation par l'oxyde nitrique de la fonction contractile du muscle squelettique .....	88
Figure 28. La technique du <i>patch-clamp</i> appliquée aux cellules musculaires squelettiques de fœtus de souris .....	93
Figure 29. Photographie d'une fibre musculaire partiellement recouverte de graisse silicone en microscopie optique .....	94
Figure 30. La technique du <i>silicone-clamp</i> .....	95
Figure 31. Enregistrements électrophysiologiques en <i>silicone-clamp</i> .....	96
Figure 32. Calcul du transitoire calcique à partir des signaux de fluorescence obtenus en réponse à une dépolarisation par la technique de <i>silicone-clamp</i> .....	101



Figure 33. Dispositif optique permettant la mesure de fluorescence à deux longueurs d'ondes d'émission 405 (F405) et 470 (F470) nm.....	102
Tableau 1. Principaux critères de classification des fibres musculaires squelettiques .....	11
Tableau 2. Nomenclature des canaux calciques voltage-dépendants .....	28
Tableau 3. Comparaison des caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type T et de type L.....	34
Tableau 4. Protéines impliquées dans la régulation de la concentration cytoplasmique de calcium.....	60
Tableau 5. Composition des différentes solutions utilisées (en mM).....	104

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Seules les abréviations utilisées dans plusieurs sections de ce manuscrit sont répertoriées. Les abréviations dérivant de l'anglais ne sont pas traduites.

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAPTA	1.2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacétique acide
$[Ca^{2+}]_i$	Concentration de calcium cytoplasmique
CaM	CalModuline
CICR	Calcium Induce Calcium Release
Couplage EC	Couplage Excitation-Contraction
DHP	DiHydroPyridine
DHPR	DiHydroPyridine Receptor
ECE	Évènements Calciques Élémentaires
FKBP12	FK506-Binding Protein, 12 kDa
$I_L$	Courant calcique de type L
$I_T$	Courant calcique de type T
InsP <sub>3</sub>	Inositol triPhosphate
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrine
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
PV	ParValbumine
RInsP <sub>3</sub>	Récepteur de l'Inositol triPhosphate
ROS	Reactive Oxygen Species
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RyR	Ryanodine Receptor
SERCA	Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase

SOC	Store-Operated Channel
Tn/TnC/TnI	Troponine/Troponine C/ Troponine I
TRP	Transient Receptor Potential
Tubule T	Tubule Transverse
ULC	Unité de Libération de Calcium
VOC	Voltage-Operated Channel

## INTRODUCTION

L'activité contractile du muscle squelettique repose sur une modulation fine de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Cette modulation fait intervenir une série d'étapes constituant le cycle excitation-contraction-relaxation. Brièvement, en réponse à la stimulation de son nerf moteur, la fibre musculaire squelettique développe un potentiel d'action, qui se propage le long du sarcolemme jusque dans les tubules transverses (tubules T). Au niveau de la jonction triadique, la dépolarisation du tubule T déclenche une libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS). Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à une protéine contractile, la troponine C, activant la contraction. La relaxation résulte d'une dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponine C, suivie de sa recapture dans les citernes terminales du RS.

Le mécanisme spécifique, liant la dépolarisation du sarcolemme à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, est appelé couplage excitation-contraction (cette définition du couplage étant toutefois quelque peu restrictive). Il implique, au niveau moléculaire, deux types de protéines : le détecteur de potentiel du sarcolemme ou récepteur des dihydropyridines (DHPR), et le canal de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS ou récepteur de la ryanodine (RyR). Le couplage excitation-contraction constitue la clé de voûte de la contraction musculaire. Il est soumis, au niveau de la cellule, à de nombreuses régulations ; pour certaines, le détail des mécanismes mis en jeu reste indéterminé.

Le DHPR est localisé dans les tubules T, mais également dans les cavéoles. Ces deux structures sarcolemmales constituent des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol. Il est aujourd'hui établi que le contenu en cholestérol de la membrane module l'activité de divers types de protéines membranaires, incluant des canaux ioniques, récepteurs et pompes. Un effet du cholestérol membranaire sur les canaux calciques sarcolemmaux en général et le DHPR en particulier, a ainsi été mis en évidence dans les cellules musculaires cardiaques et vasculaires. Cependant, le rôle potentiel du cholestérol dans la modulation de l'activité du DHPR et, plus généralement, du couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique de mammifère restait, jusqu'à présent, largement inexploré.

Les cavéoles contiennent par ailleurs de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation cellulaire, dont la synthèse de l'oxyde nitrique (NO). Il existe une littérature abondante concernant la régulation de divers acteurs du couplage EC du muscle squelettique par le NO. Néanmoins, ces données, obtenues sur préparation fragmentaire, sont difficilement extrapolables à la fibre intacte. Ainsi, les mécanismes physiologiques de régulation de l'activité musculaire par le NO restent hypothétiques.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était d'étudier la modulation fonctionnelle du couplage EC par le cholestérol et le NO, dans la fibre musculaire squelettique intacte en conditions de potentiel imposé. Cette préparation est en effet la seule qui permette à la fois un contrôle précis du potentiel membranaire de la cellule, nécessaire à une étude rigoureuse du couplage EC, et le maintien d'une configuration physiologique des mécanismes étudiés.

Ce manuscrit comporte tout d'abord une synthèse des connaissances concernant les systèmes de régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, leur implication dans le couplage excitation-contraction, et leur modulation par différents facteurs, dont le cholestérol et le NO. Cette synthèse est suivie d'une section dédiée aux matériels et méthodes utilisés. Les résultats sont ensuite présentés sous forme de trois articles, deux publiés, un en cours de révision, regroupés en deux sections dédiées l'une au cholestérol, l'autre au NO. Dans chaque section, les articles sont précédés d'un texte introductif comprenant l'essentiel des résultats et éléments de discussion, ainsi qu'une conclusion. Enfin, pour clore ce manuscrit, une conclusion générale est proposée, suivie des perspectives que ce travail permet d'envisager.

# CHAPITRE 1

## HISTOPHYSIOLOGIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Le système musculaire squelettique exerce un rôle fondamental dans l'organisme : il permet le déplacement, le maintien de la posture, et, accessoirement, dégage de la chaleur. La fonction principale du muscle squelettique est la production de force et de mouvement, par un mécanisme spécifique : la contraction. Sa structure extrêmement organisée, de l'échelle de l'organe à l'échelle cellulaire, reflète cette fonction. L'organisation des cellules musculaires squelettiques, nommées fibres musculaires squelettiques en raison de leur forme allongée, a été activement explorée ces 50 dernières années. Le modèle initialement utilisé fut celui du muscle de grenouille (ou parfois d'autres amphibiens). Une part importante des données structurales et fonctionnelles aujourd'hui à notre disposition provient de ce modèle. Or des divergences existent entre les différentes classes d'animaux (et parfois même entre les différentes espèces). Mon travail de thèse ayant été réalisé sur des fibres musculaires de mammifère (modèle de la souris), les données présentées dans ce chapitre, et d'une manière plus générale dans l'ensemble de cet historique, se rapporteront, sauf mention contraire, au mammifère.

### I Le système musculaire squelettique

#### I.1 Anatomie du muscle squelettique

Chaque muscle squelettique est un organe bien délimité dont la majeure partie est constituée de centaines, voir de milliers de fibres musculaires. Le muscle renferme également du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et des neurofibres. Le tissu conjonctif assure le maintien de la structure du muscle et permet la transmission de la force développée aux pièces osseuses. Les vaisseaux sanguins assurent son approvisionnement en oxygène et nutriments. Enfin, les neurofibres régissent l'activité musculaire.

Le tissu conjonctif musculaire est organisé en plusieurs couches, qui donnent à l'organe une structure en « poupée russe ». Ainsi, chaque fibre est entourée d'une gaine de tissu conjonctif lâche appelé **endomysium** (la fibre n'est cependant pas en contact direct avec cet endomysium : elle sécrète une lame basale qui l'entoure). Une dizaine de fibres environ et leur endomysium sont regroupées en faisceau, délimité par une gaine plus épaisse : le **périmysium**. L'ensemble des faisceaux constituant un même muscle est contenu dans un tissu conjonctif dense, l'**épimysium**. À l'extérieur de l'épimysium, le **fascia** regroupe les muscles d'un même groupe fonctionnel. Dans la plupart des cas, le périmysium se joint à un tendon cylindrique, ancrant ainsi le muscle à un élément du squelette, os ou cartilage (pour revue, voir Ishikawa et coll., 1983).

	<b>Type I</b>		<b>Type II</b>	
		<b>II A</b>	<b>II D/ II X</b>	<b>II B</b>
<b>Contraction</b>	Lente		Rapide	
	Tonique		Phasique	
<b>Métabolisme</b>	Oxydatif (SO)	Essentiellement oxydatif (FO)	Oxydatif et glycolytique (FOG)	Essentiellement glycolytique (FG)
<b>Résistance à la fatigue</b>	Élevée	Élevée	Faible	
<b>Activité myosine ATPasique</b>	Faible activité		Haute activité	
	Stable en milieu acide	Stable en milieu basique	Intermédiaire	
<b>Isoforme de la MHC</b>	MHC I	MHC II A	MHC II X	MHC II B

**Tableau 1 : Principaux critères de classification des fibres musculaires squelettiques**

## I.2 La fibre musculaire squelettique

### I.2.1 Une structure syncytiale

La fibre musculaire squelettique est une longue cellule cylindrique de taille conséquente : son diamètre se situe habituellement entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  ; sa longueur varie de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  à plusieurs dizaines de mm, parfois même quelques dizaines de cm. C'est un *syncytium* résultant de la fusion d'un grand nombre de cellules au cours du développement embryonnaire. Elle contient donc de nombreux noyaux (jusqu'à une centaine) situés en périphérie, juste au-dessous de la membrane plasmique ou sarcolemme, le centre de la fibre étant occupé par des myofibrilles.

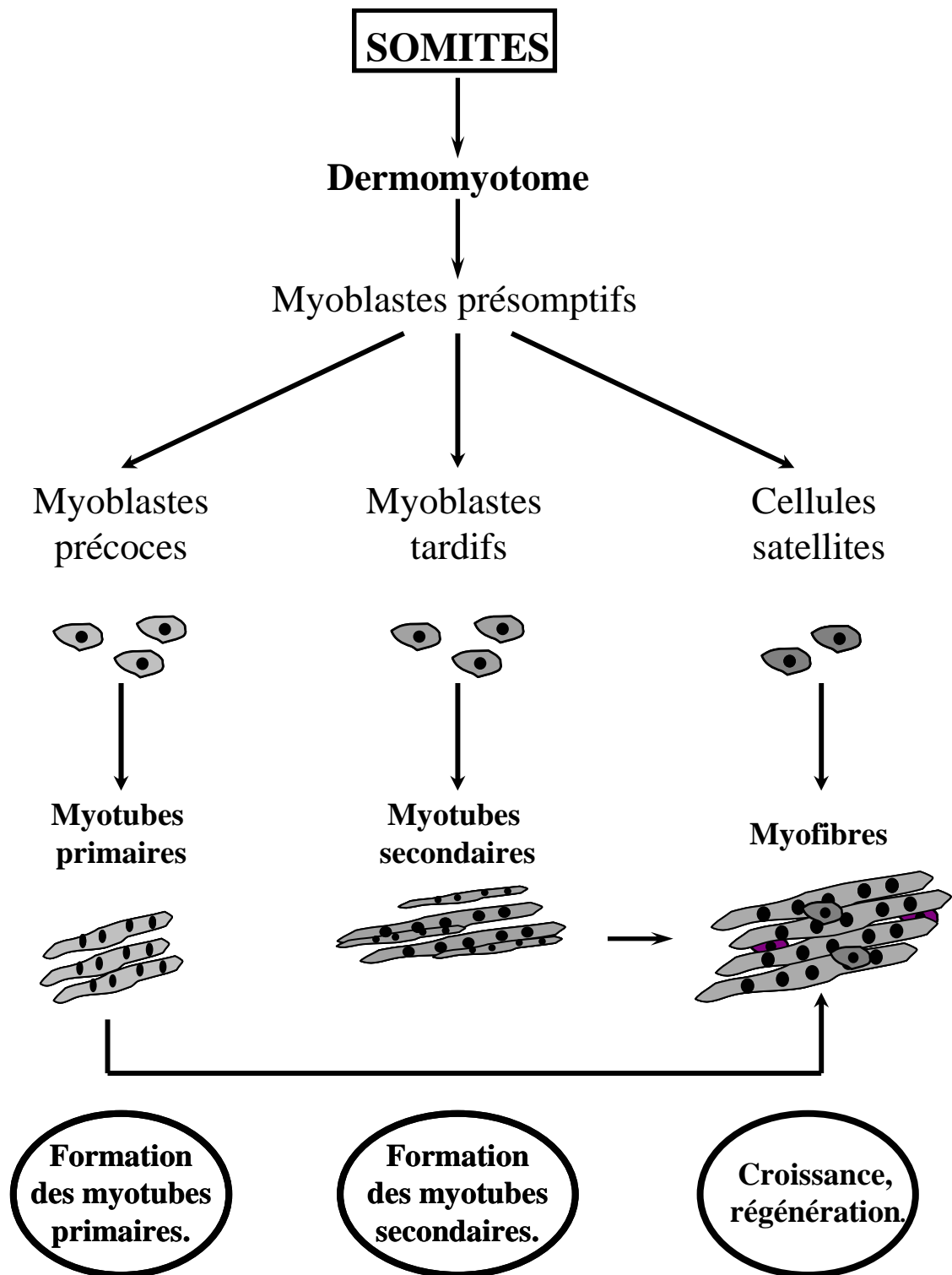
### I.2.2 Classification des fibres musculaires squelettiques

Les cellules musculaires contractiles ne constituent pas une population homogène. Il existe différents types de fibres, classés selon des critères morphologiques, physiologiques ou biochimiques. La première ébauche de classification fut établie par Louis Antoine Ranvier en 1873, sur la base de la couleur des cellules et de leur vitesse de contraction (rouge à contraction lente et soutenue ou blanche à contraction rapide). La couleur de ces fibres fut par la suite attribuée à leur contenu en myoglobine, hémoprotéine musculaire fixant l'oxygène. Depuis, de nombreuses études ont permis de classer les fibres musculaires en deux catégories principales : les fibres lentes de type I, et les fibres rapides de type II (pour revue, voir Berchtold et coll., 2000). Les principaux critères de classifications sont repris dans le tableau 1.

**Les fibres de type I (ou type lent)** interviennent lors d'exercices prolongés et prédominent dans les muscles à fonction posturale. Elles sont caractérisées par un diamètre relativement petit, une vitesse de contraction lente et une haute résistance à la fatigue musculaire. Leur métabolisme est essentiellement de type oxydatif, d'où leur richesse en myoglobine (muscle rouge), enzymes oxydatives et mitochondries.

**Les fibres de type II (ou type rapide)** sont impliquées dans les mouvements rapides et puissants, mais de courte durée. Elles ont un diamètre plus élevé, une vitesse de contraction rapide et une haute sensibilité à la fatigue. Elles sont divisées en 3 sous-groupes : IIa, IIb et IIc/x. **Les fibres de type IIb** ont un métabolisme essentiellement glycolytique. Elles contiennent peu de myoglobine (muscle blanc), d'enzymes oxydatives et de mitochondries. **Les fibres de type IIa** possèdent des caractéristiques propres aux fibres de type I, à savoir la présence de myoglobine, et de nombreuses mitochondries. Elles ont ainsi un potentiel oxydatif supérieur aux fibres de type IIb, mais également un potentiel glycolytique plus élevé que les fibres de type I. Elles sont plus résistantes à la fatigue que les fibres de type IIb. **Les fibres de types IIc/x** forment un intermédiaire entre fibres de type IIb et fibres de type IIa.





**Figure 1 : Myogenèse du muscle squelettique.**

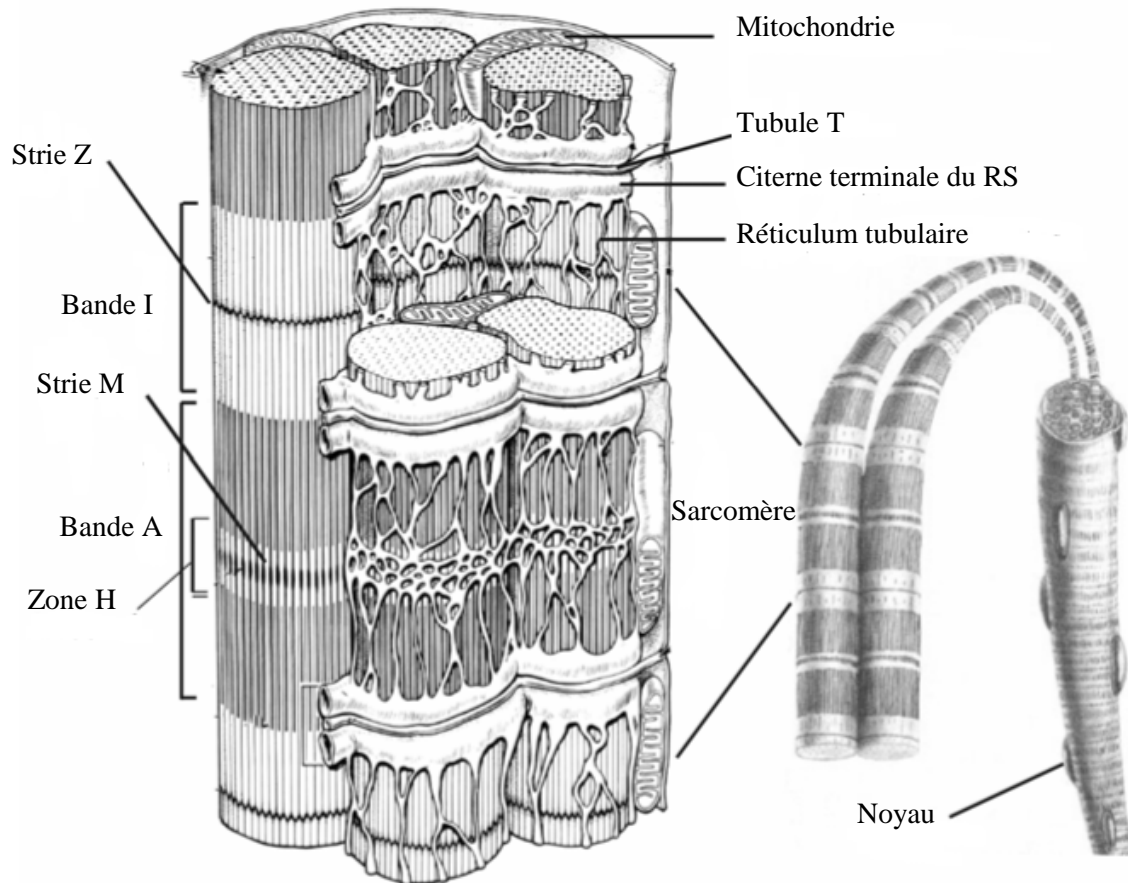
Les cellules précurseurs du tissu musculaire squelettique sont situées dans le dermomyotome. Elles se différencient en myoblastes. Il existe plusieurs catégories de myoblastes. Les myoblastes précoces fusionnent et forment les myotubes primaires, qui constitueront l'ébauche du muscle. Les myoblastes tardifs forment les myotubes secondaires. Les myotubes se différencient en myofibres. Les cellules satellites constituent une catégorie particulière de myoblastes, encore présents à l'âge adulte. Elles interviennent dans les processus de croissance et régénération du tissu musculaire.

La plupart des muscles squelettiques sont constitués d'un mélange des différents types de fibre. Ainsi, notre modèle adulte, le flexor digitorum brevis (un muscle de la patte) contient majoritairement des fibres de type IIa, mais également des fibres de type IIb et I. Chez le rat, par exemple, ce muscle est composé de 7 % de fibres de type I, 92 % de fibres de type IIa, et 1% de fibres de types IIb (Henriksen et coll., 1990).

### I.3 Myogenèse et maturation du muscle squelettique.

Le tissu musculaire squelettique est d'origine mésodermique. La plupart des cellules musculaires dérivent de précurseurs situés dans le **dermomyotome des somites**, structures résultant de la métamérisation du mésoderme intermédiaire. Au cours de la différenciation, les futures cellules musculaires du tronc resteront dans l'aire somitique ; celles des membres migreront en direction des bourgeons des membres. Le déroulement général de la myogenèse est relativement bien établi (pour revue, voir Bischoff, 1994 ; Franzini-Armstrong & Fischman, 1994 ; Hauschka, 1994 ; Muntz, 1990) (Figure 1).

- 1) À l'emplacement des futurs muscles squelettiques s'accumulent les **myoblastes présomptifs**. Ces cellules, encore capables de se diviser, ne synthétisent pas de protéines spécifiques du muscle et ne peuvent être différenciées visuellement des cellules mésenchymateuses adjacentes.
- 2) Ces cellules vont se transformer en **myoblastes**, dont la forme en fuseau est caractéristique de la lignée myogénique. Les myoblastes sont des cellules post mitotiques (donc incapables de se diviser), mononucléées, synthétisant des protéines musculaires contractiles.
- 3) Les myoblastes s'alignent et fusionnent pour donner de grosses cellules cylindriques multinucléées, les myotubes. Ils existent au moins deux populations distinctes de myoblastes, donnant naissance à deux types de myotubes. Les myoblastes embryonnaires (observés en premier au cours du développement) forment, avant innervation, les **myotubes primaires** qui s'alignent et s'allongent entre leurs tendons pour constituer l'ébauche du muscle. Ces myotubes primaires s'entourent d'une lame basale qui recouvre également les cellules mononucléées indifférenciées, situées à leur périphérie. Ces cellules indifférenciées vont proliférer et donner naissance à une population de myoblastes fœtaux, dont la fusion, sous contrôle de l'innervation, formera les **myotubes secondaires**. Les myotubes secondaires vont progressivement s'entourer de leur propre lame basale. Dans les muscles plus larges, une troisième, voire une quatrième vague de prolifération et fusion peuvent avoir lieu.
- 4) Les myotubes ainsi formés vont se différencier en **myofibres**. Dans les myotubes, les noyaux ont une position centrale et les myofibrilles une position périphérique. Lors de la différenciation, les myofibrilles s'organisent en position centrale, faisant apparaître les



**Figure 2 : Relations entre le réticulum sarcoplasmique, les tubules T et les myofibrilles du muscle squelettique de mammifère.**

Le RS enveloppe chaque myofibrille comme un manchon. Les tubules T pénètrent profondément à l'intérieur de la fibre, entre les citernes terminales situées près des jonctions A-I. Les points de jonction entre RS et tubules T sont appelés triades.

striations caractéristiques de la fibre musculaire squelettique ; les noyaux migrent en périphérie. Dans notre modèle fœtal, le muscle squelettique du tronc de la souris, le développement des myofibrilles commence au 15<sup>e</sup> jour de gestation (E14, naissance à E19, le stade E0 définissant le jour d'observation du bouchon vaginal) (Takekura et coll., 2001).

- 5) Les myofibres continuent de croître au cours du développement pré- et postnatal. L'addition de noyaux se fait par fusion avec des myoblastes particuliers : les **cellules satellites**. Les cellules satellites sont des cellules mononucléées, situées sous la lame basale, en contact étroit avec la myofibre. Elles résultent de précurseurs qui prolifèrent dans les phases précoces du développement, puis quittent le cycle cellulaire et deviennent quiescents. À l'âge adulte, elles peuvent être activées par des facteurs de croissance ou en réponse à une atteinte du muscle squelettique. Elles participent en effet aux processus de régénération.

## II Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique

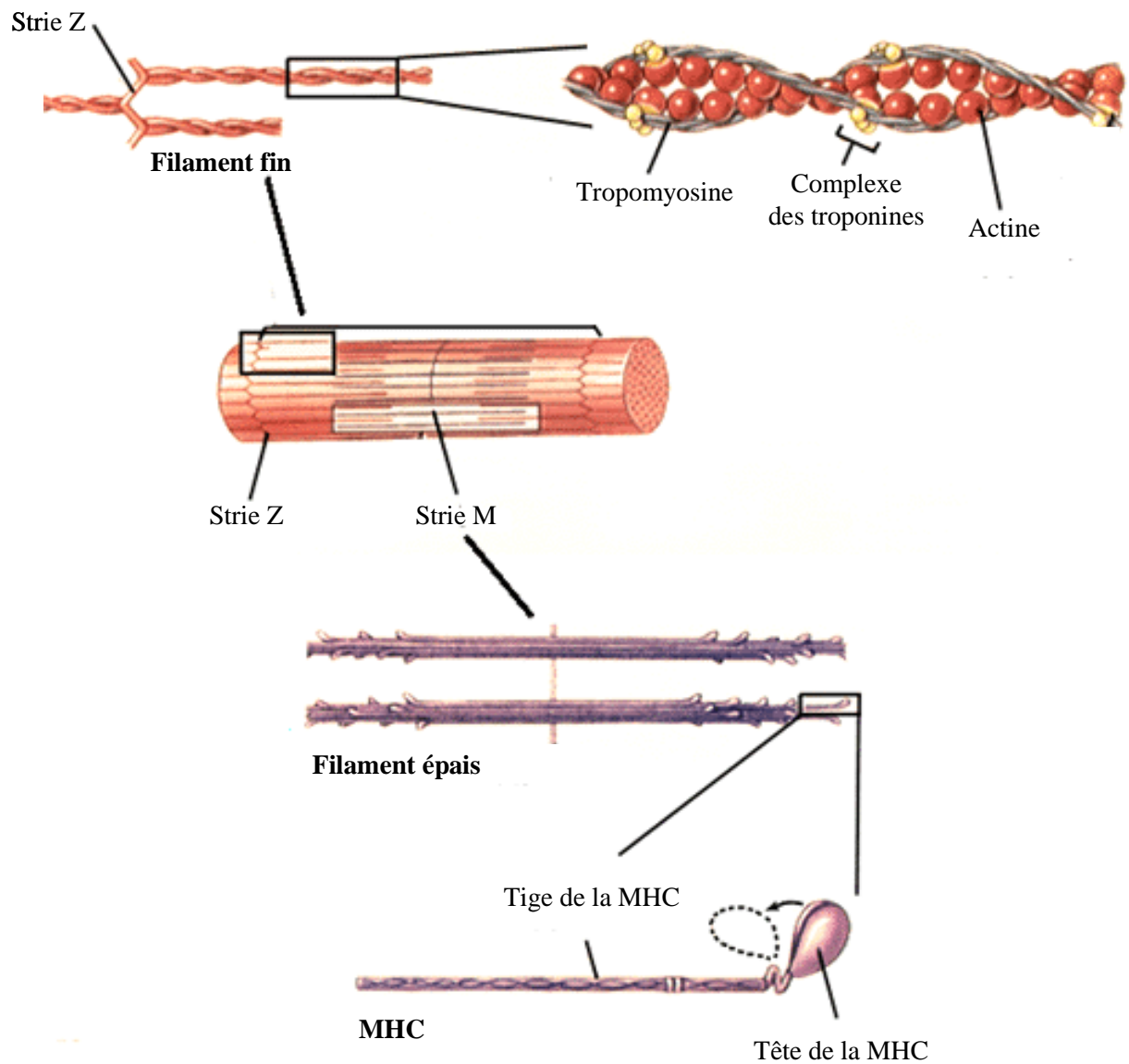
Les composantes d'une fibre musculaire peuvent être grossièrement divisées en deux catégories : celles qui produisent l'activité contractile (myofibrilles), et celles qui soutiennent cette activité (contrôle de l'état de contraction : sarcolemme et réticulum sarcoplasmique, maintien de l'intégrité cellulaire lors de la contraction : cytosquelette non contractile, approvisionnement en énergie : mitochondries, enzymes et substrats métabolique du cytoplasme ou sarcoplasme).

### II.1 L'appareil contractile

#### II.1.1 Organisation générale des protéines contractiles

Les myofibrilles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire squelettique. En microscopie photonique, à fort grossissement, elles apparaissent parallèles, orientées selon l'axe longitudinal de la fibre qu'elles parcourent sur toute sa longueur. Elles mesurent de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre et occupent environ 80% du volume de la cellule. Ainsi, selon sa taille, chaque fibre peut posséder plusieurs centaines ou plusieurs milliers de myofibrilles. Ces myofibrilles sont donc extrêmement serrées les unes contre les autres et laissent peu d'espace entre elles. Selon leur fonction, les autres organites sont soit confinés dans les espaces intermyofibrillaires, soit relégués dans les aires périnucléaires et subsarcolemmales.

Chaque myofibrille est constituée d'une alternance de bandes foncées (bandes A pour anisotrope) et claires (bandes I pour isotropes). Les bandes A et I sont parfaitement alignées et se poursuivent sur toute la largeur de la fibre musculaire, ce qui lui donne son aspect strié



**Figure 3 : Filament fin et filament épais.**

Le filament fin est constitué de deux filaments d'actine enroulés en double hélice, associés à des protéines de tropomyosine et troponine (TnC, TnI, TnT). Le filament épais résulte de l'assemblage de deux chaînes lourdes (MHC), et de quatre chaînes légères (MLC) de myosine. Deux chaînes légères sont associées de façon non covalente avec la tête d'une MHC.

(Figure 2). Sur une fibre au repos, chaque bande A présente en son milieu une région plus claire appelée zone H. La zone H est à son tour divisée en deux par une ligne sombre, la strie M. De même, une zone plus foncée nommée strie Z marque le milieu des bandes I. La région comprise entre deux stries Z est appelée **sarcomère**. C'est la plus petite unité contractile (2 à 3  $\mu\text{m}$  de long) de la fibre musculaire. Chaque myofibrille peut être considérée comme une chaîne de sarcomères mis bout à bout.

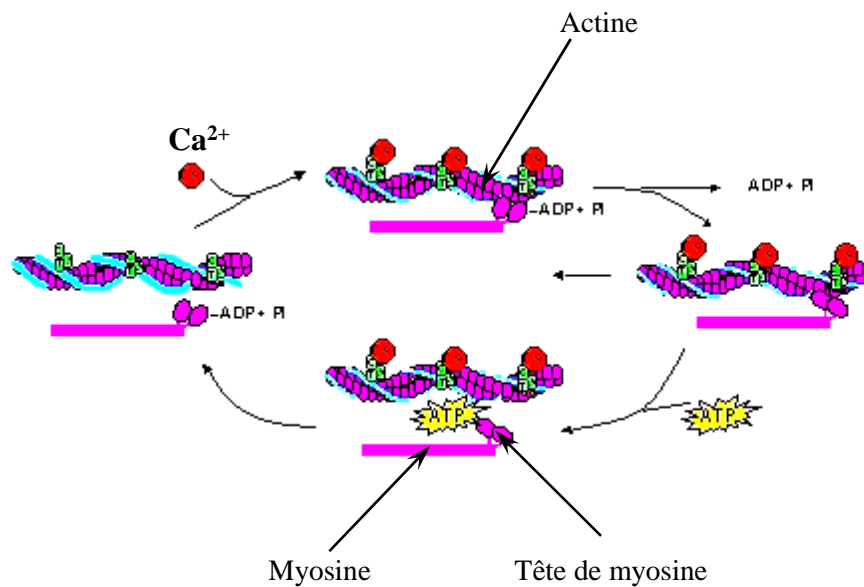
Les stries des myofibrilles sont formées par la disposition ordonnée, à l'intérieur des sarcomères, de deux types de filaments protéiques nommés **myofilaments**. Les filaments épais, de 12 à 16 nm de diamètre, parcourent toute la longueur de la bande A ; les filaments fins, de 5 à 7 nm de diamètre, s'étendent le long de la bande I et de la bande A, exception faite de la zone H. La présence de brins reliant les filaments épais adjacents marque la strie M. La strie Z est formée d'une couche de protéines qui constitue le point d'attache des filaments minces (pour revue, voir Craig, 1994 ; Peachey & Franzini-Armstrong, 1983).

Lorsqu'une cellule musculaire se contracte, chacun de ses sarcomères raccourcit, et les stries Z successives se rapprochent. Cependant, aucun des filaments ne change de longueur : la contraction se fait par glissement des filaments fins le long des filaments épais, de telle sorte qu'ils se chevauchent d'avantage (« *Sliding filament model* », Huxley & Hanson, 1954 ; Huxley & Niedergerke, 1954).

## II.1.2 Protéines constituant l'appareil contractile

### II.1.2.1 Les myofilaments épais :

Les myofilaments épais comprennent essentiellement de la **myosine**, protéine constituée de deux longues chaînes lourdes (PM=200 kDa) (MHC pour *Myosin Heavy Chain*) qui au niveau de leur extrémité C-terminale s'enroulent l'une autour de l'autre en hélice  $\alpha$  (Figure 3). Elles forment ainsi la queue de la molécule. Au niveau de l'extrémité N-terminale, ces chaînes lourdes se séparent et s'associent à deux chaînes légères de myosine (PM de 15 à 30 kDa) (MLC pour *Myosin Light Chain*), formant une structure globulaire qui constitue la tête de la molécule (pour revue, voir Clark et coll., 2002). Les têtes de myosine portent un site de liaison à l'actine (composant des myofilaments fins) et une activité ATPasique, impliquée dans la contraction musculaire. Dans un sarcomère, chaque filament épais compte environ 200 molécules de myosine, regroupées de telle sorte que leurs queues représentent la partie centrale du filament, et que les extrémités globulaires soient orientées dans des directions opposées.



**Figure 4 : Bases moléculaires de la contraction musculaire.**

La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la troponine C permet la fixation des têtes de myosine sur les filaments d'actine. Puis les têtes de myosine pivotent, induisant un glissement des filaments les uns par rapport aux autres. L'hydrolyse de la molécule d'ATP provoque un détachement des têtes de myosine : le processus peut se répéter.

### II.1.2.2 Les myofilaments fins

Les myofilaments fins sont principalement composés d'actine et d'un ensemble de protéines régulatrices : la tropomyosine et la troponine (Figure 6) (pour revue, voir Clark et coll., 2002 ; Pette, 1998) (Figure 3). **L'actine** est un polypeptide formé de plusieurs sous-unités globulaires **d'actine G** (PM=43 kDa), polymérisées en longs brins **d'actine F** qui s'enroulent en double hélice pour former le filament fin. Elle porte des sites de liaison sur lesquels les têtes de myosine se fixent lors de la contraction. **La tropomyosine** (Tm) est un dimère constitué de deux sous-unités :  **$\alpha$ -tropomyosine** (PM=34 kDa) et  **$\beta$ -tropomyosine** (PM=36 kDa). **La troponine** (Tn) est une protéine oligomérique constituée de trois sous-unités ayant chacune une fonction spécifique :

- **la troponine T** (TnT, PM=37 kDa), qui se lie à la Tm, et stabilise le complexe Tn-Tm-actine ;
- **la troponine I** (TnI, PM=23 kDa), qui se fixe à l'actine, et inhibe l'interaction actine-myosine (elle maintient le complexe dans une configuration qui masque le site de fixation de la myosine sur le filament d'actine) ;
- **la troponine C** (TnC, PM=18 kDa), qui se lie aux ions  $Ca^{2+}$  lors de la contraction, et régule l'inhibition exercée par la TnI.

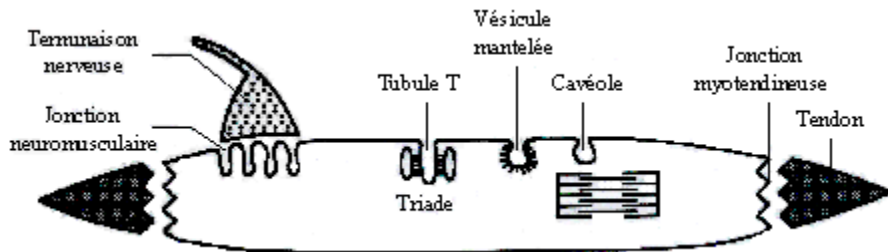
### II.1.3 Importance du calcium lors de la contraction musculaire :

Pour résumer, le glissement des filaments fins le long des filaments épais est produit par l'alternance d'attachements et de détachements de la tête de myosine au filament d'actine (Figure 4). Celle-ci agit comme une crémaillère pour produire une tension et tirer le filament fin vers le centre du sarcomère. La fixation d'ATP sur la tête de myosine et son hydrolyse en ADP+Pi interviennent dans ce cycle d'attachements/détachements. La contraction musculaire est donc une conséquence de l'activation de l'ATPase de la myosine.

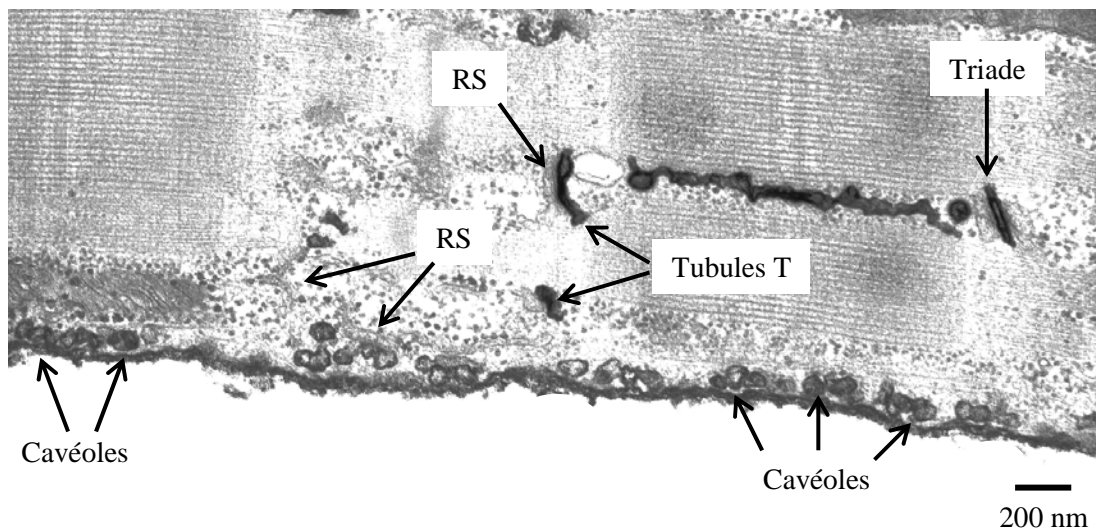
Dans le muscle squelettique, il y a activation de l'ATPase de la myosine lorsque la concentration de calcium cytoplasmique varie de 100 nM à 1  $\mu$ M. En effet, à une concentration calcique de repos, la TnI inhibe l'interaction actine-myosine. Lorsque sa concentration augmente dans le cytoplasme, le calcium se fixe à la TnC, qui va lever l'inhibition exercée par la TnI, en permettant le déplacement de la Tm. La myosine se fixe alors sur le filament d'actine. Elle subit une modification conformationnelle consommatrice d'énergie (activation de l'ATPase et hydrolyse d'une molécule d'ATP), qui produit une tension sur le filament d'actine, à l'origine de la contraction. Le calcium se lie également à la calmoduline, molécule activant les calmodulines-kinases qui vont phosphoryler les MLCs régulatrices. La phosphorylation de ces MLCs n'est pas essentielle à la contraction du muscle squelettique chez les Vertébrés, mais elle augmenterait, lors d'une faible activation de la contraction par le calcium, la force développée et la vitesse de redéveloppement de force. Les MLCs possèdent elles aussi un site de fixation du calcium, dont le rôle n'est cependant pas établi (pour revue, voir Gordon et coll., 2000 ; Perry, 1994).



(a)



(b)



**Figure 5 : Différenciations du sarcolemme.**

(a) Représentation schématique d'une fibre musculaire illustrant les spécialisations morphologiques du sarcolemme (d'après Horwitz et coll., 1994). (b) Photographie en microscopie électronique d'une fibre musculaire intercostale de fœtus de souris à E18.

Lors de la relaxation, la concentration de calcium cytoplasmique retourne à des valeurs de repos. Le calcium se détache alors de la TnC qui change de forme, permettant à la Tm de masquer à nouveau les sites actifs de l'actine.

D'autres protéines interviennent également dans la contraction et la relaxation musculaire. C'est le cas de la titine, qui s'étend de la strie M à la strie Z et confère, entre autre, ses propriétés élastiques au sarcomère. Bien que le rôle de la titine ait été longtemps considéré comme passif, de récentes études suggèrent qu'à faibles niveaux de calcium, les propriétés de la protéine et ses interactions avec les autres filaments varient, ce qui pourrait modifier les propriétés du sarcomère (pour revue, voir Clark et coll., 2002, Gordon et coll., 2000).

## II.2 Systèmes membranaires spécifiques

La cellule musculaire squelettique contient des systèmes membranaires spécifiques comme le sarcolemme et le réticulum sarcoplasmique (RS), qui constituent des éléments clés dans le contrôle de l'activité contractile. Ces deux systèmes interagissent au niveau de structures précises, les triades, de sorte que le signal électrique émis au niveau de la jonction neuromusculaire soit transmis jusqu'au RS, qui libère le calcium nécessaire à la contraction.

### II.2.1 Sarcolemme et microdomaines sarcolemmaux

En microscopie électronique, la surface de la fibre musculaire apparaît composée de trois structures : l'endomysium, la lame basale et **le sarcolemme**. Comme nous l'avons vu précédemment, l'endomysium est un tissu conjonctif principalement composé de fibres de collagène. La lame basale constitue un feutrage sur lequel s'appuie ce réseau de fibres. Elle entretient des contacts moléculaires étroits avec le sarcolemme, véritable limite externe de la cellule. Le sarcolemme n'est pas une surface plane, mais présente de nombreuses invaginations qui accroissent la surface membranaire (Figure 5). Ces invaginations sont abondantes au niveau de zones jonctionnelles : la jonction myotendineuse et la jonction neuromusculaire. Les zones extra-jonctionnelles, quant à elles, présentent trois types d'invaginations : les vésicules mantelées, les cavéoles, et les tubules transverses (tubules T) (pour revue, voir Ishikawa et coll., 1983 ; Peachey & Franzini-Armstrong, 1983).

**Les cavéoles** sont de petites invaginations en forme d'oméga, de 50 à 100 nm de diamètre, présentes dans presque tous les types de tissus. Leur présence augmente de 60 à 80 % l'aire du sarcolemme. Les cavéoles se regroupent en anneaux situés à l'aplomb des bandes I et stries M. On en trouve également à proximité de l'embouchure des tubules T (pour revue, voir Franzini-Armstrong, 1994 ; Razani et coll., 2002 ).

**Les tubules T** forment un réseau d'invaginations spécifique du muscle strié, le système tubulaire transverse, qui pénètre profondément la fibre musculaire. Il s'insinue entre les

myofibrilles et envoie des ramifications autour de chaque sarcomère (Figure 2). Il permet ainsi la propagation rapide du potentiel d'action et l'acheminement de substances nutritives au cœur de la fibre. Chez le mammifère, les tubules T se situent au niveau des jonctions entre bandes A et I. Dans les fibres musculaires squelettiques, le système tubulaire transverse comprend deux régions distinctes. Certains segments apparaissant comme des tubules droits, plats et allongés, établissent des jonctions avec le RS : ce sont **les tubules T jonctionnels**. Ils constituent la majorité du réseau tubulaire transverse. Ils sont reliés par des tubules étroits de section circulaire et d'aspect sinueux, constituant **les tubules T non-jonctionnels**. Les tubules T sont de plus connectés les uns aux autres par des extensions longitudinales (pour revue, voir Peachey & Franzini-Armstrong, 1983).

### II.2.2 Le réticulum sarcoplasmique

Le RS est constitué d'un vaste réseau membranaire interne, en continuité avec la membrane nucléaire et délimitant un espace clos, isolé du cytoplasme. C'est une forme complexe de réticulum endoplasmique lisse, spécifique de la cellule musculaire pour laquelle il joue le double rôle de réservoir calcique intracellulaire et de principal régulateur de la concentration cytoplasmique en calcium lors de la contraction. Son réseau de citernes, parallèle aux myofibrilles, enveloppe chacune d'elle à la manière d'un manchon de dentelle (Figure 2). Ce réseau s'interrompt au niveau des deux jonctions A/I de chaque sarcomère, laissant la place aux tubules T. Des connections filamenteuses, au niveau des stries Z, relient le RS aux myofibrilles, stabilisant sa disposition vis-à-vis des sarcomères.

Le RS est divisé en 3 régions de morphologie différente : le réticulum fenestré, le réticulum tubulaire ou longitudinal, et le réticulum jonctionnel ou citernes terminales. **Le réticulum tubulaire** est composé de tubules parallèles, orientés de façon longitudinale. Au niveau des zones H des sarcomères, ces tubules fusionnent pour former **le réticulum fenestré**. Celui-ci est plat et perforé de pores, constitués par la fusion des membranes du réticulum (ces pores traversent totalement le RS et permettent ainsi la communication des deux compartiments cytoplasmiques situés de part et d'autre). Enfin, les extrémités en forme de « cul-de-sac » correspondent aux **citernes terminales**, qui établissent des contacts avec les tubules T. Chaque tubule T est entouré de deux citernes terminales, constituant des structures à trois éléments nommées triades (pour revue, voir Franzini-Armstrong, 1994 ; Ishikawa et coll., 1983 ; Peachey & Franzini-Armstrong, 1983;).

### II.2.3 Les triades

Les triades sont des zones de jonction où les membranes du système tubulaire transverse et du RS sont en étroite apposition : l'espace compris entre les membranes de ces deux structures varie entre 12 et 17 nm. Il est caractérisé par la présence de structures visibles en microscopie électronique, les « pieds jonctionnels », qui « pontent » les deux membranes. Ces éléments

ont un rôle fondamental dans le contrôle de l'activité contractile : leur disparition chez la souris dysgénique est associée à une absence de contraction (Rieger et coll., 1987).

## II.2.4 Développement des systèmes membranaires spécifiques

La maturation des systèmes membranaires se déroule en parallèle, suivant 4 grandes étapes interconnectées :

- 1) augmentation du nombre de tubules T et de vésicules de RS ;
- 2) augmentation du nombre de liaisons entre tubules T et RS ;
- 3) acquisition de la « morphologie adulte » pour les deux systèmes membranaires ;
- 4) orientation transversale des triades, et localisation à la jonction A-I.

Le but de cette partie est de donner quelques repères chronologiques quant à la mise en place de ces systèmes dans notre modèle fœtal : le muscle du tronc de la souris.

### II.2.4.1 Biogenèse du système tubulaire transverse

Les **tubules T** apparaissent à E15, sous forme de petites invaginations tubulaires de la membrane plasmique. Ils sont alors peu nombreux (Takekura et coll., 2001). À E16, ces tubules sont plus fréquents, plus longs, et s'insinuent entre les myofibrilles (Franzini-Armstrong, 1991 ; Takekura et coll., 2001). Leur orientation est alors majoritairement longitudinale. Ces tubules longitudinaux sont reliés entre eux par des segments transversaux ou obliques. À ce stade, seules de courtes portions du système tubulaire transverse forment des liaisons avec le RS. La maturation du système tubulaire transverse se poursuit ensuite de la manière suivante : 1) augmentation de la densité de tubules T ; 2) augmentation du nombre de triades ; 3) basculement des tubules T et triades qui prennent une position transversale, et localisation au niveau des jonctions A-I des sarcomères.

### II.2.4.2 Biogenèse du réticulum sarcoplasmique

Le **RS** est présent de façon très précoce au cours du développement. Dès l'apparition des myofibrilles (E14), il s'intercale entre elles sous forme de vésicules. Ces vésicules sont reliées par des connections filamenteuses à la bande Z (Franzini-Armstrong, 1991 ; Takekura et coll., 2001). À E17, le RS s'organise en réseau tubulaire au niveau des jonctions A-I (Takekura et coll., 2001). La différenciation du RS en trois zones n'est pas encore établie : toutes ses membranes forment, de façon aléatoire, des liaisons avec les tubules T. L'apparition des trois zones est progressive et coïncide avec le passage des jonctions triadiques à une position transversale (Franzini-Armstrong, 1991). Le RS peut former plusieurs types de jonctions avec les structures sarcolemmales : jonctions périphériques avec la membrane de surface, ou jonctions avec les tubules T (diades : accollement d'un tubule T et d'une citerne de RS, triades et pentades : deux tubules pour trois citernes de RS). Les zones de couplage périphérique ont une existence temporaire aux cours du

développement, fortement liée à l'évolution du système tubulaire transverse. Elles se forment à E14 (avant apparition des tubules T), et disparaissent totalement entre E15 (apparition des tubules T) et E18 (Takekura et coll., 2001). Les triades, quant à elles, apparaissent dès E15. Elles adoptent un motif de distribution sarcomérique (au niveau les jonctions A-I) bien avant que leur orientation transversale ne se mettent en place. La transition longitudinale/transversale est graduelle, passant par des stades obliques. Une bonne partie de cette transition vers la position transversale se déroule entre E16 et E18 (Franzini-Armstrong, 1991). Elle s'achève trois semaines après la naissance. Diades et pentades apparaissent avant les triades et ont une existence transitoire : elles sont pratiquement absentes chez l'adulte.

### **II.3 Cytosquelette non contractile ou exosarcomérique :**

Le cytosquelette exosarcomérique peut être subdivisé en deux groupes : le cytosquelette périmyofibrillaire, qui relie entre elles les myofibrilles adjacentes ; et le cytosquelette sous-sarcolemmal, qui connecte l'appareil contractile au sarcolemme, et de façon indirecte, à la matrice extracellulaire (Berthier & Blaineau, 1997). Le cytosquelette non contractile assure la liaison d'une part entre les myofibrilles, permettant la coordination de la contraction dans l'ensemble de l'appareil contractile ; d'autre part entre myofibrilles et matrice extracellulaire, renforçant la résistance de la structure cellulaire à la contraction.

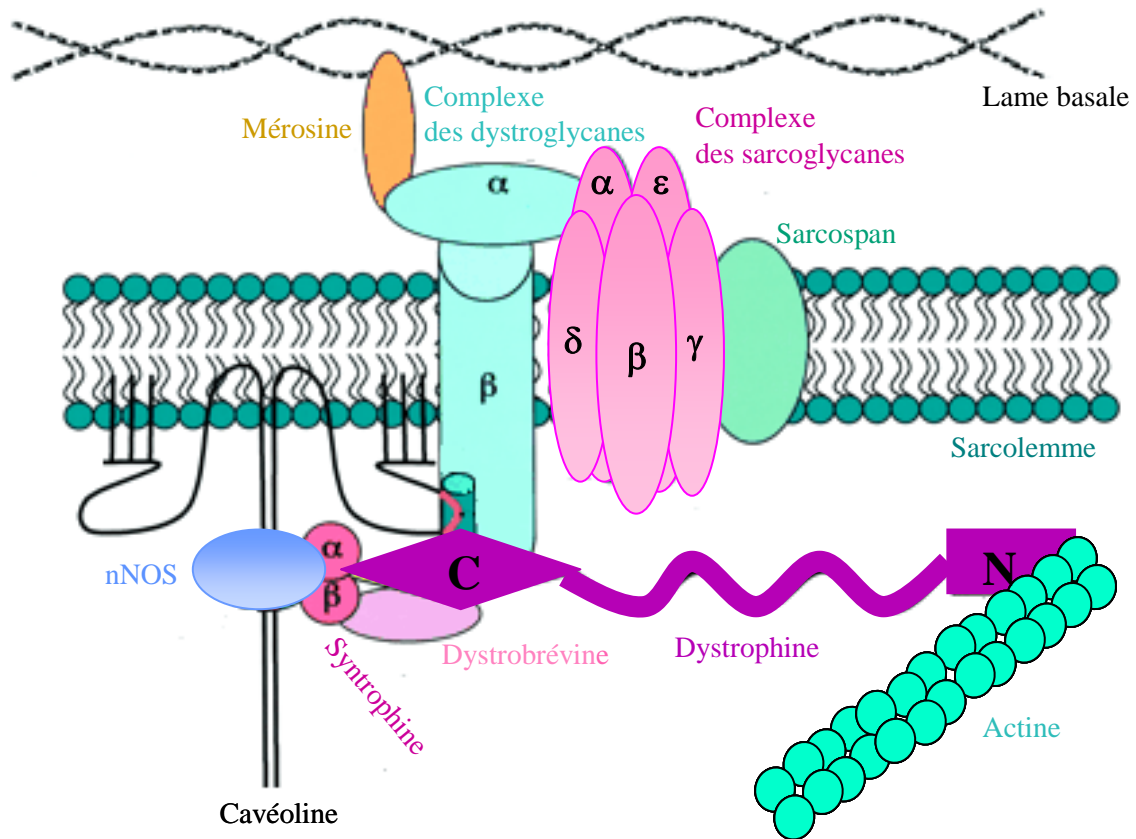
#### **II.3.1 Le cytosquelette périmyofibrillaire**

Le cytosquelette périmyofibrillaire du muscle squelettique est composé d'actine  $\gamma$  non contractile et de filaments intermédiaires de desmine (Clark, 2002). Dans l'espace myofibrillaire, la desmine est concentrée autour des stries Z, établissant, à ce niveau, un lien entre les myofibrilles adjacentes. Elle permet ainsi de coordonner la contraction entre les différentes myofibrilles.

D'autres protéines entrent dans la composition des filaments intermédiaires, comme la vimentine, la nestine, la synémine, la paranémine, etc. Leur rôle est cependant moins bien établi.

#### **II.3.2 Le cytosquelette sous-sarcolemmal**

Le cytosquelette sous-sarcolemmal est relié à diverses protéines, dont l'actine  $\gamma$  non contractile, et de façon plus ou moins directe, les filaments intermédiaires du cytosquelette périmyofibrillaire. Les protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal ont une répartition très spécifique dans la fibre musculaire. Elles sont concentrées au niveau de trois régions hautement spécialisées : les jonctions neuromusculaires, les jonctions myotendineuses et les costamères.



**Figure 6 : Structure du complexe protéique associé à la dystrophine.**

D'après Razani et coll., 2002.

La dystrophine est reliée à l'actine non contractile par sa partie N-terminale. Sa région riche en cystéines s'associe au complexe des dystroglycanes, qui interagit avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de la mérosine. Sa partie C-terminale lui permet de s'associer aux syntrophines, lesquelles sont capables de se lier à la nNOS. La nNOS est également reliée à la cavéoline-3, protéine qui s'associe au groupe dystrophine/DAPs par liaison avec le  $\beta$ -dystroglycane.

### II.3.2.1 *Les costamères*

Les costamères sont des domaines sous-membranaires spécifiques, discontinus, et à distribution régulière. Ils furent décrits pour la première fois par Pardo et coll. (1983), comme des aires enrichies en vinculine, se présentant sous forme d'anneaux perpendiculaires à l'axe de la fibre musculaire, et disposés à intervalles réguliers, à l'aplomb de chaque bande I avec interruption au niveau de la strie Z. Les costamères furent alors nommés selon leur apparence (Latin *costa*, côte). Par la suite, des protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal furent localisées à d'autres endroits du sarcolemme : par exemple, à l'aplomb de la strie M (Porter et coll., 1992). Ainsi, la notion de costamère s'est quelque peu élargie. De nos jours, dire d'une protéine ou d'une structure membranaire qu'elle a une distribution costamérique signifie essentiellement qu'elle présente une répartition sous-membranaire hétérogène, discontinue et répétitive.

La fonction principale des costamères semble être l'ancrage de l'appareil contractile au sarcolemme et à la lame basale, permettant ainsi la transmission de la force contractile à la matrice extra-cellulaire et le maintien de l'intégrité du sarcolemme lors de la contraction (Pardo et coll., 1983 ; Porter et coll., 1992). Ils sont également impliqués dans le compartimentage de protéines membranaires et sous-sarcolemmales, la transduction de signaux métaboliques et la détection du stress mécanique. Enfin, certaines structures membranaires spécifiques sont localisées au niveau des costamères, en particulier les cavéoles.

### II.3.2.2 *Les protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal : le groupe dystrophine/DAG*

Les protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal peuvent être classées en trois groupes, d'après les interactions physiques qu'elles établissent entre elles : le groupe des intégrines, le groupe spectrine et le groupe dystrophine/DAG (Dystrophin Associated Glycoproteins, pour revue, voir Berthier & Blaineau, 1997). Nous nous concentrerons dans cette partie sur le groupe dystrophine/DAG, ce complexe protéique étant impliqué dans les structures et voies de signalisation qui font l'objet de cette thèse.

Le groupe dystrophine/DAG est composé d'une quinzaine de protéines associées les unes aux autres (Figure 6). Il permet grâce à un complexe transmembranaire de relier l'actine non contractile à la matrice extracellulaire. Ce groupe s'articule autour d'une protéine, la dystrophine. La dystrophine est liée au **complexe des DAG**, constitué de quatre sous-ensembles : les dystroglycanes, les sarcoglycanes, les syntrophines, et la dystrobrevine. Les DAGs interagissent avec d'autres protéines, impliquées dans la structure et la signalisation cellulaire. Par exemple, le  $\beta$ -dystroglycane s'associe à la cavéoline-3, isoforme musculaire de la cavéoline, une protéine membranaire intervenant dans la composition des cavéoles (Sotgia et coll., 2000). De même, l' $\alpha$ 1-syntrophine se lie à l'isoforme neuronale de la NO synthase (nNOS), constituant, dans le muscle squelettique, un des points d'ancrage de cette enzyme au sarcolemme (Wakayama et coll., 1997).

### III Les microdomaines sarcolemmaux

Cavéoles et tubules T ne sont pas de simples différenciations morphologiques de la membrane de surface : ils constituent de véritables microdomaines structuraux et fonctionnels, différent du reste du sarcolemme par leur composition et leur implication spécifique dans certains mécanismes de signalisation intracellulaire.

#### III.1 Propriétés biochimiques des microdomaines sarcolemmaux :

Bien que connectés au sarcolemme, les tubules T et les cavéoles ont une composition lipidique distincte. En effet, ces structures sont enrichies en **cholestérol et sphingolipides** (sphingomyéline et glycosphingolipides) (Fielding & Fielding, 2000 ; Hidalgo 1985 ; Razani et coll., 2002 ; Roseblatt et coll., 1981). Elles restent isolées dans la membrane de surface sous forme d'îlots, au sein desquels les molécules ont une mobilité restreinte. Ces structures présentent des propriétés biochimiques particulières : une faible densité, et une résistance à la solubilisation par des détergents non ioniques tels que le Triton X-100 (à 4 °C).

Cavéoles et tubules T contiennent une famille de protéines intégrées à la membrane, de PM 21 à 24 kDa : **les cavéolines**. La famille des cavéolines comporte trois isoformes principales, nommées Cav-1, Cav-2 et Cav-3. La Cav-3 n'est exprimée que dans les cellules musculaires : elle est rencontrée dans les muscles cardiaque, squelettique, et lisse (Song et coll., 1996 ; Tang et coll., 1996). Elle forme, par oligomérisation, des complexes de 350 à 400 kDa (Tang et coll., 1996). Dans le muscle squelettique, Cav-3 est localisée dans les cavéoles et les tubules T, tant au cours du développement (Parton et coll., 1997) que chez l'adulte (Ralston & Ploug, 1999). On la retrouve également à la JNM et la JMT.

#### III.2 Biogenèse et maintien de l'intégrité structurale des microdomaines sarcolemmaux

##### III.2.1 Rôle du cholestérol

Le développement et le maintien de l'intégrité structurale des tubules T et des cavéoles dépend, entre autre, de la présence de cholestérol membranaire. En effet, l'application d'agents séquestrant le cholestérol sur des cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses produit un aplatissement de leurs cavéoles (voir par exemple Löhn et coll., 2000 ; Rothberg et coll., 1992 ; Schnitzer et coll., 1994). Sur la lignée de cellules musculaires squelettiques C2C12, un tel traitement provoque une forte réduction de la longueur de tubules T connectés à la surface, et une redistribution des marqueurs des tubules T (Cav-3 et sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR) vers des endosomes (Carozzi et coll., 2000). De plus, il a été démonté, dans des



cellules MDCK, que le contenu cellulaire en cholestérol doit atteindre un certain niveau avant que la formation de cavéoles n'ait lieu (Hailstones et coll., 1998).

### III.2.2 Rôle de la cavéoline

Après l'identification de la Cav-3 en 1996 (Song et coll., 1996), une multitude d'études fut réalisée, supportant l'implication de cette protéine dans la genèse des tubules T. Ainsi, Biederer et coll (2000) démontrèrent que l'ARNm de la Cav-3 est détectable dans les somites en développement et dans le cœur, au 10<sup>ème</sup> jour de gestation, bien avant la maturation des tubules T. De plus, la Cav-3 est associée aux tubules T lors du développement (Parton et coll., 1997). Par la suite, la génération de souris déficientes en Cav-3 permet de confirmer le rôle central de cette protéine dans le développement et le maintien des microdomaines sarcolemmaux. Ainsi, les fibres musculaires squelettiques matures de souris Cav-3 *KO* ne possèdent pas de cavéoles, et présentent, en microscopie électronique, des tubules T dilatés et orientés de façon longitudinale, cette orientation étant, en temps normal, rencontrée dans le muscle en développement (Galbiati et coll., 2001a). À l'inverse, le nombre de cavéoles est augmenté dans des fibres musculaires squelettiques isolées à partir de souris surexprimant Cav-3 (Galbiati et coll., 2000).

L'étude de certaines pathologies musculaires a apporté des informations supplémentaires concernant le rôle de la Cav-3 (pour revue, Galbiati et coll., 2001b). Ainsi, chez les patients atteints de LGMD-1C (Limb-Girdle Muscular Dystrophy), une forme de la myopathie des ceintures associée à deux mutations du gène Cav-3, la perte de 95% de l'expression de la protéine Cav-3 dans les muscles squelettiques est associée à une désorganisation du système tubulaire transverse, et une diminution du nombre de cavéoles (Minetti et coll., 1998 ; 2002). À l'inverse, dans les fibres musculaires des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), la protéine Cav3 est surexprimée, et une augmentation du nombre et de la taille des cavéoles est observée (Repetto et coll., 1999). Ces deux caractéristiques sont retrouvées dans le muscle squelettique de la souris *mdx* (X-linked Muscular Dystrophy), un modèle animal de la DMD (Vaghy et coll., 1998).

L'implication de la cavéoline dans la genèse et le maintien des microdomaines sarcolemmaux pourrait être attribuée à son action sur le métabolisme cellulaire du cholestérol. En effet, Cav-1 se lie à cet alcool (Thiele et coll., 2000), interviendrait lors de son transport du lieu de synthèse (réticulum endoplasmique) à la membrane, et régule son niveau cellulaire (Razani et coll., 2002). Cependant, l'implication de Cav-3 dans le transport du cholestérol n'est pas démontrée à ce jour.

### **III.3 Les microdomaines sarcolemmaux : des carrefours de signalisation membranaires**

Si l'implication des tubules T dans la signalisation intracellulaire, plus précisément le couplage excitation-contraction, est depuis longtemps établie, la fonction des cavéoles a fait l'objet de nombreuses spéculations depuis leur découverte en 1955 (pour revue, Razani et coll., 2002). En 1994, Lisanti et coll. constataient que la plupart des molécules contenues dans les cavéoles de cellules endothéliales appartiennent à diverses voies de signalisation. Ils proposèrent alors ces cavéoles comme des organites spécialisés dans la transduction du signal ; leur rôle de compartimentage des molécules-signal permettrait des interactions entre différentes voies de signalisation. Aujourd'hui, l'implication des cavéoles dans la signalisation intracellulaire du muscle squelettique est largement admise. Diverses molécules-signal sont localisées dans ces microdomaines : le récepteur des dihydropyridines, la nNOS, les phosphokinases  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , l'adenylyl cyclase, etc. Certaines ont une fonction régulée par la Cav-3 (pour revue, Razani et coll., 2002). Les cavéoles contiennent également le complexe dystrophine-glycoprotéines (Song et coll., 1996) ; Cav-3 coimmunoprécipite et interagit avec les  $\alpha$ -sarcoglycanes,  $\beta$ -dystroglycanes, et la dystrophine (Figure 6) (Song et coll., 1996 ; Sotgia et coll., 2000).

L'importance des cavéoles et tubules T dans la fonction musculaire est illustrée par le fait que de nombreuses pathologies sont associées à une perturbation de ces structures (pour revue, Galbiati et coll., 2001b ; Razani et coll., 2000). Par ailleurs, des dysfonctionnements des voies de signalisation associées à Cav-3 sont fréquemment rencontrés dans ces pathologies. Ainsi, l'expression de la nNOS et son activité enzymatique sont diminuées dans le muscle squelettique de la souris *mdx* (Vaghy et coll., 1998). À l'inverse, les souris transgéniques surexprimant le mutant P104L de Cav-3 (une des mutations rencontrées chez les patients atteints de LGMD-1C) développent de sévères myopathies, accompagnées d'une augmentation significative de l'activité nNOS dans le muscle squelettique (Sunada et coll., 2001).

### **III.4 L'oxyde nitrique (NO) : une voie de signalisation associée aux microdomaines sarcolemmaux**

Le NO et ses dérivées sont des médiateurs essentiels dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, au sein d'une large variété de types tissulaires. La présence de la voie de signalisation du NO (activité de synthèse de NO et protéine nNOS) dans le muscle squelettique a été mise en évidence chez l'Homme par Nakane et coll. en 1993, puis chez le rat (Kobzik et coll., 1994).

(a)

nNOS ( <i>neuronal</i> )	iNOS ( <i>inducible</i> )	eNOS ( <i>endothelial</i> )
Constitutive	Induite	Constitutive
Sarcolemme	Cytosol	Mitochondrie
Calcium-calmoduline	Transcription	Calcium-calmoduline
Fibres rapides	Non testé	Non spécifique
	Action antimicrobienne	?

(b)

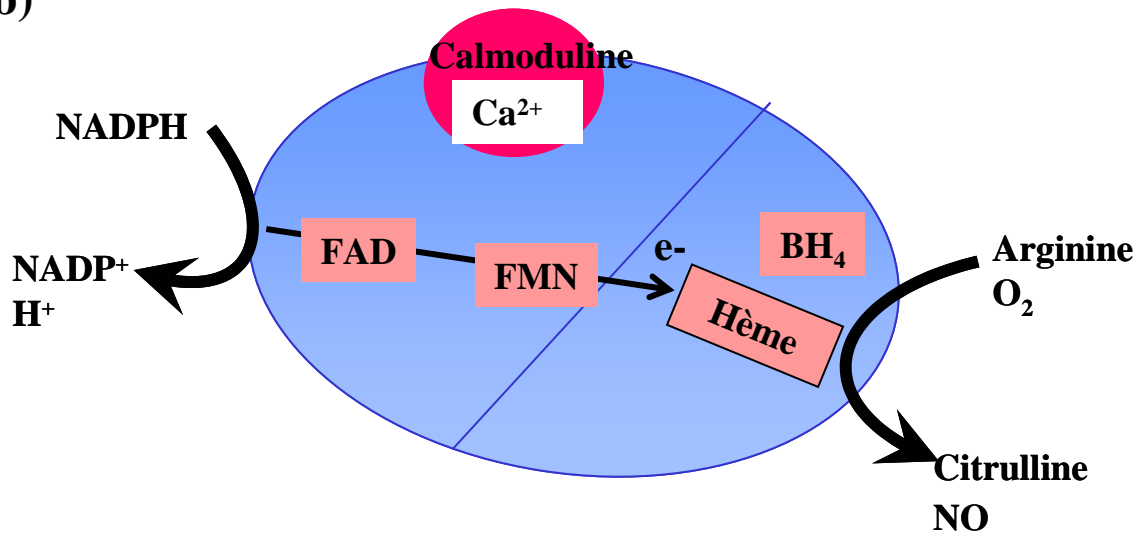


Figure 7 : La NO synthase.

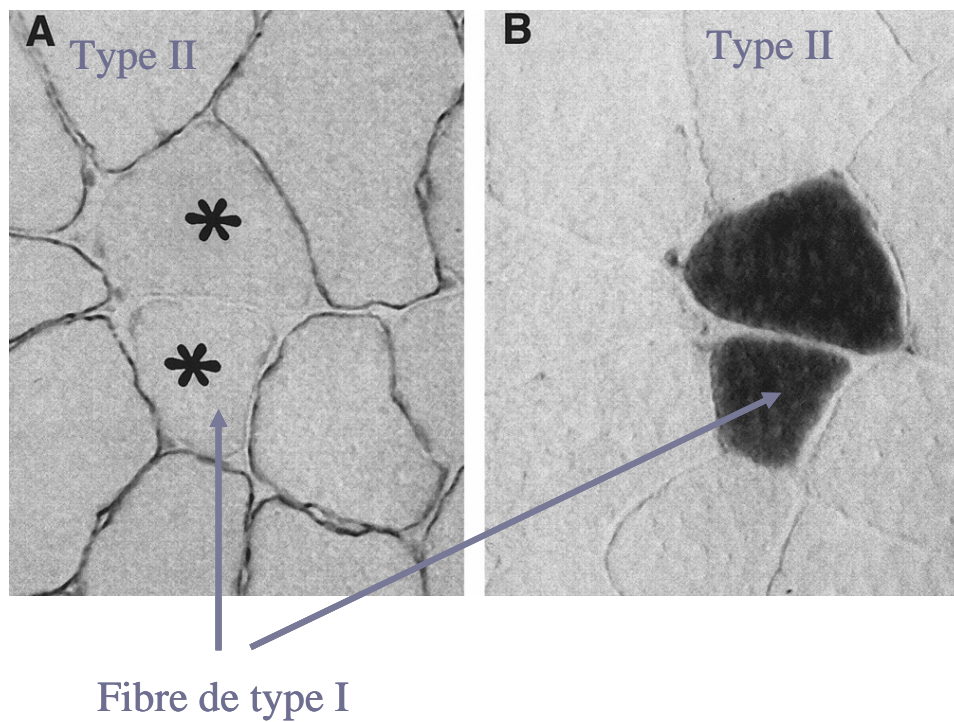
(a) Expression, localisation et régulation des trois isoformes de la NOS (d'après Reid, 1998). (b) La NOS permet la synthèse de NO et de citrulline à partir de L-arginine et d'O<sub>2</sub>. Son activité est régulée par le calcium et la calmoduline. La réaction nécessite comme cofacteurs le NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), le FAD (Flavin Adenine Dinucleotide), le FMN (Flavin MonoNucleotide), la BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine) et l'hème (d'après Alderton et coll., 2001).

### III.4.1 La NO synthase, enzyme clé de la voie du NO

Les synthases de l'oxyde nitrique (NOS pour Nitric Oxide Synthase) sont des hémoprotéines. Elles existent sous trois isoformes principales, nommées d'après leur ordre de découverte, et d'après les cellules et systèmes à partir desquels elles ont été initialement purifiées (chaque isoforme présente une large distribution tissulaire) : la **nNOS** (*neuronal*) ou NOS1, la **iNOS** (*immune* ou *calcium calmoduline independent* ou *inducible*) ou NOS2, et la **eNOS** (*endothelial*) ou NOS3 (Figure 7a). Les muscles squelettiques de mammifère peuvent exprimer les trois isoformes de la NOS (pour revue, voir Stamler & Meissner, 2001). Cependant, la iNOS est induite par des processus inflammatoires, et n'est pas ou très peu exprimée de manière constitutive. Par ailleurs, l'expression de eNOS est faible : ni la libération de NO par le muscle isolé, ni la fonction contractile, ne sont altérées dans le muscle squelettique (diaphragme et soleus) de souris *KO* pour eNOS (Hirschfield et coll., 2000). Ainsi, l'isoforme fonctionnelle principale du muscle squelettique semble être la nNOS, plus précisément un variant d'épissage nommé nNOS $\mu$  (Silvagno et coll., 1996).

La NOS produit du NO et de la citrulline à partir de L-arginine et d'O<sub>2</sub> (Figure 7b). La terminologie NO au sens large regroupe en fait toute une variété de composés biologiquement actifs : le NO lui-même (oxyde nitrique), NO<sup>-</sup> (anion Nitroxyl), N<sub>2</sub>O (oxyde nitreux), NO<sup>+</sup> (cation nitrosyl (nitrosonium)), NO<sup>2-</sup> (Nitrite), N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (diazote trioxyde), NO<sup>2</sup> (dioxyde d'azote), N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (diazote tétraoxyde), ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite), NO<sup>2+</sup> (cation nitryl), NO<sup>3-</sup> (nitrate). La réaction nécessite comme cofacteurs le NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), le FAD (Flavin Adenine Dinucleotide), le FMN (Flavin MonoNucleotide), la tétrahydrobioptérine, l'hème et la calmoduline (Figure 7b). nNOS et eNOS sont activées par interaction avec le calcium et la calmoduline. En revanche, la calmoduline reste liée à la iNOS à des niveaux de calcium de repos : la iNOS est donc régulée au niveau transcriptionnel. Dans le muscle squelettique, l'activité de la nNOS est stimulée par des signaux extracellulaires qui augmentent la concentration cytosolique de calcium, facilitant en conséquence l'interaction de l'enzyme avec la calmoduline : stimulation du muscle, ou contraction musculaire (Hirschfield et coll., 2000 ; Kobzik et coll., 1994 ; Silveira et coll., 2003). À l'inverse, les protéines Cav-3, PIN et CAPON sont des inhibiteurs endogènes de la nNOS.

L'expression de la nNOS varie selon le type de fibre musculaire (Figure 8). Ainsi, chez les rongeurs, la nNOS apparaît, par immunomarquage, concentrée dans les fibres de type II (rapides), mais faiblement exprimée, voir absente, dans les fibres de type I (lentes) (Brenman et coll., 1995 ; Kobzik et coll., 1994). Ces observations sont supportées par l'étude de Kobzik et coll. (1994), qui a mis en évidence une corrélation entre l'activité de la nNOS et le pourcentage de fibres de type II dans le muscle. En mesurant la conversion de [<sup>3</sup>H]-arginine en [<sup>3</sup>H]-citrulline, ces auteurs ont en effet évalué une activité variant de 2.5 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine dans le soleus (13% de fibres de type II) à 13.5 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine dans l'EDL (98% de fibres de type II). Cependant, une telle corrélation n'a pas pu être démontrée



**Figure 8 : Localisation de la NO synthase dans la fibre musculaire squelettique.**

D'après Kobzik et coll., 1994.

(a) Immunomarquage de la NOS dans des sections au cryostat d'un muscle squelettique de rat, montrant un marquage net de la membrane de surface dans la plupart des fibres. (b) Le marquage de la coupe adjacente à l'ATPase identifie les fibres marquées pour la NOS comme des fibres de type II, et les fibres non marquées comme des fibres de type I.

chez l'Homme. Notons par ailleurs que, contrairement à la nNOS, la eNOS est exprimée à la fois dans les fibres lentes et rapides, où elle semble spécifiquement localisée dans la mitochondrie.

### III.4.2 Localisation de la nNOS dans la fibre musculaire squelettique

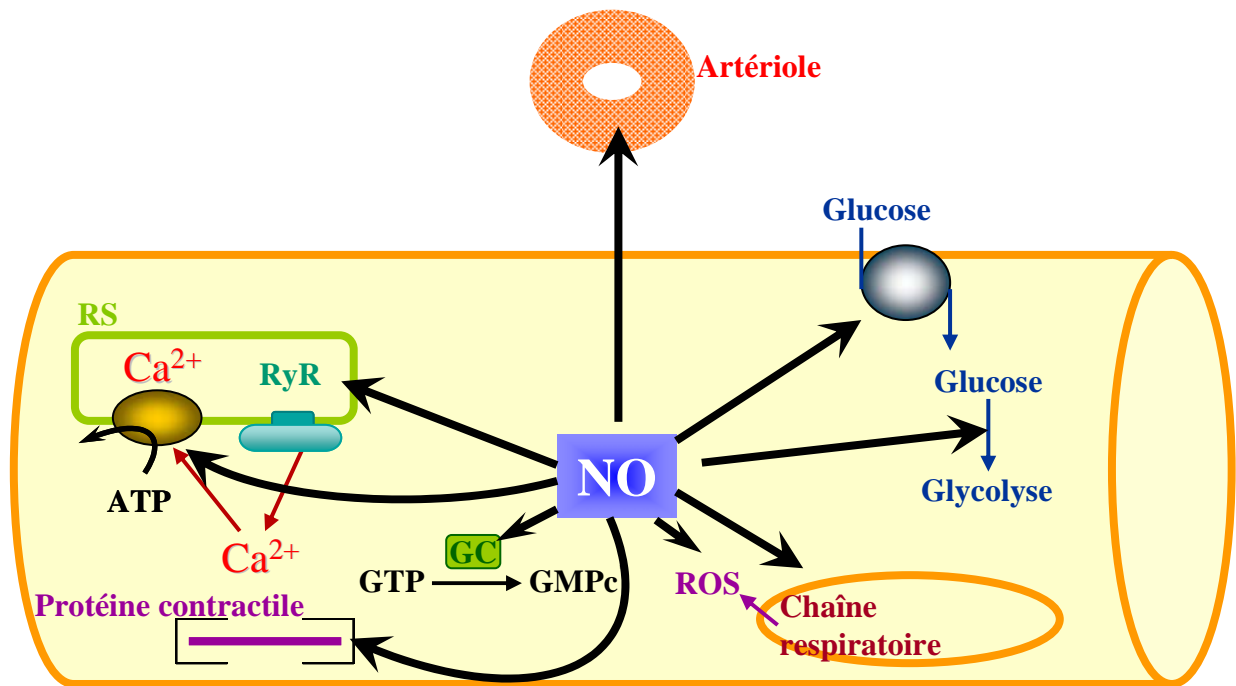
Dans le muscle squelettique adulte, la nNOS est concentrée au niveau de structures spécialisées du sarcolemme (la JNM, la JMT et les costamères) par liaison au complexe dystrophine/DAG (Brenman et coll., 1995), plus précisément à l' $\alpha$ 1-syntrophine (Wakayama et coll., 1997). Une des conséquences de l'absence de dystrophine, chez les patients atteints de dystrophie de Duchenne et les souris *mdx*, est la perte de la nNOS du sarcolemme, qui est redistribuée, en quantité inférieure, dans le cytoplasme (Brenman et coll., 1995 ; Chang et coll., 1995a). Cette anomalie de localisation est accompagnée d'une diminution de l'activité totale de la nNOS dans la cellule (Brenman et coll., 1995, Chang et coll., 1995a) et du niveau de son ARNm, suggérant une diminution de l'expression de la protéine (Chang et coll., 1995a). De même, dans les muscles squelettiques de souris  $\alpha$ 1-syntrophine *KO*, la nNOS est absente du sarcolemme et redistribuée dans le cytoplasme (Kameya et coll., 1999). L'ancrage de la nNOS au sarcolemme pourrait toutefois impliquer des protéines supplémentaires (voir par exemple Abdelmoity et coll., 2000).

S'ajoutant aux structures évoquées précédemment, Wakayama et coll (1997) ont observé, dans le muscle squelettique humain, un regroupement de l' $\alpha$ 1-syntrophine, la dystrophine et la nNOS au niveau d'aires sous-sarcolemmales, situées près des mitochondries, qu'ils proposèrent comme des cavéoles. Ces résultats sont appuyés par plusieurs travaux, qui font état d'interactions entre la nNOS et la Cav-3, l'isoforme de cavéoline exprimée dans le muscle squelettique : nNOS coimmunoprécipite avec Cav-3, (Venema et coll., 1997), les deux protéines sont colocalisées, par immunocytochimie, au niveau du sarcolemme (Segal et coll., 1999). La Cav-3 inhibe la nNOS, probablement par déplacement de la calmoduline (Garcia Gardena et coll., 1997 ; Venema et coll., 1997). En revanche, elle ne permet pas son ancrage dans le sarcolemme, l'enzyme étant délocalisée dans les muscles de souris *mdx*, qui surexpriment Cav-3 (Brenman et coll., 1995 ; Chang et coll., 1995a ; Vaghy et coll., 1998).

La nNOS pourrait également être localisée, dans la fibre musculaire squelettique, au niveau d'organites intracellulaires. Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas, à ce jour, de confirmer ou d'invalider cette hypothèse (pour revue, Stamler et Meissner, 2001).

### III.4.3 Implication de la nNOS dans fonction du muscle squelettique.

Le NO module de nombreuses fonctions du muscle squelettique : la différenciation des myotubes, l'activité contractile, l'autorégulation du flux sanguin, la respiration, le transport de glucose, la glycolyse et la respiration mitochondriale (Figure 9) (pour revue, voir Stamler &



**Figure 9 : Cibles potentielles du NO dans le muscle squelettique .**  
 D'après Grozdanovic, 2001.

Meissner, 2001 ; Reid, 1998). Par ailleurs, de nombreuses pathologies musculaires sont associées à une perturbation de la voie du NO (pour revue, voir Kaminski & Andrade, 2001). Il a été démontré que l'activité nNOS est réduite dans les muscles de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, ou de souris *mdx* (Brenmann et coll., 1995), et que la majorité des atteintes membranaires sont évitées chez les souris *mdx* transgéniques, présentant la même activité nNOS que les souris témoins (Wehling et coll., 2001). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une diminution de la production de NO provoque une dégénérescence des fibres musculaires squelettiques. Cependant, les souris mutantes nNOS<sup>-/-</sup> ne présentent pas de dégénérescence musculaire (Chao et coll., 1998). De plus, les souris transgéniques surexprimant un mutant de Cav-3 (P104L) présentent de sévères myopathies, mais associées cette fois-ci à une augmentation de l'activité nNOS (Sunada et coll., 2001). Ainsi, l'implication du NO dans la dégénérescence musculaire n'est, à ce jour, pas établie.



## CHAPITRE 2

### SYSTÈMES DE RÉGULATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

Le calcium participe à toutes les étapes de la vie cellulaire : il déclenche la fécondation, contrôle le développement et la différenciation des cellules précurseurs, régule l'activité des cellules matures, et finalement intervient dans les mécanismes de mort cellulaire (pour revue, voir Berridge, 1998). Dans la fibre musculaire squelettique, le calcium constitue l'élément clé du contrôle de la contraction. Il intervient aussi dans diverses fonctions de la fibre musculaire, telles que l'expression de gènes, la régulation d'activités enzymatiques, etc. Dès lors, une perturbation des différents systèmes de régulation du calcium intracellulaire peut entraîner de nombreuses pathologies musculaires comme l'hyperthermie maligne, la myopathie à axe central etc. (pour revue, voir Missiaen et coll., 2000), et, au stade ultime, être létale pour la cellule.

La fibre musculaire doit donc réguler de façon très fine son niveau de calcium intracellulaire, plus précisément le calcium libre cytoplasmique. Cette régulation se fait tant au repos (maintien de l'homéostasie calcique) que lors de l'activation cellulaire (une modification de la concentration cytoplasmique de calcium constitue un signal codé en terme de durée, amplitude, et localisation). Trois mécanismes distincts mais complémentaires agissent conjointement :

- 1) le flux net de calcium à travers le sarcolemme ;
- 2) les mouvements de libération et de repompage du calcium dans les compartiments intracellulaires : RS et mitochondries ;
- 3) la fixation du calcium libre sur les protéines cytoplasmiques (rôle tampon).

#### I Le sarcolemme

Le sarcolemme sépare deux milieux de concentration très différente en calcium : le milieu extracellulaire ( $[Ca^{2+}]_e = 2.5 \text{ mM}$ ) et le cytoplasme ( $[Ca^{2+}]_s = 100 \text{ nM}$  au repos) (Perry, 1994). Le gradient électrochimique qui s'exerce sur cet ion est donc très élevé. À température physiologique ( $37^\circ\text{C}$ ), on calcule, par l'équation de Nernst, un potentiel d'équilibre  $E_{Ca} = 135 \text{ mV}$ . Le modèle cellulaire utilisé dans notre étude, la fibre musculaire squelettique de souris, présente un potentiel de membrane de repos ( $E_r$ ) d'environ  $-80 \text{ mV}$  (Luff et Atwood, 1979). Le gradient électrochimique du calcium sera donc de l'ordre  $-215 \text{ mV}$  ( $= E_r - E_{Ca}$ ), favorisant son entrée dans la cellule. Ainsi l'influx de calcium se fait-t-il de manière passive, à travers différents canaux, tandis que son expulsion est un phénomène actif, impliquant des pompes calciques et, dans une moindre mesure, l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ .

Sous unité (nom précédent)	Sous unité (nom actuel)	Nom du gène	Sous type (nom précédent)	Sous type (nom actuel)	Type de canal	Localisation principale
$\alpha_{1S}$	Ca <sub>v</sub> 1.1	CACNA1S			L	Muscle squelettique
$\alpha_{1C}$	Ca <sub>v</sub> 1.2	CACNA1C	$\alpha_{1C-a}$	Ca <sub>v</sub> 1.2a	L	Cœur
			$\alpha_{1C-b}$	Ca <sub>v</sub> 1.2b	L	Muscle lisse
			$\alpha_{1C-b}$	Ca <sub>v</sub> 1.2c	L	Cerveau, cœur, glande pituitaire, glandes surrénales
$\alpha_{1D}$	Ca <sub>v</sub> 1.3	CACNA1D			L	Cerveau, pancreas, rein, ovaire, cochlée
$\alpha_{1F}$	Ca <sub>v</sub> 1.4	CACNA1F			L	Rétine
$\alpha_{1A}$	Ca <sub>v</sub> 2.1	CACNA1A	BI1	Ca <sub>v</sub> 2.1a	P/Q	Cerveau, cochlée, glande pituitaire
			BI2	Ca <sub>v</sub> 2.1b		
$\alpha_{1B}$	Ca <sub>v</sub> 2.2	CACNA1B	$\alpha_{1B-1}$	Ca <sub>v</sub> 2.2a	N	Cerveau, système nerveux
			$\alpha_{1B-2}$	Ca <sub>v</sub> 2.2b		
$\alpha_{1E}$	Ca <sub>v</sub> 2.3	CACNA1E	BII	Ca <sub>v</sub> 2.3a	R ?	Cerveau, cochlée, rétine, cœur, glande pituitaire
	Ca <sub>v</sub> 2.3		BII2	Ca <sub>v</sub> 2.3b		Cerveau, cochlée, rétine
$\alpha_{1G}$	Ca <sub>v</sub> 3.1	CACNA1G		Ca <sub>v</sub> 3.1a	T	Cerveau, système nerveux
$\alpha_{1H}$	Ca <sub>v</sub> 3.2	CACNA1H		Ca <sub>v</sub> 3.2a	T	Cerveau, cœur, rein, foie, muscle squelettique du fœtus et du nouveau-né
$\alpha_{1I}$	Ca <sub>v</sub> 3.3	CACNA1I		Ca <sub>v</sub> 3.3a	T	Cerveau

**Tableau 2 : Nomenclature des canaux calciques voltages-dépendants**  
D'après Ertel et coll., 2000.

Les canaux sont classés d'après leur sous unité  $\alpha_1$ . La nomenclature  $\alpha_{1A-I} + \alpha_{1S}$  fut proposée par Birnbaumer et coll en 1994. La nomenclature actuelle est une adaptation de celle des canaux potassiques. Elle utilise un système numérique pour définir des familles et sous-familles de canaux calciques selon la similarité de leurs séquences d'acides aminés. Le nom du canal indique l'ion perméant (calcium : Ca) et le régulateur physiologique principal (potentiel : voltage) mis en indice (Ca<sub>v</sub>). Le numéro d'identification correspond à la famille du gène de la sous unité  $\alpha_1$  du canal (de 1 à 3), et à l'ordre de découverte de cette sous unité au sein de la famille (1 à m). Par exemple, le canal Cav 1.2 est la 2<sup>e</sup> sous unité découverte au sein de la famille des Ca<sub>v</sub>1.

## I.1 Canaux calciques du sarcolemme

Il existe plusieurs types de canaux calciques sarcolemmaux, qui peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur mécanisme d'activation (Hofman et coll., 2000 ; Ma et Pan, 2003 ; Missiaen et coll., 2000 ; Wingertzahn et coll., 1998). Deux catégories sont majoritairement présentes au niveau du sarcolemme :

- 1) **les VOC** (*Voltage-Operated Channels*), activés par une variation du potentiel membranaire. Nous adopterons pour les nommer l'anglicisme "canaux calciques voltage-dépendants", et par analogie, emploierons le terme "voltage-dépendance" pour "dépendance au potentiel".
- 2) **les SOC** (*Store-Operated Channels*), dont l'ouverture est déclenchée par la déplétion des stocks internes de calcium. Le mécanisme reliant la déplétion à l'ouverture du canal reste indéterminé à ce jour.

D'autres canaux perméables au calcium ont pu être observés dans le sarcolemme : les canaux calciques de fuite (Alderton & Steinhardt, 2000), les canaux mécanosensibles (Franco-Obregon & Lansman, 2002) et les canaux cationiques purinergiques (Collet et coll., 2002). Nous ne les aborderons pas dans cet historique.

### I.1.1 Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltages-dépendants sont fermés au potentiel de repos de la cellule, et s'ouvrent lors d'une dépolarisation. Ils présentent trois états cinétiques : fermé (non conducteur), ouvert (conducteur), et inactivé. En effet, l'état ouvert est transitoire : lors de dépolarisations soutenues, le canal passe à un état non conducteur, inactivé. On distingue les **LVA** (*Low-Voltage-Activated*), ou canaux à bas seuil, et les **HVA** (*High-Voltage-Activated*), ou canaux à haut seuil, qui s'activent respectivement pour de faibles ou de plus fortes dépolarisations. Les LVA comprennent les canaux calciques de type T, les HVA les canaux de type L, N, P/Q et R. Ces canaux se distinguent par leur voltage dépendance, leurs cinétiques d'activation, d'inactivation et de désactivation, leur conductance unitaire, et leur sensibilité aux agents pharmacologiques. Ils présentent également des localisations différentes (Tableau 2) (pour revue, voir Ashcroft, 2000 ; Catterall, 1995 ; Jones, 1998).

Dans le muscle squelettique de mammifère, deux types de courant calcique peuvent être enregistrés : le courant calcique de type L, et le courant calcique de type T. **Le courant de type L** ( $I_L$  pour Long-lasting) est un courant soutenu. À l'inverse, **le courant de type T** ( $I_T$  pour Transient) est un courant transitoire (cinétiques d'activation et d'inactivation rapides). L'expression de  $I_T$  est temporaire : ce courant disparaît totalement 3 semaines après la naissance. En revanche,  $I_L$  reste présent à l'âge adulte (Beam & Knudson, 1988b).

### I.1.1.1 Le canal calcique de type L ou récepteur des dihydropyridines

Le canal calcique de type L du muscle squelettique est appelé également récepteur des dihydropyridines (DHPR) en raison de sa sensibilité à ces agents pharmacologiques. C'est un large complexe protéique ellipsoïdal transmembranaire, de poids moléculaire (PM) d'environ 435 kDa. Ce canal est exprimé de manière précoce lors du développement musculaire, puisque l'ARNm codant pour sa sous-unité principale peut être déjà détecté au stade E13 de la vie fœtale (Chaudhari & Beam, 1993). Aux stades précoces de développement, le DHPR est localisé dans la membrane de surface. Il migre ensuite dans le système tubulaire transverse, où il sera circonscrit chez l'adulte (Jorgensen et coll., 1989 ; Romey et coll., 1989). Ce canal est également situé dans les cavéoles (Jorgensen et coll., 1989).

#### I.1.1.1.1 Caractéristiques biophysiques

Bien que de nombreux travaux concernant les caractéristiques électrophysiologiques unitaires et macroscopiques de  $I_L$  aient été menés chez la grenouille, je n'exposerai dans cette partie que des résultats provenant d'études effectuées chez le mammifère (rat et souris). En effet, il existe de nombreuses différences entre le modèle mammifère et amphibien, et une revue exhaustive dépasserait le cadre de ce travail. Pour les caractéristiques macroscopiques, je me suis attachée à donner des valeurs obtenues dans les conditions les plus physiologiques possibles :  $Ca^{2+}$  comme cation perméant, fibres musculaires adultes fraîchement dissociées. Ce dernier point est important car  $I_L$  évolue au cours de la maturation des cellules musculaires (Beam & Knudson, 1988b ; Strube et coll., 2000). Pour les caractéristiques unitaires, les données sont classiquement mesurées en utilisant le  $Ba^{2+}$  comme porteur de charge. Je présenterai ici principalement les données obtenues sur cellules intactes, dans lesquelles les interactions DHPR/protéines présentes en conditions physiologiques sont respectées. Dans la cellule musculaire, l'enregistrement du canal isolé se fait sur cellule immature : le myotube (les données présentées ici proviennent de cultures primaires de myotubes). En effet, chez l'adulte, le DHPR est situé dans les tubules T, ce qui le rend difficilement accessible à une pipette de *patch-clamp*. En revanche, sur myotube, à un stade précoce de différenciation (avant la formation des tubules T),  $I_L$  peut être enregistré à la surface de la cellule (Dirksen & Beam, 1995 ; 1996).

**La conductance** unitaire du canal dans un myotube est de 14 pS en présence de 110 mM  $Ba^{2+}$  (Dirksen & Beam, 1995). La conductance macroscopique maximale, mesurée dans des fibres adultes fraîchement dissociées, varie de 55 à 200 S/F en présence de 2 ou 2.5 mM  $Ca^{2+}$  (Collet et coll., 2003 ; Delbono et coll., 1997 ; Renganathan et coll., 1997 ; Szentesi et coll., 2001).

#### **Voltage-dépendance du canal** :

Le DHPR est un canal à haut seuil (HVA). En enregistrement unitaire, **son seuil d'activation** se situe autour de -10 mV (en présence de 110 mM  $Ba^{2+}$ , Dirksen & Beam, 1995). La probabilité d'ouverture,  $P_o$ , augmente avec la dépolarisation, la valeur de demi activation étant d'environ +6 mV (Dirksen & Beam, 1995). Pour le courant macroscopique, des valeurs de seuil et de potentiel de demi activation,  $V_{1/2}$ , variant respectivement de -40 à -20 mV, et de

-21 à -0.78 mV, ont été rapportées (en présence de 2 ou 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , Collet et coll., 2003 ; Delbono et coll., 1997 ; Donaldson & Beam, 1983 ; Renganathan et coll., 1997 ; Szentesi et coll., 2001). Ces mêmes études donnent un potentiel d'inversion du canal,  $V_{rev}$ , se situant entre +50 et +70 mV, ce qui diffère considérablement du potentiel d'équilibre du  $\text{Ca}^{2+}$  que prédirait l'équation de Nernst dans leurs conditions expérimentales (2 ou 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la solution externe). Cette différence peut être expliquée par un flux additionnel de cations monovalents, par exemple  $\text{K}^+$ , à travers le canal, comme suggéré par Friedrich et coll., 1999.

### Cinétiques du canal :

Le DHPR est un canal à cinétiques lentes : les valeurs de temps au pic (temps nécessaire pour atteindre le pic du courant après dépolarisation) rapportées sur fibres dissociées en présence de 2 ou 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  varient de 100 à 250 ms. Elles dépendent de la dépolarisation appliquée (Collet et coll., 2003 ; Donaldson et coll., 1983 ; Friedrich et coll., 1999 ; Szentesi et coll., 2001).

La principale caractéristique de ce canal est son **activation** très lente, qui devient plus rapide lorsque la dépolarisation augmente. Une étude menée chez la grenouille suggère qu'elle peut être considérablement accélérée si on applique une prédépolarisation (Feldmeyer et coll., 1992). Ce phénomène peut être expliqué par l'existence de deux états fermés du canal. La transition entre l'état fermé n°1 et le n°2 serait très lente, tandis que celle entre l'état fermé n°2 et l'état ouvert serait rapide (Garcia et coll., 1994 ; pour revue, voir Melzer et coll., 1995). Ainsi, une prédépolarisation amènerait le canal directement dans l'état fermé n°2.

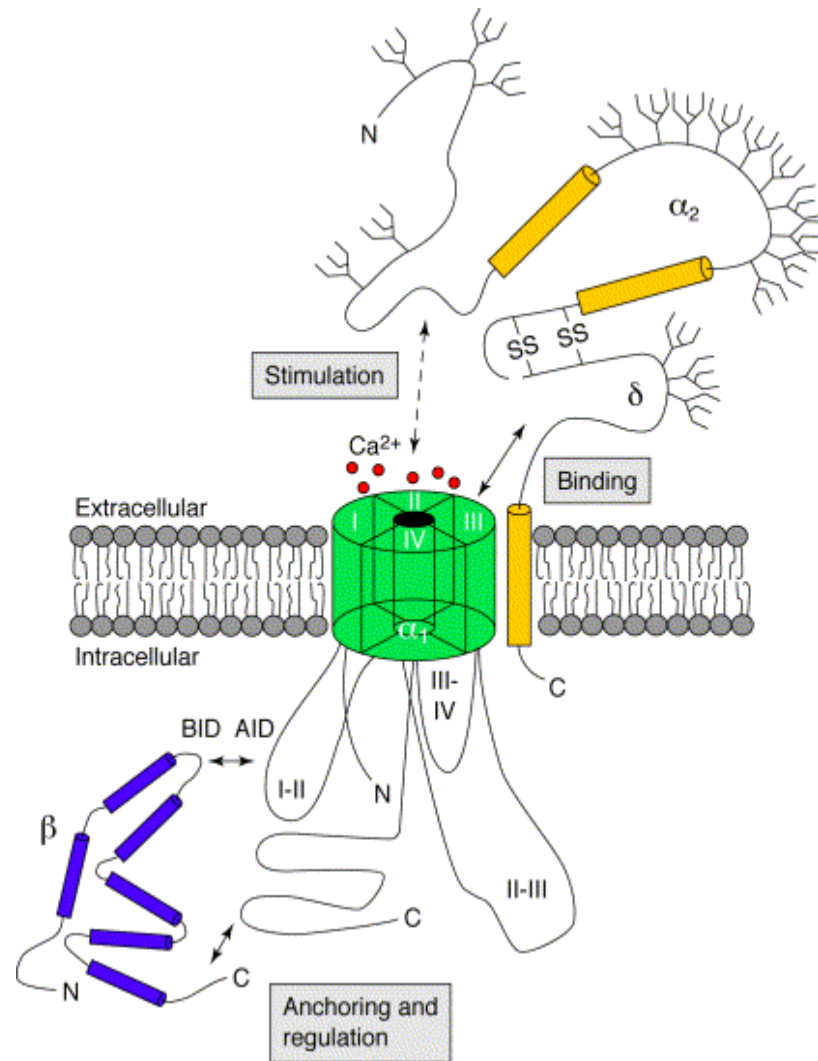
Lors d'une dépolarisation prolongée,  $I_L$  présente une **inactivation** lente (constante de temps  $\tau_{inac}$  de l'ordre de la seconde) (Collet et coll., 2003 ; Friedrich et coll., 1999 ; Szentesi et coll., 2001).  $\tau_{inac}$  varie suivant le potentiel de dépolarisation. Sa courbe de voltage-dépendance est en forme de U, l'inactivation la plus rapide étant observée pour le potentiel qui produit un courant d'amplitude maximale. Ce phénomène pourrait donc refléter une déplétion en calcium du milieu extracellulaire contenu dans les tubules T, due à l'entrée massive de cet ion dans la cellule *via*  $I_L$  (Friedrich et coll., 1999). Une inactivation du canal par le calcium entrant pourrait également expliquer cette courbe, deux mécanismes étant envisageables : déphosphorylation du canal par activation de phosphatases calcium dépendantes, ou liaison directe du calcium à la sous-unité  $\alpha_{1S}$  (pour revue, voir Ashcroft, 2000). Par ailleurs, le canal subit une inactivation voltage-dépendante (pour revue, voir Mc Donald et coll., 1994 ; Melzer et coll., 1995). De plus, l'inactivation est en partie contaminée par la présence de courants sortants retardés à travers les canaux  $\text{K}^+$ , qui sont difficiles à bloquer (Melzer et coll., 1995).

Après un pulse court dépolarisant, la repolarisation de la membrane produit un courant de queue entrant qui diminue au fur et à mesure que les canaux se referment (**déactivation**). La déactivation du canal de type L squelettique est relativement lente (pour revue, voir McDonald et coll., 1994). Une constante de temps de déactivation,  $\tau_d$ , d'environ 105 ms, a été mesurée sur fibres adultes dissociées (Delbono, 1992).

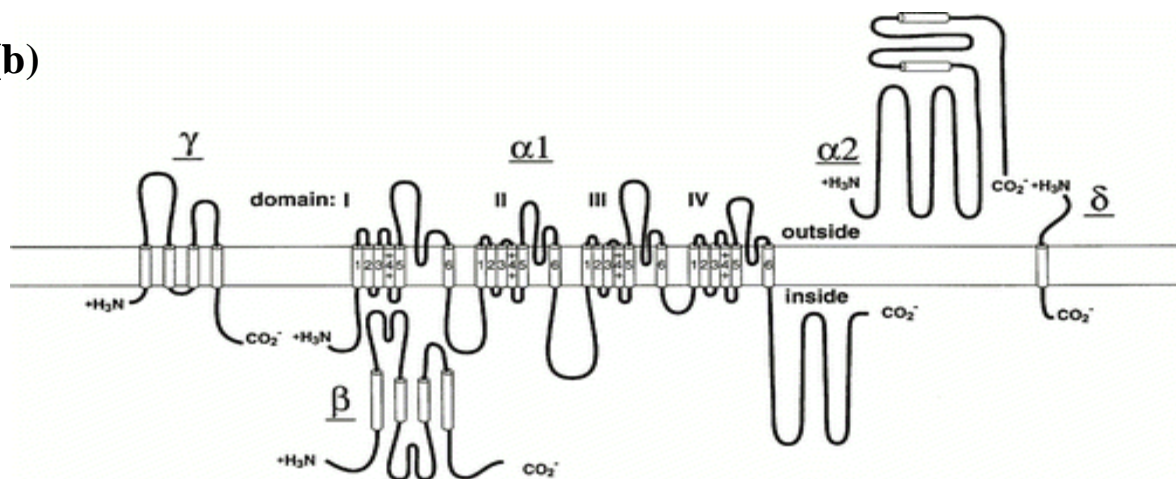
### Sélectivité du canal :

Un canal calcique du sarcolemme doit être sélectif au calcium en présence d'autres cations monovalents dans le compartiment extracellulaire, qui présentent parfois une concentration 100× supérieure. Dans les conditions physiologiques, la sélectivité relative du DHPR pour le

(a)



(b)



**Figure 10 : Les canaux calciques voltage-dépendants et le récepteur des dihydropyridines**

(a) Organisation structurale des quatre sous-unités constituant la plupart des canaux calciques voltages activés. Les doubles flèches pleines indiquent des sites d'interaction entre les sous-unités. Les flèches en pointillé indiquent des interactions présumées. Le DHPR contient une cinquième sous-unité : la sous-unité  $\gamma$  (d'après Walker & De Waard, 1998). (b) Topologie membranaire présumée des cinq sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  et  $\gamma$  du DHPR (d'après Hockerman et coll., 1997).

$\text{Ca}^{2+}$  par rapport aux cations monovalents est très grande, avec des rapports de perméabilité  $>1000$  ( $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ). Mais en absence de calcium, ou à faible concentration, il perd sa sélectivité et laisse passer des ions monovalents ( $\text{Na}^+$  par exemple), sur le seul critère de taille, le pore ayant un diamètre d'environ 0.6 nm. Le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le canal est défini par la présence de deux sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de haute affinité dans le pore. Ainsi, à faible concentration, un seul des deux sites est occupé, et le  $\text{Ca}^{2+}$  est retenu. À forte concentration, les deux sites sont occupés : il y a répulsion électrostatique, ce qui réduit le temps de fixation des ions, et produit un flux calcique. La courbe d'intensité du courant en fonction de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est donc une hyperbole : à faible concentration, on est en présence d'un courant entrant d'ions monovalents ; à concentrations micromolaires, ce courant est inhibé par le calcium qui bloque le pore ( $K_i = 1 \mu\text{M}$  dans le muscle squelettique d'amphibien, McCleskey & Almers, 1985) ; à concentrations millimolaires, on retrouve un courant entrant, mais cette fois purement calcique (pour revue, voir Jones, 1998 ; McDonald et coll., 1994).

#### I.1.1.1.2 Caractéristiques pharmacologiques

Les DHPR sont caractérisés par leur sensibilité aux DHP, qui peuvent se comporter comme des agonistes ( $\pm$ Bay K 8644) ou des antagonistes (nifédipine, nitrendipine, PN 200-110) du canal. Il a été montré sur cultures primaires de myotubes de rat et de souris, et sur fibres musculaires fraîchement dissociées de rats nouveau-nés, que l'effet des DHP est dépendant du potentiel de maintien de la membrane, et donc de l'état du canal : au repos *versus* inactivé (Beam & Knudson, 1988a). D'autres composés organiques, tels que les phénylalkylamines (verapamil) et les benzothiazépines (diltiazem), inhibent les DHPR. De même, certains ions inorganiques tels que le  $\text{Cd}^{2+}$ , le  $\text{Co}^{2+}$ , le  $\text{La}^{3+}$  et le  $\text{Ni}^{2+}$  bloquent ces canaux du fait de leur perméabilité très réduite (pour revue, voir Jones, 1998). Les protons agissent également comme des inhibiteurs du canal, mais induisent des états de sous-conductance plutôt que de le bloquer complètement. En revanche, d'autres ions divalents, tels que le  $\text{Ba}^{2+}$ , le  $\text{Mg}^{2+}$  et le  $\text{Sr}^{2+}$  peuvent traverser le canal et générer un courant (Tsien et coll., 1987).

#### I.1.1.1.3 Structure moléculaire

Le DHPR est un complexe protéique constitué de plusieurs sous-unités. Sa structure moléculaire fait l'objet de nombreuses publications (pour revue, voir Catterall, 1995 ; Jones, 1998 ; Lorenzon & Beam, 2000 ; McDonald et coll., 1994 ; Melzer et coll., 1995 ; Walker & De Ward, 1998). La sous-unité principale,  $\alpha_1$ , est transmembranaire, et commune à tous les canaux calciques voltage-dépendants. Elle porte les fonctions de base du canal, comme le pore sélectif aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , le détecteur de potentiel, et le site de liaison aux agonistes et antagonistes. Les autres sous-unités sont dites auxiliaires ou régulatrices : elles modulent la structure tertiaire et les propriétés du canal. Elles sont soit communes à tous les HVA :  $\alpha_2\delta$  (transmembranaire) et  $\beta$  (cytoplasmique), soit propres au DHPR :  $\gamma$  (transmembranaire) Ainsi, pour avoir les propriétés d'un canal natif, le DHPR doit contenir l'ensemble ces sous-unités, arrangées dans une stœchiométrie 1 : 1 : 1 : 1 (Figure 10) (Suh-Kim et coll., 1996).

**La sous-unité  $\alpha_1$  :**

La diversité biophysique et pharmacologique des canaux calciques repose essentiellement sur l'existence de nombreuses isoformes de la sous-unité  $\alpha_1$  (10 allèles ont pu être identifiés). La dénomination et classification de ces différentes isoformes est largement admise, malgré une complexité qui résulte d'un épissage alternatif, parfois tissu-dépendant. D'un point de vue structurel, elles peuvent être classées en 3 groupes (Tableau 2). **Ca<sub>v</sub>1** et **Ca<sub>v</sub>2**, produisant du courant de type HVA (L, N, P, Q ou R suivant les sous-unités) et **Ca<sub>v</sub>3** produisant du courant de type LVA (type T) (Ertel et coll., 2000).

L'isoforme majoritairement responsable du courant calcique de type L dans le muscle squelettique adulte est  $\alpha_{1S}$  (Ca<sub>v</sub>1.1). L'isoforme cardiaque de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_{1C}$ , est exprimée de façon transitoire pendant le développement embryonnaire ; le rapport des ARNm  $\alpha_{1S}/\alpha_{1C}$  varie ainsi de 1 à E14, à 100 à la naissance (Chaudhari et coll., 1993).  $\alpha_{1S}$  a été clonée par Tanabe et coll. en 1987. La séquence de l'ADN complémentaire prédit une protéine de 1873 résidus, et de PM de 212 kDa. Or De Jongh et coll. (1989 ; 1991) ont pu isoler deux formes de la sous-unité  $\alpha_{1S}$  de la membrane du tubule T : une, minoritaire, de **212 kDa** :  $\alpha_{1(212)}$  et une, majoritaire, de **175 kDa** :  $\alpha_{1(175)}$ .  $\alpha_{1(175)}$  serait générée par clivage protéolytique posttransductionnel au niveau C terminal de  $\alpha_{1(212)}$ , ce clivage donnant naissance à une protéine d'environ 1690 acides aminés. Malgré l'intérêt évident de cette découverte dans le domaine du couplage EC, les études n'ont pas été poursuivies dans la littérature.

La sous-unité  $\alpha_{1S}$  est constituée de **4 domaines homologues (I-IV)**, reliés par des boucles intracellulaires. Chacun de ces domaines contient **6 segments transmembranaires (S1-S6)** en hélices  $\alpha$ , reliés par des boucles intracellulaires ou extracellulaires que l'on nommera par leur nom anglophone : *linker*, afin d'éviter toute confusion avec les boucles interdomaines (Figure 10).

Le *linker* S5-S6, extracellulaire, présente une partie hydrophobe transmembranaire qui constitue la limite interne du **pore du canal**. La sélectivité du canal pour le calcium repose sur la présence dans ce pore d'un anneau de quatre résidus glutamate (un par domaine) chargés négativement. Ces résidus constituent un ou plusieurs sites de liaison à haute affinité pour le calcium.

Le segment S4 contient, au sein d'une région hautement hydrophobe, plusieurs résidus chargés positivement. Par analogie avec les canaux sodiques, on considère ce segment S4 comme le "**détecteur de potentiel**" : en réponse à une dépolarisation de la membrane, les résidus chargés positivement se déplacent, induisant un changement de conformation de la protéine. Ainsi ce segment couple-t-il les changements de potentiel membranaire à l'ouverture du canal.

Le segment S6, les régions encadrant le *linker* S5-S6 du domaine I, et la boucle I-II, sont des éléments déterminants de l'**inactivation voltage-dépendante**.

**La sous-unité  $\beta$  :**

La sous-unité  $\beta$  est une protéine cytoplasmique d'environ 60 kDa. Quatre allèles codant pour cette sous-unité sont identifiés à ce jour. L'isoforme  $\beta_{1A}$ , de 524 résidus, prédomine dans le muscle squelettique (Powers et coll., 1992). Sa structure comporte 5 hélices  $\alpha$ .



La sous-unité  $\beta$  se lie via un motif hautement conservé de 30 résidus (BID pour Bêta Interaction Domain) à une séquence du linker I-II de la sous-unité  $\alpha_{1S}$ , d'au moins 18 résidus (AID pour Alpha 1 Interaction Domain).  $\beta$  est non seulement indispensable à l'adressage du DHPR à la membrane, mais elle est également impliquée dans la modulation de son activité (Gregg et coll., 1996 ; Strube et coll., 1996 ; Beurg et coll., 1997). Ainsi, une diminution de l'amplitude de  $I_L$  est constatée chez les souris  $\beta$  KO. L'absence de la sous-unité  $\beta$  affecte également d'autres propriétés du canal : accélération des cinétiques d'activation, ralentissement des cinétiques d'inactivation et déplacement de la voltage-dépendance vers des valeurs plus positives.

### **La sous-unité $\alpha_2$ - $\delta$ :**

La sous-unité  $\alpha_2$ - $\delta$  est constituée de deux portions reliées par un pont disulfure.  $\alpha_2$  (143 kDa) forme la partie N terminale et  $\delta$  (27 kDa) la partie C terminale de la protéine.  $\delta$  contient un segment transmembranaire, et servirait d'ancre à  $\alpha_2$ , qui elle est complètement extracellulaire. Ces deux portions sont le produit d'un seul gène, pour lequel 3 allèles ont été identifiés.

### **La sous-unité $\gamma$ :**

La sous-unité  $\gamma$  a un PM de 30 kDa, et contient 222 résidus. Sa structure comporte quatre segments hydrophobes transmembranaires. 5 allèles codant pour  $\gamma$  ont été identifiés. Dans le muscle squelettique, c'est l'isoforme  $\gamma_1$  qui est exprimée

$\gamma_1$  soutient l'inhibition de  $I_L$ . Ainsi, la densité de  $I_L$  dans les myotubes en culture de souris dépourvues de la sous-unité  $\gamma$  ( $\gamma_{null}$ ) ou hétérozygotes pour cette sous-unité ( $\gamma_{het}$ ) est supérieure à celle des souris témoins. De même, l'inactivation produite par de longues dépolarisations est ralentie, et la voltage-dépendance de la courbe d'inactivation du courant est déplacée vers des potentiels plus positifs (Ahern et coll., 2001). Ce déplacement de la courbe d'inactivation du courant est également constaté dans des fibres musculaires dissociées à partir de muscles de souris adultes  $\gamma_{null}$  (Ursu et coll., 2004)

#### I.1.1.1.1 Maturation de $I_L$ au cours du développement

Les modifications de  $I_L$  au cours du développement ont fait l'objet de nombreuses études sur myotubes en culture. Une revue exhaustive de ces études dépasserait le cadre de ce travail. Nous nous restreindrons ici à présenter les données obtenues dans une préparation proche de la nôtre, la fibre musculaires fraîchement dissociée.

$I_L$  présente au cours du développement une augmentation d'amplitude (Shimahara & Bournaud, 1991 ; Strube et coll., 2000). D'après une étude de Strube et coll. (2000) sur le muscle intercostal de souris, la conductance du courant macroscopique augmente de 100 % entre les stades E14 et E19, tandis que la conductance du courant unitaire diminue d'environ 2 pS entre E14 (13 pS) et E18 (11 pS). La densité de canaux fonctionnels restant constante, l'augmentation de la conductance macroscopique est expliquée par un doublement de la  $P_o$  du canal (*conductance macroscopique = conductance unitaire  $\times$  densité de canaux fonctionnels  $\times$  probabilité d'ouverture*). Cette augmentation est accompagnée d'un

	Canal calcique de type T	Canal calcique de type L
<b>A. Courant unitaire</b>		
Conductance (pS)	9	14
Seuil d'activation (mV)	-40	-10
<b>B. Courant macroscopique</b>		
Conductance (pS/pF)	51.2	120
Voltage-dépendance		
Seuil d'activation (mV)	-45	-10
$V_{1/2}$ (mV)	-23	+10
Cinétiques		
Temps au pic (ms)	12	200
$\tau_{ac}$ (ms)	3	60
$\tau_{inac}$ (ms)	16	1000

**Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type T et de type L.**

Les valeurs données ont été arrondies. Celles du courant unitaire proviennent de l'étude de Dirksen et Beam (1995). Elles ont été obtenues à partir de myotubes de souris, en présence de 110 mM de  $Ba^{2+}$  dans la solution externe. Les valeurs données pour le courant macroscopique proviennent de l'étude de Berthier et coll. (2002) pour le canal de type T, et de Strube et coll. (2000) pour le canal de type L. Elles ont été obtenues à partir de cellules musculaires squelettiques fraîchement dissociées de fœtus de souris au stade E18, en présence de 10 mM de  $Ca^{2+}$ .  $V_{1/2}$  : potentiel de demi-activation ;  $\tau_{ac}$  : constante de temps d'activation ;  $\tau_{inac}$  : constante de temps d'inactivation. Pour les cinétiques, les valeurs données sont celles du plateau.

déplacement de la courbe densité de courant *versus* potentiel vers des potentiels plus négatifs, et d'une accélération des cinétiques d'inactivation, tandis que les cinétiques d'activation demeurent inchangées. Ces cinétiques d'activation et d'inactivation dépendent de la dépolarisation.

L'évolution de  $I_L$  se poursuit lors du développement post natal. Gonoï et Hasegawa (1988) rapportent, chez la souris, une augmentation d'un facteur 4 de l'amplitude de ce courant, entre le premier et le trentième jour après la naissance (P1 et P30). Dans l'étude de Beam et Knudson (1988b), qui s'appuie sur le même modèle, elle se déroule en parallèle avec l'accroissement de la surface membranaire du système tubulaire transverse, entre P1 et P45. Ces auteurs observent également pendant ce laps de temps, un déplacement de la courbe courant-potentiel, mais, à l'inverse du fœtus, vers des potentiels plus positifs.

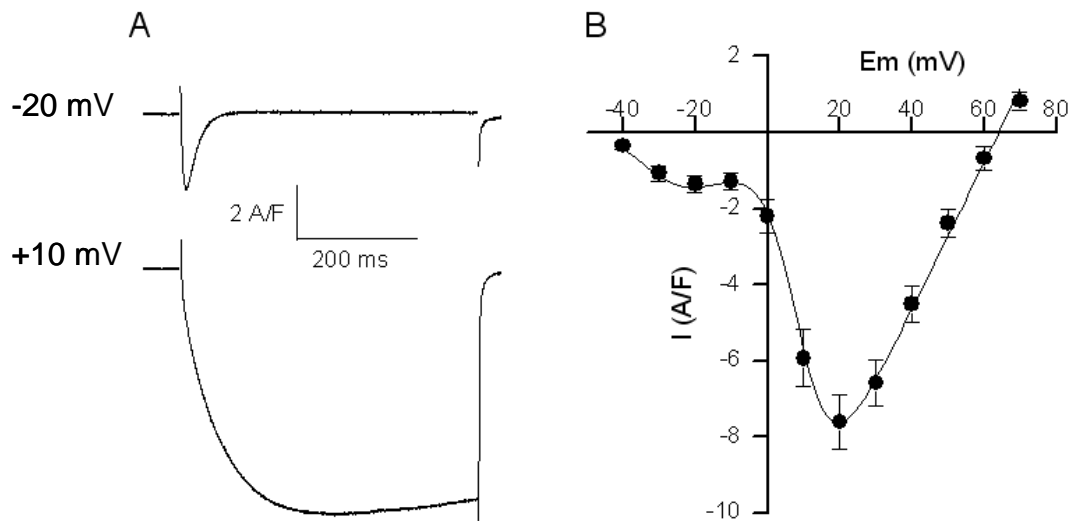
### 1.1.1.2 Le canal calcique de type T

Le canal calcique de type T est exprimé de façon transitoire au cours du développement : sa sous-unité principale, dont l'ARNm est déjà détecté au stade E14 de la vie fœtale, disparaît 2 semaines après la naissance (Berthier et coll., 2002). Cette expression transitoire de la protéine concorde avec celle du courant  $I_T$  : en effet, celui-ci disparaît également en 2 à 4 semaines après la naissance (Beam et Knudson, 1988b ; Gonoï et Hasegawa, 1988), ce qui suggère une implication dans le développement. Le canal de type T est localisé dans la membrane de surface (Romey et coll., 1989).

#### 1.1.1.2.1 Caractéristiques biophysiques

5 caractéristiques électrophysiologiques principales permettent de différencier le canal de type T du DHPR dans le muscle squelettique (Perez-Reyes, 2003) :

- 1) le canal s'active pour de faibles dépolarisations de la membrane plasmique : c'est un canal à **bas seuil** (LVA) ;
- 2) le courant est transitoire pendant un pulse prolongé Le canal calcique de type T est un canal à cinétiques rapides : **le temps au pic** est court, et dépend du potentiel : il diminue lorsque la dépolarisation augmente, jusqu'à atteindre un plateau. **Les cinétiques d'activation et d'inactivation** dépendent également du potentiel : elles sont relativement lentes près du seuil d'activation du canal, mais accélèrent lorsque la dépolarisation augmente (jusqu'à un plateau), ce qui donne au courant un aspect dit de *criss-crossing* ;
- 3) le canal de type T présente une **déactivation** très lente, qui génère un courant de queue de longue durée ;
- 4) sa voltage-dépendance est modulée par la présence d'ions  $Ba^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  dans la solution externe d'enregistrement, et leur concentration ;
- 5) son inactivation a lieu dans les mêmes valeurs de potentiel que son activation.



**Figure 11 : Courants calciques de type T et de type L obtenus sur cultures primaires de myotubes de souris.**

(A) Tracés des courants calciques de type T (en haut) et de type L (en bas) évoqués respectivement à -20 mV et à +10 mV, montrant l'inactivation du courant de type T au cours d'un pulse de 750 ms. (B) Courbe I-V des courants calciques de type T et de type L. L'amplitude des courants a été normalisée par la capacité cellulaire. Le courant de type T s'active pour de faibles dépolarisations de la membrane. Son amplitude est plus faible que celle du courant de type L.

En revanche, le canal de type T présente le même profil de sélectivité au calcium que le DHPR (Perez-Reyes, 2003). Le tableau 3 permet de comparer des valeurs paramètres biophysiques de  $I_L$  et  $I_T$  obtenues dans les mêmes conditions expérimentales (voir également Figure 11).

Une autre caractéristique du canal de type T est **son courant de fenêtre** qui, mesuré dans des fibres musculaires fœtales de souris fraîchement dissociées en présence de 2 mM de  $Ca^{2+}$ , est centré à  $-55$  mV, et s'étend de  $-80$  à  $-20$  mV. Le courant de fenêtre définit l'influx basal maintenu de calcium qui existe lorsque le potentiel de membrane d'une cellule est positionné dans une fenêtre où il est insuffisant pour inactiver les canaux, mais suffisant pour en ouvrir une fraction significative. Le courant de fenêtre du canal de type T permet donc au calcium d'entrer dans la cellule à des potentiels plus négatifs que ceux nécessaires à la contraction, et proches du potentiel de membrane (Berthier et coll., 2002). Dans les myoblastes humains en culture, ce courant de fenêtre est centré autour de  $-58$  mV en présence d'1.8 mM  $Ca^{2+}$ , et assez large pour modifier les concentrations de calcium intracellulaires (Bijlenga et coll., 2000). Ainsi, il pourrait être impliqué dans les étapes du développement calcium-dépendantes, comme semble l'indiquer l'incapacité des myoblastes traités par le nickel ou l'amiloride à fusionner (Bijlenga et coll., 2000).

#### I.1.1.2.2 Caractéristiques pharmacologiques

Le canal de type T se distingue des DHPR par sa faible sensibilité aux DHP, phenylalkylamines et benzothiazépines (McDonald et coll., 1994). Il est également beaucoup plus sensible à l'amiloride, un agent antihypertenseur : des concentrations millimolaires sont nécessaires à un blocage total du canal. En revanche, il présente une plus forte affinité à un autre agent antihypertenseur, le mibéfradil, qui bloque le canal à des concentrations submicromolaires (Cribbs et coll., 1998 ; Perez-Reyes, 2003 ; Williams et coll., 1999).

$I_T$  est également inhibé par certains cations divalents :  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  (Cognard et coll., 1986). Il présente une haute sensibilité au  $Ni^{2+}$  et au  $Cd^{2+}$  (500  $\mu$ M suffisent à bloquer  $I_T$  pour chacun des deux ions) (Berthier et coll., 2002). Comme pour le DHPR, les protons agissent sur les canaux de type T comme inhibiteurs (McDonald, 1994). En revanche, certains cations divalents comme le  $Ba^{2+}$  peuvent traverser le canal de type T et générer un courant. À l'inverse du DHPR, la conductance du canal est identique en  $Ba^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Perez-Reyes, 2003).

#### I.1.1.2.3 Structure moléculaire

Contrairement aux DHPR, dont la liaison forte aux DHP permet la purification, le canal de type T n'a pas encore été purifié : les différentes sous-unités le composant, autres que la sous-unité principale  $\alpha 1$  commune à tous les canaux calciques, restent donc à déterminer (Perez-Reyes, 2003).

**La sous-unité  $\alpha_1$  :**

Trois isoformes de  $\alpha_1$  produisent du courant de type T :  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ , et  $\alpha_{1I}$ . L'isoforme exprimée dans les cellules musculaires squelettiques est  $\alpha_{1H}$  (Ca<sub>v</sub>3.2) (Berthier et coll., 2002 ; Williams et coll., 1999 ; Bijlenga et coll., 2000).  $\alpha_{1H}$  a été clonée pour la première fois en 1998, dans le cœur, chez l'homme, par Cribbs et coll.

La structure de  $\alpha_{1H}$  est dans l'ensemble similaire à celle des autres sous-unités  $\alpha_1$ . Elle présente toutefois quelques différences avec le DHPR (Williams et coll., 1999) :

- 1) la boucle I-II est plus grande et ne présente pas de domaine AID de liaison à la sous-unité  $\beta$  ;
- 2) dans les domaines III et IV, au niveau des linkers 5-6, les résidus glutamates des HVA, impliqués dans la sélectivité au calcium, ont été remplacés par des résidus aspartates. La charge globale est ainsi conservée, mais la sélectivité du canal pourrait être modifiée (Williams et coll., 1999 ; Perez-Reyes, 1999).

**Les sous-unités auxiliaires :**

L'implication de sous-unités régulatrices dans la structure et la fonction des LVA reste controversée (pour revue, voir Walker & De Waard, 1998). Les propriétés électrophysiologiques de  $\alpha_{1H}$  exprimée seule sont en effet fortement semblables à celles du canal natif (Perez Reyes, 1998 ; 2003).

I.1.1.2.4 Maturation de  $I_T$  au cours du développement

La densité de  $I_T$  augmente de façon transitoire au cours du développement musculaire (Berthier et coll., 2002 ; Shimahara & Bournaud, 1991). Berthier et coll. (2002) observent, sur cellules musculaires fraîchement dissociées à partir de muscles intercostaux de fœtus de souris, une augmentation de la densité de courant, entre les stades E14 et E16. Elle diminue progressivement par la suite, de E14 à E19. Cette diminution de  $I_T$  se poursuit lors du développement postnatal, jusqu'à disparaître quelques semaines après la naissance (3 à 4 semaines après la naissance chez le rat, dans l'étude de Beam et Knudson (1988b) ; 17 jours après la naissance chez la souris pour Gonoï et Hasegawa (1988)).

En revanche, les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques sont similaires à tous les stades de développement fœtal (Berthier et coll., 2002). Ainsi, les paramètres d'activation et d'inactivation ne varient pas entre E14 et E19. De même,  $V_{rev}$  demeure inchangé, indiquant une stabilité de la sélectivité du canal. Enfin, la voltage-dépendance de  $I_T$  ne varie pas au cours de la vie fœtale : pour le courant macroscopique, des valeurs de seuil et de  $V_{1/2}$  respectivement d'environ  $-45$  mV et  $-25$  mV, ont été rapportées à tous les stades de développement, en présence de  $10$  mM  $Ca^{2+}$  (Berthier et coll., 2002). La voltage dépendance est également stable au cours du développement post natal. Sur fibres fraîchement dissociées de souris et rats nouveaux-nés, des valeurs de seuil d'activation situées autour de  $-40$  mV ont été rapportées, en présence de  $10$  mM  $Ca^{2+}$  ou  $Ba^{2+}$  (Beam et Knudson, 1988a ; 1988b).

### I.1.2 Les SOC (Store-Operated Channels) :

Dans de nombreux types de cellules non excitables, la déplétion des stocks intracellulaires de calcium provoque une entrée de cet ion à travers la membrane plasmique via les SOC, nommée **entrée capacitive de calcium** (ECC) (pour revue, voir Parekh & Penner, 1997). La première mesure électrique d'ECC fut effectuée dans des mastocytes par Hot & Penner (1992) sous forme d'un courant membranaire qu'ils nommèrent *Calcium Release-Activated Calcium Channel Current* ( $I_{CRAC}$ ). L'existence d'ECC fut ensuite démontrée dans les cellules excitables, notamment les cellules musculaires squelettiques : myotubes squelettiques en culture (Hopf et coll., 1996), fibres musculaires squelettiques adultes (Kurebayashi & Ogawa, 2001) et enfin cellules musculaires squelettiques fœtales (Collet & Ma, 2004). Dans ces cellules, l'ECC pourrait être un élément clé de la régulation de l'homéostasie calcique. En effet, le RS a des capacités limitées de stockage du calcium, et est susceptible d'être déplété lors de stimulations soutenues ; l'ECC permet de renouveler les stocks déplétés. Lors d'exercices intensifs ou de fatigue musculaire, elle fournirait également le calcium nécessaire à la contraction (Ma & Pan, 2003). Le signal qui couple la déplétion à l'ouverture des canaux reste inconnu dans l'ensemble des types cellulaires (Ma & Pan, 2003). Dans le muscle squelettique, l'activation des SOC, qui nécessite l'ancrage du RS avec la membrane plasmique du tubule T au niveau de la triade, serait liée à un changement conformationnel du récepteur à l'inositol triphosphate (RInsP<sub>3</sub>) ou du RyR (Pan et coll., 2002 ; Launikonis et coll., 2003), et impliquerait la calséquestrine (Shin et coll., 2003).

La nature moléculaire des SOC reste indéterminée à ce jour, mais de multiples arguments expérimentaux justifient une forte présomption de leur constitution par des protéines de la famille des **TRP** (*Transient Receptor Potential*), notamment les nombreuses similarités fonctionnelles entre certains TRP et les canaux générant  $I_{CRAC}$ . Les TRP furent initialement identifiés chez la *Drosophile* (Montell & Rubin, 1989) où ils constituent des canaux perméables au calcium activés par la voie de signalisation de la phospholipase C. Leurs homologues mammifères forment une famille d'au moins 20 canaux calciques, divisée en 6 sous groupes (TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPN) dont trois sont proche du TRP originel : TRPC (ou short), TRPV (vanilloïde) et TRPM (melastatin) (pour revue, voir Montell, 2002). Leurs sous-unités sont constituées de 6 segments transmembranaires séparant les domaines cytoplasmiques N-terminal et C-terminal, dont la nature varie selon la famille d'appartenance du TRP. Ces sous-unités sont probablement assemblées en tétramères, pour former des canaux cationiques non sélectifs permettant le passage du calcium dans la cellule. Les TRP ont une large distribution tissulaire chez les mammifères. Leurs fonctions sont nombreuses et comprennent entre autre l'entrée de calcium en réponse à une déplétion des stocks intracellulaires, la perception de certains stimuli sensoriels, le contrôle du cycle cellulaire (implication de TRPM1 dans le cancer de la peau., Clapham et coll., 2001). Certains TRPC sont impliqués dans l'entrée capacitive de calcium chez les mammifères (Ma & Pan, 2003). Dans les cellules musculaires squelettiques, notamment, les TRPC1-4-6 sont exprimés à la membrane plasmique ; TRPC1 et TRPC4 pourraient être impliqués dans l'augmentation de l'influx calcique observé chez les souris *mdx*., un modèle animal de la dystrophie musculaire de Duchenne (Vandebrouck et coll., 2002).

## I.2 Systèmes d'extrusion du sarcolemme

Au repos, le flux net de calcium à travers le sarcolemme est maintenu à une valeur nulle, l'influx étant contrebalancé par un efflux équivalent. Il existe donc des systèmes d'extrusion du calcium à son niveau. Des études effectuées sur vésicules de sarcolemme ont confirmé la présence, dans la fibre musculaire squelettique du lapin et du porc, d'une pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase et d'un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Michalak et coll., 1984 ; Mickelson et coll., 1985). Chez le rat et le lapin, ces deux systèmes d'extrusion sont localisés dans la membrane de surface et la zone jonctionnelle des tubules T (Sacchetto et coll., 1996).

### I.2.1 L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ :

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est un **antiport électrogène**, qui permet le transport de trois ions  $\text{Na}^+$  dans un sens en échange d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sens opposé (Donoso & Hidalgo, 1989). La direction de l'échange dépend du gradient électrochimique transmembranaire des deux espèces d'ions transportées, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ne consommant pas d'ATP. Les gradients électrochimiques physiologiques entraînent l'entrée de  $\text{Na}^+$  à partir du compartiment extracellulaire, et l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Dans son mode inversé, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  fait entrer un  $\text{Ca}^{2+}$  et sortir trois  $\text{Na}^+$  (Donoso & Hidalgo, 1989). Suivant les ions en présence, il peut effectuer d'autres types de transport :  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  (Donoso & Hidalgo, 1989),  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{Ni}^{2+}$  (pour revue, voir Quednau et coll., 2004). Les principaux inhibiteurs de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sont l'amiloride et ses dérivés, mais d'autres composés organiques et inorganiques sont susceptibles d'affecter son activité (pour revue, voir Blaustein & Lederer, 1999).

#### I.2.1.1 Structure moléculaire

Il existe **trois isoformes de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ : NCX1, NCX2 et NCX3**, codées par trois gènes distincts. Elles diffèrent par leur distribution tissulaire : NCX1, initialement purifiée sur le cœur de chien (Nicoll et coll., 1990), est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que NCX2 et NCX3 sont limitées au cerveau et muscle squelettique (pour revue, voir Quednau et coll., 2004).

Les derniers modèles structuraux de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  **représentent 9 segments transmembranaires séparés en deux groupes** (5 du côté N-terminal et 4 du côté C-terminal) par une large boucle intracellulaire (Nicoll et coll., 1999). Les trois isoformes présentent des motifs répétés, de leur nom anglophone  $\alpha$ - et  $\beta$ -repeat.  $\alpha$ -repeat est constitué de deux séquences très conservées, situées au niveau des segments transmembranaires, et qui interagissent dans la structure tertiaire de la protéine. Il est impliqué dans la liaison et le transport de l'ion.  $\beta$ -repeat est situé sur la boucle cytoplasmique (pour revue, voir Quednau et coll., 2004).



Les cellules musculaires squelettiques expriment NCX1 et NCX3, de manière spécifique du type de muscle et du stade du développement (Deval et coll. 2000 ; Fraysse et coll. 2001). Ainsi, chez l'adulte, NCX1 est exprimée de façon prédominante dans les fibres oxydatives (type 1 et 2 a), tandis que NCX3 l'est dans les fibres rapides glycolytiques (Fraysse et coll., 2001). Leur rôle respectif au sein des deux types de fibres est donc susceptible d'être différent.

### *I.2.1.2 Implication de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans l'activité musculaire squelettique*

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a fait l'objet de nombreuses études dans les myocytes cardiaques, où il représente un des mécanismes majeurs d'extrusion du calcium cytoplasmique (pour revue, voir Wier, 1990). Bien que son rôle apparaisse moins important que dans le muscle cardiaque, de nombreux rapports suggèrent une implication de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dans l'activité contractile du muscle squelettique chez l'adulte (Huerta et coll., 1991 ; Léoty, 1984 ; Zavec et coll., 1991). Des études effectuées sur fibres musculaires de grenouille démontrent toutefois qu'il n'est pas directement impliqué dans le couplage EC (Garcia et coll., 1992). En revanche, Balnave & Allen (1998) ont observé, sur fibres musculaires de souris, que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est activé lorsque la concentration intracellulaire de calcium atteint des niveaux comparables à ce qui est observé lors de la contraction. Il fonctionne alors dans le sens physiologique. Ces auteurs écartent l'hypothèse d'une implication de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dans la diminution du calcium cytoplasmique suite à une contraction simple, celui-ci fonctionnant de manière trop lente par rapport aux mécanismes d'extrusion du RS pour pouvoir, dans ces conditions, agir de façon significative sur la concentration de cet ion. En revanche, lors d'une activité musculaire intense, le niveau de calcium cytoplasmique reste élevé pendant de longues périodes ; l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  peut dès lors contribuer à son extrusion (Balnave & Allen, 1998).

### **I.2.2 La pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase**

À l'inverse de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) peut transporter le calcium contre son gradient électrochimique en hydrolysant de l'ATP, la stœchiométrie du transport étant de 2 moles de calcium transportées pour une mole d'ATP hydrolysée. La PMCA agit uniquement dans le sens de l'efflux de calcium. Il a été établi sur vésicules de sarcolemme de muscle de porc (Mickelson et coll., 1985) et de lapin (Michalak et coll., 1984) que son activité est stimulée par liaison avec la calmoduline et par phosphorylation par la protéine kinase AMPc-dépendante. Ainsi, en absence de calmoduline, la PMCA a une affinité très faible pour le calcium ; la liaison à la calmoduline la fait passer dans un état de haute affinité ( $K_m < 0.5 \mu\text{M}$ ).

La PMCA appartient à la famille des ATPases de type P, qui couplent l'hydrolyse d'ATP au transport de cations. Quatre gènes codant pour **quatre isoformes de la PMCA ont été identifiés : PMCA1, PMCA2, PMCA3 et PMCA4** ; il existe de plus de multiples formes

d'épissage alternatif (pour revue, voir Grover & Khan, 1992). Les quatre isoformes se répartissent différemment dans les tissus. La PMCA1 a une distribution large : son ARNm est détecté dans l'utérus, le cerveau, le cœur, le muscle squelettique (Sacchetto et coll., 1996), le muscle lisse, le poumon, le foie, le rein, la rate, etc. Les ARNm de la PMCA2 et de la PMCA3 sont présents en forte quantité dans le cerveau, et de façon plus restreinte dans le cœur, l'utérus, le foie et le rein pour la PMCA2, et dans le muscle squelettique et les testicules pour la PMCA3. Le gène du PMCA4 est exprimé à un faible niveau dans presque tous les tissus, et de manière plus importante dans le cerveau (pour revue, voir Grover & Khan, 1992).

La structure de la PMCA, prédite à partir de son profil d'hydrophobicité, contient 10 segments transmembranaires ; environ 80% de sa masse fait saillie dans le cytoplasme, et seule une boucle très courte est exposée au milieu extracellulaire.

### **I.2.3 Systèmes d'extrusion sarcolemmaux et régulation de l'homéostasie calcique**

Nous avons vu dans cette partie que le sarcolemme contient à la fois l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Les taux de transport du calcium par la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , mesuré dans des vésicules membranaires, sont respectivement de  $10 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , et de  $50\text{-}90 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  ; les  $K_m$  sont de  $0.3\text{-}1 \text{ }\mu\text{M}$  et de  $3 \text{ }\mu\text{M}$  (Donoso & Hidalgo, 1989 ; Michalak et coll., 1984 ; Mickelson et coll., 1985). La pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase a donc une plus haute affinité pour le calcium : elle sera plus à même de réguler sa concentration cytoplasmique dans les conditions de repos, quand cette concentration est basse. En revanche, elle est vite saturée lorsque la concentration de calcium augmente. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ayant une affinité plus faible, mais une capacité de transport plus élevée, il régulera préférentiellement la concentration cytoplasmique de calcium lorsque celle-ci est élevée, comme lors de périodes d'intense activité. Notons toutefois que dans des conditions physiologiques d'activité (contraction brève ou prolongée), les mécanismes du RS sont responsables de l'essentiel de l'extrusion du calcium cytoplasmique.

## **II Les compartiments intracellulaires**

Les mouvements calcium à travers la membrane plasmique ne constituent pas la voie principale de signalisation calcique intracellulaire. La plupart des cellules, et la fibre musculaire squelettique en particulier, ont développé une voie de signalisation additionnelle, qui permet de générer rapidement des signaux en profondeur dans la cellule, et localisés de façon précise. Ces voies impliquent des organites intracellulaires spécialisés dans le stockage et la libération de calcium. Dans le muscle squelettique, ces organites sont majoritairement constitués du réticulum sarcoplasmique, mais aussi des mitochondries.

## II.1 Le réticulum sarcoplasmique

Au repos, 60 à 70 % du calcium total de la fibre musculaire squelettique est contenu dans les citernes terminales du RS : la concentration de calcium libre avoisine 1 mM dans la lumière de cet organite, contre 100 nM dans le cytoplasme (Meissner, 1994). Le contenu en calcium total du muscle squelettique reste essentiellement inchangé pendant l'activité musculaire : plus de 99% du calcium nécessaire à l'activation de la contraction du muscle squelettique provient du RS, ce qui souligne son rôle fondamental dans la régulation du cycle contraction-relaxation.

La fonction du RS s'appuie sur trois mécanismes :

- 1) libération sur commande de calcium via des **canaux calciques** situés au niveau des citernes terminales : les récepteurs de la ryanodine (RyR). Il s'agit d'un efflux passif, dans le sens du gradient de concentration ;
- 2) recapture du calcium libéré par les myofibrilles lors de la relaxation musculaire. Les ions calcium traversant la membrane contre un gradient de concentration calcique élevé, cette recapture fait intervenir un mécanisme de transport actif, les **pompes calciques ATPases** du RS longitudinal.
- 3) stockage du calcium : une forte concentration luminale de calcium est maintenue, en vue d'une libération ultérieure, grâce à des protéines fixant cet ion comme la **calséquestrine**.

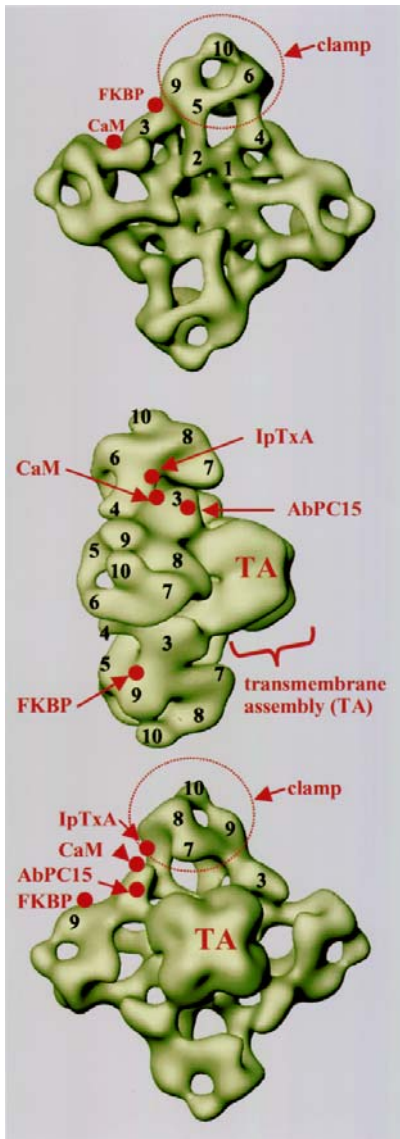
### II.1.1 Le récepteur de la ryanodine

Le RyR, nommé d'après sa sensibilité à la ryanodine, un alcaloïde végétal issu d'une plante (*Ryana Speciosa*), est le plus gros canal ionique connu à ce jour. Dans la fibre musculaire squelettique, il est localisé au niveau des citernes terminales du RS, plus précisément de la zone jonctionnelle. Son rôle clé dans la fonction des muscles cardiaques et squelettiques en a fait l'objet de nombreuses études (pour revue, voir Csernoch, 1999 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Meissner, 1994 ; Meissner, 2002 ; Melzer et coll., 1995 ; Ogawa et coll., 1999).

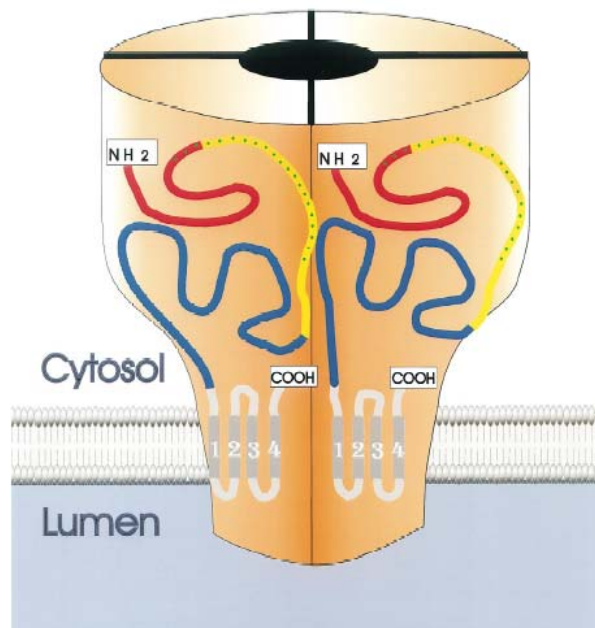
Le RyR étant un canal situé sur un système membranaire interne, il n'est pas accessible à une pipette de patch dans des conditions de fibre musculaire intacte. Différentes techniques permettent d'en étudier la fonction (pour revue, voir Zucchi & Ronca-Testoni, 1997).

- 1) étude de la libération de calcium par des vésicules de RS. Le calcium est soit radiomarqué, soit mesuré par fluorescence ;
- 2) étude des propriétés du canal isolé en bicouche lipidique. La bicouche sépare deux chambres, contenant des solutions différentes : chambre *cis*, qui correspond au côté cytoplasmique du RyR, chambre *trans* pour le côté luminal ;
- 3) liaison à la [<sup>3</sup>H] ryanodine, qui reflète l'état d'activité du canal. Nous reviendrons dessus par la suite ;
- 4) études indirectes : mesure de variation de calcium cytoplasmique sur fibres intacte ;
- 5) mesure d'événements calciques élémentaires : *sparks* et *embers* (voir chapitre 3).

(a)



(b)



(c)

Type	RyR1	RyR2	RyR3
Localisation tissulaire principale	Muscle squelettique	Muscle cardiaque	Cerveau, diaphragme, muscle squelettique
Nombre de sous-unités de RyR+FKBP12	4+4	4+4	4+4
Nombre d'acides aminés par sous-unité	5037	4970	4870
Activation	Détecteur de potentiel Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>

**Figure 12 : Le récepteur de la ryanodine**

(a) Reconstruction 3D du RyR1 (de type squelettique) (d'après Stokes & Wagenknecht, 2000). Les nombres indiquent des structures globulaires distinctes, toutes localisées dans le cytoplasme. Les cercles rouges indiquent les sites de liaison à divers ligands. Abréviations: IpTxA: impérotaxine A, TA: structure transmembranaire. AbPC15 correspond à un anticorps monoclonal. (b) Représentation schématique de l'arrangement tétramérique du RyR. Le profil d'hydrophatie prévoit de 4 à 12 segments transmembranaires au niveau de l'extrémité C-terminale (d'après Wu & Hamilton, 1998). (c) Propriétés des trois isoformes RyR (d'après Meissner, 2002).

### II.1.1.1 Propriétés électrophysiologiques

Le RyR est un canal à **haute conductance** pour les cations monovalents et bivalents. Des expériences effectuées sur RyR squelettique de mammifère incorporé en bicouche lipidique ont permis de définir des conductances de l'ordre de 100 pS en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (54 mM à la face *trans*) comme porteur de charges (Smith et coll., 1988) ; et de 529 pS en présence de  $\text{K}^+$  (250 mM) comme porteur de charges, avec 50  $\mu\text{M}$  de calcium sur la face *cis* et la face *trans* (Sarkozi et coll., 2000). Des conductances unitaires de 26 et 22 pS respectivement pour la choline et le Tris ont été rapportées, suggérant la présence d'un large pore (Smith et coll., 1988). En dépit de cette forte conductance, contrairement aux autres canaux présents dans la membrane du RS, l'activité du RyR modifie très peu le potentiel membranaire.

Si le RyR est très sélectif aux cations par rapport aux anions, il est en revanche peu **sélectif au calcium par rapport aux cations monovalents**. Ainsi, en conditions bi-ioniques, on obtient des rapports de perméabilité de 5 pour  $\text{PCa}/\text{PNa}$  (Lai et coll., 1988 ; Liu et coll., 1989), 6 pour  $\text{PCa}/\text{PK}$  (Smith et coll., 1988). Cette faible sélectivité a de nombreuses répercussions physiologiques. En effet, dans la cellule, le calcium n'est pas le seul ion qui peut traverser le pore du canal. Il est en compétition avec d'autres ions perméants, présent à forte concentration ( $\text{Na}^+$ , 10 mM,  $\text{K}^+$  : 140 mM).

### II.1.1.2 Structure moléculaire

#### II.1.1.2.1 Les différentes isoformes

Le RyR fut d'abord isolé et purifié dans les muscles squelettique et cardiaque, en utilisant comme sonde la [ $^3\text{H}$ ] ryanodine (pour revue, voir Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Chez les mammifères, les études de clonage moléculaire ont révélé 3 isoformes de RyR codées par des gènes distincts, situés sur des chromosomes différents (Figure 12). Ces isoformes sont nommées d'après leur ordre de purification, et le tissu dans lequel elles ont été initialement purifiées (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Martonosi & Pikula, 2003 ; Ogawa et coll., 2000) :

- **RyR1 (de type squelettique)** est l'isoforme dominante du muscle squelettique et est également exprimé dans certaines parties du cerveau et certains muscles lisses ;
- **RyR2 (de type cardiaque)**, exprimé dans le muscle cardiaque, est également largement distribué dans le cerveau et certains muscles lisses ;
- **RyR3 (de type cérébral)**, identifié initialement dans le cerveau, est réparti de façon ubiquitaire dans divers tissus, incluant le muscle squelettique à faible niveau.

Il existe également certainement des formes d'épissage alternatif (Fill & Copello, 2002). Les trois isoformes de RyR présentent les mêmes propriétés de conductance, ce qui suggère que le pore du canal est très conservé (Meissner, 1994). Dans les muscles d'oiseau, de poisson et d'amphibien, 2 isoformes majeures,  $\alpha$  et  $\beta$ , ont identifiées, homologues respectifs de RyR1 et RyR3 (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997).

L'isoforme principale du muscle squelettique, RyR1, est présente à la fois dans les fibres lentes et rapides (Martonosi et Pikula, 2003). Les muscles de mammifères contiennent également l'isoforme RyR3, mais en concentration 20 à 50 fois inférieure (Conti et coll., 1996). Le rapport RyR3/RyR1 varie d'un muscle à l'autre, mais aucune corrélation ne peut être faite avec le type de fibres composant le muscle (Conti et coll., 1996, Flucher et coll., 1999). Ainsi, chez le rat et le lapin, la plus forte expression de RyR3, analysée par Western Blot, est rencontrée dans le diaphragme et le soleus ; la plus faible dans les muscles abdominaux et le tibialis antérieur. Le RyR3 n'est pas détecté dans l'EDL. En revanche, l'expression de RyR1 est à peu près la même entre ces différents types de muscles. Un fort contenu de RyR3 dans le diaphragme est observé dans différents mammifères (rat, souris, lapin et vache) (Conti et coll., 1996). Lorsqu'il est présent dans un muscle, RyR 3 est situé dans les citernes terminales du RS, plus précisément au niveau de la triade (Conti et coll., 1996 ; Flucher et coll., 1999).

#### II.1.1.2.2 Structure du RyR

Les RyR sont de vastes complexes protéiques de 2.3 MDa, constitués de quatre sous-unités d'environ 560 kDa. Ce sont les plus gros canaux décrits à ce jour (Meissner, 1994). Les différentes isoformes présentent la même structure générale, et les mêmes dimensions. Les RyR sont des homotétramères, composés de sous-unités de la même isoforme (Figure 12) (Ogawa, 1999).

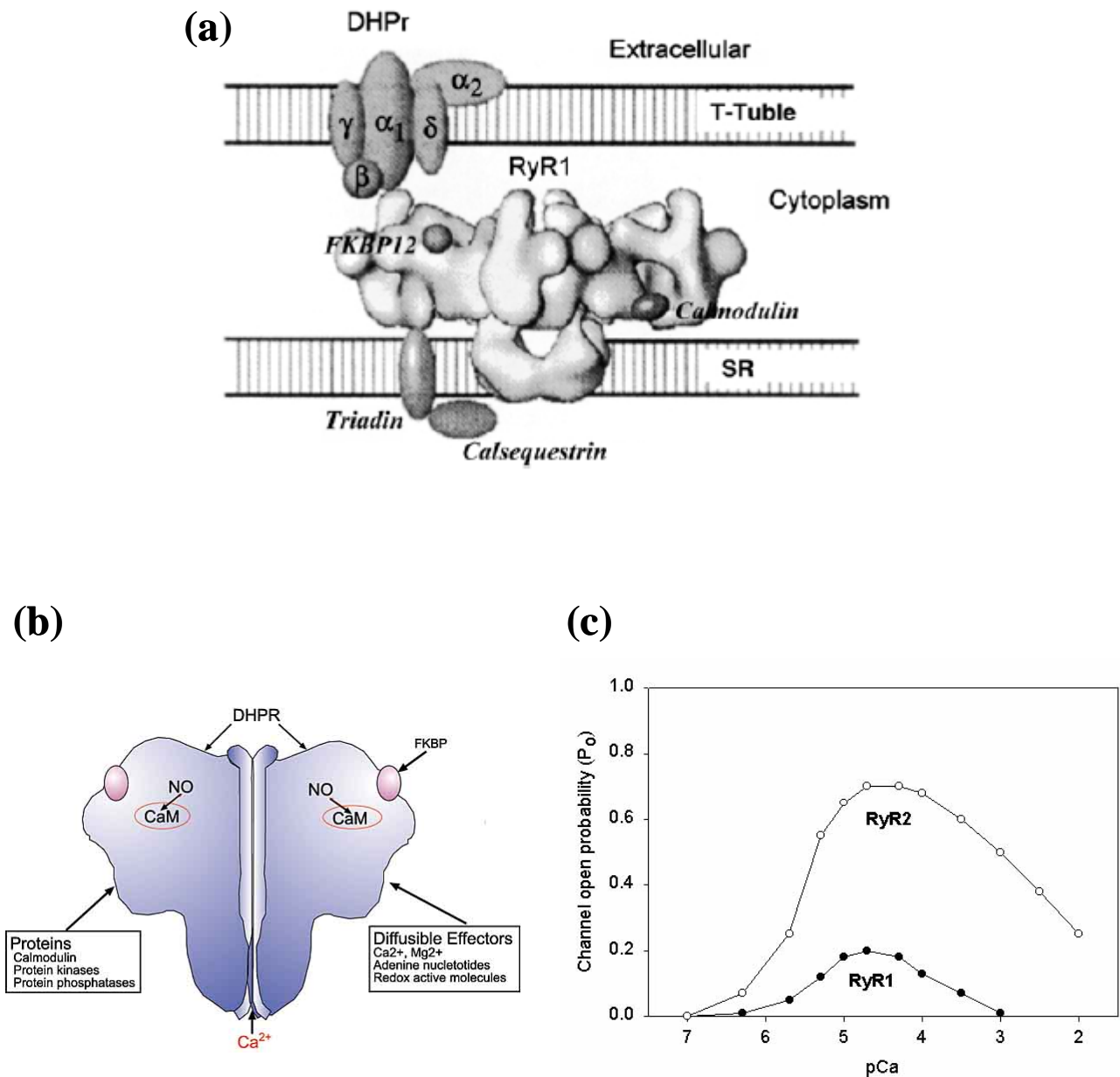
##### **Structures primaire et secondaire :**

La séquence primaire des 3 isoformes du RyR prédit des molécules d'environ 5000 résidus par sous-unité. Pour exemple, le RyR1 de lapin en contient 5037 (Zorzato et coll., 1990). Les profils d'hydrophobicité indiquent une large partie N-terminale, représentant  $\frac{4}{5}$  de la séquence, et supposée constituer le domaine cytoplasmique de la molécule ou pied. La région C-terminale est plus petite ( $\frac{1}{5}$  de la séquence), hydrophobe, et constituée de segments transmembranaires formant le pore du canal. La région transmembranaire présente de fortes similarités avec le RIP<sub>3</sub>. Le nombre de domaines transmembranaires du côté C-terminal de la molécule varie de 4 à 12 selon les modèles. De nombreuses études ont apporté des arguments en faveur du modèle à 4 segments (modèle de Takeshima et coll., 1989) (pour revue, voir Balshaw et coll., 1999 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Meissner, 1994).

L'analyse de la structure primaire du RyR a révélé la présence de plusieurs séquences consensus de liaison à divers ligands (ATP, Ca<sup>2+</sup>, caféine, calmoduline), et des motifs de phosphorylation. De nombreux sites de liaisons du RyR seraient situés dans le cytoplasme (Balshaw et coll., 1999 ; Stokes & Wagenknecht, 2000).

##### **Structure tertiaire**

Le RyR est une large molécule, de dimensions 29×29×12 nm pour l'isoforme squelettique (Radermacher et coll., 1994). La cryomicroscopie électronique et les techniques de reconstruction 3D ont permis d'obtenir des détails de sa structure tertiaire, qui concordent avec les interprétations de la séquence de résidus (pour revue, voir Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Wagenknecht & Radermacher, 1995). Globalement, le RyR présente une



**Figure 13 : Interactions protéiques et régulations du RyR.**

(a) Représentation schématique de l'arrangement du complexe protéique s'organisant autour du RyR1 (de type squelettique) (d'après Caputo, 2001). (b) Éléments de régulation de l'activité du RyR1 (d'après Meissner, 2002). (c) Dépendance de l'activité du RyR1 et du RyR2 (de type cardiaque) vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$ . La probabilité d'ouverture a été enregistrée sur canal reconstitué en bicouche lipidique (d'après Meissner, 2002).

forme de champignon, la partie cytoplasmique contenant 80% de la protéine. Cette partie est constituée de quatre sous-unités en forme de quatre sphères, s'associant en une structure en trèfle à 4 feuilles nommée pied, qui fait saillie dans le cytoplasme. En plus du pied, la molécule comporte une région centrale plus petite, constituée de 4 lobes, qui représente la partie transmembranaire et forme le canal. La structure cytoplasmique est un large groupe de peptides assemblés de façon lâche, ménageant entre eux de nombreux sillons, trous et canaux. Ces canaux, arrangés de façon radiale, pourraient fournir des voies au calcium sortant du canal central vers la périphérie de la molécule (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). La structure transmembranaire est constituée d'un petit groupe de résidus qui fait saillie dans le centre du groupe cytoplasmique.

### II.1.1.3 Les protéines interagissant avec le RyR

*In situ*, le RyR est associé de façon non covalente à de nombreuses protéines qui modifient son activité (Figure 13): calséquestrine, calréticuline, annexine VI, triadine, jonctine, FKBP12, calmoduline, protéine S100, DHPR, jonctate, mitsugumine 29, aldolase, glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, etc (pour revue, voir MacKrell, 1999 ; Martonosi & Pikula, 2003). Nous nous concentrerons dans cette partie sur les plus étudiées. Les interactions RyR-DHPR seront traitées en détails dans le chapitre 3.

#### II.1.1.3.1 Les protéines cytoplasmiques

##### **Calmoduline**

La calmoduline fut la première protéine interagissant avec le RyR à être identifiée (Smith et coll., 1989). C'est une petite protéine cytoplasmique (concentration = 2 $\mu$ M) de 16.7 kDa, constituée de deux domaines globulaires séparés par un domaine central en hélice  $\alpha$  (Balshaw et coll., 2001). La calmoduline sert d'intermédiaire à de nombreux processus biologiques dépendant du calcium. Elle module la libération de calcium par le RS en agissant soit directement sur le RyR, soit sur des protéines qui régulent l'activité du RyR comme le DHPR, la protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/CaM dépendante, et la calcineurine, protéine phosphatase qu'elle stimule (Meissner, 2002).

Quelle que soit la concentration de calcium, RyR1 lie une seule calmoduline par sous-unité (Balshaw et coll., 2001). Le site de liaison est situé sur sa surface cytoplasmique, à 10 nm de distance du pore du canal, dans un domaine qui connecte directement cette partie cytoplasmique aux segments transmembranaires (Wagenknecht & Radermacher, 1997). De ce fait, la liaison à la calmoduline est susceptible de provoquer des changements structuraux qui modifient les propriétés du canal. Les effets dépendent de la concentration de calcium libre. À faible concentration (<1 $\mu$ M), rencontré habituellement dans le muscle au repos, la calmoduline se lie sous forme libre au RyR (ApoCam) et a un effet stimulateur sur son activité, augmentant d'un facteur 3 la  $P_o$  en enregistrement unitaire, ou la liaison à la [<sup>3</sup>H] ryanodine (Tripathy et coll., 1995). À des concentrations calciques plus importantes (50 à 100  $\mu$ M), potentiellement atteintes lors d'une contraction, elle se lie au RyR sous une forme complexée au calcium (CaCam) et a un effet inhibiteur avec une diminution par 2 à 4 de la  $P_o$



et de la liaison à la [<sup>3</sup>H] ryanodine (Tripathy et coll., 1995). L'inhibition est partielle et réversible (Meissner, 1994). Il a été reporté que l'oxydation modifiait la régulation du canal par la calmoduline.

ApoCam et CaCam partagent un seul domaine de liaison sur RyR1, situé entre les résidus 3616 et 3643 (Meissner, 2002). Elles se lient et se dissocient avec des échelles de temps allant de la seconde à la minute (Balshaw et coll., 2001). Il est donc probable que la calmoduline est liée de manière constitutive au RyR. Ainsi, dans des conditions physiologiques, elle reste fixée pendant le cycle contraction-relaxation. Il n'est cependant pas certain qu'elle exerce une activité inhibitrice lors d'une courte contraction.

### **FKBP12 (FK506-binding protein, 12 kDa)**

Les propriétés du RyR isolé en bicouche lipidique diffèrent de celles qu'il présente dans son environnement natif (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Ce comportement est dû à la perte d'une petite protéine de 12 kDa, associée avec le pied du RyR : la FK506 binding protein ou FKBP12. La FKBP12 est le récepteur de la FK506 et de la rapamycine, deux immunosuppresseurs très connus.

RyR1 et RyR3 se lient de façon indifférente à FKBP12 et FKBP12.6 (Ogawa, 1999). Chaque monomère fixe une protéine : 4 FKBP12/FKBP12.6 sont donc associées à chaque RyR (Jayaraman et coll., 1992). À l'instar de la calmoduline, le site de liaison de la FKBP12 sur RyR1 est situé sur sa surface cytoplasmique, à 10 nm de distance du pore du canal (Wagenknecht et Radermacher, 1997). Sa liaison peut donc provoquer des modifications des propriétés du canal, modifications qui impliquent des changements de la conformation du RyR (Martonosi et Pikula, 2003).

Plusieurs groupes ont reporté que l'absence de FKBP12 provoquait l'apparition d'états de sous-conductance de longue durée : le canal s'ouvre plus facilement, mais ne se stabilise pas dans une configuration de pleine ouverture (pour revue, voir Fill & Copello, 2002). De plus la coexpression de RyR et de la FKBP12, dans des cellules d'insectes, élimine les états de sous-conductance (Brillantes et coll., 1994). Ces observations suggèrent que la FKBP12 stabilise le RyR, et donc la voie de perméabilité du canal (le pore) : elle maintient l'état fermé, et diminue la fréquence des états de sous-conductance en coordonnant les interactions entre les 4 monomères du RyR lorsque celui-ci est amené à s'ouvrir. Plus récemment, il a été suggéré que FKBP12 synchronisait également la fonction des RyR adjacents, permettant aux canaux de s'ouvrir et se refermer simultanément (Marx et coll., 1998).

#### II.1.1.3.2 Les protéines luminales

### **Calséquestrine**

La calséquestrine tient son nom de sa capacité à lier le calcium (approximativement 40 moles de calcium par mole de protéine). C'est le tampon calcique majeur de la lumière du RS. Elle est concentrée dans les sites de libération de calcium, et a un rôle actif dans la régulation de RyR, qui sera détaillé par la suite.

### II.1.1.3.3 Les protéines de la membrane du RS

#### **Triadine :**

La triadine est une protéine intégrée de la membrane du RS, de 94 kDa. Elle est enrichie au niveau de la zone jonctionnelle, où elle est colocalisée avec le RyR (Knudson et coll., 1993). Elle lie à la fois la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR et le RyR ; elle a donc été initialement identifiée comme stabilisant les interactions ces deux structures. Toutefois, des études plus récentes révèlent que la triadine interagit également avec la calséquestrine (Guo & Campbell, 1995). Dès lors, la triadine pourrait ancrer le RyR et la calséquestrine, et ainsi maintenir les stocks calciques proches de leur site de libération (pour revue, voir par exemple Csernoch, 1999).

#### **Jonctine :**

La jonctine fut d'abord identifiée dans le muscle cardiaque comme une protéine de 26 kDa liant la calséquestrine (Mitchell et coll., 1988). Dans le muscle squelettique, elle est enrichie dans la zone jonctionnelle du RS. Elle appartient à la même famille que la triadine, et ancre aussi la calséquestrine à la membrane du RS. La structure prédite à partir de sa séquence de 210 résidus indique une protéine avec un domaine N-terminal cytoplasmique très court, et un domaine luminal beaucoup plus long. (pour revue, voir par exemple Franzini-Armstrong & Protasi, 1997).

### II.1.1.4 Développement des RyR

Dans les cellules musculaires squelettiques, l'expression de RyR1 et RyR3 varie selon le stade de développement. Des études menées sur cellules C2C12 de souris ont permis d'établir la présence des deux isoformes du RyR dans les cellules différenciées, alors qu'elles ne sont pas détectées dans les cellules indifférenciées. L'expression de RyR1 et RyR3 n'est pas induite par la fusion : si elle est observée dans les myotubes, elle l'est également dans des myoblastes dont la différenciation a été induite, mais la fusion bloquée (Tarroni et coll., 1997).

*In vivo*, dans les muscles des pattes arrières de la souris, RyR1 et RyR3 sont détectés par immunofluorescence au stade E14 de la vie fœtale (Flucher et coll., 1999). L'expression de RyR1 augmente dans les premiers jours post-natals, et se maintient à un niveau élevé chez l'adulte (Bertocchini et coll., 1997). RyR3 est exprimé dans la majorité des muscles squelettiques à E18 et dans les premières semaines après la naissance. Son expression augmente également dans les premiers jours post-natals, pour devenir maximale au 15<sup>ème</sup> jour après la naissance (P15), puis diminue et devient nulle dans certains muscles (Bertocchini et coll., 1997 ; Tarroni et coll., 1997 ; Flucher et coll., 1999). Ainsi, RyR3 disparaît de l'EDL dès P25 alors qu'il est encore détecté à P60 dans le diaphragme (Flucher et coll., 1999).

### II.1.1.5 Régulation du RyR

L'activité des RyR est régulée par divers facteurs endogènes, processus cellulaires et agents pharmacologiques (Figure 13). Cette partie a pour vocation de répertorier les principaux (pour revue, voir Csernoch, 1999 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Meissner, 1994 ; Meissner, 2002 ; Zucchi & Ronca-Testoni, 1997).

#### II.1.1.5.1 Régulation par des facteurs endogènes

##### **Le calcium**

Le calcium est non seulement le principal ion transitant à travers le canal, mais également un composé essentiel de la modulation de son activité.

##### *Calcium cytoplasmique*

Le calcium joue un rôle prépondérant à la face cis du RyR, puisque les autres ligands nécessitent sa présence pour pouvoir exercer leur effet maximal (pour revue, voir Csernoch, 1999). L'action du calcium sur le RyR est complexe. En absence d'autres ligands régulateurs, comme le  $Mg^{2+}$  et l'ATP, la mesure de l'activité du canal en fonction de la concentration de calcium cytoplasmique donne une courbe en forme de cloche (Figure 13), reflétant une activation par de faibles concentrations de calcium (1-10  $\mu M$ ), et une inactivation par de fortes concentrations (1-10 mM). Ces résultats ont été obtenus avec divers types de techniques : mesure du courant unitaire sur canal isolé, de l'efflux calcique de vésicules de RS, de liaison à la [ $^3H$ ] ryanodine (pour revue, voir Fill & Copello, 2002). Ainsi, la  $P_o$  d'un RyR isolé de muscle squelettique de mammifère (rat ou porc) et incorporé en bicouche lipidique, présente une courbe bimodale d'activation/inactivation par le calcium, l'activation ayant lieu pour des pCa comprises entre 8 et 4 (Fill et coll., 1990 ; Delbono & Chu, 1995 ; Sarkozi et coll., 2000). Comme attendu de part ces données en canal unitaire, la libération de calcium, mesurée sur fibre isolée de mammifère (rat) par fluorescence, présente une inactivation par le calcium (Sarkozi et coll., 2000).

Ce double effet du calcium sur le RyR révèle la présence de 2 sites de liaison : un site activateur à forte affinité ( $EC_{50}$  d'environ  $2\mu M$  et coefficient de Hill proche de 2) et un site inhibiteur à faible affinité ( $IC_{50}$  d'environ  $150\mu M$  et coefficient de Hill supérieur à 1) (Meissner et coll., 1986). Les sites de liaison sont situés du côté cytoplasmique, dans le pied du RyR (Meissner, 2002)

Si la courbe bimodale d'activation/inactivation est retrouvée pour les trois isoformes du RyR, la sensibilité au calcium diffère selon l'isoforme considérée. En ce qui concerne le muscle squelettique, il a certes été démontré, chez le lapin, que RyR3 présente la même sensibilité que RyR1 au niveau du site inhibiteur (Murayama & Ogawa, 1997). Cependant, au niveau du site activateur, RyR3 apparaît soit 4 à 10 fois moins sensible au calcium que RyR1 (Murayama & Ogawa, 1997 ; Murayama et coll., 1999 ; Takeshima et coll., 1995), soit plus sensible au calcium que RyR1, selon la technique utilisée (Murayama et coll., 1999). Ces résultats suggèrent que ces deux isoformes sont activées par deux mécanismes différents (voir chapitre couplage excitation-contraction).

### *Calcium luminal*

Il existe à ce jour de nombreuses preuves de la sensibilité du RyR à la concentration calcique de la lumière du RS. Ainsi, des études menées sur vésicules de RS (Hidalgo et Donoso, 1995), ou sur fibres pelées de rat (Lamb et coll., 2001), ont démontré que l'activité et la sensibilité du canal à certains agonistes augmentent avec la concentration luminale de calcium. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : la liaison du calcium à des sites luminaux du RS ; la liaison du calcium à des sites cytoplasmiques, une fois le canal traversé (pour revue, voir Beard et coll., 2004 ; Fill & Copello, 2002 ; Sitsapean & Williams, 1997) ; ou un effet du calcium luminal sur les protéines lumineales interagissant avec le RyR : jonctine, calsequestrine (Hidalgo et Donoso, 1995).

### **Modulation par d'autres cations divalents : exemple du Mg<sup>2+</sup>**

Le Ba<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup> sont inhibiteurs du RyR (pour revue, voir Meissner, 1994). L'effet inhibiteur du Mg<sup>2+</sup> dépend de la concentration de calcium à la face *cis*. Ainsi, l'*IC50* mesuré sur vésicules de RS est d'environ 20 µM en présence de 1µM de calcium, et 100 µM en présence de 10 µM de calcium, avec un coefficient de Hill supérieur à 1, indiquant un effet coopératif (Meissner et coll., 1984). D'un point de vue moléculaire, le Mg<sup>2+</sup> se fixerait sur les deux sites de liaison du calcium, en se comportant comme un antagoniste compétitif des sites activateurs, et un agoniste des sites inhibiteurs (le site inhibiteur ne fait pas la discrimination entre les différents cations divalents) (Ogawa, 1999). Au niveau du site activateur, le Mg<sup>2+</sup> déplace la courbe de sensibilité au calcium du canal vers des concentrations plus importantes, et diminue l'amplitude maximale de libération de calcium (Ogawa, 1999). À concentrations physiologiques de Mg<sup>2+</sup>, 10 µM de calcium sont nécessaires pour que cet ion prenne la place du Mg<sup>2+</sup> au niveau du site activateur (pour revue, voir Csernoch, 1999).

D'une façon générale, le RyR1 est plus sensible à l'action du Mg<sup>2+</sup> que le RyR2 et le RyR3 (Fill & Copello, 2002).

### **Les nucléotides adénylés :**

L'ATP libre cytoplasmique (concentration de 300µM environ) est un activateur du RyR. Son action dépend de l'isoforme : il est plus efficace sur RyR1 que sur RyR2 et RyR3 (pour revue, voir Fill & Copello, 2002 ; Meissner, 2002). De nombreux autres nucléotides adénylés (par ordre d'efficacité : AMP-PCP>AMPc, ADP, AMP> adénine>adénosine) activant le canal, cet effet semble impliquer la liaison du nucléotide à un site effecteur plutôt qu'une phosphorylation. Par ailleurs, les nucléotides non adénylés (CTP, GTP, ITP, UTP) n'ont aucun effet sur la libération de calcium par le RS (Meissner, 1984).

Le cytoplasme de la fibre musculaire squelettique contient 5 mM d'ATP total, et 1.5 mM de Mg<sup>2+</sup> libre : la plupart de l'ATP est donc lié au Mg<sup>2+</sup>. De ce fait, il est fortement probable que MgATP, plutôt que l'ATP libre, soit le modulateur physiologique du RyR. Ainsi l'addition de Mg<sup>2+</sup> et de nucléotides adénylés sur des vésicules de RS de lapin, à des concentrations proches de celles du cytoplasme, stimule fortement l'activité du canal, une manière dépendante de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Meissner et coll., 1986). Ceci indique l'existence d'un site régulateur qui, quand il lie le MgATP, rend le canal plus sensible à l'activation par le calcium. Ce site semble être différent de ceux du calcium (pour revue, (Ogawa, 1999).

**Autre :**

Le RyR est également modulé par le pH, la force ionique, les polyols, les polyamines endogènes et les acides carnitines à longue chaîne (pour revue, voir Csernoch, 1999 ; Meissner, 1994 ; Meissner, 2002).

## II.1.1.5.2 Régulation par des processus cellulaires

**Phosphorylation**

Des études fonctionnelles comparant les effets de kinases endogènes et exogènes sur RyR en bicouche supportent la présence de plusieurs sites de phosphorylation (Hain et coll., 1994). Il a par ailleurs été démontré que différentes protéines kinases endogènes (PKA, PKC, PKG et CaMKII) pouvaient phosphoryler le RyR isolé. La phosphorylation augmente l'activité du canal ; l'effet est reversé par déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A. *In situ*, PKC étant située dans la zone jonctionnelle des tubules T, il est possible qu'elle soit impliquée dans la régulation du RyR. Toutefois, il n'y a pas de consensus à ce jour quant au niveau de phosphorylation du RyR1 *in vivo*, ou à l'implication de kinases endogènes dans la modulation de l'activité du canal. Notons également que la phosphorylation de protéines associées au RyR, la calséquestrine et de la triadine, a été rapportée (pour revue, voir Csernoch, 1999 ; Fill & Copello, 2002 ; Meissner, 1994 ; Meissner, 2002).

**Statut redox et S-nitrosylation :**

Cette partie sera détaillée dans le chapitre 3.

## II.1.1.5.3 Pharmacologie du RyR

**Caféine :**

La caféine appartient au groupe des méthylxanthines, groupe qui stimule la libération de calcium par le RS (Csernoch, 1999). Appliquée à des concentrations millimolaires, elle induit une contracture musculaire, et réduit l'accumulation de calcium par le RS

La caféine agit directement sur le RyR et présente deux modes d'action selon sa concentration. À faible concentration (<2 mM), les effets de la caféine sont calcium-dépendants, et peuvent être simplement dus à une augmentation de la sensibilité du site d'activation : elle augmente la  $P_o$  des canaux en présence de concentrations micromolaires de calcium à la face *cis*. À forte concentration (>5 à 10 mM), le canal s'ouvre même en absence de calcium à la face *cis*, mais conserve les mêmes cinétiques et la même perméabilité, indiquant un effet plus direct de la caféine (pour revue, voir Csernoch, 1999 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Les canaux activés par la caféine conservent leur sensibilité à la ryanodine et à l'ATP, et peuvent être bloqué par le  $Mg^{2+}$  ou le rouge de ruthénium (pour revue, voir Ogawa, 1999).

**Rouge de ruthénium**

Le rouge de ruthénium appartient au groupe des polyamines, groupe qui affecte l'activité du RyR. C'est un inhibiteur efficace du RyR ( $IC_{50}$  de 20 à 100 nM). Il diminue considérablement la probabilité d'ouverture du canal en favorisant les événements fermés de

longue durée. L'inhibition est pratiquement irréversible (Csernoch, 1999). L'inhibition des RyR par le rouge de ruthénium peut être expliquée par le fait que cette molécule est capable d'entrer dans le pore du canal, le bloquant ainsi dans un état ouvert, mais occlus (pour revue, voir Zucchi & Ronca-Testoni, 1997).

### **Ryanodine**

La ryanodine a une action complexe sur la contractilité du muscle : sur faisceaux de soleus ou EDL, elle diminue la force de la contraction et du tétanos, mais induit une contracture qui prend place lentement (Fryer et coll., 1989). Comme son nom l'indique, le RyR lie la ryanodine ; cette liaison induit un changement complexe de la fonction du canal, similaire pour les trois isoformes, et dose-dépendant (pour revue, voir Fill & Copello, 2002 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997) :

- **de faibles doses de ryanodine (10 nM)** augmentent la fréquence d'ouverture du RyR, celui-ci conservant un niveau normal de conductance ;
- **des doses intermédiaires (1-10 µM)** provoquent l'effet classiquement décrit : le canal est bloqué dans un état de sous-conductance ( $1/3$  ou  $1/2$  de l'amplitude contrôle), à cinétiques lentes (Fill & Copello, 2002). L'induction d'événements de très longue durée, et la diminution de la conductance du pore, sont bien visibles sur canal unitaire en bicouche, (Rousseau et coll., 1987 ; Smith et coll., 1988). Dans la cellule musculaire isolée, la liaison de la ryanodine à son récepteur provoque, lors de la répétition d'une stimulation, une augmentation graduelle de la  $[Ca^{2+}]_i$  de repos. Ce phénomène est dû à l'incapacité du RyR à se refermer après ouverture suite à une dépolarisation (open-locked process) (Collet & Jacquemond, 2002.) ;
- **de fortes doses (100µM)** bloquent le canal dans une configuration fermée

Il est généralement admis que le RyR contient un site à haute affinité par monomère, localisé dans la partie C-terminale de la protéine, région censée contenir le pore (Callaway et coll., 1994). La présence de ce site sur les deux isoformes rencontrées dans le muscle squelettique, RyR1 et RyR3, a été démontrée par liaison à la  $[^3H]$  ryanodine, chez le lapin (Murayama & Ogawa, 1997). La liaison de la ryanodine à son site dépend fortement de l'état d'activité du canal. Ainsi, les ligands connus pour provoquer l'ouverture du canal et stimuler la libération de calcium par le RS (calcium, ATP, caféine) augmentent le taux d'association de la ryanodine, tandis que les inhibiteurs, tels que le  $Mg^{2+}$  et le rouge de ruthénium, le diminue (Chu et coll., 1990). Le site de liaison de la ryanodine est donc plus accessible dans le canal ouvert. Par conséquent, la liaison à la ryanodine peut être utilisée comme un détecteur de la conformation et de l'état d'activation du canal (pour revue, Meissner & el-Hashem, 1992).

## II.1.2 Récepteurs de l'inositol trisphosphate

Le récepteur de l'inositol trisphosphate (RInsP<sub>3</sub>) est un canal calcique activé par la fixation d'un messager intracellulaire : l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>). L'InsP<sub>3</sub> est produit conjointement au diacylglycérol (DAG) par les phospholipases C (PLC) qui hydrolysent le phosphatidyl inositol disphosphate (PIP) localisé dans la membrane plasmique.

Les études moléculaires ont identifié au moins trois isoformes du RInsP<sub>3</sub> chez les mammifères, codées par trois gènes différents (pour revue, voir Yoshida & Imai, 1997) :

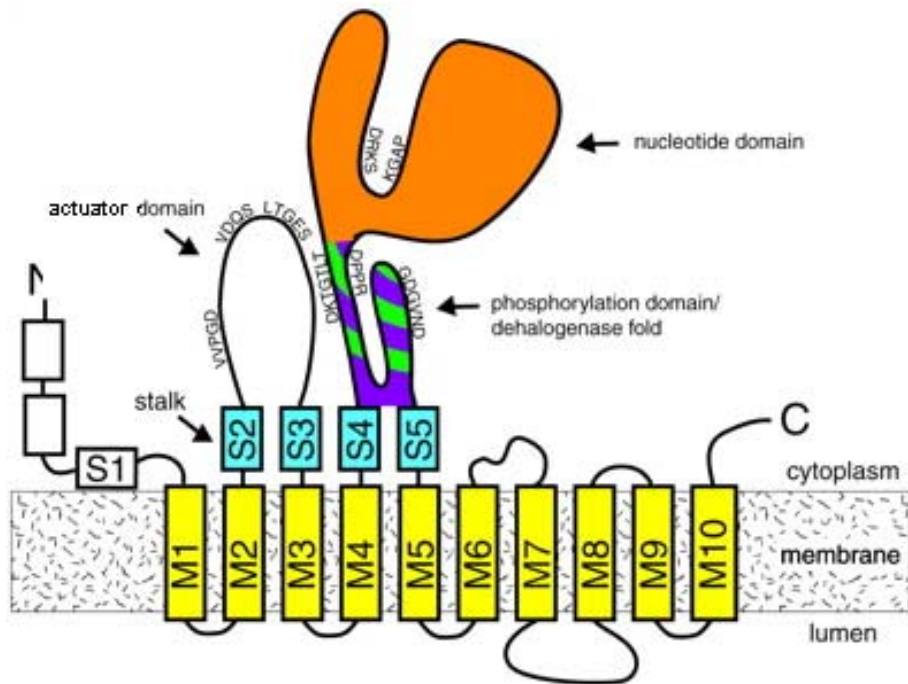
- **RInsP<sub>3</sub> de type I**, composée de 2749 résidus, ce qui correspond à un PM de 313 kDa ;
- **RInsP<sub>3</sub> de type II**, comportant 2701 résidus, soit un PM de 307 kDa ;
- **RInsP<sub>3</sub> de type III**, composée de 2670 résidus, correspondant à un PM de 304 kDa.

De Smedt et coll. (1997) ont démontré par RT-PCR, chez la souris, que les 3 isoformes sont présentes dans le muscle squelettique, dans les proportions suivantes : 16 % RInsP<sub>3</sub> de type I, 47 % RInsP<sub>3</sub> de type II, 37 % RInsP<sub>3</sub> de type III. Le RInsP<sub>3</sub> serait exprimé de façon préférentielle dans les fibres oxydatives, lentes ou rapides (Moschella et coll., 1995). Il n'existe pas à ce jour de travaux portant sur les propriétés ou la régulation de l'activité du RInsP<sub>3</sub> dans le muscle squelettique de mammifère. En revanche, des études menées sur récepteur isolé en bicouche lipidique montrent de nombreuses différences dans la pharmacologie des RInsP<sub>3</sub> et des RyR, comme la sensibilité à la ryanodine, la caféine, l'héparine etc. (pour revue, voir Fransini-Armstrong & Protasi, 1997).

La localisation précise du RInsP<sub>3</sub> dans la cellule musculaire squelettique a été étudiée par Liberona et coll. (1998) sur culture primaire de cellules musculaires de souris, par liaison à l' [<sup>3</sup>H] InsP<sub>3</sub>. Ces auteurs observent que le canal est enrichi au niveau du noyau. La présence de RInsP<sub>3</sub> dans la membrane du RS, quant à elle, n'est pas définitivement établie, bien que de nombreux arguments appuient cette hypothèse. On peut citer parmi eux le fait que les tubules-T du muscle squelettique contiennent les enzymes nécessaires à la génération d'InsP<sub>3</sub>, ou les fortes quantités d'InsP<sub>3</sub> (300-400 Pmol/mg de protéine) rencontrées au niveau de la triade (pour revue, voir Melzer, 1995).

## II.1.3 La SERCA

À l'instar de la PMCA, la Ca<sup>2+</sup>-ATPase Mg<sup>2+</sup>-dépendante du RS (SERCA pour Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase) appartient à la famille des ATPases de type P. Dans des conditions physiologiques d'activité musculaire (contraction brève ou prolongée), la SERCA est responsable de l'essentiel de l'extrusion cytoplasmique du calcium vers son lieu de stockage : la lumière du RS.



**Figure 14 : Structure de la protéine SERCA.**

D'après Wuytack et coll., 2002.

La SERCA comprend un domaine M membranaire, permettant le passage de calcium à travers la membrane, et trois domaines cytoplasmiques, formant la tête de l'ATPase (P pour phosphorylation, N pour Nucleotid binding, A pour Actuator).



### II.1.3.1 Structure moléculaire

Les SERCA constituent une large famille de protéines comportant environ 1000 résidus, soit un PM de 100 à 110 kDa. Elles sont codées par 3 gènes distincts. L'expression des isoformes est tissu-spécifique, et régulée par le développement (pour revue, voir Berchtold et coll., 2002 ; Wuytack et coll., 2002) :

- **SERCA1** est exprimée exclusivement dans le muscle squelettique, et préférentiellement dans les fibres musculaires rapides. Elle présente 2 variants d'épissage : **SERCA1a**, exprimé chez l'adulte, et **SERCA1b**, exprimé chez le nouveau-né.
- **SERCA2**, par ses deux variants d'épissage, est distribuée dans tous les tissus. On distingue **SERCA2a**, une isoforme spécifique du muscle (lent, cardiaque, et lisse), qui apparaît très tôt lors du développement ; et **SERCA2b**, exprimée dans les cellules non musculaires et le muscle lisse.
- **SERCA3** est largement distribuée dans les cellules musculaires et non musculaires.

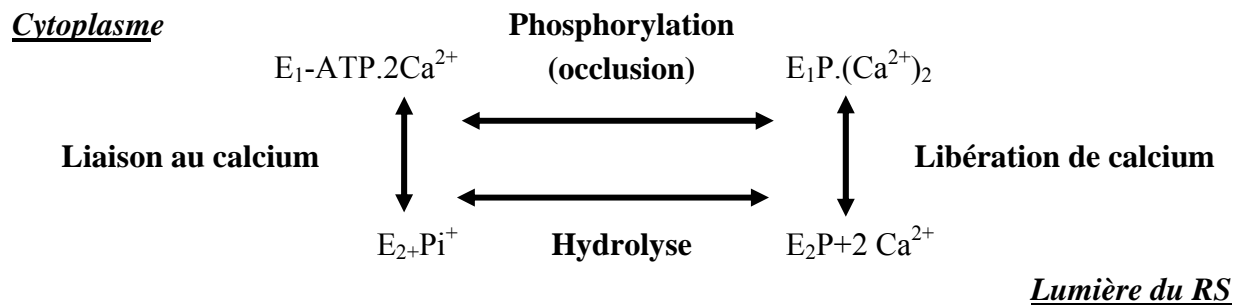
La SERCA est constituée d'une seule chaîne polypeptidique, repliée en 4 domaines : un domaine M transmembranaire, relié par une tige à 3 domaines cytoplasmiques (Figure 14) (pour revue, voir Berchtold et coll., 2002 ; Wuytack et coll., 2002) :

- **le domaine M** est composé de 10 hélices  $\alpha$  transmembranaires (M1-M10), de longueur et d'inclinaison variable. Il contient les deux sites de liaison au calcium (sites I et II), et permet le passage de cet ion à travers la membrane.
- les trois domaines cytoplasmiques forment la tête de l'ATPase, qui représente  $\frac{2}{3}$  de la protéine. Elle est composée de deux boucles, la plus large contenant à la fois le site catalytique (**domaine P** pour Phosphorylation), phosphorylé au niveau d'un résidu aspartate lors de la catalyse, et le site de liaison à l'ATP (**domaine N** pour Nucleotid Binding). La petite boucle (**domaine A** pour Actuator) intervient dans les changements de conformation de l'enzyme, qui permettent le couplage hydrolyse d'ATP-transport de calcium.

### II.1.3.2 Mécanismes de transport du calcium

Les SERCA sont structurellement distinctes des PMCA, mais partagent les mêmes mécanismes de transport du calcium : elles catalysent le transport électrogénique de 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$  par molécule d'ATP hydrolysée, du cytoplasme vers la lumière du RS. Le transport de calcium est réversible sous certaines conditions, induisant la formation d'une molécule d'ATP pour 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$  libérés dans le cytoplasme (pour revue, voir Martonosi & Pikula, 2003). L'entrée de 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS étant accompagnée de 4 charges positives, un contretransport d'ion  $\text{H}^+$  et des mouvements d'ions à travers les canaux anioniques et cationiques du RS se mettent en place pour empêcher les variations de potentiel membranaire.

De nombreux **modèles du cycle catalytique des SERCA** sont proposés, et s'appuient tous sur la transition entre 2 états de conformations différents, nommés  $E_1$  et  $E_2$ . Dans l'état  $E_1$ , les 2 sites de liaison au calcium sont de haute affinité, et se trouvent du côté cytoplasmique ; l'enzyme lie à la fois le calcium et l'ATP. Dans  $E_2$ , les 2 sites sont de faible affinité, et du côté luminal. Des changements conformationnels interviennent à toutes les étapes du cycle: liaison au calcium, formation de la phosphoenzyme, libération de calcium dans la lumière du RS, déphosphorylation par hydrolyse (pour revue, voir MacLennan & Kranias, 2003 ; Wuytack et coll., 2002).



### II.1.3.3 Implication de la SERCA dans l'activité musculaire squelettique

Les SERCA maintiennent la concentration cytoplasmique de calcium autour de 100 nM au repos. En effet, il existe une fuite permanente de calcium à partir du RS, faible à comparer de celle qui survient lors de la contraction (1% environ), et qui s'effectue via les RyR, dont la probabilité d'ouverture n'est pas nulle en conditions basales (pour revue, voir Csernoch, 1999). Lorsque la concentration de calcium cytoplasmique augmente, l'activité des pompes est stimulée. À l'inverse, une augmentation de la concentration de calcium dans la lumière du RS inhibe cette activité (Fryer & Stephenson, 1996 ; Inesi & De Meis, 1989). Ainsi, l'activité de la SERCA est maximale lors d'une contraction, lorsque la concentration cytoplasmique de calcium est la plus haute, et la concentration luminale la plus faible (pour revue, voir Beard et coll., 2004). Des vitesses maximales de recapture du calcium de 6.4 et 2.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{g de prot}\cdot\text{min}^{-1}$  ont été rapportées chez l'homme, respectivement dans les fibres musculaires squelettiques de type II et type I (Salviati et coll., 1984). Ces vitesses sont  $10^5$  fois inférieures à la vitesse de libération par le RyR, ce qui est dû aux contraintes mécaniques du couplage énergétique. Ceci est compensé par le nombre important de pompes présentes dans la cellule, qui couvrent l'ensemble du RS longitudinal (leur densité au niveau de la membrane du RS est d'environ 30000/ $\mu\text{m}^2$ ) (pour revue, voir Franzini-Armstrong & Peachey, 1981). Ainsi, dans les fibres rapides, elles peuvent représenter 80 % du contenu protéique de la membrane du RS. Cette forte densité, associée au développement considérable du RS dans la plupart des types de muscles, fait que 1-2 cycles seulement sont nécessaires, lors d'une relaxation, pour ramener la concentration cytoplasmique de calcium à ses valeurs de repos. L'activité de la SERCA dans les muscles rapides est plus importante que dans les muscles lents, de façon à peu près proportionnelle au temps de relaxation.

#### II.1.3.4 Régulation par les facteurs endogènes

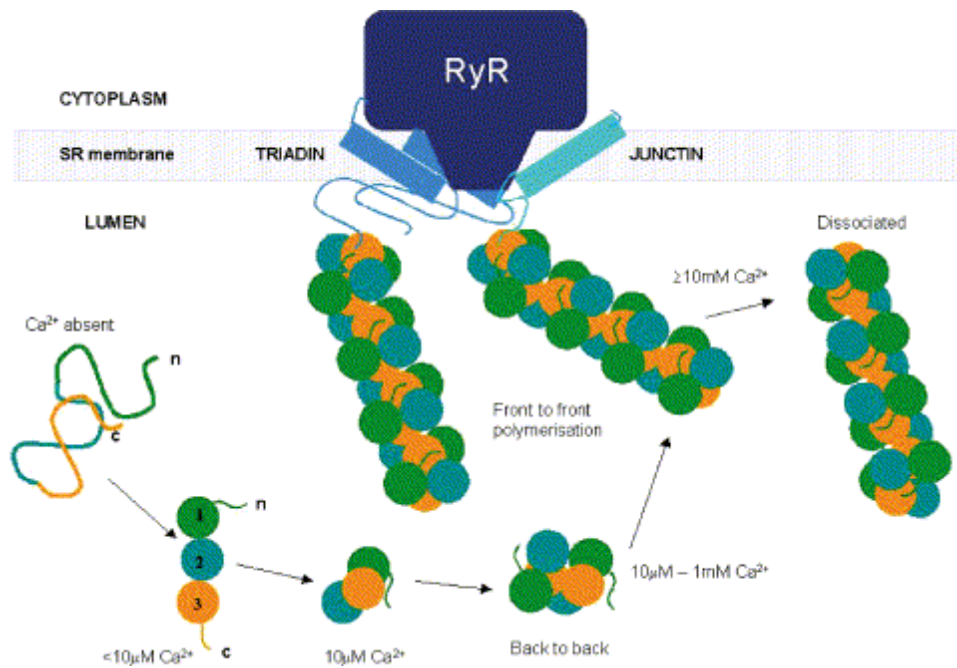
Dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique lent, la SERCA est régulée par une protéine intrinsèque, le phospholamban. Le phospholamban est une petite protéine membranaire, homopentamérique, comportant 52 résidus, soit un PM de 22 kDa. Elle est fortement exprimée dans le RS des fibres cardiaques et musculaires squelettiques lentes, mais est absente des fibres rapides. Lorsque la concentration calcique est faible, elle interagit avec SERCA2a, et diminue son affinité apparente pour le calcium. Aux niveaux physiologiques de calcium, cette diminution inhibe l'activité de SERCA2a. L'interaction SERCA2a-phospholamban, et donc l'inhibition, est interrompue par une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium, ou la phosphorylation du phospholamban (pour revue, voir MacLennan & Kranias, 2003 ; Wuytack et coll., 2002). L'importance du phospholamban dans la régulation de l'activité de la SERCA a pu être mise en évidence par des expériences menées sur souris transgéniques, exprimant cette protéine dans le muscle rapide, où elle est habituellement absente. Dans les fibres musculaires de souris transgéniques, l'affinité de SERCA1 pour le calcium, et la vitesse de relaxation du muscle, sont diminuées (Slack et coll., 1997). Cette étude démontre, en prime, que SERCA1 peut interagir avec le phospholamban.

Si les fibres rapides ne contiennent pas le phospholamban, elles expriment en revanche une protéine de la même famille, mais qui ne possède pas de site de phosphorylation cytoplasmique : la sarcolipine. La sarcolipine copurifie avec SERCA1. Des études menées in vitro par cotransfection de sarcolipine et SERCA1 de lapin en cellules HEK-293 ont démontré que la sarcolipine diminue l'affinité de SERCA1 pour le calcium (Odermat et coll., 1998). In vivo, la cotransfection de sarcolipine dans le soleus de rat (muscle à prédominance lente) inhibe l'activité de SERCA2a. Dans ce cas, l'affinité de la pompe est inchangée, mais la vitesse maximale de transport de calcium est diminuée (Tupling et coll., 2002).

La SERCA est également régulée des facteurs non protéiques. Lytton et coll. (1992) ont mesuré la dépendance au pH des différentes isoformes de SERCA exprimées en cellules COS. La courbe d'activité de l'enzyme en fonction du pH est en forme de cloche, le maximum se situant entre les pH 6.8-7 pour SERCA1 et SERCA2, et le pH 7.2-7.4 pour SERCA3. La courbe d'activité de l'enzyme en fonction du de  $[Mg^{2+}]$  est également bimodale, et dépend du pH (Bishop et coll., 1988).

#### II.1.3.5 Pharmacologie de la SERCA

Plusieurs substances sont connues comme inhibitrices de l'activité calcium-ATPase du RS : par exemple la vanadate, la thapsigargine, le CPA (acide cyclopiazonique) et le TBQ (2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (pour revue, voir Inesi & Sagara, 1994).



**Figure 15 : Modélisation des changements structuraux présumés de la calséquestrine en fonction de la concentration de calcium.**

D'après Beard et coll., 2004.

En absence de Ca<sup>2+</sup>, la calséquestrine reste sous forme dépliée. Lorsque la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> augmente faiblement (10 μM), la protéine se condense en un monomère compact. Une plus forte augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provoquera une dimérisation puis une polymérisation des monomères. À des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> extrêmes (≥ 10 mM), la calséquestrine se dissocie de la triadine et de la jonctine.

## II.1.4 Les protéines de stockage du calcium

### II.1.4.1 La calséquestrine

La calséquestrine est la protéine majoritaire du RS, entièrement contenue dans les citernes terminales, et absente du RS longitudinal. Elle est distribuée dans divers tissus musculaires (cardiaque, squelettique et lisse) et non musculaires (cervelet par exemple). Dans le tissu musculaire, deux isoformes sont observées codées par deux gènes distincts : l'isoforme squelettique, présente dans les muscles rapides, et l'isoforme cardiaque, dans le cœur et les muscles lents.

#### II.1.4.1.1 Rôle de tampon calcique des citernes du RS

Une des fonctions majeures de la calséquestrine est d'augmenter la contenance du RS en calcium. Ainsi, elle permet de stocker le calcium nécessaire à la contraction à des concentrations supérieures à 20 mM, tandis que le niveau luminal de calcium libre reste à 1 mM. Cette capacité de stockage permet au muscle de contracter de façon répétitive, sans perte de force. La calséquestrine contient 18 à 50 sites de liaison au calcium par monomère, ce qui lui permet d'en fixer de 40 à 50 moles par mole de protéine. En revanche, son affinité pour cet ion est faible : le Kd varie de 1  $\mu$ M à 1 mM, dépendant de l'espèce considérée, de l'isoforme, et de la présence d'autres cations. La calséquestrine est en effet peu spécifique au calcium : d'autres cations peuvent entrer en compétition au niveau des sites de liaison, dans l'ordre d'affinité :  $\text{La}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}/\text{Sr}^{2+} > \text{K}^{+}$  (pour revue, voir Beard et coll., 2004 ; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997).

En absence de calcium, la calséquestrine n'est pas repliée dans l'espace (Figure 15). Une concentration calcique d'environ 10  $\mu$ M permet le repliement de la molécule en un monomère compact de 400 résidus, et de PM 40 kDa. L'augmentation de la concentration de 10 à 100  $\mu$ M provoque une dimérisation, puis une polymérisation. À 1 mM, ce qui correspond aux concentrations lumineuses physiologiques, le polymère est stable et linéaire. Il est ancré dans la membrane du RS par liaison au RyR, soit de façon directe, soit par l'intermédiaire de deux protéines : la triadine et la jonctine. Les 4 protéines forment alors la composante lumineuse du complexe macromoléculaire entourant le RyR. Des concentrations calciques supérieures à 10 mM provoquent une dissociation de ce complexe. On ne sait pas si, dans ces conditions, la calséquestrine reste sous forme polymérisée, ou redevient monomérique (pour revue, voir Beard et coll., 2004 ; Fill & Copello, 2002).

La taille du stock luminal de calcium libre (et donc susceptible de traverser le RyR) varie au cours du processus de libération du calcium. Une augmentation transitoire de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre survient au tout début de ce processus (Ikemoto et coll., 1991 ; Ikemoto & Yamamoto, 2000). Une hypothèse proposée par ces auteurs pour expliquer ce phénomène est que l'activation du RyR induit des changements de conformation du canal, qui provoquent une dissociation du calcium de la calséquestrine, et conséquemment une élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  lumineuse. Cette élévation stimulerait la libération de calcium par le RS. Cette hypothèse s'appuie sur les

interactions moléculaires mises en évidence entre le RyR et la calséquestrine, et suggère un couplage entre le RyR et les protéines lumineales de stockage du calcium, qui leur permettrait de libérer le calcium nécessaire à la contraction (MacKrell, 1999).

#### II.1.4.1.2 Implication dans la régulation de l'activité du RyR

Pendant de nombreuses années, la calséquestrine a été considérée comme un simple tampon calcique du RS, qui permettait le stockage de calcium en fortes quantités, et facilitait son transport du site de repompage (SERCA) au site de libération (RyR). Depuis une décennie, de nouvelles observations ont indiqué que l'implication de la calséquestrine dans la régulation de l'homéostasie calcique va bien au-delà de son rôle de tampon : elle module l'activité du canal calcique du RS (RyR) (pour revue, Beard et coll., 2004). Une étude comparant les effets de la calséquestrine sur vésicules de RS, où le RyR est dans son environnement natif, et sur RyR purifiée en bicouche lipidique, a démontré qu'à des concentrations calciques lumineales de 1 mM, en présence de la triadine et de la jonctine, la calséquestrine inhibe le RyR (Beard et coll., 2002). L'inhibition est levée quand la concentration calcique varie, soit par changement de conformation de la calséquestrine, soit par sa dissociation du RyR. Ces modifications qui interviennent au niveau de la calséquestrine amplifient les effets directs de la  $[Ca^{2+}]$  libre luminal sur l'activité du RyR. En revanche, la calséquestrine active le RyR purifié, en absence de triadine et de jonctine. Cette régulation du RyR pourrait coordonner le taux de libération de calcium du RS avec le remplissage des stocks, et ainsi permettre d'optimiser la libération de calcium tout en préservant les stocks calciques.

Notons que  $[Ca^{2+}]$  doit atteindre 5 mM dans la lumière du RS pour provoquer la dissociation de la calséquestrine. (Beard et coll., 2002). Il est fortement improbable que la concentration physiologique lumineale de calcium libre atteigne ce niveau *in vivo*, car le fort pouvoir tampon de la calséquestrine la maintient à des valeurs proches de 1 mM. De ce fait, les petites variations de concentration lumineales calciques, dans les valeurs physiologiques de 500  $\mu$ M à 2-3 mM, sont plus susceptibles de provoquer des changements conformationnels de la calséquestrine, qui reste ancrée au complexe du RyR. Ces changements de conformation amplifient les effets directs des variations de calcium luminal sur l'activité du RyR (Beard et coll., 2004).

#### II.1.4.2 Les autres protéines

D'autres protéines de stockage du calcium sont présentes en faible quantité dans la lumière du RS : **la calréticuline**, analogue de la calséquestrine dans les cellules non musculaires ; **la protéine HRC** (Histidine-Rich Calcium-binding), qui partage de nombreuses similarités avec la calséquestrine ; et **la sarcaluménine**. Contrairement à la calséquestrine qui est concentrée dans les citernes terminales, la protéine HRC et la sarcaluménine sont réparties dans l'ensemble du RS. Elles auraient donc le rôle de tampon du calcium non jonctionnel. Elles sont également supposées réguler le RyR (pour revue, voir Beard et coll., 2004).

## II.2 Les mitochondries

Nous avons vu dans le chapitre 1 que, chez le mammifère, la population de mitochondries diffère entre les fibres oxydatives et les fibres glycolytiques. En effet, les mitochondries sont nombreuses et larges dans les fibres de type I, mais petites et moins abondantes dans les fibres de type IIb (Ogata & Yamasaki, 1985). À l'instar de l'ensemble des organites de la fibre musculaire squelettique, leur répartition dans le cytoplasme est fortement conditionnée par la présence de myofibrilles. Ainsi, des études menées chez le rat ont montré que la plupart des mitochondries sont confinées dans les espaces intermyofibrillaires. De nombreuses mitochondries sont également rassemblées en groupes parallèles sous le sarcolemme (Ogata & Yamasaki, 1985).

À l'inverse du RS, la mitochondrie n'est pas considérée comme un organite dévoué au stockage du calcium : son contenu en calcium est très faible :  $1.7 \text{ mmol.kg}^{-1}$  de masse sèche par exemple, dans le muscle squelettique de grenouille, contre  $117 \text{ mmol.kg}^{-1}$  pour le RS (Somlyo et coll., 1981). Néanmoins, des études sur mitochondries isolées à partir de divers muscles squelettiques (lents et rapides) (voir par exemple, Sembrowich et coll., 1985) ont montré que ces organites sont capables de séquestrer le calcium, et jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire.

### II.2.1 Les systèmes de transport du calcium mitochondriaux

Le potentiel de la membrane interne mitochondriale, généré par la chaîne respiratoire ou par hydrolyse de l'ATP, est fortement négatif : de  $-80$  à  $-200 \text{ mV}$ . Ce potentiel favorise l'entrée de calcium dans la mitochondrie. Si la distribution de  $\text{Ca}^{2+}$  de part et d'autre de la membrane était passive, à un tel potentiel négatif, sa concentration dans la matrice mitochondriale serait 5 à 6 fois supérieure à la concentration cytoplasmique. Or, dans des conditions physiologiques, le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie est faible : le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est donc pas distribué de façon passive, la membrane interne de la mitochondrie étant majoritairement imperméable à cet ion. Le  $\text{Ca}^{2+}$  traverse cette membrane via des transporteurs, dont la nature moléculaire reste indéterminée.

#### II.2.1.1 Mécanismes de l'influx calcique

Deux types de transporteurs permettant l'influx de calcium ont pu être observés sur mitochondrie isolée : l'uniprot, et le RAM (pour Rapid Uptake Mode). Néanmoins, l'existence de RAM n'a jamais été mise en évidence sur cellules intactes (pour revue, voir Rizzuto et coll., 2000).

**L'uniprot** est un transporteur à faible affinité pour le calcium, mais haute capacité de transport. Ses propriétés diffèrent selon le type de muscle. Ainsi, dans des mitochondries isolées à partir de muscle squelettique, la concentration calcique de demi-activation et la vitesse maximale de transport sont respectivement de  $2.6 \text{ }\mu\text{M}$  et  $2.6 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ de prot.s}^{-1}$  dans

le muscle lent, contre 0.9-1  $\mu\text{mol}$  et 0.6-0.9  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de  $\text{prot.s}^{-1}$  dans le muscle rapide (Sembrowich et coll., 1985). L'uniport est un canal qui permet le passage de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  (mais pas de  $\text{Mg}^{2+}$ ) à travers la membrane, la force électromotrice provenant du potentiel membranaire fortement négatif. Il est activé par le calcium externe, et inhibé par certains cations divalents :  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ . L'ATP, le phosphate inorganique et le  $\text{Mg}^{2+}$  modulent son ouverture ; le rouge de ruthénium agit comme un inhibiteur non compétitif. L'uniport est également inhibé par le FCCP, un protonophore qui annule le potentiel de la membrane interne (pour revue, voir Ganitkevich, 2003 ; Martonosi & Pikula, 2003 ; Rizzuto et coll., 2000.).

Le calcium entrant dans la mitochondrie *via* l'uniport ne reste pas libre dans la matrice mitochondriale : il se lie au phospholipides membranaires et/ou précipite avec les ions phosphates pour former de l'hydroxyapatite (il n'y a pas de protéines fixant le calcium dans les mitochondries) (pour revue, voir Ganitkevich, 2003).

### II.2.1.2 Mécanismes de l'efflux calciques

L'extrusion de calcium de la mitochondrie implique 3 processus : un mécanisme  $\text{Na}^{+}$ -indépendant, un échangeur  $\text{Na}^{+}$ -dépendant, et un pore de transition de perméabilité non sélectif et de forte conductance (PTP) (pour revue, voir Ganitkevich, 2003 ; Martonosi & Pikula, 2003 ; Rizzuto et coll., 2000) :

- l'efflux  $\text{Na}^{+}$ -indépendant impliquerait un **échangeur  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$** , de stœchiométrie  $n\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ , avec n probablement supérieur à 2. Il n'est pas inhibé par le rouge de ruthénium ;
- l'efflux  $\text{Na}^{+}$ -dépendant correspond à un **échangeur  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$**  distinct de celui de la membrane plasmique, mais de même stœchiométrie :  $3 \text{Na}^{+}/1 \text{Ca}^{2+}$ . Grâce à cette stœchiométrie, le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  est favorisé par le potentiel membranaire. Il est inhibé entre autre par le rouge de ruthénium, la vérapamil, le diltiazem, le CGP et certains cations divalents :  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ;
- **le PTP** présente une dépendance au calcium matriciel. Son ouverture est régulée par le potentiel de membrane, le pH, et inhibée par la cyclosporine A.

## II.2.2 Mitochondries et homéostasie calcique

### II.2.2.1 Régulation du métabolisme intramitochondrial par le calcium

Les mitochondries sont traditionnellement considérées comme des fournisseurs d'énergie, capables, dans le muscle squelettique, de s'adapter à une augmentation de la demande lors d'un exercice. Des études menées sur biopsie de muscle squelettique humain, démontrent que la concentration calcique est plus importante dans des mitochondries issues de muscles ayant subi un exercice intense, que dans celles issues de muscles non exercés (Madsen et coll.,



1996). Une hypothèse quant au rôle de ce calcium est qu'il régule le métabolisme intramitochondrial. En effet, de nombreuses enzymes impliquées dans le cycle de Krebs sont sensibles au calcium. Jouaville et coll. (1999) ont ainsi observé, dans des myotubes en culture primaire, que l'augmentation transitoire de calcium dans la mitochondrie activait la production d'ATP.

#### II.2.2.2 Régulation de la concentration cytoplasmique du calcium : rôle des mitochondries

Cependant, le rôle des transports calciques mitochondriaux ne peut se limiter à la régulation du métabolisme. Dans de nombreux tissus, la preuve a été faite que les mitochondries sont également impliquées dans la régulation de la concentration de calcium libre cytoplasmique. Ainsi, chez le mammifère, dans le muscle squelettique de type lent, Sembrovich et coll. ont démontré, en 1985, que les mécanismes de capture du calcium par les mitochondries ont des caractéristiques qui en font des régulateurs potentiels de la concentration de calcium cytoplasmique, en conditions physiologiques. Dix ans plus tard, dans le même type de muscle, Gillis et coll. (1997) ont mis en évidence l'implication des mitochondries dans la diminution du calcium cytoplasmique, lors de la relaxation.

Au niveau de la mitochondrie, Bruton et coll. (2003) ont observé, dans des fibres intactes isolées à partir de muscles lents (soleus) et rapides (EDL) de souris, une augmentation transitoire de la concentration calcique luminale lors d'un simple tétanos. Cette augmentation ne s'observe que dans les mitochondries proches du sarcolemme. L'entrée de calcium ne crée pas de variation de potentiel membranaire, suggérant qu'elle est accompagnée d'un influx d'anions ou d'un efflux de cations. Dans les fibres musculaires étudiées, l'influx de calcium semble passer par l'uniport : l'application de FCCP, inhibe de façon significative l'augmentation de calcium mitochondriale ; l'extrusion implique l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (l'addition de CGP amplifie le signal calcique mitochondrial), mais pas le PTP (la cyclosporine A n'affecte pas le signal). Notons cependant que d'autres études menées par le même groupe sur *fdb* (muscle rapide) de souris, en utilisant les mêmes préparations et techniques d'enregistrement (microscopie confocale) n'ont pas mis en évidence cette élévation de la concentration calcique mitochondriale après une activité tétanique répétée (protocole de fatigue), suggérant une régulation complexe des mécanismes de transport mitochondriaux (Lännergren et coll., 2001).

Dans le muscle squelettique, les mitochondries des espaces intermyofibrillaire présentent divers patterns d'organisation. Certaines sont situées de part et d'autres des stries Z et limitées par la bande I ; elles sont adjacentes aux citernes terminales du RS (Ogata & Yamasaki, 1985). Quelques mitochondries, dans les fibres de type IIa, sont arrangées en colonnes longitudinales, qui s'étendent sur plusieurs sarcomères ; elles approchent également le réseau du RS (Isaeva & Shirokova, 2003). Ces relations avec le RS placent les mitochondries à proximité des sites de libération du calcium. Elles peuvent donc potentiellement interagir avec les microdomaines cytoplasmiques à forte concentration calcique qui se crée lors de la libération de calcium, comme cela a pu être observé dans d'autres types cellulaires (pour

	Fibre lente	Fibre rapide
<b>A. Concentration de sites (<math>\mu\text{M}</math>)</b>		
Troponine C : sites de liaison au $\text{Ca}^{2+}$	120	240
Parvalbumine : sites de liaison au $\text{Ca}^{2+}$ et au $\text{Mg}^{2+}$	0	1500
<b>B. Constantes de vitesse de réaction</b>		
Réaction $\text{Ca}^{2+}$ -troponine C		
$k_{on}$ ( $10^8 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	0.885	0.885
$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	57.5	115
$Kd$ ( $\mu\text{M}$ )	0.65	1.3
Réaction $\text{Ca}^{2+}$ -parvalbumine		
$k_{on}$ ( $10^8 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	-	0.417
$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	-	0.5
$Kd$ ( $\mu\text{M}$ )	-	0.012
Réaction $\text{Mg}^{2+}$ -parvalbumine		
$k_{on}$ ( $10^8 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	-	0.00033
$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	-	3
$Kd$ ( $\mu\text{M}$ )	-	90.9

**Tableau 4 : Protéines impliquées dans la régulation de la concentration cytoplasmique de calcium.**

D'après Baylor et Hollingworth, 2003.

revue, voir Rizzuto et coll., 2000). Ces aspects de la régulation de la concentration calcique intracellulaire seront abordés dans le chapitre 3.

Au final, les mitochondries pourraient également représenter la dernière ligne de défense dans les processus de mort cellulaire, en empêchant ou retardant l'augmentation de calcium dans le cytoplasme, lorsque tous les autres mécanismes d'extrusion ont été dépassés (Martonosi, 1994).

### **III Les protéines cytoplasmiques jouant le rôle de tampon calcique**

Le cytoplasme de la fibre musculaire squelettique contient diverses protéines susceptibles de fixer le calcium. Toutes ne jouent cependant pas le rôle de tampon calcique. En effet, pour pouvoir moduler la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ , une protéine doit être capable de fixer cet ion de manière relativement spécifique, avec une haute affinité (constante d'affinité située entre  $10^8 \cdot \text{M}^{-1}$  et  $10^6 \cdot \text{M}^{-1}$ ), en présence de concentrations physiologiques de  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ . Essentiellement trois protéines présentant une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  sont actuellement identifiées dans le muscle : la troponine C, la calmoduline et la parvalbumine ; l'affinité de la myosine pour le calcium est plus faible. Toutes ces protéines sont impliquées dans la régulation de la contraction ou de la relaxation musculaire (pour revue, voir Berchtold et coll., 2000 ; Gordon et coll., 2000 ; Perry, 1994). La concentration de CaM étant extrêmement faible dans la fibre musculaire squelettique (environ  $3\mu\text{M}$ ), seules la TnC et la PV seront considérées comme tampon calcique (Tableau 4).

#### **III.1 La troponine C**

De nombreux travaux, principalement effectués sur fibres pelées, ont établi que les fibres lentes et les fibres rapides sont distinguables par la sensibilité au calcium de leurs protéines contractiles (voir par exemple Mounier et coll., 1989 ; Ruff, 1989 ; Stephenson & Williams, 1981). Les fibres lentes présentent en effet un seuil d'activation par le calcium plus faible, et une sensibilité plus importante, que les fibres rapides. La sensibilité au calcium dépend en grande partie de l'expression de l'isoforme lente ou rapide de la TnC (Moss et coll., 1986). La TnC n'est cependant pas le seul facteur responsable de la sensibilité myofibrillaire au calcium : les protéines du complexe des troponines, la tropomyosine, la myosine, et les protéines de liaison de la myosine sont aussi impliquées (pour revue, voir Berchtold et coll., 2000 ; Gordon et coll., 2000 ; Perry, 1994).

La TnC appartient à la super famille des protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ses deux isoformes sont composées de 2 domaines globulaires (N- et C-terminal) reliés par une hélice  $\alpha$  centrale (pour revue, voir Berchtold et coll., 2000 ; Gordon et coll., 2000 ; Perry, 1994). La séquence primaire des deux isoformes de la TnC est caractérisée par la présence de 4 régions homologues de 30 résidus, qui constituent les domaines de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces domaines

forment 4 poignées E-F (EF hand), qui se comportent comme quatre sites de fixation pour les cations divalents. La présence de ces poignées E-F est caractéristique des protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Les sites de fixation sont numérotés de I à IV à partir de la région N-terminale : les sites I et II sont situés dans le domaine N-terminal, les sites III et IV dans le domaine C-terminal.

- **Les sites C-terminaux (III et IV)** ont une haute affinité pour le calcium ( $K_{\text{Ca}^{2+}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), et une affinité suffisante pour le  $\text{Mg}^{2+}$  ( $K_{\text{Mg}^{2+}} \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) pour que cet ion soit lié à la TnC dans des conditions de repos. Ils sont appelés sites structuraux car leur liaison au calcium ou  $\text{Mg}^{2+}$  augmente les interactions TnC/TnI, et la liaison de la TnC au filament fin (Zot & Potter, 1982).
- **Les sites N-terminaux (I et II)** ont une plus faible affinité pour le calcium ( $K_{\text{Ca}^{2+}} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), mais une haute sélectivité du calcium par rapport au magnésium. Ils interviennent dans la sensibilité au calcium de la fibre : l'application, sur fibre pelée de lapin, d'une TnC recombinante, dont les sites I et II sont modifiés, rend la fibre insensible au calcium (Sorenson et coll., 1995). La région N-terminale de la TnCs ne contient qu'un seul site de liaison au calcium : le site II, son site I étant incapable de fixer les cations divalents.

La liaison du calcium à la TnC produit de forts changements de conformation, qui sont présumés être la conséquence de l'altération des positions relatives des sites de liaison au calcium. La nature du changement de conformation de la TnC lorsqu'elle fixe le calcium n'est pas encore totalement élucidée. Ce changement de conformation est à l'origine de la levée de l'inhibition exercée par la TnI (pour revue, voir Berchtold et coll., 2000 ; Perry, 1994).

### III.2 Les chaînes légères de la myosine

Les MLC proviennent du même gène primitif que les autres protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'étude de leur séquence de résidus indique qu'elles possèdent 4 poignées E-F. Cependant, des délétions et des substitutions survenues au cours de l'évolution ont annulé, pour trois de ces sites potentiels, la capacité à fixer le  $\text{Ca}^{2+}$ . Un seul site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  demeure, de faible affinité ( $K_A \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ ). Ce site est également capable de fixer le  $\text{Mg}^{2+}$ , avec une affinité suffisante ( $K_A \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) pour que celui-ci puisse être lié dans des conditions de repos. L'échange entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  se ferait de façon trop lente pour que ce site soit impliqué de façon directe dans la régulation de la contraction. Cependant, il pourrait avoir une fonction lors d'augmentations prolongées de calcium (pour revue, voir Gordon et coll., 2000 ; Perry, 1994).

### III.3 La parvalbumine

La parvalbumine (PV) fut découverte dans le muscle de carpe en 1952 par J.G. Henrotte. Elle tient son nom de la similitude de sa solubilité avec celle des albumines. La PV est une protéine cytoplasmique d'un PM de 12 kDa, appartenant à la famille des protéines fixant le  $\text{Ca}^{2+}$  (protéines à poignées EF). Elle présente une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  (Tableau 4), ce qui en fait

potentiellement un tampon calcique. Chez le mammifère, il existe 2 isoformes de la PV : une isoforme  $\alpha$ , rencontrée chez l'adulte, et une isoforme  $\beta$ , ou oncomoduline, présente surtout chez l'embryon préimplantatoire, et dans le cytotrophoblaste du placenta (Föhr et coll., 1993). L'isoforme  $\alpha$  est distribuée dans un nombre restreint de tissus, principalement le muscle squelettique et certains types de cellules nerveuses. Elle est peu présente, voire absente, dans le muscle cardiaque et lisse (pour revue, voir Berchtold, 2000 ; Pauls et coll., 1996a).

### III.3.1 La PV comme tampon calcique

La PV contient deux sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , d'affinité supérieure à celle des sites de la TnC, mais non spécifiques. De ce fait, dans la cellule musculaire squelettique au repos (concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  inférieure ou égale à 100 nM), les sites de la PV sont pratiquement tous occupés par le  $\text{Mg}^{2+}$ . Lors d'une stimulation, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  atteint des niveaux micromolaires : le  $\text{Ca}^{2+}$  déplace le  $\text{Mg}^{2+}$  de ces sites de liaison. La vitesse de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la PV est donc déterminée par la vitesse de dissociation du  $\text{Mg}^{2+}$ . Cette dernière étant relativement lente, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la PV sera plus lente que sur la TnC. Ainsi, lors d'une stimulation, le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie préférentiellement à la TnC, et l'activité tampon de la PV est retardée ; elle fixera le  $\text{Ca}^{2+}$  seulement après déclenchement de la contraction (Gillis et coll., 1982 ; Pauls et coll., 1996b ; Potter et coll., 1981 ; Robertson et coll., 1981). Notons qu'il existerait sur la PV un 3<sup>ème</sup> site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , de faible affinité, et non sélectif entre les cations (pour revue, Pauls et coll., 1996a).

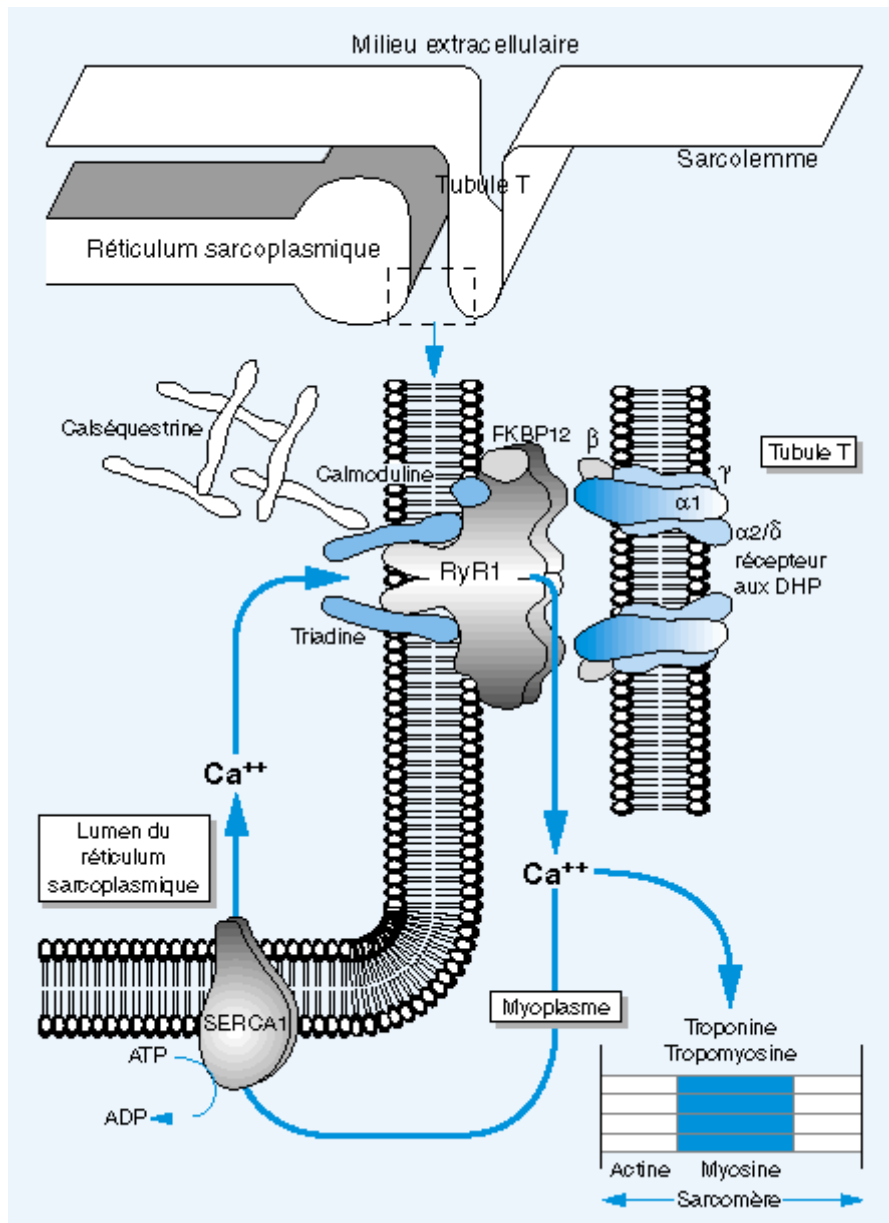
### III.3.2 Implications de la PV dans la relaxation du muscle squelettique

La relaxation du muscle squelettique, après contraction, est initiée par une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . L'extrusion du calcium cytoplasmique peut être accomplie par recapture dans le RS via la pompe  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  ou par liaison à des tampons protéiques cytoplasmiques tels que la PV. La PV a initialement été proposée comme impliquée dans la relaxation des muscles poïkilothermes, dans des conditions de basse température, lorsque l'activité de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  du RS est ralentie (Gillis et coll., 1982). En revanche, son rôle dans la relaxation des muscles de mammifères, homéothermes, a longtemps été soumis à controverse. Dans les années 80, un certain nombre d'études ont ainsi rapporté que la SERCA était suffisante pour extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme, et que la PV avait une fonction mineure dans les fibres musculaires de mammifères (voir par exemple, Gillis et coll., 1982). Cependant, ces études considéraient des animaux de grande taille, dont les fibres ne contiennent que de faibles concentrations de PV. Par des comparaisons inter-espèce, chez le mammifère, Heizmann et coll., (1982) ont en effet révélé une corrélation inverse entre la taille de l'animal et le contenu en PV des fibres musculaires squelettiques. En revanche, le contenu en PV est corrélé de façon positive avec la vitesse de relaxation des fibres. Autrement dit, les mammifères de petite taille ont des fibres musculaires plus riches en PV que ceux de grandes tailles, et qui relaxent plus rapidement. Ces auteurs ont également observé que la quantité de PV dans un muscle est d'autant plus élevée que sa composition en fibres rapides (de type II) est importante. Ainsi, les muscles lents, majoritairement composés de fibres de type I, présentent une quantité plus faible de PV. À titre d'exemple, chez le rat et la souris, la PV est absente des fibres de type I (à contraction

lente), absente ou présente en faible quantité dans les fibres de type IIa, mais présente en quantités modérées ou fortes dans les fibres IIb (Fuchtbauer et coll., 1991 ; Carroll et coll., 1997). L'ensemble de ces résultats suggère une implication de la PV dans la relaxation de la fibre musculaire rapide chez le mammifère.

Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Carroll et coll. (1997) qui observent, dans les muscles lents (*soleus*) et rapides (*fdb*) du rat, une proportionnalité entre la vitesse de déclin du transitoire calcique après stimulation électrique et la concentration de PV dans le muscle. L'analyse des contributions propres de la SERCA et de la PV à l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme révèle que, dans les muscles rapides, la PV est majoritairement responsable de cette extrusion, tandis que dans les muscles lents, l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  est dominée par la SERCA. Ainsi, bien que la SERCA soit suffisante pour ôter le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme, la PV contribuerait de façon importante à la diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , et de ce fait, à la relaxation de la fibre rapide. Un argument supplémentaire est apporté par l'étude in vitro de Liu et coll. (1997). Dans des fibres musculaires (*fdb*) de souris maintenues en culture, le contenu en PV diminue graduellement et, de manière concomitante, après 6 jours de culture, la vitesse de déclin d'une variation transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenchée par une stimulation électrique externe ralentit, quelque soit la durée de la stimulation appliquée (1, 5 ou 10 potentiels d'action à la fréquence de 100 Hz). Les auteurs proposent une corrélation positive entre le contenu en PV et la constante de temps de décroissance des variations transitoires calciques, suggérant une implication de la PV dans la relaxation de la fibre, tant après une stimulation brève que prolongée (5 à 100 ms).

Cependant, la preuve expérimentale irréfutable de l'importance fonctionnelle de la PV dans le processus de relaxation de la fibre musculaire de mammifère n'a été obtenue que récemment, par des expériences de transfection et mutagenèse dirigée. Dans l'étude de Muntener et coll. (1995), un muscle lent de rat (*soleus*) transfecté avec un plasmide contenant l'ADNc de la PV, présente une augmentation de sa vitesse de relaxation corrélée avec l'expression de la protéine. Cette corrélation positive, dose-dépendante, démontre de façon directe la fonction physiologique de la PV comme facteur relaxant du muscle squelettique rapide de mammifère. À l'inverse, Schwaller et coll. (1999) ont testé, chez la souris PV *KO* (souris dont les muscles n'expriment pas la PV), l'effet de stimulations brèves sur fibre isolée de muscles rapides (EDL). Dans les fibres PV *KO*, après une stimulation de 20 ms, le déclin de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ , et la vitesse de relaxation, sont plus lents que dans la fibre sauvage, démontrant l'implication de la PV dans l'extrusion du calcium cytosoplasmique lors de la relaxation. Sur les cellules musculaires (*fdb* et *EDL*) de ces souris PV *KO*, Raymackers et coll. (2000) ont, par la suite, étudié l'effet de stimulations téaniques sur la vitesse de relaxation. Dans les muscles sauvages, la vitesse de relaxation diminue avec l'augmentation de la durée de la stimulation téanique. Dans les muscles PV *KO*, l'absence de PV se traduit d'une part par une vitesse de relaxation plus lente par rapport aux muscles sauvages, et d'autre part par une indépendance de cette vitesse vis-à-vis de la durée de la stimulation téanique. Dans ces conditions, la vitesse de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  est uniquement conditionnée par la cinétique de fonctionnement de la SERCA. En conséquence, les auteurs proposent que, dans les muscles *fdb* et *EDL* sauvages, la PV facilite le transit du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis les myofibrilles vers le réticulum. Le ralentissement de la relaxation avec l'augmentation de la durée de la stimulation téanique traduirait une saturation progressive de la PV par le  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 16 : Structures mises en jeu dans le cycle excitation-contraction-relaxation du muscle squelettique.**

D'après Monnier & Lunardi, 2000.

Quatre DHPR, localisés au niveau des tubules T, interagissent avec un tétramère RyR1 au niveau des citernes terminales du RS. L'ouverture du canal RyR1 est activée grâce à un changement conformationnel du DHPR, provoqué par une variation du potentiel de membrane. Dans la lumière du RS, le  $\text{Ca}^{2+}$  est complexé par la calséquestrine, une protéine qui fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une faible affinité et une forte capacité. La calséquestrine interagit avec le RyR1 par l'intermédiaire de la triadine. Le  $\text{Ca}^{2+}$  relâché par le RS se fixe sur la troponine C, et permet ainsi une interaction entre l'actine des filaments fins et la myosine des filaments épais qui aboutit à la contraction des sarcomères. L'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique à destination de la lumière du RS se fait grâce à la SERCA. Dans les fibres musculaires rapides, la transition du calcium de la troponine C vers le SERCA se fait par fixation sur une protéine cytoplasmique, la parvalbumine.

## CHAPITRE 3

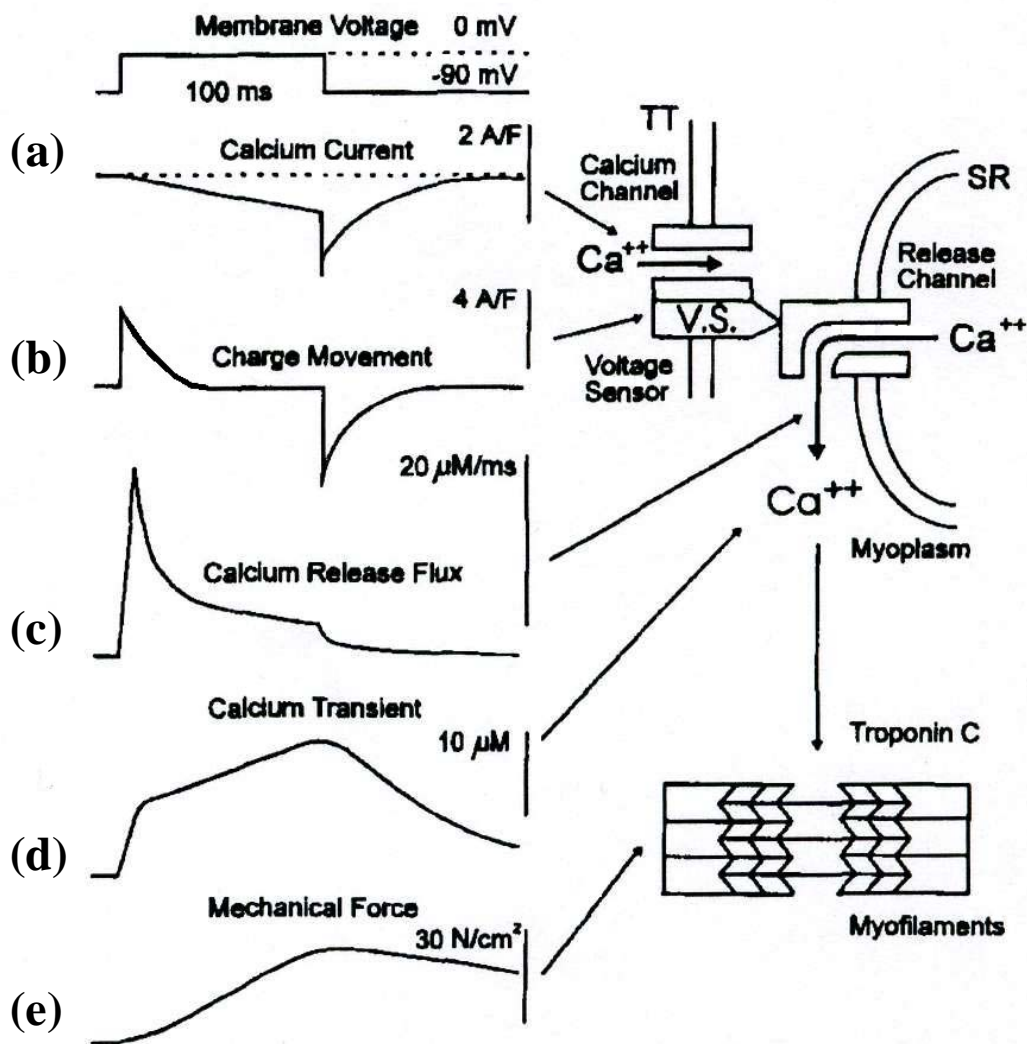
### LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Le terme de couplage excitation-contraction fut initialement proposé par Sandow en 1965, pour désigner, dans la fibre musculaire squelettique, les étapes conduisant de l'excitation du sarcolemme à la contraction des myofibrilles. L'existence de telles étapes avait été mise en évidence dès la fin des années 1940 par les travaux de A.V. Hill (Hill, 1948 ; 1949), faisant cas de l'activation extrêmement rapide (en quelques ms) des myofibrilles les plus profondes d'une fibre musculaire squelettique d'épaisseur 100  $\mu\text{m}$ , à la suite d'une stimulation du sarcolemme. Calculant la quantité d'une substance diffusant depuis la membrane de surface qui atteindrait le centre de la fibre pendant cet intervalle de temps, il conclut que la diffusion d'un activateur serait trop lente pour permettre la communication du stimulus aux myofibrilles les plus internes. Il devait donc exister un mécanisme supplémentaire, relayant la stimulation du sarcolemme à l'intérieur de la fibre.

La molécule activatrice de la contraction du muscle squelettique est l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , et la modulation de sa concentration cytoplasmique implique essentiellement un compartiment intracellulaire, le RS. Intégrons maintenant les différents mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique dans le **cycle excitation-contraction-relaxation** (Figure 16). Au repos, la concentration cytoplasmique de calcium d'une fibre musculaire squelettique de vertébré est maintenue aux alentours de 100 nM. Quand la fibre est activée par un influx nerveux, la dépolarisation locale, au niveau de la plaque motrice, déclenche un potentiel d'action, qui se propage le long du sarcolemme jusqu'à l'intérieur de la fibre *via* les tubules T. La dépolarisation des tubules T provoque la libération de calcium par le RS, ce qui élève la concentration de calcium cytoplasmique d'un facteur de 10 à 100. Le calcium se lie par une réaction rapide à la TnC, activant la contraction. La relaxation du muscle squelettique est initiée par une chute de la concentration de calcium cytoplasmique. Le processus d'extrusion du calcium du cytoplasme se déroule en 3 étapes : 1) dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC ; 2) translocation du  $\text{Ca}^{2+}$  vers son site d'entrée dans le réticulum, facilitée par des protéines cytoplasmiques à forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , comme la PV dans le muscle rapide ; 3) recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RS longitudinal *via* la pompe SERCA. Dans la lumière du RS, le calcium se lie à une protéine, la calséquestrine.

Par la suite, la définition du **couplage excitation-contraction (couplage EC)** a été restreinte au mécanisme liant la dépolarisation du sarcolemme à la libération de calcium par le RS. Ce mécanisme implique principalement une structure particulière dans le muscle squelettique adulte, qui met en étroite relation les membranes des tubules T et du RS : la triade. Au niveau moléculaire, deux types de canaux interviennent: le canal voltage-dépendant du sarcolemme ou DHPR, et le canal de libération de calcium du RS ou RyR. Nous détaillerons au cours de ce chapitre l'organisation particulière des systèmes membranaires et protéiques au niveau de la triade, et les interactions fonctionnelles entre DHPR et RyR.





**Figure 17 : Signaux associés au couplage excitation-contraction.**

D'après Melzer et coll., 1995.

(a) Courant calcique de type L. Dans le muscle squelettique, il n'est pas directement associé au couplage EC, mais permet d'étudier la fonction du DHPR. (b) Mouvements de charges intramembranaires. (c) Flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, calculé à partir du transitoire calcique. (d) Transitoire calcique (variations de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). (e) Force mécanique.

# I Signaux associés au couplage excitation-contraction

Avant d'aborder le fonctionnement du couplage EC, il m'a paru indispensable de caractériser les signaux qui permettaient de l'approcher d'un point de vue expérimental (Figure 17). Le couplage peut être conceptuellement divisé en 3 étapes :

- 1) **la détection du potentiel** par une structure située dans la membrane du tubule T. Cette étape peut être étudiée *via* l'enregistrement de courants de déplacements de charges au sein de la membrane (ou mouvements de charges intramembranaires) ;
- 2) **la transmission du signal au RS** ;
- 3) **le processus de libération du calcium**. Si cette étape fut d'abord étudiée à travers ses répercussions mécaniques (développement de tension), l'avancée des techniques optiques de détection du calcium a permis d'avoir accès à une conséquence plus directe : l'augmentation transitoire de la concentration de calcium cytoplasmique en réponse à une stimulation (ou transitoire calcique). Le flux de libération de calcium par le RS peut même être calculé à partir de ce transitoire. Depuis peu, grâce à l'avènement de la microscopie confocale, la mesure d'événements ponctuels de libération de calcium (*sparks* et *embers*) est également possible.

## I.1 Mouvements de charges intramembranaires

### I.1.1 Mouvements de charges et couplage excitation-contraction

#### I.1.1.1 Définition des mouvements de charges

L'existence, dans la membrane plasmique, de molécules dipolaires ou chargées (par exemple, résidus d'acides aminés chargés au sein d'une protéine, ou ions liposolubles) qui changent de position ou se déplacent lors d'une variation de champ électrique, a été postulée par Hodgkin et Huxley en 1952. Ces auteurs suggérèrent que ces molécules constituaient le mécanisme de base de la détection et de la réponse aux changements de potentiel membranaire. Par la suite, des courants attribués à des mouvements de charges à l'intérieur de la membrane,  $I_Q$ , furent enregistrés de façon consécutive dans le muscle squelettique (Schneider & Chandler., 1973), et dans l'axone (Armstrong & Bezanilla, 1973). Ces mouvements de charges sont associés à tous les processus voltage-dépendants qui ont lieu dans les membranes. Ils sont ainsi impliqués dans les mouvements de porte voltage-dépendants des VOC (*gating currents* ou courants de porte). Ils sont également associés au couplage EC. Les mouvements de charges intramembranaires de la cellule musculaire squelettique ont été étudiés de façon intensive chez l'amphibien, et dans une moindre mesure chez le mammifère. Ainsi, nous ne pouvons exclure les études menées chez l'amphibien dans ce chapitre, mais nous nous attacherons à présenter le plus possible des données obtenues chez le mammifère.

Trois critères permettent de caractériser un mouvement de charge intramembranaire :

- 1) Le courant doit présenter une saturation aux deux extrémités de la gamme de potentiels, qui correspond à l'adoption de deux positions conformationnelles extrêmes par les molécules porteuses de charges. Ainsi, la distribution de la quantité de charges déplacée en fonction du potentiel suit une relation sigmoïdale, décrite par une fonction de Boltzman.
- 2) La quantité totale de charges déplacées ne doit dépendre que du potentiel initial et du potentiel final. Cette seconde loi implique l'égalité entre la quantité de charges déplacée lors de la dépolarisation ( $Q_{on}$ ), et la quantité de charges déplacée lors de la repolarisation ( $Q_{off}$ ).
- 3) Le courant de charges doit avoir la même polarité que le pulse qui l'a généré. Ces courants de charges ne présentent donc pas de potentiel d'inversion.

#### *1.1.1.2 Implication dans le couplage excitation-contraction*

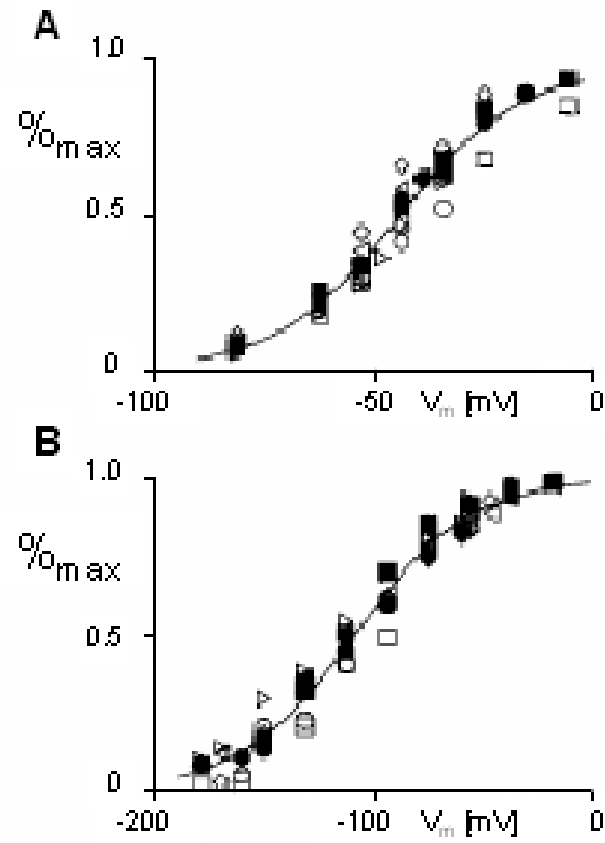
L'idée d'une implication des mouvements de charges dans le couplage EC, suggérée initialement lors de leur caractérisation dans le muscle squelettique (Schneider & Chandler, 1973), s'est progressivement imposée au vu des nombreuses correspondances observées entre ce signal et la contraction musculaire, ou la libération de calcium par le RS. Les études relatées ici ont toutes été effectuées chez la grenouille. En 1976, Chandler et coll. observaient que les mouvements de charges disparaissaient ou réapparaissaient en parallèle avec la capacité de la fibre musculaire à produire une force. Par la suite, Kovacs et coll. (1979), en mesurant de façon simultanée les mouvements de charges et les transitoires calciques, démontrèrent que la majeure partie des charges se déplace au tout début du pulse dépolarisant, avant que la libération de calcium n'atteigne son niveau maximum. Enfin, deux études établirent la relation proportionnelle entre le flux maximal de libération de calcium et la quantité de charges déplacées (Melzer et coll., 1986 ; Rakowski et coll., 1985). Les mouvements de charges semblaient donc constituer un élément initiateur de la libération de calcium.

Cette hypothèse a par la suite été confirmée par de nombreux résultats expérimentaux, notamment les similitudes de la pharmacologie des mouvements de charges et du couplage EC, ou leur absence conjointe dans les fibres musculaires de la souris dysgénique (Adams et coll., 1990 ; Tanabe et coll., 1988).

### **I.1.2 Propriétés des mouvements de charges**

#### *1.1.2.1 Caractéristiques générales*

Chez le mammifère adulte, les mouvements de charges intramembranaires ont pu être mesurés dans des fibres musculaires squelettiques en utilisant les techniques du voltage clamp



**Figure 18 : Voltage-dépendance des mouvements de charges intramembranaires de type 1 ou 2.**  
D'après Szucs et coll., 1991.

Les mouvements de charges intramembranaires, enregistrés dans la fibre musculaire squelettique de grenouille normalement polarisée (A) ou dépolarisée (B) sont normalisés par  $Q_{max}$ . Les différents symboles indiquent différentes fibres.

à trois électrodes (voir par exemple Simon & Beam, 1985), du vaseline gap (voir par exemple Lamb & Walsh, 1987 ; Szentesi et coll., 1997), du patch clamp (Wang et coll., 1999) et du silicone clamp (Collet et coll., 2003). Selon la préparation, les conditions ioniques expérimentales et les techniques utilisées, les paramètres caractéristiques de la distribution des mouvements de charges peuvent varier considérablement. Ainsi, des valeurs de  $Q_{max}$  (quantité maximale de charges déplacées) variant de 15 à 40 nC/ $\mu$ F, et de  $V_{1/2}$  variant de -15 à -40 mV, ont été enregistrées (Collet et coll., 2003 ; Dulhunty et Gage, 1983, Dulhunty et coll., 1987 ; Hollingworth et coll., 1990b ; Hollingworth & Marshall, 1981 ; Lamb, 1986 ; Simon et Beam, 1985 ; Szentesi et coll., 1997).

De nombreuses molécules sont capables de répondre au changement de potentiel, produisant des courants de charges. Il est donc difficile d'isoler les mouvements de charges impliqués dans le couplage EC. De plus, les mouvements de portes des canaux ioniques du sarcolemme produisent des courants de charges. Cependant, leur contribution à la quantité totale de charges déplacées a été évaluée comme négligeable (pour revue, voir Schneider, 1981).

### 1.1.2.2 Charges 1 et 2

Deux types de mouvements de charges peuvent être mesurés, dépendant du potentiel de maintien de la membrane :

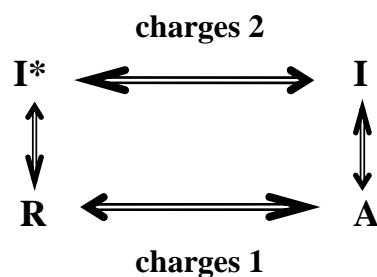
- 1) Si la membrane est maintenue à un potentiel inférieur ou égal au potentiel de repos, la masse des charges se déplace en réponse à une dépolarisation. Ce type de charges, nommées **charges 1** par Adrian & Almers (1976a), est caractéristique d'un état de repos ou de disponibilité de la cellule (la cellule est capable de répondre à une dépolarisation électrique).
- 2) Si la fibre est maintenue dépolarisée pendant plusieurs secondes, les charges 1 disparaissent de façon exponentielle. La fibre entre dans un état inactivé, dans lequel il est impossible de déclencher une contraction par une stimulation électrique. Dans ces conditions, les charges sont activées par application de potentiels plus négatifs (-100 mV par exemple), et sont nommées **charges 2** (Adrian & Almers, 1976b). La quantité de charges 2 mesurées dans une fibre dépolarisée est à peu près égale à celle des charges 1 dans une fibre maintenue au potentiel de repos.

Une repolarisation de la membrane après une dépolarisation prolongée permet une récupération des charges 1. En parallèle, il y a diminution des charges 2 (Brum & Rios, 1987). Les charges 1 et 2 ont été étudiées par de nombreux auteurs, à la fois chez la grenouille et chez le mammifère (pour revue, voir Rios et coll., 1992). Le modèle à deux états de Boltzman décrit aussi bien la distribution en fonction du potentiel des charges 1 que celle des charges 2. Les paramètres mesurés présentent cependant des différences : si  $Q_{max}$  et  $k$  (facteur de pente) sont similaires, le potentiel de demi-activation des charges 2 est déplacé de 70 mV vers des potentiels plus négatifs, par rapport aux charges 1 (Figure 18). Dans la fibre musculaire squelettique de l'amphibien, l'existence de deux composantes des charges 1,  $Q_{\beta}$  et  $Q_{\gamma}$ , a été mise en évidence. Ces deux composantes se distinguent par leurs différences de cinétiques,

leur voltage-dépendance, et leurs sensibilités respectives vis-à-vis d'agents pharmacologiques tels que la tétracaine. Les propriétés et origines de ces deux composantes ont été largement étudiées (pour revue, voir Rios & Pizarro, 1991 ; Melzer et coll., 1995 ; Schneider, 1994). Cependant, leur existence n'est pas prouvée chez le mammifère.

### I.1.2.3 Modèle de fonctionnement du détecteur de potentiel

Le premier modèle de fonctionnement du détecteur de potentiel, expliquant le phénomène d'inactivation des charges, proposait l'existence de 3 états : un état de repos (R), un état activé (A), et un état inactivé (I). Ce schéma simple fut modifié pour intégrer la notion de changements réciproques entre charges 1 et charges 2 (réduction de la quantité de charges 2 lors de la restauration de charges 1 par repolarisation) dérivée de nombreux travaux (pour revue, Rios et coll., 1992). Brum et Rios (1987) ont ainsi proposé un modèle à 4 états :



Les similarités entre les valeurs de  $Q_{max}$  et de  $k$  impliquent que seules les transitions représentées horizontalement sont voltages-dépendantes, générant des mouvements de charges, tandis que les transitions verticales, indiquant les processus d'inactivation (A-I) et de recouvrement après inactivation (I\*-R), sont voltages-indépendantes. Ainsi, les charges 1 proviennent des mouvements du détecteur de potentiel entre l'état de repos R et l'état activé A, tandis que les charges 2 proviennent de transitions entre 2 états inactivés : I et I\*. Pendant l'inactivation et la restauration, un échange réciproque entre charges 1 et charges 2 a lieu. Résumons brièvement le fonctionnement du modèle. Au potentiel de repos, R est l'état prédominant. Une dépolarisation provoque une transition vers A avec des cinétiques rapides (de l'ordre de la ms), et finalement de A à I avec des cinétiques plus lentes (de l'ordre de la s). Ainsi, un seul potentiel d'action déplace le système de R à A, puis de A vers R, la durée de la dépolarisation n'étant pas assez longue pour permettre le passage à l'état I. En revanche, de plus longues stimulations provoquent cette transition vers I. Après une inactivation complète, une repolarisation rapide fera passer le détecteur dans l'état I\*, cette transition étant favorisée d'un point cinétique par rapport à la transition I-A. De I\*, le détecteur retournera lentement dans l'état R.

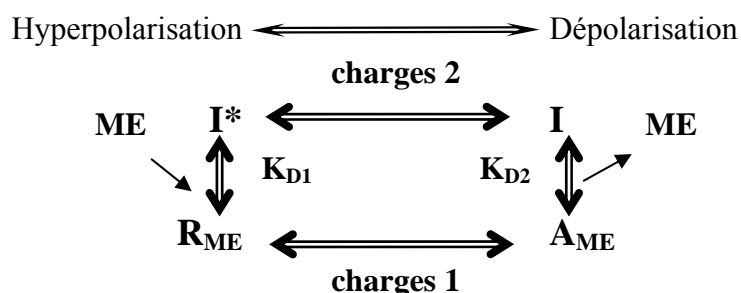
### I.1.2.4 Calcium extracellulaire et site promoteur

#### I.1.2.4.1 Effet du calcium extracellulaire

Bien que l'activité mécanique du muscle squelettique ne requière pas la présence de calcium dans la solution d'enregistrement (Armstrong et coll., 1972), et que le transitoire calcique puisse être évoqué en absence d'influx calcique (Brum et coll., 1987), de nombreuses études ont établi une modulation du couplage EC par le calcium externe (pour revue, voir Melzer et coll., 1995). Les travaux du groupe de Rios, effectués sur fibres musculaire squelettique de grenouille, ont largement contribué à l'explication de ce phénomène. En 1988, ce groupe observait un déplacement, vers des potentiels plus négatifs, de la voltage dépendance de l'inactivation du transitoire calcique, lors du remplacement du  $\text{Ca}^{2+}$  par le  $\text{Mg}^{2+}$  dans la solution externe (Brum et coll., 1988b). Ces résultats faisaient écho à des études antérieures, qui rapportaient des phénomènes similaires sur le développement de force. Successivement, le même groupe (Brum et coll., 1988a) démontrait qu'en absence de calcium ou autres ions métalliques dans la solution externe, les charges ne se déplaçaient qu'entre les états d'inactivation, quel que soit le potentiel de maintien de la membrane (-80 ou 0 mV). Pour expliquer ce phénomène, les auteurs postulèrent que la liaison du détecteur de potentiel au calcium (ou autres ions alcalins) est requise pour la restauration des charges 1. Les affinités pour le détecteur de potentiel de différentes espèces d'ions alcalins ou alcalino-terreux furent par la suite déterminées, par mesure des mouvements de charges et transitoires calciques, en présence de ces différents ions dans la solution externe (Pizarro et coll., 1989). La séquence d'affinité ainsi obtenue est la suivante :  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Li}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{K}^{+} > \text{Rb}^{+} > \text{Cs}^{+}$ .

#### I.1.2.4.2 Le site promoteur

En accord avec les travaux du groupe de Rios qui établissent la nécessité de la liaison du détecteur de potentiel à un ion métallique pour son fonctionnement, Schnier et coll (1993) proposèrent le modèle suivant :



Selon ce modèle, l'ion métallique se lie avec haute affinité ( $K_{D1}$ ) à un site externe, le site promoteur, permettant la transition du détecteur de potentiel d'un état inactivé ( $I^*$ ) à un état de repos ( $R_{ME}$ ). Après dépolarisation et activation de ce détecteur, l'affinité diminue ( $K_{D2}$ ). L'ion métallique se dissocie ; le détecteur passe d'un état activé ( $A_{ME}$ ) à un état inactivé ( $I$ ). Ce modèle simple ne considère que les états d'équilibre du système. Rios et Pizarro (1991) en ont proposé un plus complexe, intégrant des considérations cinétiques, que nous ne détaillerons pas ici.

### I.1.2.4.3 Rôle des antagonistes calciques

De nombreux travaux ont mis en évidence la fixation préférentielle des antagonistes calciques sur les formes inactivées du détecteur de potentiel, et ses répercussions sur le couplage EC (pour revue, voir Melzer et coll., 1995 ; Rios & Pizarro, 1991). Citons comme exemple l'étude de Feldmeyer et coll. (1990), qui démontre que le D600 (gallopamil), une phenylalkylamine, provoque une inhibition des mouvements de charges, en modifiant la voltage-dépendance du détecteur de potentiel. Cette voltage-dépendance, initialement caractéristique des charges 1, évolue vers une dépendance type charges 2 après application de D600 : le D600 induit donc une inhibition similaire à celle provoquée par une dépolarisation prolongée. Rios et Pizarro (1991) proposent une explication simple à l'effet des antagonistes calciques : tout comme le calcium stabilise le système dans les états de repos et activé, les antagonistes calciques, se fixant de façon préférentielle sur les états inactivés, stabilisent le système dans un état inactivé. Il en résulte une inhibition apparente des mouvements de charges. L'effet des antagonistes calciques est inhibé par toute action visant à empêcher le système d'évoluer vers ses états inactivés. Ainsi, Feldmeyer et coll (1990) observent, en présence de D600, une récupération des mouvements de charges 1 et du transitoire calcique lors d'une hyperpolarisation.

## I.1.3 Le DHPR comme détecteur de potentiel du couplage excitation-contraction :

### I.1.3.1 Identification moléculaire du détecteur de potentiel

L'idée d'un rôle du DHPR comme détecteur de potentiel émergea en premier lieu des nombreux travaux démontrant certaines similitudes pharmacologiques entre ce canal et le couplage EC (pour revue, voir Schneider, 1994). Par exemple, dans des fibres partiellement dépolarisées, la nifédipine, une DHP, inhibe la libération de calcium et les mouvements de charges (Rios & Brum, 1987). Un argument majeur a par la suite apporté par le modèle de la souris dysgénique. La mutation dysgénique (*muscular dysgenesis*) provoque l'absence de la sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR, corrélée à une diminution des mouvements de charges, et une absence du couplage EC (Beam et coll., 1986). L'expression de la sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR de lapin dans des cellules musculaires dysgénique restaure les mouvements de charges (Adams et coll., 1990), et le couplage EC (Tanabe et coll., 1988).

Utilisant un protocole de dépolarisation pour inactiver les charges sous-limaires (charges qui ne déclenchent pas de contraction visible), Simon et Hill (1992) ont mis en évidence une relation de proportionnalité entre l'activation de la libération de calcium, et les mouvements de charges. La libération de calcium est proportionnelle à la quantité de charges déplacées élevée à la puissance 4, ce qui concorde avec son contrôle par les 4 segments S4 d'une même sous-unité  $\alpha_1$  d'un DHPR, ou par les 4 DHPR d'une même tétrade.



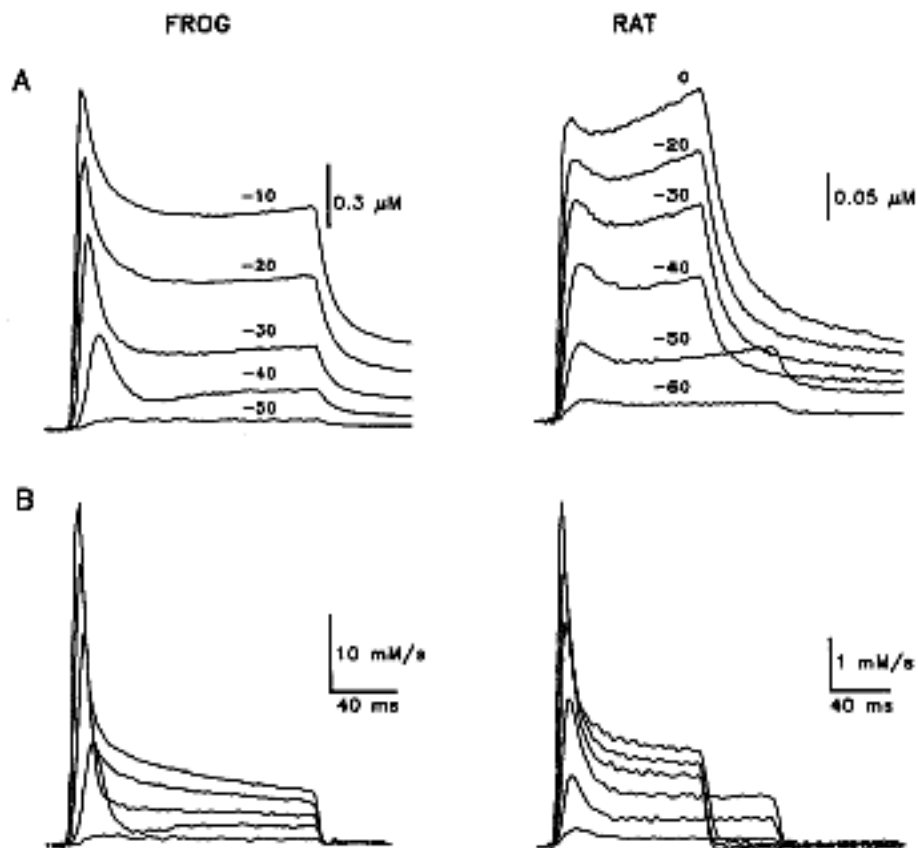
### *I.1.3.2 Détecteur de potentiel et canal de type L : une même structure pour deux fonctions ?*

Depuis l'identification du DHPR comme détecteur de potentiel se pose la question de l'unité des structures soutenant le courant calcique de type L et les mouvements de charges associés au couplage EC. En d'autres termes, existe-t-il deux types de DHPR, l'un fonctionnant comme un canal calcique, l'autre comme un détecteur de potentiel ?

De nombreuses similitudes ont été notées entre les comportements des deux structures susnommées. Entre autre, la séquence d'affinité des ions alcalins pour le site promoteur du détecteur de potentiel (Pizarro et coll., 1989) est similaire à celle des perméabilités relatives du canal calcique de type L du cœur, déterminées par le site de liaison intrapore (Hess et coll., 1986) ; ceci laisse supposer des analogies structurales. L'argument le plus solide en faveur de l'identité des protéines portant chacune des deux fonctions provient cependant d'études menées sur la souris dysgénique. Le couplage EC et le courant calcique type L sont simultanément restaurés par expression de la sous-unité  $\alpha_1$  dans des myotubes de souris dysgéniques (Tanabe et coll., 1988). De même, si les cellules musculaires dysgéniques présentent une réduction des mouvements de charges (Adams et coll., 1990), l'expression de la sous-unité  $\alpha_1$  restaure en moyenne  $4/5$  de la quantité de charges initiales. La restauration du courant type L, des mouvements de charges et du couplage EC implique que le même gène code à la fois pour le canal calcique et le détecteur de potentiel. Cependant, les deux protéines impliquées pourraient différer par épissage alternatif ou modifications post-traductionnelles.

En contrechamp de ces similitudes, certaines divergences ont pu être observées entre les propriétés du courant calcique et du couplage EC. Ainsi le seuil d'activation de la libération de calcium est de 15-20 mV plus négatif que celui du courant (Collet et coll, 2004 ; Garcia et coll., 1989). De même, certains agents pharmacologiques provoquent des effets différents sur les deux fonctions. Par exemple, chez le rat, l'ion perchlorate déplace les courbes d'activation des charges et des transitoires calciques vers des potentiels plus négatifs, mais n'affecte pas celle du courant calcique de type L (Gyorke & Palade, 1992). Cet effet divergent du perchlorate a fait l'objet de nombreuses études, chez le mammifère ou l'amphibien (pour revue, voir Melzer et coll., 1995).

La question de l'existence d'une ou deux protéines demeure donc. Schwartz et coll (1985) ont étudié le rapport entre la densité du DHPR et celle du courant calcique dans le muscle de grenouille. Leurs estimations faisaient état de 25 à 50 fois plus de DHPR que de canaux calciques activés par le potentiel. La plupart des DHPR serait donc incapable de fonctionner comme des canaux calciques, et pourrait porter une fonction différente. Cependant, ces estimations s'appuyaient sur le postulat que l'ensemble des canaux calciques s'ouvre de façon simultanée au pic du courant macroscopique. Or, il est établi que le canal calcique présente une faible  $P_o$ , qui n'atteint jamais 1, même aux dépolarisations les plus larges. Ainsi, les DHPR pourraient être des canaux calciques non fonctionnels la plupart du temps. De Jongh et coll. (1989) ont apporté le premier argument moléculaire en faveur de l'existence de deux types de DHPR, en isolant dans le muscle squelettiques de lapin deux formes de la protéine : une chaîne longue, qui a la taille prédite par la séquence originelle (1873 résidus), et une



**Figure 19 : Voltage-dépendance des transitoires calciques et du flux de libération de calcium enregistrés chez le mammifère et l'amphibien.**

D'après Shirokova et coll., 1996.

Les transitoires ont été mesurés avec l'indicateur Antipyrylazo III. (A) Transitoires calciques évoqués aux différents potentiels indiqués. (B) Flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  calculé à partir des enregistrements en (A). Le pic précoce correspond à la composante inactivable. Il est suivi d'une composante soutenue.

tronquée (1673 résidus). La forme tronquée, qui est la plus abondante, a alors été proposée comme détecteur de potentiel, tandis que la forme intégrale serait le canal fonctionnel (Catterall WA, 1991). Toutefois, cette hypothèse a été invalidée par les travaux de Beam et coll. (1992), démontrant que l'expression d'une forme courte en myotubes dysgénique restaure à la fois le courant de type L et le couplage EC.

## **I.2 Transitoires calciques et flux de libération de calcium**

Depuis les années 1970, les mesures optiques des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ont procuré d'importantes informations sur le fonctionnement des mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Ainsi, dans la fibre musculaire squelettique, l'enregistrement de transitoires calciques induits par une stimulation électrique a fourni une approche très puissante pour étudier le couplage EC. À l'instar des mouvements de charges, ces transitoires, et les flux de libération de calcium sous-jacents, ont été principalement étudiés chez l'amphibien. Nous développerons donc, dans ce paragraphe, les caractéristiques et modèles établis dans cette classe de vertébrés, puis nous les comparerons aux données récemment obtenues chez le mammifère.

### **I.2.1 Transitoire calcique voltage-dépendant**

Lorsque le calcium est libéré du RS, la concentration de  $Ca^{2+}$  libre augmente dans le cytoplasme, déclenchant les mécanismes d'extrusion de cet ion par des processus de pompes et de tampons. Le déroulement du transitoire calcique résulte de la contribution relative, au cours du temps, des mécanismes d'entrée et de disparition du calcium du cytoplasme. Ses propriétés sont qualitativement similaires chez l'amphibien et le mammifère (Figure 19). Dans le muscle squelettique, la libération de calcium intracellulaire est étroitement contrôlée par le potentiel de membrane. Ainsi, sous des conditions de potentiel imposé, le début et la fin du pulse dépolarisant sont respectivement associés à une augmentation et à un déclin du signal calcique. Le potentiel-seuil de détection des transitoires calciques dans des fibres musculaires squelettiques de mammifère se situe autour de  $-40$  mV (Garcia & Schneider, 1993 ; Jacquemond, 1997). En réponse à des dépolarisations d'amplitude croissante, la vitesse de montée du transitoire augmente et atteint une amplitude maximale, ce qui reflète l'accroissement (voltage-dépendant) de la libération de calcium par le RS (Garcia & Schneider, 1993 ; Delbono & Stefani, 1993 ; Jacquemond, 1997). La libération de calcium est inactivée par des dépolarisations membranaires prolongées, le potentiel de demi-inactivation étant de  $-42$  mV chez la souris, en présence d'indo-1 (Collet et coll., 2004). Le déclin du transitoire lors de la repolarisation peut être décrit par une fonction exponentielle plus une constante. Lorsque son amplitude croît, en réponse à une dépolarisation plus longue ou plus forte, la constante de vitesse de déclin diminue, tandis que le niveau calcique résiduel augmente (Garcia & Schneider, 1993 ; Delbono & Stefani, 1993 ; Jacquemond, 1997).

## I.2.2 Le flux de libération de calcium

Le transitoire calcique  $[Ca^{2+}]_i(t)$ , résulte, comme nous venons de le voir, de la libération de calcium dans le cytoplasme et des processus d'extrusion, et peut être décrit par l'équation 1 :  $d[Ca^{2+}]_i(t) / dt = \text{flux d'entrée} - \text{flux d'extrusion}$ . Le flux d'entrée peut inclure à la fois la libération par le RS, et l'entrée par d'autres sources, telles que le milieu extracellulaire *via* des canaux voltages-dépendants. Cependant, Brum et coll (1988b) ont démontré que, dans la plupart des situations, le flux d'entrée depuis le compartiment extracellulaire est négligeable par rapport au flux de libération du RS. Ainsi, le flux d'entrée de calcium dans le cytoplasme correspond essentiellement au flux de libération de calcium par le RS. Le flux de libération ( $R_{rel}$ , en  $\mu M.ms^{-1}$ ) peut être estimé à partir de  $[Ca^{2+}]_i(t)$  sur la base de l'équation 1, suivant différentes méthodes (Baylor et coll., 1983 ; Melzer et coll., 1984).

Le flux de libération de calcium apparaît, chez l'amphibien, constitué de deux composantes (Figure 19 : une composante soutenue, non inactivable, voltage-dépendante et un pic transitoire précoce, qui refléterait l'activation et l'inactivation calcium-dépendante d'une population de RyR (Baylor et coll., 1983 ; Melzer et coll., 1984 ; Schneider & Simon, 1988). Chez le mammifère, le flux présente globalement les mêmes propriétés (Garcia & Schneider, 1993 ; Delbono, 1995) mais il n'est pas certain que les mécanismes impliqués soient identiques (Shirokova et coll., 1996 ; Szentesi et coll., 1997).

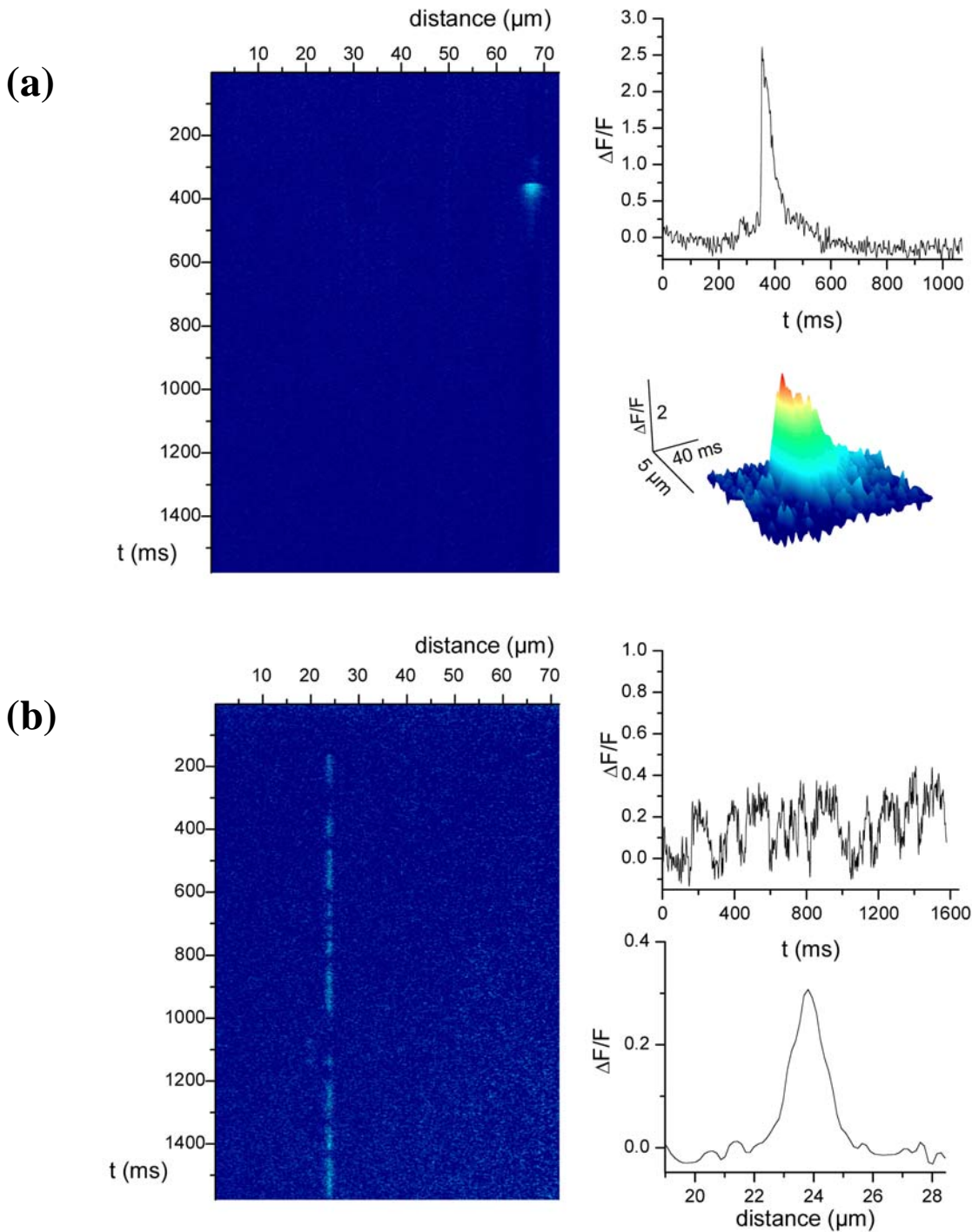
### Inactivation calcium dépendante :

La composante « pic » (ou composante inactivable) du flux de libération de calcium peut être supprimée par l'application antérieure d'une brève dépolarisation tandis que la composante soutenue n'est pas affectée (Schneider & Simon, 1988 ; Pizarro et coll., 1997). L'inhibition semble être corrélée à l'élévation de calcium produite par la pré-dépolarisation, suggérant un processus d'inhibition calcium-dépendant (Schneider & Simon, 1988). Cette inactivation sélective du pic par un pulse préconditionnant est également observée chez le mammifère (Garcia & Schneider, 1995 ; Sarkozi et coll., 2000)

### Inactivation déterministique des RyR

Une étude fine des mécanismes d'inactivation calcium-dépendant a permis l'émergence, chez l'amphibien, du modèle de **libération quantique de calcium** (Pizarro et coll., 1997 ; pour revue, voir Stern et coll., 1997). Selon ce modèle, le transitoire calcique n'est pas produit par un groupe homogène de canaux de libération de calcium : les fortes dépolarisations activeraient et inactiveraient des RyR inaccessibles aux dépolarisations plus faibles. Autrement dit, les groupes de RyR sont dévolus chacun à un potentiel précis, auquel ils s'activent.

Cette hypothèse a été reprise chez le mammifère par Szentesi et coll. (2000), qui proposèrent un **modèle d'inactivation déterministique des canaux**. Selon ce modèle, une dépolarisation à un certain potentiel recrute toujours le même groupe de RyR, qui subit successivement un processus d'inactivation. Ainsi, dans les expériences de doubles pulses, l'inhibition observée dans le pic du deuxième pulse sera quantitativement égale à la composante inactivable du pulse précédent.



**Figure 20 :  $\text{Ca}^{2+}$  sparks et embers dans la fibre musculaire squelettique de souris.**

(a) Exemple de « spark » calcique spontané détecté en microscopie confocale à balayage laser en mode ligne dans une fibre musculaire squelettique perméabilisée. A gauche est présentée une image de fluorescence du fluo-3 en fonction de la distance et du temps  $F(x,t)$ . A droite, sont présentées les caractéristiques temporelles et spatiales du « spark » détecté. La variation de fluorescence  $\Delta F$  a été normalisée par rapport au niveau de base  $F$ . (b) Exemple d'activité locale spontanée, soutenue répétitive et de faible amplitude, détectée en microscopie confocale à balayage laser en mode ligne, dans une fibre musculaire intacte chargée en fluo-3. A gauche est présentée une image de fluorescence du fluo-3 en fonction de la distance et du temps  $F(x,t)$ . A droite, sont présentées les caractéristiques temporelles et spatiales de la variation de fluorescence. La variation de fluorescence est exprimée par rapport au niveau de base ( $\Delta F/F$ ).

### I.3 Les événements calciques élémentaires (ECE)

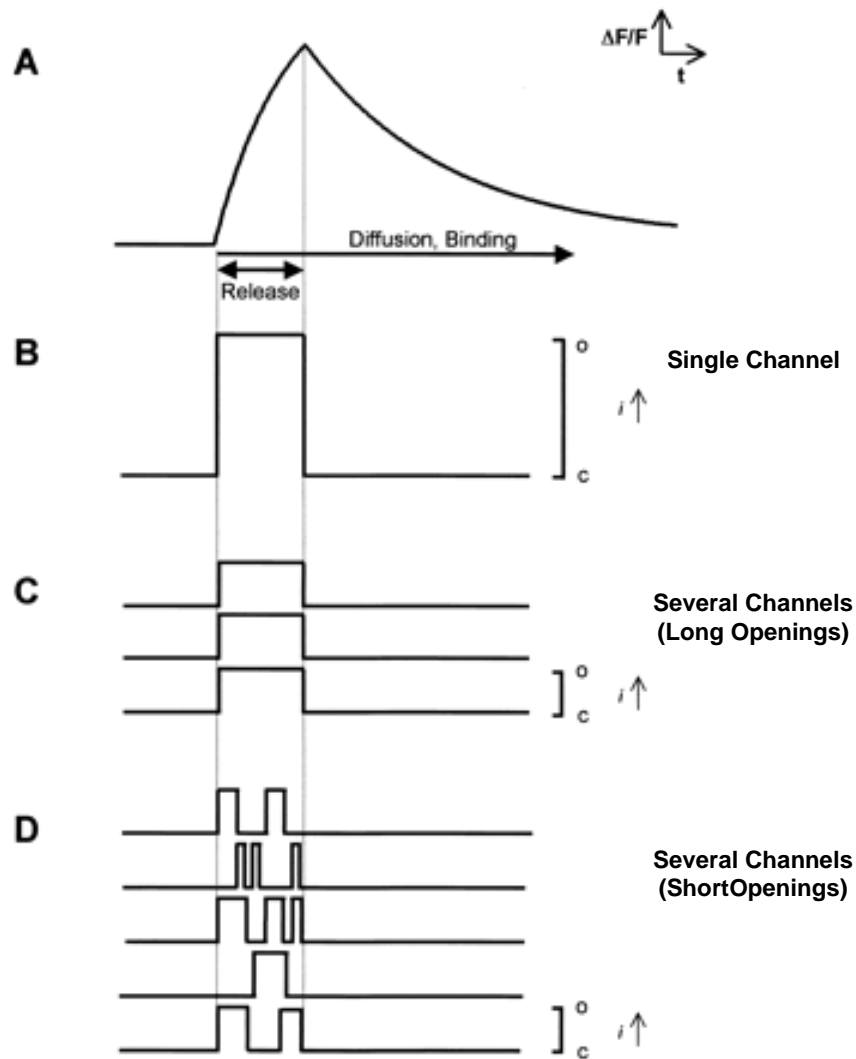
Une avancée récente dans l'étude du couplage EC fut apportée par l'utilisation du microscope confocal à balayage laser, capable de mesurer des variations de fluorescence dans un volume restreint :  $0.4 \times 0.4 \times 0.8 \mu\text{m}^3$  (nommé volume confocal). Cette méthodologie a permis d'identifier des événements élémentaires de libération de calcium (que j'appellerai ici ECE pour événements calciques élémentaires), localisés à un niveau précis du sarcomère. Les ECE existent sous deux formes : les *sparks* et les *embers* (Figure 20). Les *sparks* présentent une phase de montée d'environ 5 ms, un pic dont l'amplitude surpasse l'unité de fluorescence, une largeur de  $2 \mu\text{m}$  et s'étendent en moyenne sur 10 ms. Par contraste, les *embers* ne présentent pas de pic. Leur phase de montée dure en moyenne 20 ms ; ils ont une amplitude moyenne de 0.1-0.4 unités, une largeur de  $1 \mu\text{m}$ , et s'étendent sur 10 à 100 ms (Csernoch et coll., 2004 ; Zhou et coll., 2003). Le *spark* est généré par 35 à 260 canaux, dont certains restent parfois ouverts dans la phase de déclin, produisant le motif en *ember* (Kirsch et coll., 2001 ; Zhou et coll., 2003). En revanche, les *embers* seraient produits par un seul RyR (Csernoch et coll., 2004 ; Szentesi et coll., 2004). Les ECE furent initialement détectés sous forme de *sparks* dans le muscle cardiaque (Cheng et coll., 1993), puis en 1995, dans le muscle squelettique d'amphibien (Klein et coll., 1996 ; Tsugorka et coll., 1995). L'étude des *sparks* a été principalement menée chez l'amphibien, la détection d'ECE ayant été plus tardive chez le mammifère.

#### I.3.1 Caractérisation des *sparks* dans le muscle squelettique d'amphibien

##### I.3.1.1 *Sparks et transitoire calcique*

Les *sparks* peuvent soit survenir de façon spontanée (Klein et coll., 1996), soit être activés par une dépolarisation, impliquant le détecteur de potentiel (Klein et coll., 1996 ; Lacampagne et coll., 1996 ; Tsugorka et coll., 1995). Lors d'une dépolarisation, les caractéristiques spatiales et temporelles des *sparks* (amplitude moyenne, temps de montée du signal) sont constantes, indiquant une indépendance de la conductance unitaire et du temps d'ouverture du canal vis-à-vis du potentiel (Klein et coll., 1996). En revanche, leur fréquence et leur délai d'apparition au cours du pulse sont altérés (Klein et coll., 1996 ; Klein et coll., 1997 ; Lacampagne et coll., 1996). Ainsi, en réponse à des dépolarisations croissantes, la fréquence totale d'événements augmente, et ces événements se regroupent en début de pulse (Klein et coll., 1997).

L'évolution de la fréquence des *sparks* au cours d'un pulse dépolarisant peut être représentée par un histogramme de latence (fréquence d'événements en fonction temps au cours de la dépolarisation). Klein et coll. (1997) ont pu reconstituer à partir de cet histogramme de latence un signal macroscopique, très proche du signal classique du flux de libération de calcium. Les auteurs en déduisent que le transitoire macroscopique, généré lors d'une dépolarisation, résulte d'une combinaison d'un grand nombre d'événements distincts. Lors d'une forte dépolarisation, le signal reconstitué présente un pic précoce et un déclin marqué ; pour des dépolarisations plus faibles, le pic est de plus faible amplitude (Klein et coll., 1997), comme



**Figure 21 : Différentes hypothèses concernant l'origine des sparks.**

D'après Schneider, 1999.

Fonction théorique représentant la variation relative de fluorescence ( $\Delta F/F$ ) correspondant à un spark. (B, C, D) Trois motifs d'activité impliquant un ou plusieurs RyR, susceptibles de sous-tendre le spark. Chaque enregistrement individuel représente l'évolution du courant  $i$  à travers un RyR (l'état ouvert est repéré par o). L'augmentation transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable du spark peut être déclenchée par l'ouverture d'un seul RyR (B), d'un groupe de RyR qui s'ouvrent et se ferment de façon synchrone, respectivement au début et au pic du spark, ou de multiples canaux qui s'ouvrent et se referment de façon asynchrone et répétée pendant la phase de montée du spark (D)

observé dans des enregistrements macroscopiques du flux calcique. En résumé, la voltage-dépendance du flux de libération de calcium semble provenir de l'occurrence temporelle d'événements élémentaires (*sparks*) dont les propriétés individuelles ne dépendent pas de la dépolarisation (Klein et coll., 1997).

### 1.3.1.2 Propriétés des *sparks*

Grâce à une technique d'imagerie confocale à haute résolution temporelle, Lacampagne et coll. (1999) ont pu étudier les cinétiques des phases de montée (augmentation de fluorescence) et de déclin (diminution de fluorescence) du *spark* dans la fibre musculaire squelettique d'amphibien. Ils ont observé que la vitesse de libération de calcium atteint un niveau maximal de façon très précoce lors de l'initiation du *spark*, et diminue fortement et brutalement au niveau du pic, initiant la phase de déclin (constante de temps de déclin d'environ 8.6 ms). Le flux de libération de calcium atteint un niveau maximal dès le début du *spark*, reste constant à cette valeur maximale tout le long de la phase de montée, puis redevient rapidement nul au niveau du pic. La durée de la phase de montée du *spark* (4.6 ms en moyenne) représenterait donc la limite inférieure du temps d'ouverture des canaux impliqués dans sa genèse, certains canaux, en nombre minoritaire, étant susceptibles de s'ouvrir ou rester ouverts lors du déclin.

En accord avec ces données cinétiques, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la formation du *spark* (Figure 21 ; Schneider, 1999):

- 1) un seul canal qui reste ouvert pendant toute la phase de montée ;
- 2) un groupe de canaux qui s'ouvrent et se ferment de façon synchrone, respectivement au début et au pic du *spark* ;
- 3) de multiples canaux qui s'ouvrent et se referment de façon asynchrone et répétée pendant la phase de montée du *spark*, et dont la majorité se ferme en un temps très court au niveau du pic.

## 1.3.2 Caractérisation des ECE dans le muscle squelettique de mammifère

En 1998, Shirokova et coll. mettaient en évidence une absence de *sparks* dans le muscle squelettique de mammifère adulte, soumis à des protocoles expérimentaux permettant leur genèse chez l'amphibien. Par la suite, des événements spontanés présentant des propriétés assez proches des *sparks* furent enregistrés dans le muscle d'embryon de souris (Chun et coll., 2003 ; Conklin et coll., 1999 ; Shirokova et coll., 1999), et dans les fibres de mammifère adulte pelées (Kirsch et coll., 2001) ou perméabilisées à la saponine (Reiken et coll., 2003 ; Ward et coll., 2003 ; Zhou et coll., 2003). Les pics de fréquence de ces ECE coïncident, au niveau du sarcomère, avec la localisation présumée du tubule T, suggérant, comme chez l'amphibien, une origine à la jonction triadique (Kirsch et coll., 2001). La majorité des ECE enregistrés dans les fibres de rat saponifiées sont des *sparks*, dont les propriétés diffèrent de ceux de l'amphibien : ils sont plus larges (étendue spatiale moyenne de 2  $\mu\text{m}$  chez le rat



contre 1.5  $\mu\text{m}$  chez la grenouille), de plus faible amplitude, et leur phase de montée est plus lente (Ward et coll., 2003 ; Zhou et coll., 2003). La source du *spark* semble également plus étendue chez le rat, et orientée selon un plan transversal à la fibre (Zhou et coll., 2003). En plus de ces *sparks*, des *embers* peuvent être observés dans la fibre saponifiée de rat, isolés ou intégrés à la phase de montée ou de déclin du *spark* (Ward et coll., 2003 ; Zhou et coll., 2003).

Une étude menée par Csernoch et coll. (2004), sur fibres intactes de rat, en potentiel imposé par la technique du *Vaseline Gap*, a permis d'identifier comme des *embers* les ECE induits par dépolarisation chez le mammifère. La fréquence de ces *embers* augmente en réponse à des dépolarisations croissantes. Leur sommation par la méthode de Klein et coll. (1997) reconstitue un signal proche du signal macroscopique de libération de calcium classiquement mesuré. Ainsi, à l'instar des *sparks* dans le muscle squelettique d'amphibien, une combinaison d'*embers* semblent constituer le transitoire calcique chez le mammifère. Les auteurs observent également des *sparks* au niveau des extrémités de la fibre, perméabilisées à la saponine comme l'exige la technique.

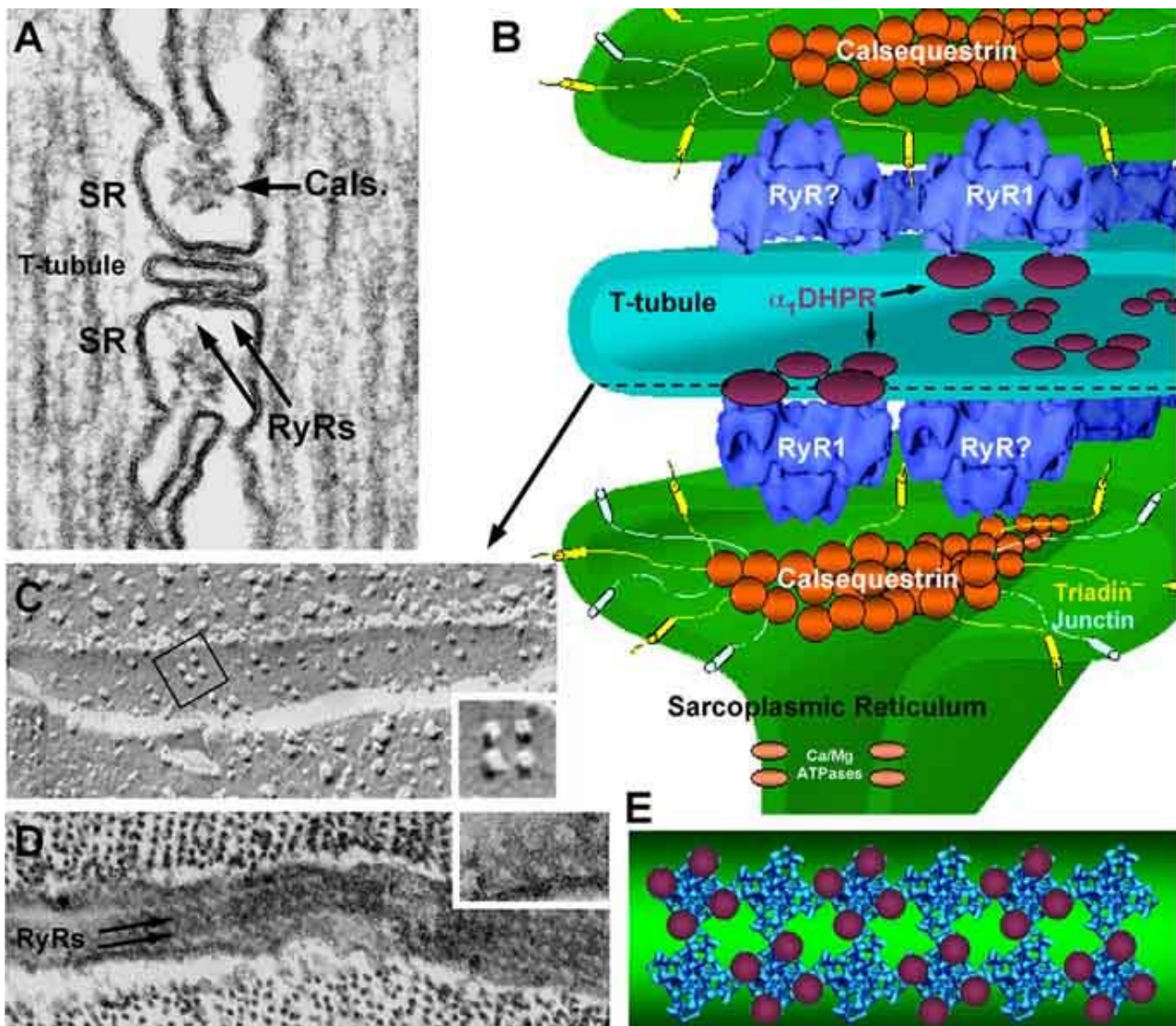
Les *sparks* se produisent de façon spontanée dans les fibres musculaires squelettiques pelées ou perméabilisées, suggérant leur inhibition par une molécule ou une structure du tubule T (Zhou et coll., 2003). Une conclusion similaire provient d'études sur myotubes, mettant en évidence la circonscription de la production de *sparks* aux régions de la cellule qui ne libèrent pas de calcium en réponse à une dépolarisation, donc qui ne possèdent pas encore les interactions matures entre RS et tubules T (Shirokova et coll., 1999).

Des études menées sur myotubes de souris *KO* pour RyR1 (Conklin et coll., 2000) ou RyR3 (Shirokova et coll., 1999 ; Conklin et coll., 2000), et myotubes dyspédiques exprimant RyR1 (Ward et coll., 2001) ou RyR3 (Ward et coll., 2000 ; 2001) ont établi que les deux isoformes du RyR sont capables de générer des *sparks*.

#### I.4 Maturation des signaux au cours du développement

La maturation des mouvements de charges au cours du développement fœtal a été caractérisée de façon précise dans le muscle intercostal de souris par Strube et coll. (1992). Ces auteurs les enregistrent dès le stade E13. La quantité maximale de charges déplacées ( $Q_{max}$ ), mesurée en présence de 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$ , augmente faiblement entre E13 ( $2.84 \pm 0.39$  nC/ $\mu\text{F}$ ) et E16 ( $3.76 \pm 0.17$  nC/ $\mu\text{F}$ ), et fortement entre E16 et E19 ( $10.01 \pm 0.99$  nC/ $\mu\text{F}$ ). À cette augmentation de  $Q_{max}$  s'ajoute un déplacement du potentiel de demi-activation ( $V_{1/2}$ ) vers des valeurs plus négatives entre E13 ( $+19.4 \pm 2.3$  mV) et E16 ( $-2.0 \pm 2.6$  mV) ; ce  $V_{1/2}$  reste stable par la suite.

Parallèlement aux mouvements de charges, les mécanismes d'initiation de la libération de calcium par le RS évoluent au cours du développement. Dans la fibre musculaire intercostale de souris, Strube et coll. (1994) ont démontré qu'au stade E18, l'activation du transitoire calcique est indépendante d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du compartiment extracellulaire : ce



**Figure 22 : Structure des triades dans les fibres musculaires squelettiques.**  
D'après Protasi, 2002.

(a) Triade du muscle de la vessie natatoire du poisson Toadfish en microscopie électronique. Cals : calséquestrine. (b) Reconstruction tridimensionnelle d'une triade montrant l'organisation structurale des RyR, DHPR, calséquestrine, triadine, jonctine et SERCA. (c) Dans le muscle squelettique, les DHPR sont groupés par quatre et forment des tétrades qui sont liée à un RyR sur deux. (d) Dans la membrane du RS, les RyR sont organisés en rangées parallèles. (e) Modèle d'organisation des RyR (en bleu) et des DHPR (en marron).

transitoire peut être évoqué en présence d'une solution extracellulaire dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou d'un bloqueur du courant calcique de type L. En revanche, à E14, deux populations de myotubes peuvent être distingués : l'une capable de générer un transitoire indépendamment de l'influx calcique extracellulaire, l'autre (46 % des myotubes) pour laquelle la genèse du transitoire dépend de cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule.

Par ailleurs, Chun et coll. (2003) observent, dans le diaphragme de souris au stade E18, une dépendance de la fréquence des *sparks* vis-à-vis de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du compartiment extracellulaire. Ils suggèrent que les *sparks* sont initiés par une augmentation locale de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , provoquée par un influx calcique *via* les DHPR. La fréquence des *sparks* et leur volume moyen diminuent entre E18 et J14 (14<sup>ème</sup> jour post natal) dans le diaphragme, et entre J1 et J7 dans l'EDL.

## II Structures impliquées : les unités de libération de calcium

Les unités de libération de calcium (ULC) résultent de l'association des domaines jonctionnels du RS contenant le RyR, et de la membrane du tubule T contenant le DHPR. Elles peuvent constituer des triades, des diades ou du couplage périphérique, la proportion de ces différents motifs variant suivant le muscle et le stade de développement. Dans le muscle squelettique adulte, les ULC forment principalement des triades (Figure 22).

### II.1 Systèmes membranaires et protéines associées

L'espace entre les membranes du RS et du tubule T est ponté par des structures régulièrement espacées, visibles en microscopie électronique : **les pieds**. Les pieds ont été identifiés comme les domaines cytoplasmiques du RyR. En effet, ils sont absents des cellules musculaires squelettiques issues de souris dyspédiques, qui n'expriment pas le RyR (Protasi et coll., 1998 ; Takekura et coll., 1995), et leur expression est restaurée par transfection de l'ADNc codant pour le RyR (Protasi et coll., 1998). La présence de pieds déterminerait la largeur de l'interstice entre le RS et le tubule T (12-17 nm), cette largeur étant réduite chez les souris dyspédiques.

Les pieds font face à des structures situées dans la membrane du tubule T, les **tétrades**, composées de 4 DHPR (Block et coll., 1988 ; Franzini-Armstrong et Nunzi, 1983). La preuve directe de la formation de ces tétrades par le DHPR provient d'études menées sur le modèle de la souris dysgénique (mutant qui n'exprime pas  $\alpha_{1S}$ ). Les tétrades sont absentes des cellules du muscle dysgénique, mais elles sont restaurées par transfection de l'ADNc de  $\alpha_{1S}$  (Flucher et coll., 1991 ; Powell et coll., 1996 ; Takekura et coll., 1994).

L'organisation des RyR et DHPR au niveau des ULC a initialement été décrite par Block et coll. (1988) dans le muscle de la vessie natatoire de poisson. Ces auteurs observent, dans la

membrane du RS jonctionnel, un arrangement des RyR en deux rangées parallèles. Les RyR sont séparés par une distance centre à centre de 26-32 nm. Les tétrades s'alignent également en deux rangées qui chevauchent celles des RyR (Figure 22). Chacun des quatre DHPR de la tétrade est situé en face d'une des quatre sous-unités du RyR, suggérant une interaction spécifique. La distance séparant deux tétrades correspond à 2 fois celle mesurée entre deux RyR : les tétrades n'interagissent donc qu'avec un pied sur deux. Ce motif peut être en partie expliqué par des problèmes d'encombrement stérique, une tétrade étant légèrement plus large qu'un pied. Cette disposition alternée semble être de règle dans le muscle squelettique. Chez certaines espèces telles que le rat, la quantification biochimique indique un rapport de 2 DHPR pour 1 RyR, en accord avec l'arrangement spatial décrit par Block et coll. (1988) (4 DHPR pour 2 RyR). Cependant, dans d'autres espèces, ce rapport peut présenter une valeur différente (pour revue, Franzini-Armstrong et Jorgensen, 1994). Une explication à ce désaccord apparent peut être fournie par l'étude de Dulhunty et coll. (1992), qui fait état de la présence de RyR en position extra-jonctionnelle, détectés par immunomarquage.

Les travaux de Block et coll. font, aujourd'hui encore, autorité, et de nombreux auteurs basent leurs modèles fonctionnels sur ces données ultrastructurales (voir par exemple Stern et coll., 1997). Cependant, si ces arrangements de tétrades et pieds ont depuis été décrits dans plusieurs types de muscles et chez plusieurs espèces, et semblent être majoritairement représentés, d'autres formes d'organisation ont pu être observées (pour revue, voir Franzini-Armstrong et coll., 1999).

## **II.2 Unité fonctionnelle : le couplon**

Au niveau des sites jonctionnels, l'interaction entre le DHPR et le RyR constitue le mécanisme par lequel la dépolarisation du tubule T active la libération de calcium par le RS. Les RyR et DHPR adjacents (et autres protéines jonctionnelles), qui sont susceptibles d'agir de concert lors du couplage EC, constituent une unité fonctionnelle désignée sous le terme de couplon (Rios & Stern, 1997 ; Stern et coll., 1997). Une triade possède donc deux couplons (un de chaque côté du tubule T) qui fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. Ces domaines jonctionnels entre le RS et les tubules T sont séparés par des domaines non jonctionnels, qui contiennent d'autres protéines (Franzini-Armstrong et Jorgensen, 1994). Trois facteurs géométriques définissant les couplons sont fortement variables d'un type de fibre à l'autre : leur forme, leur taille, et la distance qui les sépare. Par exemple, dans un EDL (muscle rapide) de rat, le couplon est constitué en moyenne de 38 pieds, contre 24 pour un soleus (muscle lent).

### **II.3 Implication des protéines dans l'organisation des unités de libération de calcium (ULC)**

L'expression des DHPR et des RyR n'est pas indispensable à la formation des triades. Ainsi, dans le modèle de la souris dysgénique, malgré l'absence de la sous-unité principale du DHPR, les triades se forment, et contiennent des pieds (Flucher et coll., 1991 ; Powell et coll., 1996 ; Takekura et coll., 1994). Les triades sont également toujours présentes dans un modèle de mutation nulle du RyR1, bien que dépourvues de pieds (Takekura et coll., 1995). Ces triades contiennent de la triadine et des DHPR (Protasi et coll., 1998). Les travaux de Felder et coll. (2002), menés sur muscles squelettiques n'exprimant ni le RyR, ni le DHPR, apportent la preuve définitive que ces deux protéines ne sont pas nécessaires aux différentes étapes de la formation des triades, entre autre l'amarrage du SR au tubule T, et le ciblage de la triadine et de la calséquestrine à la membrane jonctionnelle du RS. D'autres protéines triadiques semblent donc être impliquées dans l'organisation de la triade. La mitsugumine 29 représente un bon candidat (mg 29) (Nishi et coll., 1999), les muscles de souris déficientes en mg29 présentant une formation incomplète du réseau de RS, un trajet irrégulier des tubules T, et un déficit partiel de triades au niveau de la jonction AI (Komazaki et coll., 2001).

La présence du RyR n'est pas indispensable au ciblage du DHPR à la triade (Protasi et coll., 1998), mais paraît fondamentale à son organisation en tétrades. En effet, la lignée cellulaire 1B5 (n'exprimant ni RyR1 ni RyR3) développe des ULC dyspédiques, contenant certes de la triadine et des DHPR, mais groupés en foyers. Ainsi, l'absence du RyR affecte à son tour l'organisation des DHPR, qui ne sont, dans ce cas, ni agencés en tétrades, ni alignés selon deux directions orthogonales. L'implication de l'ancrage RyR-DHPR dans l'agencement spatial du DHPR est confirmée par le fait que l'expression de l'ADNc codant pour le RyR restaure à la fois la formation de spots périphériques de RyR, et le regroupement de DHPR en tétrades, dans ces mêmes cellules 1B5 (Protasi et coll., 1998).

À l'inverse, les interactions RyR-DHPR ne sont pas nécessaires à l'organisation des RyR au niveau du RS jonctionnel. En effet, dans le muscle dysgénique, les RyR présents au niveau des triades sont normalement organisés en pieds régulièrement espacés (Powell et coll., 1996).

### **II.4 RyR1, RyR3 et unités de libération de calcium**

Nous avons vu dans le chapitre 2 que les muscles squelettiques de mammifères peuvent exprimer soit uniquement du RyR1, soit du RyR1 et en moindre quantité du RyR3 (pour revue, Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Dès lors se pose la question de l'implication de chacune des 2 isoformes dans le couplage EC. Quelques muscles squelettiques, dont les plus rapides, expriment seulement l'isoforme RyR1, prouvant que RyR1 peut soutenir à lui seul le couplage EC (Bertocchini et coll., 1997 ; Conti et coll., 1996). RyR1 est capable de créer un lien avec la sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR, permettant un couplage de type squelettique, et la formation de tétrades. Ainsi,

l'expression de RyR1 dans des cellules 1B5 induit la formation de tétrades, et la restauration des signaux calciques sous-tendant le couplage EC (Fessenden et coll., 2000 ; Protasi et coll., 1998 ; 2000). En revanche, l'expression de RyR3 dans ces mêmes cellules, même à fortes doses, ne rétablit aucun de ces deux paramètres, bien qu'elle restaure la présence de pieds, assemblés en motifs organisés, au niveau des ULC (Fessenden et coll., 2000 ; Protasi et coll., 2000). RyR3 ne peut donc supporter seul le couplage EC. De ce fait, les muscles se développant en absence de RyR1, suite à une mutation, présentent de graves défauts de développement, et une absence de couplage, malgré la présence de RyR3 (Takeshima et coll., 1994).

Les implications distinctes de RyR1 et RyR3 dans le couplage EC pourraient résulter d'une divergence de leur localisation. En effet, Felder & Franzini-Armstrong (2002) ont constaté que, dans des muscles de diverses espèces n'exprimant que RyR1, les pieds ne sont observés qu'au niveau de la surface jonctionnelle du RS. En revanche, dans les muscles exprimant RyR1 et RyR3, des pieds additionnels sont identifiés dans les régions parajonctionnelles immédiatement adjacentes aux régions jonctionnelles. Les auteurs en déduisent que RyR3 est restreint aux régions parajonctionnelles, et que son activation est indirecte lors du couplage EC. Cependant, les travaux de Flucher et coll. (1999) localisent par immunomarquage, dans certains muscles, RyR3 à la jonction triadique, entre le tubule T et le RS. Ainsi, si RyR1 semble être ciblé à la zone jonctionnelle, RyR3 pourrait être localisé aux niveaux jonctionnel et parajonctionnel.

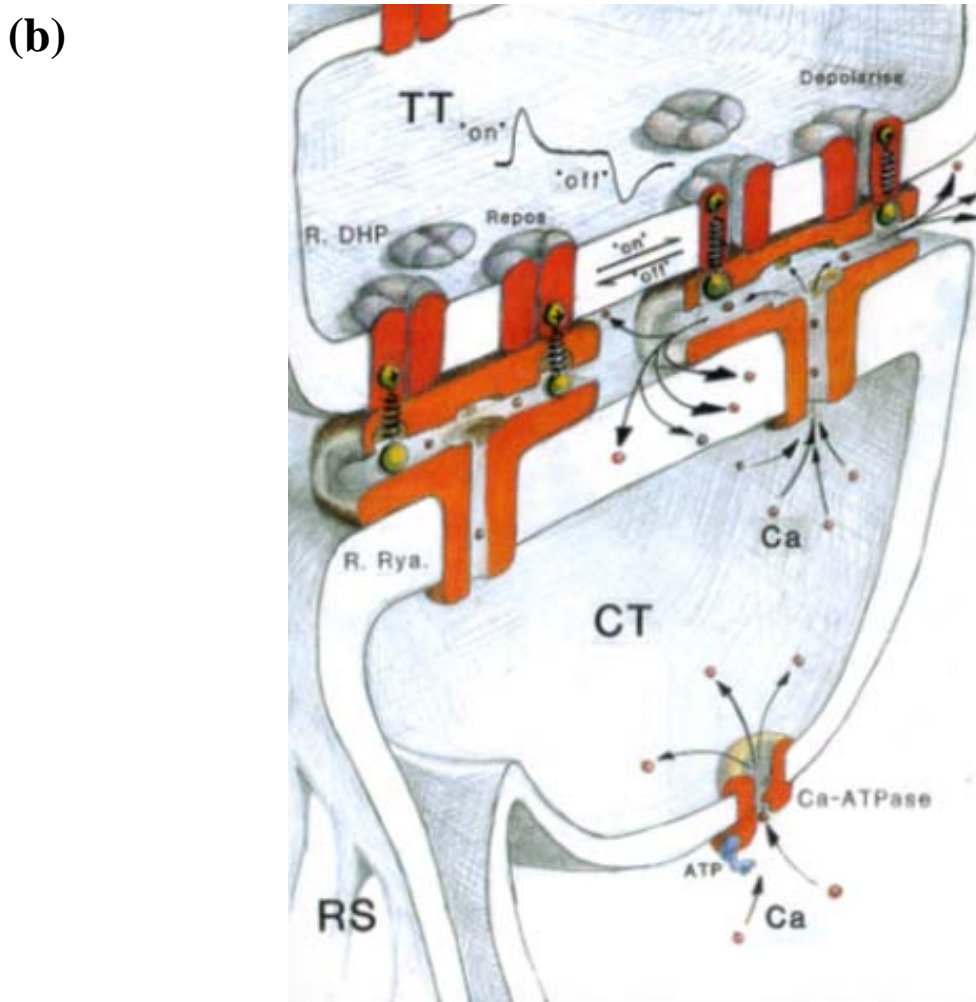
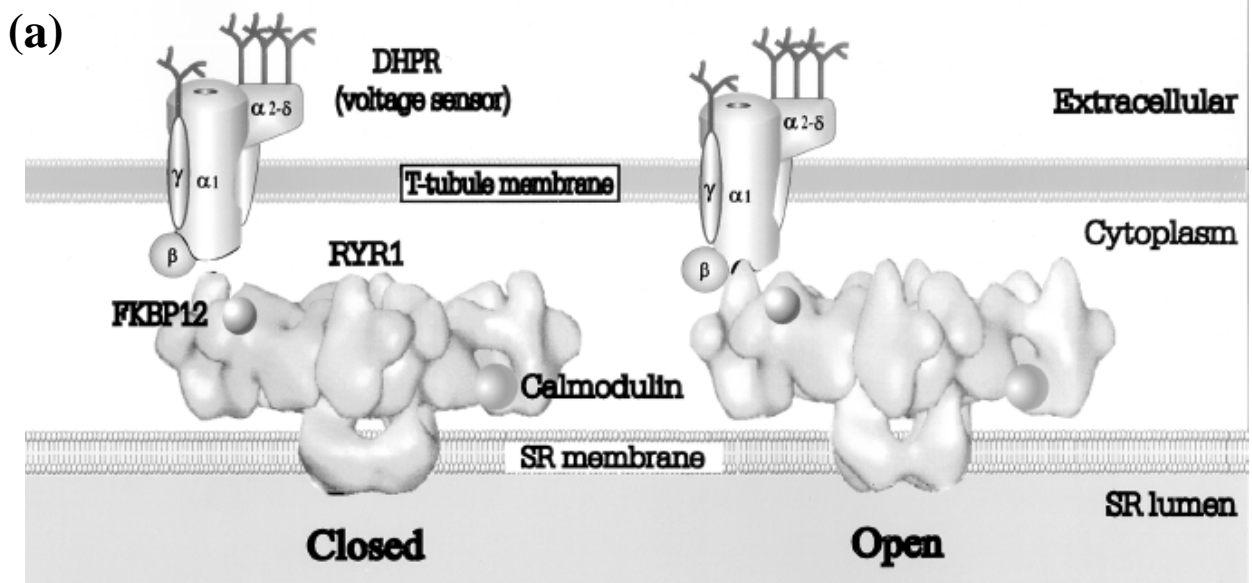
Sorrentino & Reggiani (1999) proposent un modèle compatible avec les travaux de Block et coll. (1988), ceux de Flucher et coll. (1999), ceux de Felder & Franzini-Armstrong (2002), et les expériences conduites sur souris dyspediques. Selon ce modèle, seul RyR1 se lie au DHPR, formant des canaux directement contrôlés par les variations de potentiels, qui composent la base de la libération de calcium par le potentiel d'action. Quand aucune autre isoforme n'est présente, RyR1 constitue à la fois les canaux couplés au DHPR, et les canaux non couplés. En effet, la disposition alternée des RyR n'est pas due à la présence des deux isoformes : la vessie nataoire de poisson, sur laquelle ce motif a initialement été décrit, n'en contient qu'une (Block et coll., 1988). Quand RyR3 est exprimé en contenu équimolaire, RyR1 forme les canaux couplés, et RyR3 les non couplés. Si RyR3 est présent en faible quantité, les canaux non couplés sont constitués à la fois de RyR1 et de RyR3.

### **III Mécanismes du couplage excitation-contraction**

#### **III.1 Aspects fonctionnels**

Les mécanismes de communication entre le DHPR, détecteur de potentiel de la membrane du tubule T, et le RyR, canal calcique du RS, ont fait l'objet de nombreux travaux et revues, diverses théories du couplage ayant été successivement proposées et, pour certaines, invalidées (pour revue, Rios & Pizarro, 1991). Nous exposerons ici les deux hypothèses actuellement retenues : le couplage mécanique, qui propose que le DHPR induise l'ouverture du RyR par une interaction moléculaire directe, et la libération autocatalytique de calcium ou CICR (*Calcium Induce Calcium Release*).





**Figure 23 : Modèle mécanique du couplage excitation-contraction.**

(a) Les états fermé et ouvert du RyR1 proviennent d'une reconstruction tridimensionnelle à partir d'images de microscopie électronique. Les cinq sous-unités du DHPR sont schématisées (d'après Wu & Hamilton, 1998). (b) Représentation artistique de l'ouverture du RyR1 lors d'une dépolarisation (d'après C. Ojeda).

### III.1.1 Couplage mécanique

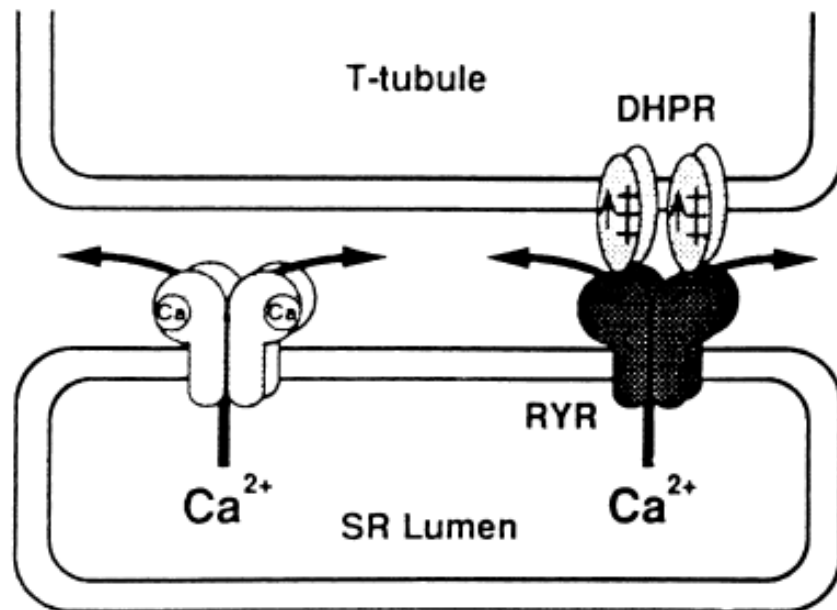
S'appuyant sur la description des mouvements de charges intramembranaires dans le muscle squelettique, Schneider & Chandler proposèrent pour la première fois, en 1973, un modèle de couplage mécanique entre les charges déplacées dans le tubule T, et la libération de calcium du RS. Suite à ce modèle, Chandler et coll., (1976) suggérèrent le « modèle du bouchon »: une molécule chargée, située dans la membrane du tubule T, est liée par une tige rigide à un bouchon, qui obstrue le pore du RyR au repos. Lors d'une variation du champ électrique, la molécule chargée se déplace, générant les mouvements de charges. Elle entraîne avec elle le bouchon, qui quitte le pore du canal, permettant la libération de calcium (Figure 23). Si le modèle du bouchon ne fait pas l'unanimité, l'hypothèse d'un couplage mécanique est aujourd'hui largement admise. Un certain nombre d'arguments expérimentaux en sa faveur ont en effet été accumulés :

- 1) Nous avons vu qu'il existe, dans le muscle squelettique, une relation structurale directe entre DHPR et RyR (Block et coll., 1988 ; Takekura et coll., 1994), qui supporte l'hypothèse d'un couplage physique (Rios et coll., 1991). Par ailleurs, une interaction protéine-protéine directe entre le DHPR et le RyR a été mise en évidence dans le muscle squelettique de lapin, par coimmunoprécipitation (Marty et coll., 1994).
- 2) Le temps de latence très court entre le signal électrique et la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  favorise l'hypothèse d'interactions moléculaires entre les deux canaux (Schneider, 1994). De telles interactions peuvent être traduites par divers modèles cinétiques de la relation entre le déplacement des charges ( $Q(t)$ ) et l'activation du RyR ( $A(t)$ ). Ainsi, Simon et Hill (1988) ont démontré que  $A(t)$  était proportionnel à  $[Q(t)]^4$  lors de l'activation de la libération de calcium au début du pulse. Cette observation concorde avec la structure en tétrade : les quatre détecteurs de potentiels d'une tétrade agissent de concert pour activer un seul RyR. Ce RyR s'ouvre et se referme avec un délai négligeable si, lorsque trois DHPR sont activés, le 4<sup>ème</sup> entre dans ou sort de l'état activé. Sur la base des connaissances ultrastructurales de la jonction triadique, Rios et coll. (1993) ont également proposé un modèle d'interactions allostériques entre le RyR et le DHPR. Selon ce modèle, le canal du RS peut s'ouvrir de façon spontanée, sans qu'aucun détecteur de potentiel ne soit activé, mais sa probabilité d'ouverture est accrue par l'activation de un à quatre détecteurs de potentiel (d'une même tétrade) lors de la dépolarisation. Chacun des détecteurs de potentiel se comporte donc comme un ligand allostérique de l'une des quatre sous-unités cytoplasmique du RyR. Ce modèle postule également une interaction allostérique entre ces quatre monomères du RyR.

### III.1.2 Libération autocatalytique de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ induce $\text{Ca}^{2+}$ release, CICR)

En 1970, Endo et coll. et Ford & Podolsky démontraient, dans des fibres musculaires squelettiques pelées, que l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans la solution d'enregistrement induisait la libération de calcium par le RS. Ils proposèrent alors, comme principal mécanisme de couplage EC, une libération de calcium induite par le calcium (CICR). Cependant, il est





**Figure 24 : Représentation schématique des deux composantes de la libération de calcium.**  
 D'après Caputo, 2001

Le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par le RyR contrôlé par le DHPR activerait le RyR non couplé par un mécanisme de CICR.

clairement établi que la source de calcium responsable de ce mécanisme n'est pas le milieu extracellulaire. En effet, Armstrong et coll. (1972) ont établi, dans le muscle squelettique de vertébré, que la présence de calcium dans le milieu externe n'est pas requise pour induire la contraction. De même, si dans le muscle cardiaque, l'influx de calcium extracellulaire *via* le DHPR permet la libération de calcium par le RS, ce mécanisme n'est pas transposable au muscle squelettique. En effet, dans le muscle squelettique de grenouille, seul 5% des DHPR sont des canaux fonctionnels (Rios et Brum 1987). De plus, le canal calcique de type L a des cinétiques d'ouverture très lentes : la libération de calcium est donc activée avant que l'influx calcique ne puisse se produire. Enfin, l'inhibition du courant calcique par des bloqueurs inorganiques (Garcia & Beam, 1994), ou par la substitution d'un résidu glutamate dans un des sites de haute affinité pour le calcium (Dirksen & Beam, 1999), n'affecte pas le couplage EC.

Si la libération de calcium par le RS n'est pas induite par un influx de calcium à partir du compartiment extracellulaire, l'implication d'un mécanisme de CICR dans le couplage EC du muscle squelettique n'est pas exclue. En effet, sur la base des travaux morphologiques de Block et coll. (1988), Rios et Pizarro (1988) ont suggéré l'existence de deux types de canaux de libération de calcium : les canaux associés aux DHPR (V-type), sous le contrôle des détecteurs de potentiel, et les canaux non associés (C-type), dont l'ouverture est contrôlée par le calcium (Figure 24). Ces deux types de canaux seraient chacun impliqués dans une composante du signal du flux de libération de calcium, l'ouverture de canaux V-type générant la composante stable, celle des canaux C-type la composante pic (Rios & Pizarro, 1988). Bien qu'il n'y ait pas de preuves tangibles pour supporter cette hypothèse, différentes observations l'appuient. Ainsi, dans le muscle squelettique d'amphibien, l'injection de fortes concentrations de tampons calciques rapides élimine de façon préférentielle la composante pic, tandis que la composante soutenue n'est pas ou peu affectée (Csernoch et coll., 1993 ; Jacquemond et coll., 1991). De plus, les deux composantes présentent différentes sensibilités à divers agents pharmacologiques. La tétracaine, par exemple, inhibe le pic sans affecter la composante soutenue (Pizarro et coll., 1992). Enfin, l'application de caféine prolonge la libération de calcium au-delà de la durée du pulse dépolarisant, selon un mécanisme indépendant du potentiel ce qui suggère fortement la présence de CICR (Schneider & Simon, 1988). Cette hypothèse de Rios et Pizarro (1988) fut reprise par Stern et coll. (1997), qui proposèrent qu'au sein d'un couplon, la libération de calcium *via* les RyR V-type active les RyR C-type adjacents. Notons toutefois que l'ensemble de ces résultats dérive d'études effectuées chez l'amphibien, et ne sont pas confirmés dans la fibre musculaire squelettique de mammifère (Shirikova et coll., 1996).

L'avènement de la microscopie confocale, et l'enregistrement de *sparks*, ont apporté des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de CICR dans le muscle squelettique. Les *sparks* spontanés observés chez l'amphibien proviendraient d'un mécanisme de CICR : leur fréquence augmente en présence de  $[Ca^{2+}]$  cytoplasmiques croissantes, ou de caféine (Klein et coll., 1996), et diminue si la  $[Mg^{2+}]$  cytoplasmique augmente (Lacampagne et coll., 1998). Cependant, l'absence de *sparks* spontanés chez le rat adulte suggère que ce mécanisme de CICR est d'importance mineure chez le mammifère (Shirokova et coll., 1998). Marx et coll. (1998), observant, en enregistrement unitaire, dans des vésicules de RS, qu'un « couplage »

entre RyR adjacents existait en présence de FKBP12, et ce même en absence de calcium luminal (baryum comme porteur de charge), ont proposé une autre hypothèse : il existerait une association physique mais aussi fonctionnelle entre les RyR adjacents, renforcée par la présence de FKBP12, qui permettrait à ces canaux de s'ouvrir simultanément.

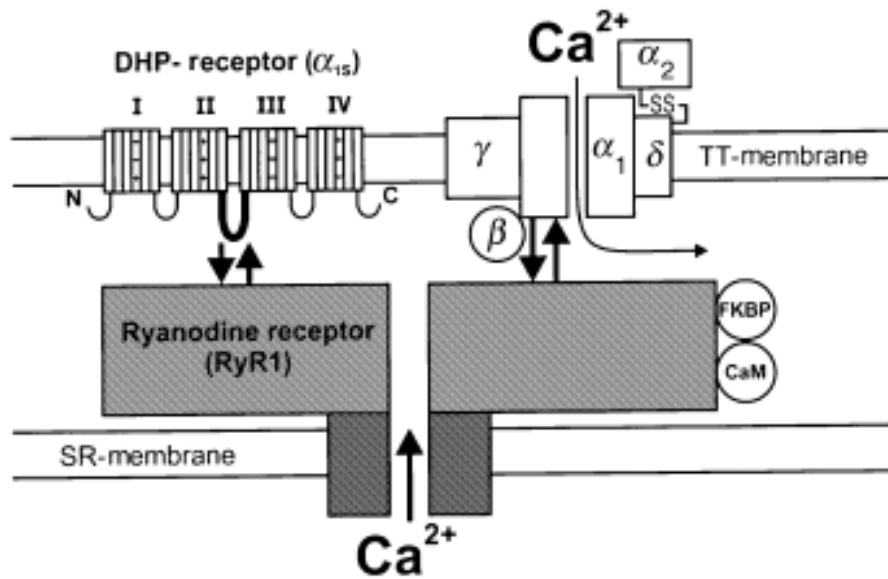
Si le mécanisme de CICR semble absent, en conditions d'enregistrement classiques, chez le mammifère adulte, il est en revanche observable chez l'embryon. Ainsi, Chun et coll. (2003) ont démontré, dans le diaphragme d'embryon de souris, que la fréquence de *sparks* diminue en présence de cobalt ou nifédipine. Les *sparks* seraient donc initiés par une augmentation locale de la  $[Ca^{2+}]$ , provenant d'un influx calcique *via* le DHPR.

### III.1.3 Implications de RyR1 et RyR3 dans le couplage EC

RyR1 constitue l'isoforme majeure du muscle squelettique de mammifère. Tandis que les muscles rapides, chez l'adulte, n'expriment que cette isoforme, les muscles foetaux, le diaphragme et certains muscles lents contiennent également RyR3 (Tarroni et coll., 1997). Une hypothèse propose que l'activation des deux isoformes repose sur différents mécanismes de couplage, RyR1 étant sous contrôle direct du détecteur de potentiel, par un couplage mécanique, et RyR3 activé par CICR (pour revue partielle, voir Murayama & Ogawa, 2002). En effet, seul RyR1 peut interagir avec le DHPR (Protasi et coll., 2000). De plus, RyR3 présente les propriétés d'un canal activé par CICR (Murayama et Ogawa, 1997) : son activation, mesurée par liaison à la  $[H^3]$  ryanodine, en vésicules de RS isolées de diaphragme de lapin, est moins sensible au calcium que celle de RyR1. Il est également stimulé par la caféine, et inhibé par le rouge de ruthénium et la procaine.

Des études menées sur souris *KO* et souris dyspédiques ont confirmé cette hypothèse. Ainsi, chez les souris RyR1<sup>-/-</sup>, RyR3<sup>+/+</sup>, l'initiation de la contraction musculaire squelettique par stimulation électrique est abolie tandis que la réponse contractile à la caféine est maintenue (Barone et coll., 1998 ; Takeshima et coll., 1994). Chez les souris RyR1<sup>+/+</sup>, RyR3<sup>-/-</sup>, la réponse à la caféine est réduite (Barone et coll., 1998). Dans des myotubes dyspédiques dépourvus de RyR1, et transfectés avec l'ADNc de RyR3, la présence de *sparks* spontanés (attribués au CICR) a été observée (Ward et coll., 2000). En revanche, les fibres musculaires squelettiques rapides intactes de rats adultes, n'exprimant que RyR1, ne produisent pas de *sparks* spontanés (Shirokova et coll., 1998), suggérant que RyR1 n'est pas activable par une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  locale.

Bertocchini et coll. (1997) ont proposé un modèle, intégrant les deux mécanismes dans le couplage EC : lors d'une dépolarisation, l'activation de RyR1 (par couplage mécanique) libérerait du calcium, qui à son tour activerait RyR3 (*via* un mécanisme de CICR), permettant l'amplification du signal calcique. En effet, dans les souris nouveaux-nés RyR3 *KO*, la contraction induite par stimulation électrique, ou par application de caféine, est réduite. En revanche, chez l'adulte, l'absence de RyR3 n'affecte pas le couplage EC : le mécanisme proposé ne serait donc présent que chez le nouveau-né.



**Figure 25 : Structure impliquées dans le couplage excitation-contraction.**

D'après Melzer & Dietze, 2001.

La boucle II-III de la sous-unité α<sup>1s</sup> du DHPR interagit avec le RyR, provoquant son ouverture lors d'une dépolarisation.

### III.1.4 Rôle des récepteurs à l'inositol triphosphate

En 1985, Vergara et coll., chez la grenouille, et Volpe et coll., chez le rat, observaient que des fibres musculaires squelettiques pelées développaient une force après application d'InsP<sub>3</sub>. Ces deux groupes suggérèrent alors que la production de cette molécule représentait le mécanisme du couplage EC. Depuis, de nombreuses études ou arguments sont venus invalider cette hypothèse (pour revue, voir Franzini-Armstrong & Protasi, 1997 ; Melzer et coll., 1995).

Cependant, si de nos jours l'InsP<sub>3</sub> n'est plus considéré comme l'élément clé du couplage EC, son implication dans la régulation du couplage n'est pas exclue. Ainsi, des études récentes ont démontré que l'application d'InsP<sub>3</sub> sur fibres pelées de rat module la libération de calcium par le RS dans le muscle lent, et de façon moins importante, dans le muscle rapide (Talon et coll., 1999 ; 2000). Un autre rôle proposé pour le RInsP<sub>3</sub> est la régulation de l'expression de gènes, ce qui concorde avec sa localisation nucléaire. La stimulation prolongée d'une cellule musculaire squelettique de rat en culture primaire (dépolariation potassique ou stimulation électrique provoquant un tétanos) produit deux types signaux calciques : un signal rapide, impliquant le RyR et associé à la contraction, et un signal lent à double composante, cytosolique et nucléaire, impliquant le RInsP<sub>3</sub> (Eltit et coll., 2004 ; Jaimovich & Carrasco, 2002). C'est ce signal lent qui serait impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes nucléaires.

### III.1.5 Implication des mitochondries dans le couplage excitation-contraction

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que les mitochondries des fibres musculaires sont capables de capturer du calcium, *via* l'uniport, lors d'une stimulation de la cellule. Ces mitochondries sont situées à proximité des sites de libération de calcium du RS, permettant, d'un point de vue structurel, une interaction fonctionnelle avec les RyR. Une telle interaction a été mise en évidence par Challet et coll. (2001) sur myotubes squelettiques de souris : ces auteurs observent de larges transitoires calciques mitochondriaux lors de l'activation des RyR, par application d'agonistes ou par dépolariation.

Plus récemment, Isaeva & Shirokova (2003) ont démontré que les mitochondries exercent un contrôle négatif sur la libération de calcium par les RyR, dans le muscle squelettique. En effet, dans des fibres de rat perméabilisées à la saponine, elles observent une diminution réversible de la fréquence des *sparks*, lors de la stimulation des mitochondries par additions de substrats mitochondriaux. À l'inverse, la fréquence des *sparks* augmente lorsque l'activité des mitochondries, ou leur capacité à capter le calcium, est inhibée. Les auteurs proposent que les mitochondries, en tamponnant le calcium cytoplasmique à proximité des RyR, inhibent le CICR.

## III.2 Interactions structurales

### III.2.1 Le DHPR

#### III.2.1.1 La sous-unité $\alpha_{1s}$

L'expression de chimères de DHPR cardiaque/squelettique dans des myotubes dysgéniques (déficients en  $\alpha_{1s}$ ) a démontré que la boucle cytoplasmique connectant les domaines II et III de la sous-unité  $\alpha_{1s}$  (ou boucle II-III) constitue la partie essentielle pour le couplage EC (Figure 25) (Tanabe et coll., 1990). Par ailleurs, le peptide isolé de la boucle II-III active le RyR1 en bicouche lipidique (mais pas le RyR2, ou RyR de type cardiaque) (Lu et coll., 1994). La boucle II-III formerait l'interface avec le pied du RyR.

El-Hayek et coll. (1995) ont identifié deux régions importantes de cette boucle II-III, qui exercent des effets opposés sur le RyR : le peptide A (Thr<sup>671</sup>-Leu<sup>690</sup>) et le peptide C (Glu<sup>724</sup>-Pro<sup>760</sup>). Testé sur préparation de triades isolées, le peptide A active la libération de calcium ; à l'inverse, le peptide C inhibe l'effet du peptide A. Ces auteurs proposent une hypothèse impliquant les deux peptides dans le couplage EC : lors d'une dépolarisation, la région inhibitrice de la boucle II-III (correspondant au peptide C), se détache du RyR, et est remplacée par la région activatrice (correspondant au peptide A), permettant l'ouverture du canal. De manière plus précise, la partie déterminante du peptide A correspond à la séquence Arg<sup>681</sup>-Leu<sup>690</sup> (el-Hayek & Ikemoto, 1998). Par la suite, Lamb et coll (2000) ont confirmé *in vivo*, sur fibre pelée de rat, les effets reportés *in vitro* pour les peptides A et C. Il a été de plus déterminé, par expression en myotubes dysgénique de chimères de DHPR cardiaque/squelettique, qu'une région comprenant le peptide C (résidus 720-765) était responsable du typage squelettique du couplage (Nakai et coll., 1998 ; Grabner et coll., 1999 ; Saiki et coll., 1999).

Des informations supplémentaires sur l'interaction structurelle DHPR-RyR sont depuis peu apportées par l'utilisation de toxines issues de venin de scorpion, l'impérotaxine A et la maurocalcine. Ces deux toxines, proches du peptide A, partageraient, avec ce peptide, un site commun de liaison sur le RyR, et leur interaction avec ce canal mimerait celle du DHPR (Altafaj et coll., 2005 ; Gurrola et coll., 1999). Appliquées sur vésicules isolées de RS ou sur RyR isolé en bicouche lipidique, elles induisent des états de sous-conductance du RyR (Estève et coll., 2003 ; Tripathy et coll., 1998).

#### III.2.1.2 Les sous-unités auxiliaires

L'expression dans des myotubes issus de souris *KO* pour  $\beta_1$  de divers chimères de la sous-unité  $\beta_1$  du DHPR, a permis de démontrer qu'une partie de la région C-terminale de cette sous-unité  $\beta_1$  est impliquée dans le couplage EC (Beurg et coll., 1999). De même, les cinétiques d'inactivation et de restauration des mouvements de charges générés par le DHPR sont altérées par coexpression avec  $\alpha_2$ - $\delta$  (Shirokova et coll., 1998). En revanche, les myotubes issus de souris *KO* pour  $\gamma_1$  ne présentent pas d'altérations du couplage EC (Ahern et coll., 2001 ; Ursu et coll., 2001).

### III.2.2 Le RyR

L'expression de chimères RyR1/RyR2 dans des myotubes dyspédiques a conduit à l'identification d'une région nommée R10 (résidus 1635-2636), impliquée dans le couplage orthograde type squelettique (Nakai et coll., 1998). Par ailleurs, par chromatographie d'affinité de protéines, une région différente de RyR1 (922-1112), interagissant spécifiquement avec la boucle II-III du DHPR type squelettique, a été identifiée (Leong & MacLennan, 1998).

La FKBP12 pourrait également jouer un rôle important dans le couplage. En effet, Dulhunty et coll (1999) ont observé, sur vésicules isolées de RS de lapin, que le peptide A n'activait le RyR1 qu'en présence de FKBP12. L'association FKBP12/RyR1 potentialise l'interaction entre RyR1 et peptide A, et les effets du peptide A sur RyR1 (O'Reilly et coll., 2002).

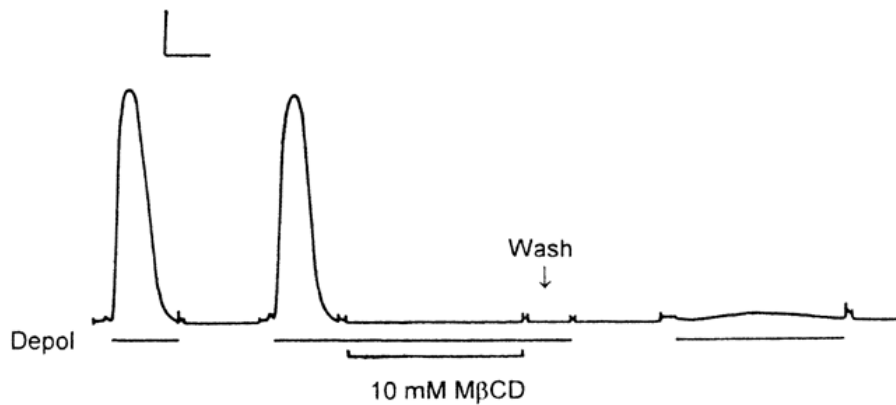
## III.3 Microdomaines sarcolemmaux et couplage excitation-contraction

### III.3.1 Cholestérol membranaire et couplage excitation –contraction

Nous avons pu voir, au cours du chapitre 1, que la composition lipidique du sarcolemme n'est pas uniforme, les structures sarcolemmales impliquées dans le couplage EC (tubules T) étant enrichies, entre autre, en cholestérol. Cette organisation du cholestérol en domaines est retrouvée de façon générale dans les membranes biologiques et artificielles (Yeagle, 1985). Certaines protéines membranaires seraient sélectivement localisées dans les domaines riches (par exemple, le DHPR) ou pauvres en cholestérol (par exemple, la SERCA). Les structures et propriétés de ces domaines sont susceptibles d'affecter de façon différente la fonction des protéines qu'ils contiennent (Bastiaanse et coll., 1997). Il est en effet établi que le contenu en cholestérol de la membrane module l'activité de divers types de protéines membranaires, incluant des canaux ioniques, des récepteurs et des pompes ; de même, le fonctionnement de certaines protéines requiert un niveau minimum de cholestérol (pour revue, Bastiaanse et coll., 1997 ; Yeagle, 1985). Deux mécanismes d'action du cholestérol sont généralement considérés :

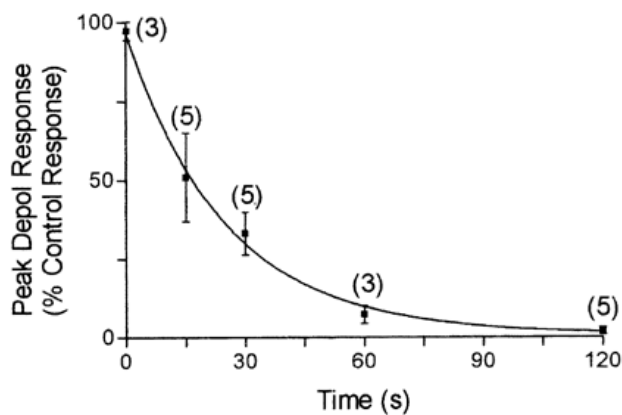
- 1) **Régulation des protéines membranaires par modulation des propriétés physiques de la membrane.** Le contenu en cholestérol de la membrane agit sur son épaisseur et sa fluidité, ces deux paramètres modulant la vitesse des changements conformationnels des protéines (pour revue, Yeagle, 1985). Ainsi, un effet de la fluidité membranaire a été observé, entre autre, sur la fonction du récepteur à la cholecystokinine (Gimpl et coll., 1997) et de certains canaux potassiques activés par le calcium (Bolotina et coll., 1989 ; Chang et coll., 1995b). Par ailleurs, l'étude de Lundbaek et coll. (1996) a démontré que la perte de cholestérol membranaire modifie l'épaisseur de la bicouche, et altère les fonctions du canal à gramicidine.
- 2) **Interaction directe protéine-cholestérol.** Ce mécanisme d'action a été mis en évidence pour des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, sur cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Bastiaanse et coll., 1994), et sur récepteur à l'ocytocine isolé en bicouche (Gimpl et coll., 1997).

(a)

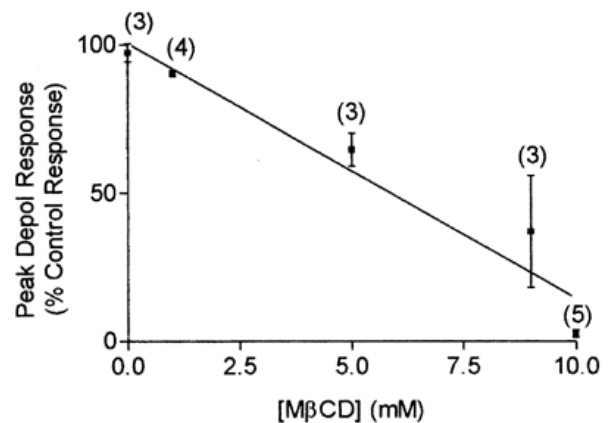


(b)

A



B



**Figure 26 : Effet de la MβCD sur la force développée en réponse à une dépolarisation des tubules T dans la fibre musculaire squelettique pelée d'amphibien.**

D'après Launikonis & Stephenson., 2001

(a) La dépolarisation des tubules T se fait par application d'une solution Na<sup>+</sup> dépolarisante. Après 2 min d'incubation en MβCD, la réponse à la dépolarisation est abolie. Barre de calibration : horizontale : 2s lors de la dépolarisation, 30 s le reste du temps ; verticale : 50 μN. (b) Diminution de la capacité de la préparation à répondre à une dépolarisation du tubule T : A) après divers temps d'incubation dans 10 mM de MβCD ; B) après 2 min d'incubation dans différentes concentrations de MβCD. Pour les figures A et B, le n sont indiqués entre parenthèses.



Dans le muscle squelettique, la plus forte densité de DHPR est rencontrée dans deux types d'invaginations enrichies en cholestérol : les tubules T et les cavéoles (Jorgensen et coll., 1989 ; Romey et coll., 1989 ; Roseblatt et coll., 1981). Au-delà de son rôle dans le maintien de l'intégrité des structures impliquées dans le couplage EC, le cholestérol modulerait l'activité de ses acteurs protéiques. Un effet du cholestérol membranaire sur les canaux calciques sarcolemmaux en général (pour revue, Bastiansee et coll., 1997), et sur le DHPR en particulier, a été mis en évidence dans de nombreuses préparations. Ainsi, Gleason et coll. (1991), étudiant, sur cellules musculaires lisse de lapin, les relations entre le contenu en cholestérol et les mouvements de calcium à travers la membrane plasmique, posent comme hypothèse qu'un enrichissement en cholestérol de cette membrane démasque des DHPR silencieux en temps normal. Une activation des canaux calciques par le cholestérol a également été démontrée par Bastiaanse et coll. (1994) sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, et Sen et coll. (1992), sur cellules musculaires lisses de rat. Par ailleurs, Renaud et coll., (1986) observent qu'une diminution du contenu en cholestérol de la membrane plasmique de cellules cardiaques d'embryons de poulet, provoque une disparition de  $I_L$ , qui résulte non pas d'une diminution du nombre de DHPR, mais d'une perte de leur activité.

Cependant, certains travaux, menés sur les mêmes types de cellules que ceux précédemment cités, ne révèlent aucun effet de la déplétion membranaire en cholestérol sur le DHPR (Löhn et coll., 2000 ; Dreja et coll., 2002). La modulation de l'activité de ce canal par cet alcool ne semble donc pas systématique, et dépendrait du modèle considéré. À ce jour, une seule étude a été réalisée sur le muscle squelettique (Launikonis & Stephenson, 2001). Dans une préparation de fibre musculaire squelettique d'amphibien pelée de manière mécanique, une déplétion membranaire en cholestérol produit une diminution de la force évoquée en réponse à une dépolarisation (Figure 26). De plus, les réponses contractiles téaniques de bandes de muscles sont totalement abolies après 3 à 4 h d'incubation en présence de l'agent séquestrant le cholestérol. En revanche, la durée de la force évoquée par une dépolarisation augmente, suggérant une diminution de la vitesse d'inactivation du détecteur de potentiel. Le détecteur de potentiel apparaissant plus sensible à la déplétion que les protéines responsables de l'excitabilité membranaire, une interaction directe cholestérol-protéine pourrait être nécessaire, dans le muscle squelettique, au fonctionnement normal du DHPR.

### **III.3.2 Oxyde nitrique et couplage excitation-contraction**

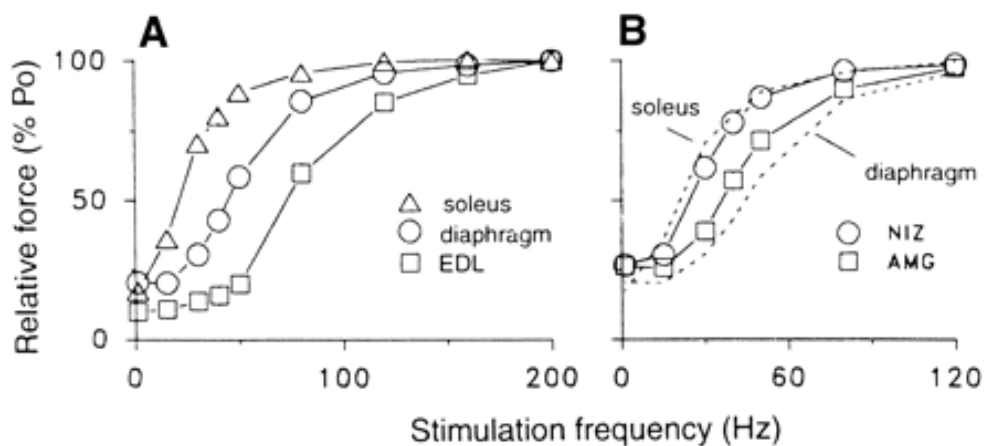
Dans le muscle squelettique, la nNOS assure la production endogène de NO. Il a été démontré que le NO peut moduler la majorité des acteurs du cycle excitation-contraction-relaxation (pour revue, voir Stamler & Meissner, 2001 ; Reid 1998). Cette molécule peut modifier les protéines cellulaires par deux mécanismes distincts (pour revue, voir Stamler, 1994) :

- 1) une réaction avec les centres métalliques, par exemple le fer hémique, pour former des groupes NO-métal. Ce mécanisme est à l'origine du pouvoir tampon de la myoglobine vis-à-vis du NO. Il permet également de moduler l'activité des métalloprotéines ; il stimule ainsi la guanylate cyclase, et provoque une augmentation du niveau de GMPcyclique (GMPc) intracellulaire (Kobzik et coll., 1994). Le GMPc active certains

(a)

	Activité de la NOS ( $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{protéine}$ )	Composition du muscle en fibres de type II (%)
<b>Soleus</b>	2.5	$13 \pm 4$
<b>Diaphragme</b>	5.2	$60 \pm 1$
<b>EDL</b>	13.5	$98 \pm 7$

(b)



**Figure 27 : Modulation par l'oxyde nitrique de la fonction contractile du muscle squelettique.**  
D'après Kobzik et coll., 1994.

(a) L'activité NO synthase du muscle squelettique est corrélée à la composition en fibres de type II. (b) Le NO déprime la fonction contractile du muscle squelettique. A) La force développée lors de stimulations submaximales diminue lorsque l'activité de la NOS augmente (EDL>diaphragme>soleus). B) Effets des inhibiteurs de la NOS sur l'activité contractile du diaphragme. L'exposition du diaphragme à divers inhibiteurs de la NOS déplace la courbe de force développée en fonction de la fréquence de stimulation vers des valeurs de fréquences plus faibles.

canaux ioniques, protéines kinases et phosphodiesterases. Si cette voie est majoritairement médiatrice des effets du NO dans les muscles cardiaque et vasculaire, elle est généralement admise comme ayant un rôle modeste dans le muscle squelettique (pour revue, Maréchal & Gailly, 1999 ; Stamler & Meissner, 2001).

- 2) une réaction avec les groupements thiols des protéines, par S-nitrosylation, pour former des groupes RS-NO (nitrosothiol). Ce mécanisme s'applique, par exemple, au RyR.

### III.3.2.1 Effets du NO sur la contraction musculaire

L'implication du NO dans la modulation de la contraction musculaire fut mise en évidence en 1994 par Kobzik et coll. Ces auteurs observaient que la force générée par divers types de muscles (le soleus, le diaphragme et l'EDL) en réponse à une stimulation électrique est inversement corrélée à leur activité NOS (Figure 27). De plus, les différences de relation force développée *versus* fréquence de stimulation, constatées entre muscles à prédominance lente et muscles à prédominance rapide, sont réduites par application d'inhibiteurs de la NOS. Ils concluent donc que le NO inhibe la contraction dans le muscle squelettique ; l'activité NOS des fibres de type I et de type II contribuerait aux différences de contractilité observées entre ces deux types de fibres. De nombreuses études postérieures ont mis en évidence une telle augmentation de l'activité contractile après application d'inhibiteurs de la NOS (Abraham et coll., 1998 ; Reid et coll., 1998 ; Richmonds & Kaminski, 2001). La modulation de la contraction par le NO s'explique en partie par ses effets sur les myofibrilles. En effet, l'application de fortes concentrations de donneurs de NO sur fibres musculaires isolées provoque une inhibition de l'ATPase de la myosine (Galler et coll., 1997 ; Perkins et coll., 1997), et une diminution de la sensibilité au calcium des myofibrilles (Andrade et coll., 1998 ; Perkins et coll., 1997). Une partie mineure de ces effets impliquerait le GMPc (Abraham et coll., 1998 ; Andrade et coll., 1998 ; Kobzik et coll., 1994).

Un point important concernant l'étude du rôle du NO a été récemment soulevé par Eu et coll. (2003). En effet, la plupart des mesures de contractilité présentées ci-dessus ont été effectuées en présence de 95% d'O<sub>2</sub> pour les tissus (pression partielle en oxygène ou pO<sub>2</sub> de 400 mmHg au cœur de l'organe), et de 21% d'O<sub>2</sub> pour les cellules (pO<sub>2</sub> de 150 mmHg), tandis que la pO<sub>2</sub> tissulaire est beaucoup plus faible : 4 à 20 mmHg soit 0.5-2.5 % d'O<sub>2</sub>. Eu et coll. (2003) ont démontré que la pO<sub>2</sub> peut moduler les effets du NO sur la contraction. Ces auteurs observent, sur cellules et muscles rapides de souris, une augmentation de la contractilité (muscle entier) et du raccourcissement des sarcomères (fibre isolée) mesurés en présence de 1% d'O<sub>2</sub>, par rapport aux valeurs obtenus en présence de 20% d'O<sub>2</sub>. L'inhibition de la production endogène de NO par un inhibiteur de la nNOS diminue la contractilité mesurée en présence de 1% d'O<sub>2</sub>, mais augmente la contractilité en présence de 20% d'O<sub>2</sub>. À 95% d'O<sub>2</sub> (condition qui produit un stress oxydatif), la production de force est augmentée, mais le contrôle de la contractilité par le NO est atténué. Par ailleurs, la réponse à la pO<sub>2</sub> disparaît chez les souris NOS KO. L'O<sub>2</sub> et le NO semblent donc interagir dans la régulation de la contraction musculaire, mais les cibles de ces effets ne sont pas clairement identifiées.

### III.3.2.2 Effets du NO sur les acteurs du couplage EC

L'hypothèse d'une modulation des protéines impliquées dans le couplage EC par le NO fut proposée dès 1994 par Kobzik et coll. De nombreuses études ont depuis été publiées sur le sujet, présentant parfois des résultats contradictoires, qui traduisent l'extrême complexité des effets du NO. Les cibles potentielles du NO sont le DHPR, la SERCA et le RyR.

#### III.3.2.2.1 Le DHPR

À l'inverse du muscle cardiaque, la régulation du DHPR par le NO n'est, à ce jour, pas établie dans le muscle squelettique (pour revue, voir Stamler & Meissner, 2001).

#### III.3.2.2.2 La pompe SERCA

Les travaux de Ishii et coll. (1998) indiquent que l'isoforme rapide de SERCA, SERCA1, est inhibée par l'application de NO. Cette inhibition ne semble impliquer ni l'oxydation de thiols libres, ni l'activation de la voie GMPc. De même, l'application de peroxy-nitrite sur SERCA2, l'isoforme lente, diminue l'activité de l'enzyme (Viner et coll., 1999). Cette diminution est corrélée avec la production de nitrotyrosine, suggérant que la nitration de résidus tyrosines dans la protéine affecte son activité.

#### III.3.2.2.3 Le RyR

Des études menées sur préparations fragmentaires mettent en évidence à la fois une inhibition et une stimulation de l'activité de RyR1 par le NO. Par exemple, Meszaros et coll. (1996) observent que l'application d'un donneur de NO (SNAP), ou de L-Arginine (qui stimule la synthèse endogène de NO), provoque une diminution de la vitesse de libération de calcium à partir de vésicules isolées de RS, et de la Po du RyR incorporé en bicouche lipidique. À l'inverse, dans l'étude de Stoyanovski et coll. (1997), le NO, délivré sous forme de gaz ou de donneurs de NO (NONOates ou S-Nitrosothiols) active le canal. La diversité des effets du NO sur RyR1 semble être liés aux conditions expérimentales : concentration (inhibition à faible *versus* activation à forte concentration) et du type de donneur de NO, état d'activation du canal, état redox du canal et présence d'agonistes et de CaM dans la solution d'enregistrement.

Dans la cellule musculaire squelettique, le NO est produit en même temps que des ROS (Reactive Oxygen Species) lors de la contraction (Silveira et coll., 2003). Le RyR1 est une cible excellente pour ces deux espèces moléculaires, car il contient un large nombre de groupements thiols, portés par des résidus cystéines : 100 cystéines par sous-unité, et 1 par FKBP12, soit 404 par tétramère. À pO<sub>2</sub> tissulaire, 50 cystéines par sous-unité sont réduites (200 par RyR1) (Eu et coll., 2000) ; la cellule maintient un environnement réducteur grâce à des composantes réductrices des thiols, la plus importante étant le glutathion. L'exposition de vésicules isolées de RS à une pO<sub>2</sub> atmosphérique résulte en une oxydation réversible de 6-8 thiols libres par sous-unité de RyR1, soit 24 à 32 par canal (Eu et coll., 2000). Ce groupe de

thiols constituerait le détecteur de  $pO_2$ . La régulation redox de RyR *in vitro* ferait intervenir le NO, *via* un mécanisme de S-nitrosylation, et dépendrait de l'état redox du canal, donc des conditions de  $PO_2$  expérimentales :

- **À  $pO_2$  tissulaire**, en présence de  $[Ca^{2+}]$  de repos, des concentrations physiologiques (submicromolaires) de NO activent le RyR1 par S-nitrosylation d'un résidu cystéine précis parmi les 50 résidus cystéines réduits de chaque sous-unité du RyR1 (Eu et coll., 2000). De même, le RyR1, isolé à partir du muscle squelettique de lapin, est physiologiquement S-nitrosylé au niveau d'un seul résidu cystéine (Eu et coll., 2000). Ce résidu a été identifié par mutagenèse dirigée comme Cys3635 (Sun et coll., 2001). Cys3635 est situé dans le site de liaison à la CaM, ce qui concorde avec le fait que le NO n'affecte l'activité de RyR1 qu'en présence de CaM (Eu et coll., 2000). La modulation de RyR1 par le NO présente une réponse biphasique vis à vis de  $[Ca^{2+}]$  : le canal est activé pour des  $[Ca^{2+}] < 10 \mu M$ , et inhibé pour des  $[Ca^{2+}] > 100 \mu M$  (Eu et coll., 2000).
- **À  $pO_2$  atmosphérique**, ni l'activation ni la S-nitrosylation du RyR1 par le NO ne sont observées (Eu et coll., 2000). La  $pO_2$  n'inhibe pas la réponse au NO par oxydation de la Cys3635, mais par un mécanisme allostérique : l'oxydation de 6 à 8 thiols par sous-unité de RyR1 provoquerait des changements de conformation de la protéine, qui gêneraient l'accès du NO à sa cible (Sun et coll., 2003).

Un modèle général de régulation de l'activité de RyR1 par les donneurs NO et les ROS (ou autres agents oxydants) a été proposé par Aghdasi et coll. L'oxydation des thiols provoque la formation de ponts disulphides entre les sous-unités du RyR1 ; ces liaisons covalentes augmentent la  $P_o$  du canal (Aghdasi et coll., 1997b). Les donneurs de NO exercent un effet biphasique sur le canal, dépendant de leur concentration (Aghdasi et coll., 1997a). De faibles concentrations n'affectent pas l'activité du RyR1, mais bloquent l'oxydation de groupements thiols critiques, et donc la formation des ponts dissulfures entre les sous-unités ; elles préviennent l'activation du canal. À plus forte concentration, les donneurs de NO contribuent à la pression oxydative et activent le RyR1, par formation de ponts disulfures entre les sous-unités.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Toutes les expériences ont été réalisées dans le respect des directives du Ministère Français de l'Agriculture (décret 87-848) et de la Communauté Européenne (86/609/EEC), concernant l'expérimentation animale. La composition des solutions citées est donnée dans le tableau 5.

### **I Matériel biologique**

#### **I.1 Préparation des cellules musculaires squelettiques fœtales**

Les cellules musculaires squelettiques fœtales sont isolées à partir de muscles intercostaux de fœtus de souris au stade E18. Ces fœtus proviennent de souris Swiss OF1 à gestation datée (IFFA CREDO, l'Arbresle, France), obtenues à la suite de périodes d'accouplement d'une nuit. Le stade E0 définit le jour d'observation du bouchon vaginal.

La technique d'isolement cellulaire associe à la fois une dissociation enzymatique et une dissociation mécanique. Le traitement enzymatique permet de détacher les cellules, mais aussi de nettoyer les membranes de tout résidu de tissu conjonctif et de la lame basale, de sorte que les cellules puissent coller au fond de la boîte et à la pipette lors de l'enregistrement.

- 1) La souris gestante est sacrifiée par dislocation cervicale. Les fœtus sont prélevés par césarienne et sacrifiés par décapitation. La dissection se déroule ensuite dans une solution de Tyrode. Sous loupe binoculaire, la cage thoracique est prélevée ; la peau, les muscles intercostaux, le sternum et la colonne vertébrale sont ôtés, de façon à ne conserver que les côtes et muscle intercostaux en deux demi cages.
- 2) Pour la dissociation enzymatique, quatre demi cages sont incubées dans 1 ml de solution PBS (phosphate buffer saline ; Sigma, St Quentin Fallavier, France) contenant 3 mg/ml de collagénase (type I, Sigma) et 1mg/ml de trypsine (type III, Sigma), pendant environ 12 min, dans un bain marie à 37 C. La réaction est interrompue par le rinçage des muscles dans une solution de Tyrode. Les muscles sont stockés dans cette solution de Tyrode à une température de 4°C pendant environ 1h avant utilisation.
- 3) La dissociation mécanique est réalisée par trituration douce à l'aide d'une pipette de large diamètre, dans des boîtes de culture en plastique (Corning) de 35 mm de diamètre contenant du Tyrode. Les cellules adhèrent spontanément au fond de la boîte. Les expériences sont ensuite réalisées à température ambiante.

## I.2 Préparation des fibres musculaires squelettiques adultes

Les fibres musculaires squelettiques adultes sont isolées à partir de muscles prélevés sur souris mâles Swiss OF1 (IFFA CREDO, l'Arbresle, France), âgées de 4 à 8 semaines. Les muscles utilisés sont les *flexor digitorum brevis* (*fdb*), localisés dans la plante des pattes postérieures de la souris.

Après sacrifice de l'animal par dislocation cervicale, les muscles sont disséqués sous loupe binoculaire, dans une solution de Tyrode. Pour la dissociation enzymatique, les deux *fdb* sont incubés au bain marie à 37°C pendant 55 à 75 min, dans 3 ml de solution de Tyrode contenant 3mg/ml de collagénase (type I, Sigma). La réaction est stoppée par le rinçage des muscles dans une solution de Tyrode dépourvue de collagénase. Les muscles sont stockés dans cette solution de Tyrode à une température de 4°C jusqu'à utilisation (au maximum 24h après dissociation). La dissociation mécanique est réalisée par trituration douce, à l'aide d'une pipette de large diamètre, directement dans la cuve expérimentale, remplie d'un milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau fœtal (MI199 ; Eurobio, France). Le fond de la cuve consiste en une lamelle de verre scellée par de la graisse silicone (graisse silicone 70428 ; Rhône-Poulenc, Saint Fons, France), et complètement recouverte d'une fine couche de ce matériau translucide ; les cellules n'adhèrent pas sur ce matériau. La présence d'un milieu de culture est à ce stade indispensable : en présence d'une simple solution de Tyrode, la plupart sinon toutes les fibres développent une contracture irréversible lorsqu'elles entrent en contact avec la graisse silicone (Jacquemond, 1997).

Les expériences sont ensuite réalisées à température ambiante.

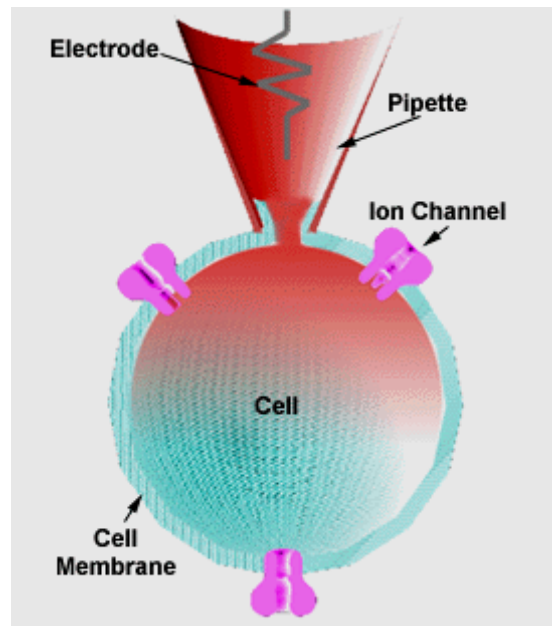
## II Électrophysiologie

### II.1 Cellules musculaires squelettiques fœtales : la technique de *patch-clamp*

#### II.1.1 Principe de la technique

La technique du *patch-clamp*, mise au point par Sakmann et Neher au milieu des années soixante-dix, permet d'atteindre un niveau de résolution tel que des courants de très faible amplitude (de l'ordre du pA) peuvent être enregistrés. Elle consiste à isoler électriquement une surface réduite de membrane (patch), de quelques  $\mu\text{m}^2$ , sous la pointe d'une micropipette de verre, remplie d'une solution conductrice et contenant une électrode reliée à un amplificateur. Cette électrode permet à la fois de contrôler le potentiel de membrane et de mesurer les courants. La principale différence par rapport à l'électrophysiologie intracellulaire classique est l'obtention d'un *seal*, c'est à dire d'un scellement verre/membrane, dont la résistance est de l'ordre du G $\Omega$ . Ce *seal* réduit le bruit de fond provoqué par des fuites de

(a)



(b)



**Figure 28 : La technique du *patch-clamp* appliquée aux cellules musculaires squelettiques de fœtus de souris.**

(a) Le *patch-clamp* en configuration cellule entière. (b) Photographie en microscopie optique d'une fibre musculaire intercostale de fœtus de souris à E18. On peut deviner l'ombre de la micropipette à droite de la photographie.



courant non spécifiques entre la micropipette et la membrane. Il est obtenu en appliquant une légère succion à la membrane via la pipette.

Dans notre étude, la technique du *patch-clamp* est utilisée en configuration « cellule entière », qui permet l'enregistrement de courants macroscopiques, générés par l'ensemble des canaux ioniques de la cellule (Figure 28). Cette configuration est obtenue par application d'une succion supplémentaire, qui provoque la rupture du patch de membrane sous la micropipette, mais sans compromettre le *seal*. L'intérieur de la cellule est alors dialysé par la solution contenue dans la pipette. Cette dialyse permet le contrôle de la composition ionique du milieu intracellulaire. Cependant, l'équilibre entre le milieu intracellulaire et le milieu intrapipette n'est pas atteint instantanément.

### II.1.2 Montage expérimental

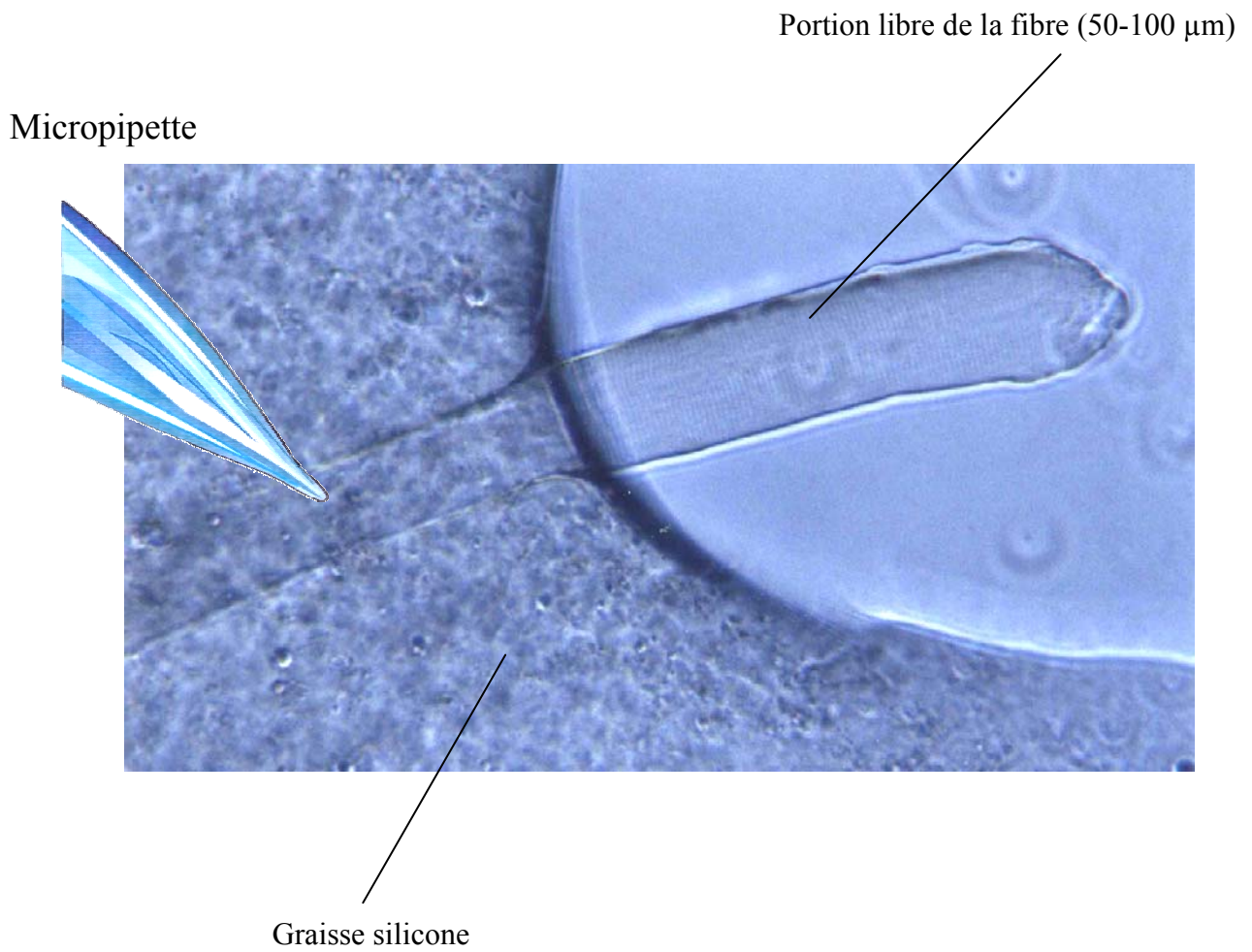
Les micropipettes sont obtenues en étirant en deux étapes un tube hématocrite en verre mou (assemblage Na-Si), de 1.5 mm de diamètre externe (Drummond scientifique et co), à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige Sc Instrument Lab, modèle pp83). Une fois remplies de milieu intrapipette, la résistance électrique de ces micropipettes varie d'environ 2 à 5 MΩ.

Les variations de potentiel membranaire, les courants macroscopiques et les mouvements de charge sont enregistrés à l'aide d'un amplificateur de *patch-clamp* (modèle Axopatch 200B ; Axon Instrument, Foster City, CA, USA). Le courant de fuite et la capacité linéaire (pour les enregistrements de mouvements de charges) sont compensés au niveau de l'amplificateur. La résistance série ( $R_s$ ) est compensée de manière analogique, proche du point d'oscillation de l'amplificateur. La chute de potentiel due à la  $R_s$  ( $R_s \times I_{max}$ ) a été vérifiée pour chaque cellule et ne dépasse jamais 6 mV (valeur moyenne :  $2.66 \pm 0.14$  mV,  $n=102$ ). Le délai nécessaire pour charger le condensateur membranaire ( $R_s \times C_m$ ) ne dépasse jamais 0.70 ms (valeur moyenne :  $0.40 \pm 0.01$  ms,  $n=120$ ). Les stimulations (saut de potentiel et injection de courant) et l'acquisition des données sont réalisées à l'aide d'un convertisseur, respectivement numérique/analogique et analogique/numérique (Digidata 1200), piloté par le logiciel pCLAMP (Axon Instrument, Foster City, CA, USA). Des précisions quant aux protocoles d'enregistrement pourront être trouvées dans l'article 1.

### II.1.3 Analyse des résultats

Les données sont analysées par les logiciels pCLAMP (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) et Sigmaplot (Jandel, San Rafael, CA, USA).

Classiquement, les valeurs de courant et de quantités de charges déplacées sont exprimées en fonction de la capacité membranaire de la cellule, qui est proportionnelle à la surface cellulaire ( $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$  ; Fatt & Katz, 1951). Cette procédure permet de comparer les résultats



**Figure 29 : Photographie d'une fibre musculaire partiellement recouverte de graisse silicone en microscopie optique.**

L'insertion de la micropipette à travers le silicone est symbolisée en haut à gauche.

entre eux, en s'affranchissant du biais introduit par les variations de taille des cellules. Dans notre cas, l'application de l'agent séquestrant le cholestérol provoquait une perte de surface membranaire au niveau des invaginations, et donc une diminution de la capacité, que nous voulions prendre en compte dans l'analyse de nos résultats. Ainsi, les valeurs brutes sont données. Cependant, nous nous sommes assurés de l'homogénéité de taille entre les cellules contrôles et traitées. Les cellules ont été photographiées en microscopie optique à contraste de phase avec un grossissement de 320×. Leur périmètre a été mesuré grâce au logiciel Lucia Analysis (Nikon, Champigny sur Marne, France). En considérant la cellule comme un cylindre à bout plat, nous avons pu calculer, à partir de cette valeur, une surface membranaire apparente, nommée surface visuelle, qui, compte tenu de la résolution de la méthode, ne tient pas compte des invaginations. Cette surface n'est pas significativement différente entre les deux types de cellules ( $10773 \pm 510 \mu\text{m}^2$  et  $10106 \pm 533 \mu\text{m}^2$  respectivement pour les cellules contrôles et traitées).

La courbe de voltage-dépendance du courant calcique de type L est ajustée par l'équation :

$$I_L(V) = G_{\max}(V - V_{\text{rev}}) / \{1 + \exp[(V_{1/2,G} - V)/k_G]\}$$

*équation 1*

où  $I_L(V)$  représente l'amplitude maximale du courant en réponse à une dépolarisation au potentiel  $V$ ,  $V_{\text{rev}}$  le potentiel d'inversion apparent,  $G_{\max}$  la conductance maximale,  $V_{1/2,G}$  le potentiel de demi-activation, et  $k_G$  un facteur de pente.

La courbe de voltage-dépendance de la conductance calcique est calculée par l'équation 2, en utilisant la valeur de  $V_{\text{rev}}$  donnée par l'équation 1 :

$$G(V) = I(V)/(V - V_{\text{rev}})$$

*équation 2*

Le décours du courant calcique de type L est ajusté par la somme de deux exponentielles suivant l'équation :

$$I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + C$$

où  $I(t)$  est l'intensité à un instant  $t$ ,  $\tau_1$  et  $\tau_2$  les constantes de temps pour les deux composantes du décours du courant,  $C$  le courant résiduel,  $A_1$  et  $A_2$  les amplitudes de chaque composante.

Pour chaque cellule, les voltage-dépendances de la conductance calcique ( $G$ ), des mouvements de charges ( $Q$ ) et des variations de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ) sont ajustées suivant l'équation de Boltzman :

$$X(V) = X_{\max} / \{1 + \exp[-(V_{1/2,X} - V)/k]\}$$

où  $X_{\max}$  correspond à  $G_{\max}$ ,  $Q_{\max}$  ou  $F_{\max}$  ;  $V_{1/2,X}$  est le potentiel auquel  $X = X_{\max}/2$  ; et  $k$  est un facteur de pente.

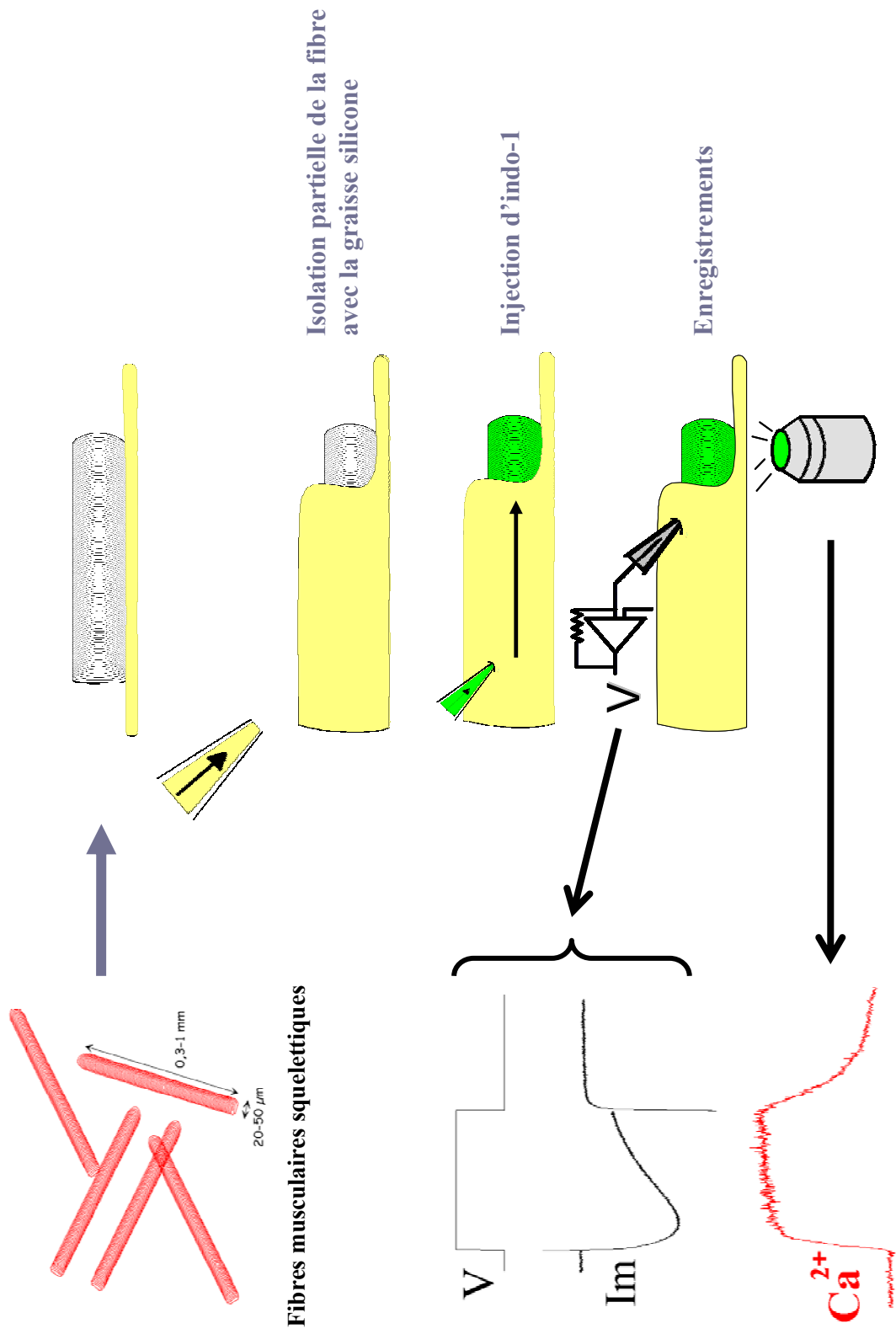


Figure 30 : La technique du *silicone-clamp*.

## II.2 Fibres musculaires squelettiques adultes : la technique de *silicone clamp*

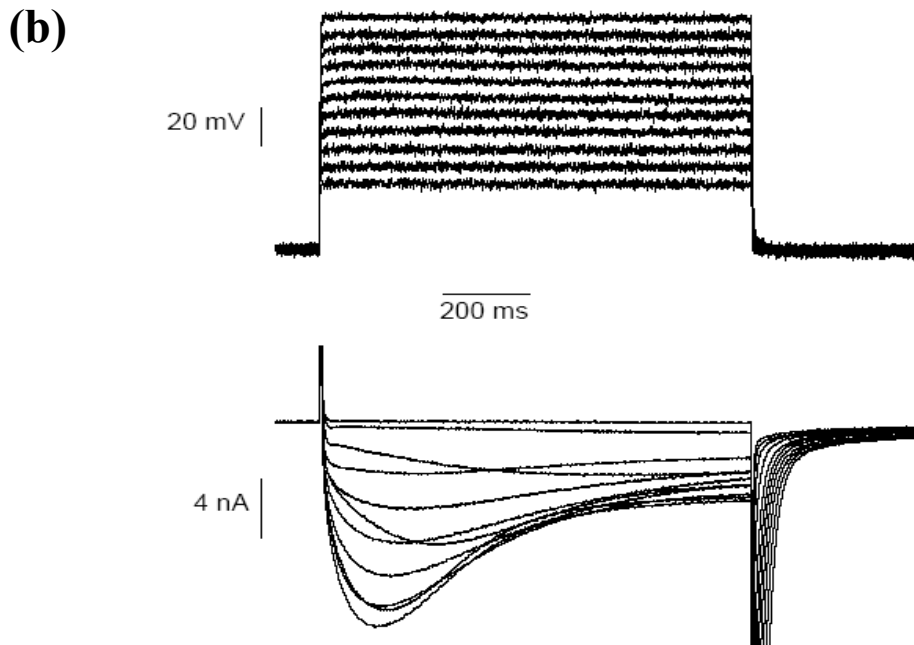
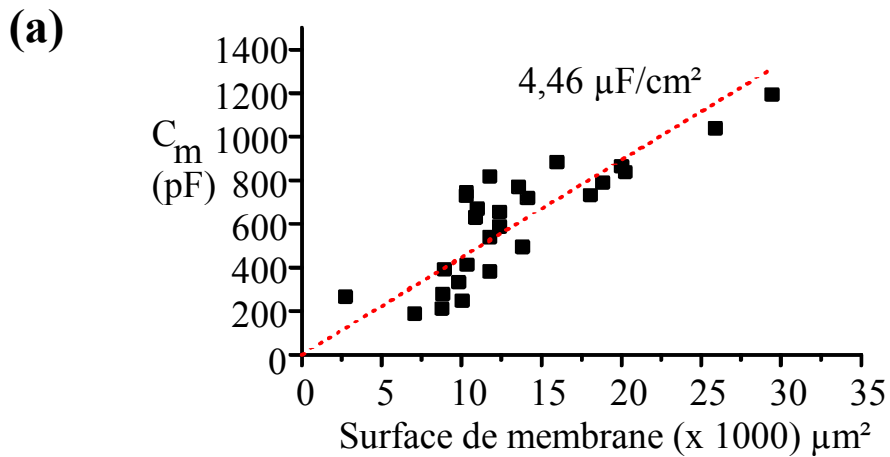
### II.2.1 Principe de la technique

Les fibres musculaires squelettiques isolées à partir du *fdb* de souris adultes ont une longueur de l'ordre de 0.3 à 1 mm, et un diamètre de 20 à 50  $\mu\text{m}$ . Cette taille importante, ajoutée à la présence du système tubulaire transverse qui représente  $4.5 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  de surface de sarcolemme (Jacquemond, 1997), ne permet pas d'imposer un potentiel uniforme à l'intégralité de la membrane avec une simple électrode de *patch-clamp*. De plus, les contractions importantes susceptibles de se développer en réponse à des dépolarisations supraliminaires compromettent la possibilité de maintenir un *seal* entre la pointe de la micropipette et la membrane cellulaire. Nous avons donc utilisé une technique qui permet de s'affranchir de ces problèmes : la technique de *silicone-clamp* (Jacquemond, 1997).

Le principe de la technique consiste à réduire la surface de membrane interrogée à l'aide d'une graisse silicone isolante (graisse silicone 70428 ; Rhône-Poulenc, Saint Fons, France). Les fibres musculaires reposent sur le fond de la cuve expérimentale, qui est recouvert d'une fine couche de graisse silicone. De la graisse silicone est également appliquée sur et autour de la fibre à l'aide d'une micropipette de verre dont l'extrémité cassée présente un diamètre de l'ordre de 30  $\mu\text{m}$ . L'écoulement de la graisse hors de la micropipette est provoqué par une pression générée par un système de microinjection (Picospritzer II ; General Valve Corporation, Fairfield, NJ, USA). Au terme de cette opération, une gaine de graisse silicone maintient mécaniquement et isole électriquement la majeure partie de la fibre, ne laissant au contact de la solution extracellulaire qu'une portion restreinte de l'une de ses extrémités, d'une longueur de 50 à 100  $\mu\text{m}$  (Figure 29). La taille de la portion libre est vérifiée à l'aide d'un oculaire micrométrique. La capacité membranaire mesurée est proportionnelle à cette taille (Figure 31).

La pointe d'une micropipette (assemblage B-Si), contenant l'électrode connectée à l'amplificateur, est insérée, à travers la graisse, dans le cytoplasme de la fibre, à une distance inférieure à 150  $\mu\text{m}$  de la portion libre. La graisse silicone permet d'éviter les fuites de courant entre la pointe de la micropipette et le milieu extracellulaire (Figure 30). Elle représente l'équivalent du *seal* obtenu en *patch-clamp* entre la membrane et la pipette. Lorsque la pointe est insérée à travers la membrane de la fibre, on observe le courant transitoire capacitif caractéristique lors des sauts de potentiels. La configuration d'enregistrement s'apparente donc à la configuration « cellule entière » classique du *patch-clamp*. La micropipette est remplie d'une solution de composition très proche de celle du milieu intracellulaire. Une fois remplie de cette solution, sa résistance varie d'environ 1 à 3  $\text{M}\Omega$ . Cette technique permet un bon contrôle du potentiel membranaire, comme l'illustre la figure 31.

Au-delà de l'intérêt électrophysiologique, cette préparation permet d'effectuer des microinjections intracellulaires sans léser la portion de fibre enregistrée. La pointe de la micropipette d'injection est insérée dans la portion isolée de la fibre, à travers la couche de



**Figure 31 : Enregistrements électrophysiologiques en *silicone-clamp*.**

(a) Capacité de membrane en fonction de la surface apparente de la portion libre de fibre musculaire (d'après Jacquemond, 1997) . (b) Fiabilité du contrôle du potentiel de membrane. La pipette reliée à l'amplificateur permet de déclencher des dépolarisations membranaires et d'enregistrer simultanément les courants qui en résultent. Une seconde microélectrode intracellulaire permet ici de suivre les variations de potentiel en réponse à des dépolarisations d'amplitude croissante (durée 1s,  $\Delta V$  de 50 à 120 mV à partir d'un potentiel de maintien de -100 mV). Les résultats montrent que la technique permet un contrôle correct du potentiel de membrane (tracé du haut) même lorsque le courant calcique s'écoule;

graisse silicone. La microinjection est utilisée en routine pour charger la fibre avec l'indicateur fluorescent, ou tester l'effet de l'application intracellulaire d'agents pharmacologiques. D'autres potentialités de cette technique sont développées dans l'article 4 placé en annexe (*Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under « Silicone Voltage-Clamp » conditions*).

L'âge de l'animal dont proviennent les fibres musculaires est un critère déterminant de la réussite de l'expérience. Il définit la taille des cellules, qui ne doivent ni être trop fines, pour permettre une manipulation aisée lors des étapes de recouvrement et d'injection, et ni trop grosses, pour que la portion libre présente une surface restreinte. Cependant, bien que délicate à mettre en œuvre, la technique est également applicable à des cellules aussi fines que les cellules musculaires squelettiques de fœtus de souris au stade E18 (diamètre de 10  $\mu\text{m}$ ).

### **II.2.2 Montage expérimental**

Les courants macroscopiques et les mouvements de charge sont enregistrés à l'aide d'un amplificateur de *patch-clamp* en configuration « cellule entière » (modèle RK-400 ; Bio-Logic, Claix, France). La stimulation de la préparation (sauts de potentiel) et l'acquisition des données sont réalisées à l'aide d'un convertisseur, respectivement numérique/analogique et analogique/numérique (Lab Master DMA board ; Scientific Solutions Inc., Mentor, OH, USA), piloté par le logiciel Biopatch Acquire (Bio-logic). La résistance série ( $R_s$ ) est systématiquement compensée de manière analogique, proche du point d'oscillation de l'amplificateur.

### **II.2.3 Analyse des résultats**

Les données sont analysées par le logiciel Microcal Origin version 7 (Originlab, Northampton, MA, USA). Les valeurs de courant et de quantités de charges déplacées sont rapportées à la capacité cellulaire. Pour l'analyse des courants calciques, de mouvements de charges, et du flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$ , les mêmes équations que pour les cellules fœtales ont été utilisées.

## **III La détection de calcium intracellulaire**

Les techniques d'évaluation des variations de calcium intracellulaire consistent à détecter un signal qui est corrélé à la concentration de calcium à l'intérieur de la cellule. Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé un signal émis par des indicateurs fluorescents sensibles au calcium.

### III.1 Les indicateurs fluorescents

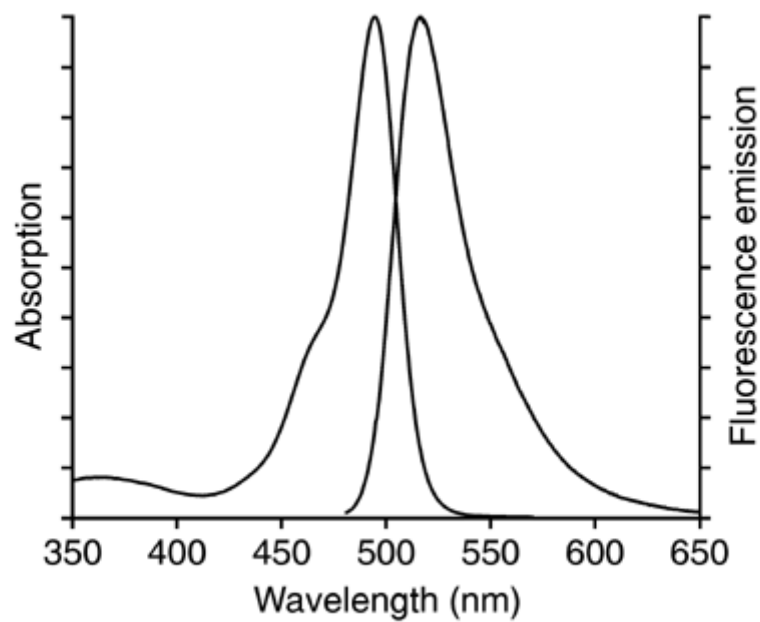
L'utilisation des indicateurs calciques fluorescents s'est considérablement accrue depuis les années 80, avec le développement de nouvelles molécules. La plupart des indicateurs utilisés sont synthétisés sur le modèle du chélateur d'ions divalents BAPTA, qui provient d'une modification chimique de la molécule d'EGTA. Le BAPTA présente, comme l'EGTA une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $Kd = 0.1 \mu\text{M}$  en solution saline), mais sa liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  est peu sensible au pH (entre 6.0 et 8.0). Comme l'EGTA, le BAPTA a une stoechiométrie de fixation pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de 1 : 1, et une sélectivité pour le  $\text{Ca}^{2+}$   $10^5$  fois supérieure à celle pour le  $\text{Mg}^{2+}$ , ce qui en fait un indicateur calcique utilisable en présence de concentrations physiologiques de ces deux ions ( $[\text{Mg}^{2+}]$   $10^3$  à  $10^4$  fois supérieures à  $[\text{Ca}^{2+}]$ ). Divers fluorophores ont été attachés au BAPTA, produisant une famille d'indicateurs qui présentent différentes affinités et propriétés optiques. Le choix de l'indicateur dépend des caractéristiques du signal à mesurer (amplitude, répartition, cinétique de variation, etc.), du niveau de résolution spatiale et temporelle souhaitée, et du caractère quantitatif ou qualitatif de l'information recherchée.

### III.2 Cellules musculaires squelettiques fœtales : le fluo-4

#### III.2.1 Principe de la technique

Excité à une longueur d'onde de 488 nm (domaine du visible, gamme des bleus), le fluo-4 émet une fluorescence dont le spectre est centré autour de 543 nm (gamme des verts). La fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'indicateur provoque un accroissement de l'intensité de la fluorescence émise. Il n'y a pas de déplacement du spectre d'émission : le fluo-4 est un indicateur non-ratiométrique. Dans le cadre de notre travail, aucune calibration de l'indicateur n'a été réalisée. Ainsi, les valeurs sont exprimées en variations de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ), où  $\Delta F$  est la variation de l'intensité de la fluorescence émise,  $F_0$  l'intensité initiale.





**Spectres d'excitation et d'émission du fluo-4**

### III.2.2 Montage expérimental

Le fluo-4 présente une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d$  mesuré à quelques centaines de nM *in vitro*) ; il est donc parfaitement adapté à l'étude de faible  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans la fibre musculaire. Cependant, cette propriété nécessite de l'utiliser à des concentrations faibles pour éviter qu'il ne se comporte comme un tampon calcique. Les cellules sont incubées 1 h à température ambiante dans une solution contenant 5  $\mu\text{M}$  de fluo-4 acétoxyméthyl ester (fluo-4 AM ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Le fluo-4 AM est une molécule dont les groupements carboxyliques ont été modifiés avec le groupement AM. Cette modification chimique permet d'obtenir une molécule non chargée qui peut traverser la bicouche lipidique. Une fois dans la cellule, le groupe lipophile est coupé par des estérases non spécifiques, produisant une molécule chargée, qui reste majoritairement piégée dans le cytoplasme.

Les transitoires calciques sont enregistrés en mode *line-scan* en utilisant un microscope confocal, constitué d'un microscope inversé Olympus avec un objectif 20 $\times$  et d'un module confocal Fluoview (Olympus, Melville, NY, USA). Le faisceau de longueur d'onde 488 nm, nécessaire à l'excitation du fluo-4, est produit par un laser argon de 5 mW atténué de 6-20 %. La longueur d'onde d'excitation est séparée de la longueur d'onde d'émission par un miroir dichroïque 488/543 suivi de filtres passe-haut à 510 nm. Les dimensions d'une image en *line-scan* sont de 512 pixels par ligne (taille du pixel : 0.25  $\mu\text{m}$ ) et de 1000 lignes par image. La résolution de l'axe en Z est de 0.8  $\mu\text{m}$ , la vitesse de *scan* de 2.05 ms par ligne de 512-pixels. L'intensité de fluorescence spécifique  $F$  et moyennée sur l'intégralité de la largeur de la

cellule. L'intensité de la fluorescence initiale  $F_0$  est moyennée de la même manière, sur la même surface d'image, mais avant stimulation. Les résultats sont exprimés en  $\Delta F/F_0$ , soit  $(F - F_0)/F_0$ . Les courbes d'intensité de pixel en fonction du temps et de l'espace ont été directement obtenues des images en *line-scan* avec les outils fournis par le National Institutes of Health-Images 1.6 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Un poste complet de *patch-clamp* a été couplé au microscope confocal pour contrôler le potentiel de membrane et appliquer les pulses dépolarisants.

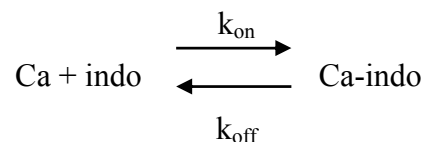
### III.3 Fibres musculaires squelettiques adultes : l'indo-1

#### III.3.1 Principe de la technique

Des calculs de  $[Ca^{2+}]_i$  ayant été réalisés à partir des mesures de fluorescence effectuées avec l'indo-1, les aspects théoriques de la technique de mesure de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'aide de cet indicateur seront abordés de manière plus développée qu'ils ne l'ont été pour le fluo-4.

##### III.3.1.1 Liaison du calcium à l'indo-1

La fixation du  $Ca^{2+}$  à l'indo-1 selon une stoechiométrie 1:1 est caractérisée par la réaction suivante :



$k_{on}$  et  $k_{off}$  correspondent respectivement aux constantes de vitesse d'association et de dissociation de la réaction. La vitesse à laquelle la concentration de complexe Ca-indo varie est donnée par :

$$d[Ca-indo] / dt = k_{on} \cdot [Ca] \cdot [indo] - k_{off} \cdot [Ca-indo]$$

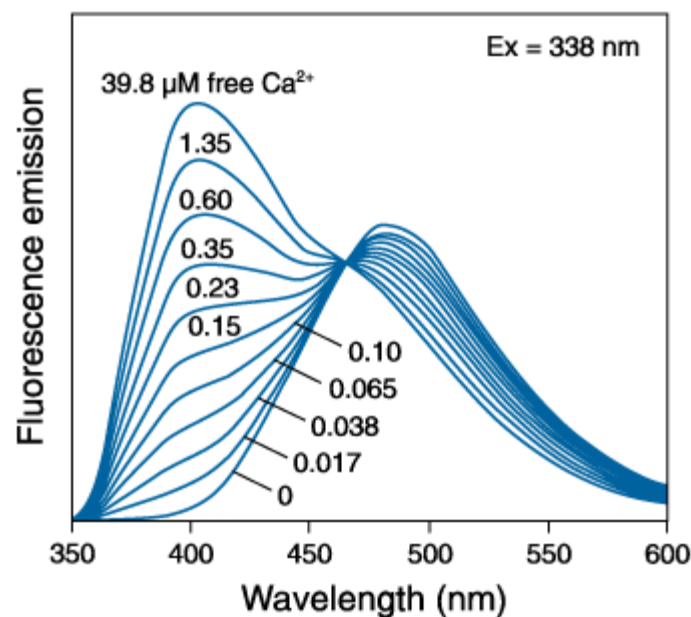
Dans l'ensemble de ce travail, nous avons considéré que la réaction entre la  $Ca^{2+}$  et l'indo-1 s'équilibre instantanément ( $d[Ca-indo] / dt = 0$ ), et aucune correction cinétique n'a été faite. Ainsi, nous avons utilisé la constante de dissociation à l'équilibre ( $Kd$ ) :

$$Kd = k_{off}/k_{on} = [Ca] \cdot [indo] / [Ca-indo]$$

Le  $Kd$  de l'indo-1 pour le  $Ca^{2+}$  est de quelques centaines de nM (350 nM dans nos conditions ; Jacquemond, 1997). Ainsi, l'indo-1 présente une forte affinité pour le  $Ca^{2+}$ , ce qui en fait un indicateur particulièrement adapté aux mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  proche du niveau de repos dans la fibre musculaire. Cependant, il doit, en conséquence, être utilisé à des concentrations faibles, pour éviter qu'il ne se comporte comme un tampon calcique intracellulaire. De plus, le niveau maximal de saturation de l'indicateur peut être atteint lors d'une stimulation de la fibre, ce qui pose un problème majeur d'estimation de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

### III.3.1.2 Calcul de la concentration de calcium à partir de l'indo-1

L'indo-1 est un indicateur excitable en lumière ultraviolette (UV, longueur d'onde d'excitation théorique de 338 nm, 335 dans nos conditions expérimentales), mais dont le spectre d'émission couvre une partie de la gamme du visible, notamment la gamme des bleus. La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'indo-1 se traduit par un déplacement de son spectre d'émission : l'indo-1 est un indicateur ratiométrique. Son spectre d'émission est centré autour de 475 nm en milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$ , et de 400 nm lorsqu'il est saturé en  $\text{Ca}^{2+}$ . Nous avons mesuré l'intensité de fluorescence à 470 nm et à 405 nm.



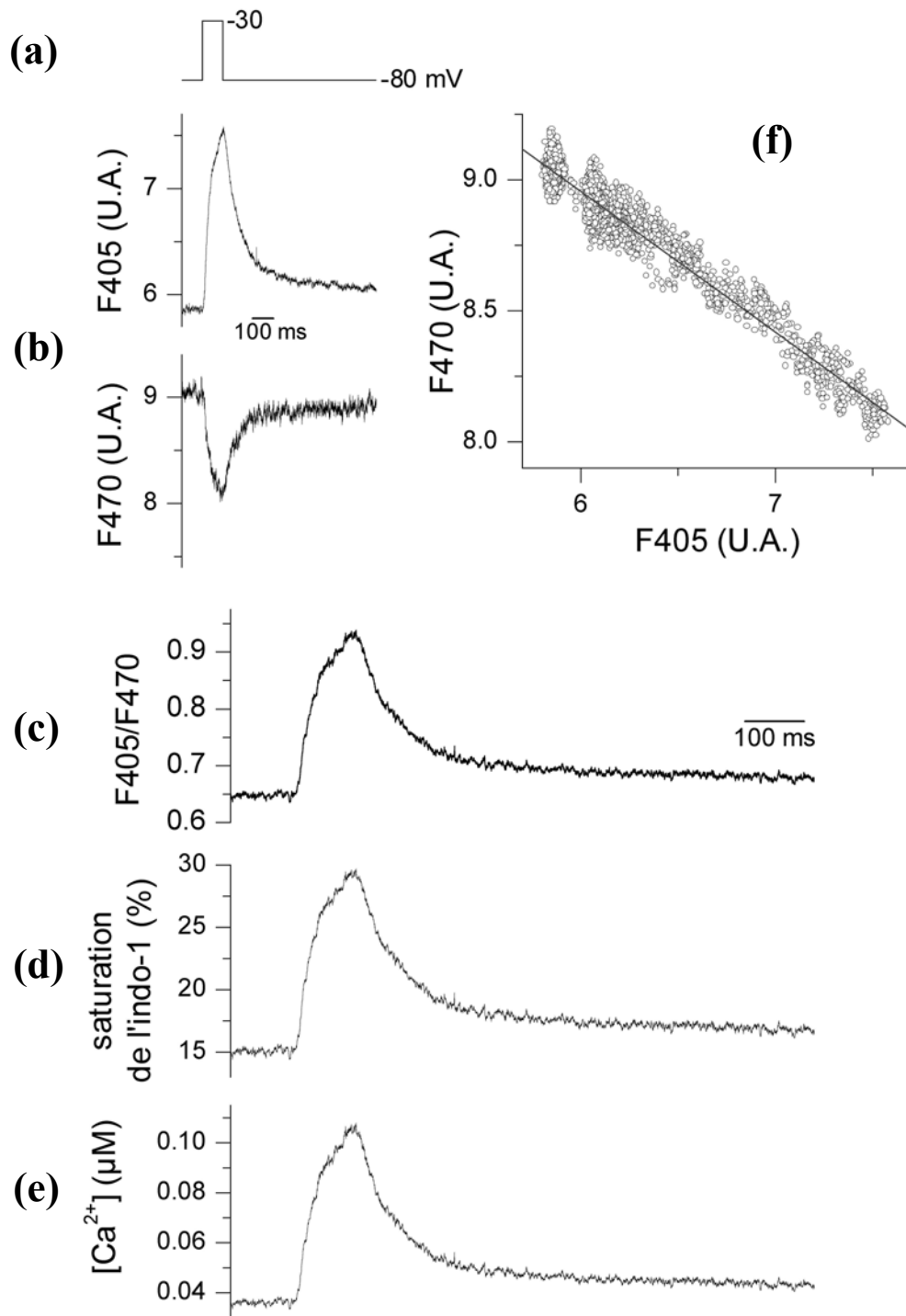
#### Spectres d'émission de l'indo-1 ( $\lambda_{\text{ex}}=338\text{nm}$ ) en présence de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre de 0 à 39.8 $\mu\text{M}$ .

Le rapport des intensités de fluorescence mesurées simultanément à ces deux longueurs d'onde permet de calculer la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en s'affranchissant des problèmes liés aux artefacts de mouvements, à l'épaisseur de la cellule, à la concentration de l'indicateur dans la cellule et à la sensibilité de l'instrument (Grynkiewicz et coll., 1985). On suppose que ces deux paramètres sont suffisamment faibles pour que la contribution à la fluorescence de chaque espèce moléculaire présente dans le milieu soit proportionnelle à sa concentration.

Soit  $F_x$  l'intensité de fluorescence mesurée à une longueur d'onde  $x$  :

$$F_{470} = S_{l470} \times C_l + S_{c470} \times C_c \quad \text{et} \quad F_{405} = S_{l405} \times C_l + S_{c405} \times C_c$$

où  $C_l$  et  $C_c$  représentent les concentrations d'indo-1 respectivement sous forme libre ou complexée au  $\text{Ca}^{2+}$ , et  $S_{l405}$ ,  $S_{c405}$ ,  $S_{l475}$ ,  $S_{c475}$  des coefficients de proportionnalités pour l'indicateur libre et complexé aux longueurs d'onde 405 nm et 470 nm.



**Figure 32 : Calcul du transitoire calcique à partir des signaux de fluorescence obtenus en réponse à une dépolarisation par la technique du *silicone-clamp*.**

(a) Dépolarisation imposée. (b) Signaux de fluorescence enregistrés à 405 et 470 nm. (c) Rapport  $F_{405}/F_{470}$ . (d) Pourcentage de saturation de l'indicateur. (e) Transitoire calcique. (f) Pente de la fonction  $F_{470} = m \cdot F_{405} + \text{constante}$  permettant d'évaluer le paramètre de calibration  $\beta$ .

$$S_{xx} = I_{ex} \times \ln 10 \times \varepsilon \times e \times RQ \times Z$$

où  $I_{ex}$  représente l'intensité d'excitation,  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire,  $e$  l'épaisseur de la préparation,  $RQ$  le rendement quantique (rapport du nombre de photons de fluorescence émis sur le nombre de photons absorbés lors de l'excitation), et  $Z$  un facteur lié à l'efficacité de collection de la lumière par le système de détection.

La fixation du  $Ca^{2+}$  à l'indo-1 suit une stœchiométrie 1:1 ;  $C_l$  et  $C_c$  sont donc corrélés à  $[Ca^{2+}]$  par l'équation suivante :

$$C_l = C_c [Ca^{2+}] / Kd$$

Le rapport  $R = F_{470} / F_{405} = (S_{l470} \times C_l + S_{c470} \times C_c) / (S_{l405} \times C_l + S_{c405} \times C_c)$  soit :

$$R = (S_{l470} + S_{c470} [Ca^{2+}] / Kd) / (S_{l405} + S_{c405} [Ca^{2+}] / Kd)$$

La  $[Ca^{2+}]$  peut donc être exprimée suivant l'équation :

$$[Ca^{2+}] = Kd \left( \frac{R - (S_{l470}/S_{l405})}{(S_{c470}/S_{c405}) - R} \right) (S_{l405}/S_{c405})$$

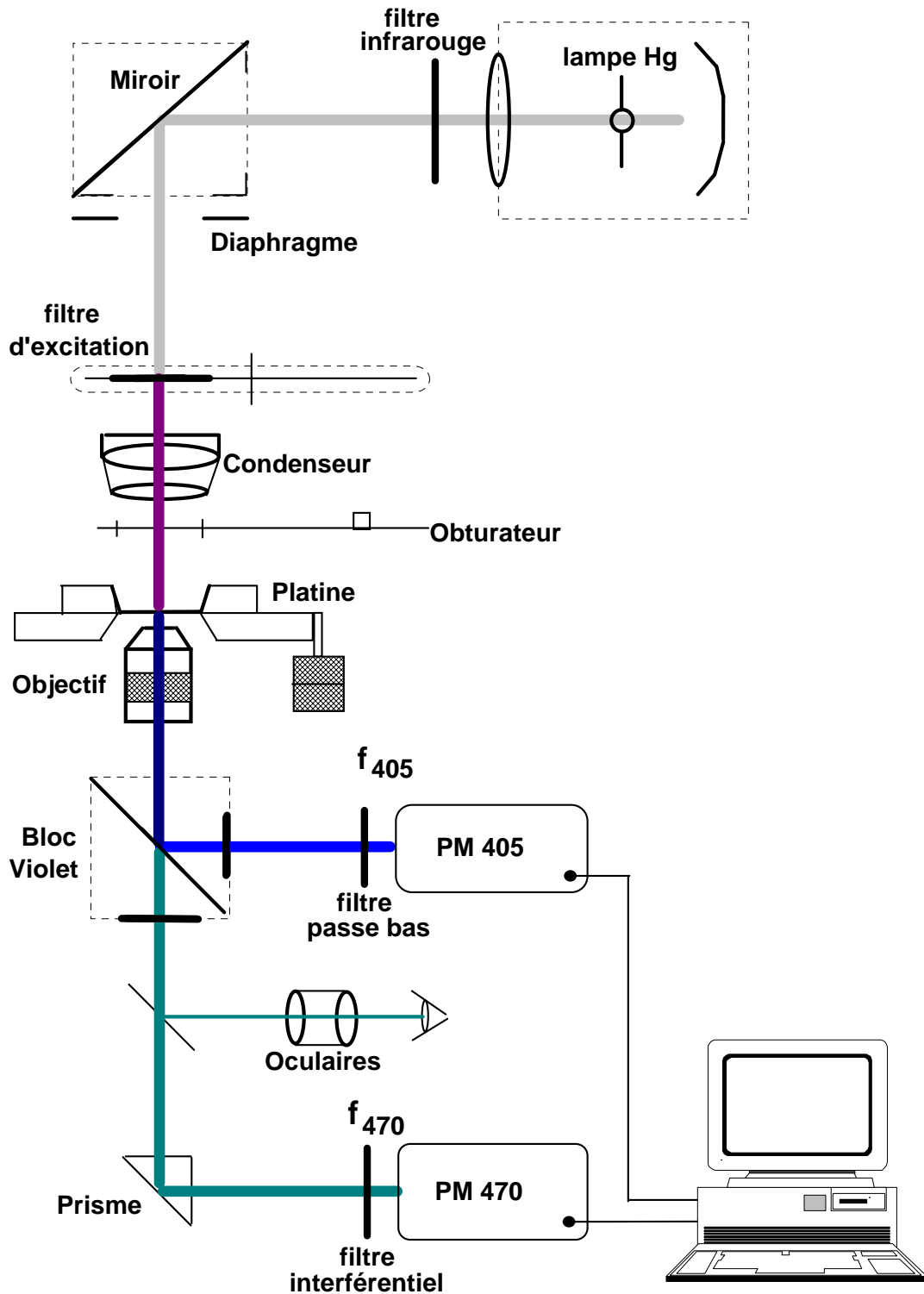
$S_{l470}/S_{l405}$  est ici la valeur limite  $R_{min}$  que  $R$  peut prendre si  $[Ca^{2+}] = 0$ ,  $S_{c470}/S_{c405}$  la valeur limite  $R_{max}$  de  $R$  pour des concentrations saturantes de  $Ca^{2+}$ .  $(S_{l405}/S_{c405})$  est traditionnellement appelé  $\beta$ . La relation permettant le calcul de  $[Ca^{2+}]$  à partir de  $R$  est traditionnellement donnée sous la forme :

$$[Ca^{2+}] = Kd \times \beta \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

Le pourcentage de saturation de l'indicateur est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ saturation} = 100 / \left( 1 + \frac{R_{max} - R}{(\beta \times R) - ((\beta \times R_{min}))} \right)$$

Les valeurs de  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  et  $\beta$  sont mesurées par calibration, sur le même dispositif optique que celui utilisé pour les mesures, et dans les conditions les plus proches possibles de celle du milieu intracellulaire. Le détail des différentes étapes permettant le calcul du transitoire calcique à partir des signaux de fluorescences est illustré dans la figure 32.



**Figure 33: Dispositif optique permettant la mesure de fluorescence à deux longueurs d'onde d'émission 405 (F405) et 470 (F470) nm.**

Les fibres musculaires isolées sont déposées dans la cuve expérimentale au niveau de la platine du microscope. PM : photomultiplicateur.

### III.3.2 Montage expérimental

#### III.3.2.1 Injection de l'indo-1

Au début de l'expérience, l'indo-1 est introduit dans la fibre par micro-injection par pression, à l'aide d'une pipette contenant 0.5 mM d'indo-1 dilué dans du milieu intrapipette. Les injections sont réalisées de manière à ce que seule une fraction restreinte (environ 1/5) du volume de la fibre apparaisse fluorescente à la fin de l'injection. Un délai de 1 h est ensuite systématiquement respecté avant enregistrement, pour permettre à l'indicateur de diffuser jusqu'à être distribué de manière homogène dans l'ensemble du volume cellulaire. L'injection d'indo-1 permet de s'affranchir des inconvénients liés à l'utilisation de la forme indo-1 AM, notamment 1) la possibilité d'un compartimentage intracellulaire de l'indicateur, 2) l'existence d'une fluorescence « parasite » due à une fraction résiduelle d'indicateur estérifié, 3) la présence d'une fluorescence de fond importante due à la fixation de l'indicateur sur des débris cellulaires présents sur le fond de la cuve. L'excitation de l'indo-1 n'est effectuée que lors de l'enregistrement pour éviter la destruction du fluorophore (*photobleaching*).

#### III.3.2.2 Dispositif de fluorescence

Le dispositif optique utilisé a été développé au sein du laboratoire par le Pr. J.C. Bernengo et le Dr. C. Ojeda (Figure 33). À l'inverse de la plupart des systèmes optiques de ce type, qui fonctionnent généralement en épifluorescence, notre système fonctionne en diafluorescence : la lumière d'excitation (UV) ne passe pas par l'objectif. Le dispositif a été construit sur la base d'un microscope inversé originalement conçu pour l'épifluorescence (Nikon Diaphot). La lampe originale, disposée au sommet du microscope, a été remplacée par une lampe à vapeur de mercure (USH-102DH Ushio). Une roue à filtres permet de passer d'un mode d'observation à un mode d'excitation. En mode observation, le faisceau lumineux est dirigé sur un filtre à densité neutre pour réduire l'intensité de lumière et préserver la vue de l'expérimentateur. En mode excitation, ce filtre est remplacé par un filtre interférentiel centré à 335 nm, fournissant ainsi la longueur d'onde d'excitation pour l'indicateur fluorescent. Le faisceau lumineux à 335 nm est focalisé sur la préparation à l'aide d'un condensateur en quartz. La fluorescence collectée par l'objectif à grossissement 40x (Olympus DL40) est séparée à 405 et 470 ( $\pm 5$ ) nm à l'aide d'un miroir dichroïque (DM 455, Bloc Violet, NIKON), couplé à des filtres optiques appropriés. La détection aux deux longueurs d'onde est réalisée par deux photomultiplicateurs (PM). Le PM utilisé pour la détection à 405 nm a été placé au niveau de la sortie normalement occupée par la lampe U.V. pour le fonctionnement en épifluorescence, et la détection à 470 nm est réalisée au niveau de la sortie latérale du microscope. Un alignement très rigoureux des différents éléments du système optique a été réalisé afin d'éviter tout artefact et d'obtenir les meilleures performances possibles du dispositif. La détection de fluorescence est réalisée sur un champ de mesure de 40  $\mu\text{m}$  de diamètre. La portion de fibre musculaire libre enregistrée est disposée au centre du champ de

détection de fluorescence. Un poste complet de *silicone-clamp* est couplé à ce dispositif, pour contrôler le potentiel de membrane et appliquer les pulses dépolarisants.

Le module d'acquisition des signaux est contrôlé par le logiciel Biopatch (Bio-Logic, Claix, France) et comprend une carte Labmaster (Scientific Solutions, Solon, OH, USA), installée sur un ordinateur PC 486, et une interface A/D, D/A (LM-125, Bio-Logic, Claix, France). Il permet de numériser et d'acquérir simultanément les signaux de fluorescence et les signaux électrophysiologiques au cours des expériences.

### III.3.2.3 Calibrations de l'indicateur *in vivo*

La fluorescence de fond est mesurée systématiquement aux deux longueurs d'onde (405 et 470 nm), à proximité de chaque fibre musculaire, et soustraite aux mesures de fluorescence effectuées sur la fibre. Ceci permet de s'affranchir de la fluorescence non spécifique. Dans nos conditions d'expériences, l'autofluorescence des cellules est négligeable aux longueurs d'onde considérées, et n'est pas significativement différente de la fluorescence de fond.

Les valeurs de  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  et  $\beta$ , permettant le calcul de  $[Ca^{2+}]$ , ont été déterminées *in vivo*.

- **Calcul de  $R_{min}$  et  $R_{max}$**  : des fibres sont intégralement recouvertes de silicone, et injectées avec de l'indo-1. Après équilibration de l'indicateur dans le volume cellulaire, une solution contenant soit 0.5 M d'EGTA, soit 1 M  $CaCl_2$ , est injectée dans les fibres. Les mesures des rapports de fluorescence sur fibre injectée à l'EGTA (milieu intracellulaire quasiment dépourvu de  $Ca^{2+}$  libre) ou au  $CaCl_2$  (milieu intracellulaire à concentration saturante de  $Ca^{2+}$ ) donnent respectivement  $R_{min}$  et  $R_{max}$ .
- **Calcul de  $\beta$**  : la valeur de  $\beta$  est calculée suivant les principes développés par Bakker et coll. (1993). Il existe une relation linéaire entre les signaux de fluorescence mesurés à 470 nm et 405 nm sur des fibres musculaires pendant une variation de calcium intracellulaire (Figure 32). La pente  $m$  de la régression linéaire ajustée aux points expérimentaux ( $F_{470}$  en fonction de  $F_{405}$ ) permet de calculer le paramètre  $\beta$  d'après l'équation :

$$\beta = (1 - m \cdot R_{max}) / (1 - R_{min})$$

### III.3.3 Analyse des résultats

La figure 32 illustre les différentes étapes permettant de calculer les signaux calciques à partir des signaux de fluorescence enregistrés sur fibre musculaire en réponse à une dépolarisation de 200 ms.



	Type d'enregistrement	Cellules musculaires squelettiques fœtales	Fibres musculaires squelettiques adultes
Milieu intrapipettes	Potentiels d'action	140 KCl, 1 MgCl <sub>2</sub> , 0.5 EGTA, 10 MOPS pH 7.2, ajusté avec KOH	
	Courants calciques	140 CsAsp, 5 MgCl <sub>2</sub> , 5 EGTA, 10 MOPS pH 7.2, ajusté avec CsOH	
	Mouvements de charges	140 NMG-Asp, 5 MgCl <sub>2</sub> , 5 EGTA, 10 MOPS pH 7.2, ajusté avec Asp ou NMG	120 K-Glutamate, 5 Na <sub>2</sub> -ATP, 5 Na <sub>2</sub> -phosphocréatine, 5 Glucose, 5.5 MgCl <sub>2</sub> , 5 HEPES pH 7.2, ajusté avec KOH
	Mesures de fluorescence	140 CsAsp, 5 MgCl <sub>2</sub> , 0.1 EGTA, 10 MOPS pH 7.2, ajusté avec CsOH	
Milieu extracellulaire	Potentiels d'action	140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 1 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES pH 7.4, ajusté avec NaOH	
	Courants calciques	130 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 10 CaCl <sub>2</sub> , 1 MgCl <sub>2</sub> , 0.001 TTX, 10 HEPES pH 7.4, ajusté avec TEA(OH)	140 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES, 0.002 TTX, 1 4-AP pH 7.2, ajusté avec TEAOH
	Mouvements de charges	130 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 10 CaCl <sub>2</sub> , 1 MgCl <sub>2</sub> , 0.001 TTX, 10 HEPES, 0.2 LaCl <sub>2</sub> , 0.5 CdCl <sub>2</sub> pH 7.4, ajusté avec TEAOH	140 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 0.5 CaCl <sub>2</sub> , 4 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES, 0.002 TTX, 1 4-AP, 0.3 LaCl <sub>2</sub> , 0.5 ou 1 CdCl <sub>2</sub> , 0.1 BTS pH 7.2, ajusté avec TEAOH
	Mesures de fluorescence	130 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 10 CaCl <sub>2</sub> , 1 MgCl <sub>2</sub> , 0.001 TTX, 10 HEPES pH 7.4, ajusté avec TEA(OH)	140 TEA-MeSO <sub>3</sub> , 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES, 0.002 TTX pH 7.2, ajusté avec TEAOH
	<b>Tyrode</b>	140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 1 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES pH 7.4, ajusté avec NaOH	140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES pH 7.2, ajusté avec NaOH

**Tableau 5 : Composition des différentes solutions utilisées (en mM)**

4-AP : 4-amino-pyridine, Asp : Aspartate, BTS : N-benzyl-p-toluène sulphonamide, MeSO<sub>3</sub> : Méthane-sulfonate, NMG : N-Méthyl-D-Glucamine, TTX : Tétródotoxine.

À partir du signal calcique, nous avons également calculé un flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RS, en nous appuyant sur la méthode de Baylor et coll. (1983). Le détail des paramètres du modèle utilisé est présenté dans l'article 4, placé en annexe.

## IV Solutions et traitements pharmacologiques

La composition des solutions utilisées pour l'ensemble des enregistrements est présentée dans le tableau 5. Toutes les solutions sont réalisées avec de l'eau déminéralisée. Les milieux intrapipettes sont filtrés (seuil de filtration à  $0.2\mu\text{m}^2$ ). Les solutions mères des agents chimiques utilisés sont réalisées soit directement dans du milieu d'enregistrement, soit dans de l'eau, soit dans du DMSO (DiMéthyl SulfOxyde). Ces solutions sont diluées au moins 1000 fois dans les solutions d'enregistrement. Les fibres musculaires squelettiques adultes sont injectées avec une solution type milieu intrapipette contenant 10 mM d'EGTA pour les enregistrements de mouvements de charges, et 50 mM d'EGTA pour les enregistrements de courants calciques. L'EGTA, chélateur du  $\text{Ca}^{2+}$ , prévient à la fois la contraction musculaire et la déphosphorylation du DHPR provoquée par le calcium. Le BTS, ajouté au milieu extracellulaire dans certains enregistrements de mouvements de charges, est un inhibiteur de l'ATPase de la myosine (Cheung et coll., 2002) ; il permet de bloquer la contraction.

**La methyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD ; Sigma)**, utilisée sur les cellules fœtales, appartient à la famille des cyclodextrines, molécules cages dérivant de l'amidon. Les molécules cages ont une structure en anneau qui ménage une cavité hydrophobe leur permettant d'inclure des molécules organiques. La M $\beta$ CD comporte un anneau hydrophobe qui séquestre le cholestérol, et des groupements hydrophiles à l'extérieur qui lui permettent de se dissoudre librement dans un environnement aqueux. De nombreux travaux ont démontré qu'elle peut enlever le cholestérol de la membrane plasmique de cellules vivantes (voir par exemple, Gimpl et coll., 1997). Dans le cadre de notre travail, les cellules musculaires dissociées à partir d'une seule demi-cage sont incubées 1 h à 37 °C dans 3 ml de Tyrode contenant 1 à 5 mM de M $\beta$ CD. Les cellules contrôles subissent la même incubation, mais dans du Tyrode. Afin de tester un éventuel effet pharmacologique direct de la M $\beta$ CD sur le DHPR, les cellules sont incubées en présence de 1.4 mM de M $\beta$ CD saturée en cholestérol (cholestérol-water soluble, Sigma ; rapport molaire cholestérol/M $\beta$ CD : 1/5). La M $\beta$ CD est stockée à 30 mM en solution dans du Tyrode. Cette solution-mère est conservée à -20°C.

**Les donneurs de NO sodium nitroprusside (SNP ; Sigma) et N-éthyl-2-1-éthyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino-éthanamine (NOC-12 ; Sigma)**, sont appliqués en incubation dans le milieu extracellulaire d'enregistrement des fibres musculaires adultes, respectivement à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$ , 1mM, 2 mM et de 1 mM. Ces composants, extrêmement sensibles à la photodégradation, sont stockés à l'obscurité, sous forme de poudre. Ils sont dilués juste avant utilisation.

**Deux inhibiteurs compétitifs de la NOS** sont utilisés : la **N-nitro-L-arginine (L-NNA ; Sigma)**, sélective de la nNOS et la eNOS, et la **S-méthyl-L-thiocitrulline (L-SMT, Sigma)**, sélective de la nNOS. Ils sont injectés dans les fibres adultes en même temps que l'indicateur fluorescent indo 1, à des concentrations de 5 mM pour la L-NNA, et 5 ou 20 mM pour la L-SMT. Un délai d'environ 1h est ensuite respecté avant l'enregistrement de la cellule. Nous avons également testé ces inhibiteurs, dilués dans du Tyrode à une concentration de 5mM, en incubation d'une nuit à 4 °C.

Pour les mesures de fluorescence sur fibres musculaires adultes, il a été vérifié que les différents agents pharmacologiques testés n'affectent pas les propriétés de l'indicateur *in vitro* (voir les articles 2 et 3 pour les méthodes de calibration).

## V Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  SEM (écart à la moyenne). Pour les fibres musculaires adultes, les courbes sont ajustées selon la méthode des moindres carrés, à l'aide d'un algorithme classique Marquardt-Levenberg inclus dans le logiciel Microcal Origin. Les comparaisons sont réalisées à l'aide du test statistique « t » de Student pour données non appariées, et du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les valeurs sont considérées significativement différentes pour P (probabilité d'erreur)  $\leq 0.05$ .

## SECTION 1

# ÉTUDE DE LA REGULATION DU COUPLAGE EXCITATION- CONTRACTION PAR LE CHOLESTEROL MEMBRANAIRE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE FŒTUS DE SOURIS

La modulation de la signalisation calcique intracellulaire par le contenu membranaire en cholestérol a été très étudiée dans les muscles lisses vasculaires et le muscle cardiaque, une altération de ce contenu étant potentiellement impliquée dans la pathologie de l'athérosclérose (voir par exemple Bastiaanse et coll., 1994 ; Dreja et coll., 2002 ; Gleason et coll., 1991 ; Löhn et coll., 2000 ; Sen et coll. 1992). Dans le muscle squelettique, le détecteur de potentiel du couplage EC est localisé dans des structures enrichies en cholestérol (Jorgensen et coll., 1989, Romey et coll., 1989 ; Roseblatt et coll., 1981). Cependant, bien que des études morphologiques aient démontré l'importance de la présence de cholestérol dans le maintien de l'intégrité de ces structures (Carozzi et coll., 2000), une seule étude fonctionnelle avait jusqu'alors été réalisée. Dans cette étude, Launikonis et Stephenson (2001) démontraient que l'application de M $\beta$ CD (un agent séquestrant le cholestérol) sur fibres musculaires d'amphibien, pelées de manière mécanique, provoquait une inhibition de la contraction. Cette inhibition semblait liée à une altération des protéines impliquées dans le cycle excitation-contraction-relaxation : DHPR et/ou SERCA. Nous avons donc décidé d'étudier, de manière directe, les effets d'une déplétion membranaire en cholestérol sur différents acteurs du couplage EC, dans les muscles squelettiques de mammifère. Le courant calcique de type L, les mouvements de charges intramembranaires et les transitoires calciques voltage-dépendants ont été enregistrés sur cellules musculaires intactes, incubées en présence de M $\beta$ CD. La perturbation, par ce traitement, des structures membranaires impliquées dans le couplage EC a été vérifiée par des études morphologiques. Nous avons utilisé des cellules musculaires intercostales de fœtus de souris au stade E18. À ce stade, le couplage EC est presque mature : les triades sont formées et l'activation du transitoire calcique est indépendante de l'influx de Ca<sup>2+</sup> à partir du compartiment extracellulaire (Strube et coll., 1994). À la différence du muscle adulte, le courant calcique de type T est encore présent.

## Résultats-Discussion

*Une déplétion membranaire en cholestérol affecte les cavéoles et les tubules T*

D'un point de vue morphologique, le traitement par la M $\beta$ CD provoque une désorganisation du système tubulaire transverse (Figure 1), et une diminution de la surface des cavéoles et des tubules T connectés à la surface (Figure 2), en accord avec l'étude de Carozzi et coll (2000).

Ceci concorde avec la diminution de 25 % de la capacité électrique de la membrane mesurée en *patch-clamp* (Figure 3).

#### *Le cholestérol membranaire module différemment les deux fonctions du DHPR*

D'un point de vue fonctionnel, la déplétion membranaire en cholestérol produit une diminution de l'amplitude du courant calcique de type L (Figure 5A) et des mouvements de charges intramembranaires (Figure 8). Cette diminution peut résulter en partie d'une perte de connectivité électrique entre les domaines membranaires contenant le DHPR et la membrane de surface. Cependant, la normalisation de la conductance et des mouvements de charge par la capacité conserve une diminution de 17 % de  $G_{max}$  (conductance maximale) et de 15 % de  $Q_{max}$  (quantité maximale de charges déplacées), indiquant que ces deux valeurs sont affectées dans des proportions plus importantes que la capacité. Ce phénomène peut être expliqué par une distribution hétérogène des DHPR dans le sarcolemme, qui sont enrichis au niveau des structures affectées par la déplétion en cholestérol. (Jorgensen et coll., 1989, Romey et coll., 1989 ; Roseblatt et coll., 1981). Cependant, le traitement affecte également, de manière qualitative, les propriétés du courant calcique de type L. Il provoque un déplacement de 15 mV de la voltage-dépendance du courant vers des potentiels plus positifs (Figure 5), un ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation (Figure 6), et une augmentation de la sensibilité au  $\pm$ Bay K 8644 (Figure 7). Ainsi, la fonction des DHPR, présents dans les domaines restés connectés à la membrane de surface, est probablement altérée par la modification du contenu en cholestérol de la membrane. En revanche, la voltage-dépendance des mouvements de charges intramembranaires n'est pas affectée (Figure 8), indiquant que le cholestérol module de façon différente les deux fonctions du DHPR : détecteur de potentiel et canal calcique de type L. Cette différence de modulation pourrait constituer un argument expérimental supplémentaire à l'hypothèse de l'existence de deux types de DHPR, l'un soutenant la fonction canal calcique, l'autre la fonction détecteur de potentiel, proposée par ailleurs (De Jong et coll., 1989 ; Schwartz et coll., 1985 ; Strube et coll., 1992 ; 2000). Une telle différence d'effets sur les deux fonctions du DHPR a également été observée pour certains agents pharmacologiques, par exemple le perchlorate ou certaines dihydropyridines (pour revue, voir Melzer et coll., 1995).

#### *Une déplétion membranaire en cholestérol affecte le couplage EC*

Des mesures de variations de fluorescence mettent en évidence dans les cellules traitées par la  $M\beta$ CD (Figure 9) une diminution de l'amplitude des transitoires calciques évoqués par une dépolarisation, ce qui indique une perturbation du couplage EC. Cette perturbation peut être expliquée par la diminution des mouvements de charge intramembranaires et/ou des modifications des propriétés du RS. En effet, la déplétion du sarcolemme en cholestérol est susceptible d'induire une déplétion consécutive de la membrane du RS, par un mécanisme de trafic intracellulaire. Certes, il est classiquement admis que la majeure partie du cholestérol de

la cellule est contenue dans la membrane plasmique (Yeagle, 1985) et concentrée, dans la cellule musculaire squelettique, dans les cavéoles et les tubules T (Rosemlat et coll, 1981). Cependant, de récents travaux, localisant le cholestérol par immunomarquage à l'anticorps Mab 2C5-6, suggèrent qu'il soit présent en quantité supérieure dans la membrane du RS que dans celle des tubules T (Clarke et coll., 2000). De plus, Launikonis et Stephenson (2001) rapportent une inhibition de la SERCA lors d'une déplétion de la membrane du RS en cholestérol.

#### *Les effets d'une déplétion membranaire en cholestérol ciblent le DHPR*

Les potentiels d'action et apparaissent similaires dans les cellules contrôles ou les cellules traitées (Tableau 1), suggérant que les propriétés des canaux impliqués dans l'excitabilité de la membrane ne sont pas, ou très peu, affectées par une perturbation de la teneur membranaire en cholestérol. Ainsi, les changements des propriétés du courant de type L proviennent d'un effet ciblant le DHPR, et non d'une altération générale des propriétés de la membrane, qui affecterait l'ensemble des protéines membranaires. Ces résultats s'opposent à ceux de Launikonis & Stephenson (2001). Ces auteurs observaient, lors d'un traitement de leur préparation à la  $M\beta CD$ , une dépolarisation du système tubulaire transverse liée à une perturbation des protéines impliquées dans l'excitabilité membranaire (principalement les canaux potassiques). Cependant, cette étude était menée sur fibre pelée, dans lesquelles, parmi les autres structures du sarcolemme, seul les tubules T sont conservés. De plus, des concentrations de 10 mM de  $M\beta CD$  étaient utilisées, contre 1 à 5 mM dans notre cas.

De même, la déplétion membranaire en cholestérol n'affecte pas le courant calcique de type T (Figure 4). Ce contrôle interne suggère que, parmi les canaux calciques voltage-dépendants de la cellule musculaire squelettique, le cholestérol membranaire module spécifiquement le DHPR. Le DHPR et le canal calcique de type T n'ont pas la même localisation sarcolemmale : le DHPR est localisé dans des microdomaines enrichis en cholestérol (cavéoles et tubules T) tandis que le canal de type T est situé dans la membrane de surface (Romey et coll., 1989). Une localisation différentielle, accompagnée d'une modulation différentielle par le cholestérol, a également été mise en évidence pour les canaux potassiques par Martens et coll. (2000) dans des systèmes d'expression hétérologues et des cellules de cerveau de rat. La modulation des propriétés des canaux associés aux domaines enrichis en cholestérol par le cholestérol membranaire pourrait donc être un phénomène physiologique répandu.

## Conclusion

En conclusion, la déplétion membranaire en cholestérol affecte les propriétés du DHPR. Cette modulation de l'activité du canal par le cholestérol pourrait être expliquée par une altération des interactions spécifiques cholestérol-DHPR ou une modification des propriétés physiques (épaisseur et fluidité) de la bicouche lipidique. En effet, les propriétés physiques de la membrane modulent les changements conformationnels des protéines (pour revue, voir Yeagle, 1985). Bolotina et coll. (1994) ont par exemple démontré qu'une variation du contenu membranaire en cholestérol de cellules musculaires lisses provoquait des changements majeurs des cinétiques des canaux potassiques activés par le  $Ca^{2+}$ , corrélés à des variations de fluidité membranaire.

D'autre part, l'expression fonctionnelle du DHPR pourrait être affectée par une perturbation des interactions du DHPR avec des protéines environnantes, localisées dans les cavéoles et les tubules T, telles que Cav-3. Carozzi et coll. (2000) ont en effet démontré, sur cellules C2C12, que la déplétion membranaire en cholestérol (par l'Amphotéricine C) provoquait une redistribution de Cav-3 et de la sous-unité  $\alpha_{1s}$  du DHPR vers des endosomes.

Enfin, une altération d'une ou plusieurs voies de signalisation associées aux cavéoles et/ou aux tubules T pourrait moduler le couplage EC. Une telle altération a été mise en évidence par Blair et coll. (1999), dans les cellules endothéliales. Ces auteurs ont observé que la diminution du contenu membranaire en cholestérol provoquait une délocalisation, hors des cavéoles, de la eNOS, et une réduction de son activation par un stress mécanique. Dans le muscle squelettique, nNOS est associée aux cavéoles, et le NO constitue un modulateur potentiel de différents acteurs du couplage EC. L'effet observé pourrait donc résulter d'une perturbation de la voie du NO. L'étude de la modulation, par le NO, des protéines impliquées dans le couplage a constitué la deuxième partie de notre travail, et nous a permis d'invalider cette hypothèse.

## **Article 1**

The Journal of Physiology  
Volume 555 (2) : 365-381, 2004

### **Membrane cholesterol modulates dihydropyridine receptor function in mice fetal skeletal muscle cells**

**Sandrine Pouvreau<sup>1</sup>, Christine Berthier<sup>1</sup>, Sylvie Blaineau<sup>1</sup>, Jacqueline Amsellem<sup>1</sup>, Roberto Coronado<sup>2</sup>, and Caroline Strube<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Physiologie des Éléments Excitables, UMR CNRS 5123, UCB-Lyon1, 69622 Villeurbanne Cedex, France

<sup>2</sup> Department of Physiology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

**Corresponding author** C. Strube : LNPC, CNRS UMR 6150, Faculté Médecine Nord, Bd Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France. Email : [strube.c@jean-roche.univ-mrs.fr](mailto:strube.c@jean-roche.univ-mrs.fr)

Caveolae and transverse (T-) tubules are membrane structures enriched in cholesterol and glycosphingolipids. They play an important role in receptor signalling and myogenesis. The T-system is also highly enriched in dihydropyridine receptors (DHPRs), which control excitation-contraction (E-C) coupling. Recent results have shown that a depletion of membrane cholesterol alters caveolae and T-tubules, yet detailed functional studies of DHPR expression are lacking. Here we studied electrophysiological and morphological effects of methyl-beta-cyclodextrin (MbetaCD), a cholesterol-sequestering drug, on freshly isolated fetal skeletal muscle cells. Exposure of fetal myofibres to 1-3 mM MbetaCD for 1 h at 37 degrees C led to a significant reduction in caveolae and T-tubule areas and to a decrease in cell membrane electrical capacitance. In whole-cell voltage-clamp experiments, the L-type Ca(2+) current amplitude was significantly reduced, and its voltage dependence was shifted approximately 15 mV towards more positive potentials. Activation and inactivation kinetics were slower in treated cells than in control cells and stimulation by a saturating concentration of Bay K 8644 was enhanced. In addition, intramembrane charge movement and Ca(2+) transients evoked by a depolarization were reduced without a shift of the midpoint, indicating a weakening of E-C coupling. In contrast, T-type Ca(2+) current was not affected by MbetaCD treatment. Most of the L-type Ca(2+) conductance reduction and E-C coupling weakening could be explained by a decrease of the number of DHPRs due to the disruption of caveolae and T-tubules. However, the effects on L-type channel gating kinetics suggest that membrane cholesterol content modulates DHPR function. Moreover, the significant shift of the voltage dependence of L-type current without any change in the voltage dependence of charge movement and Ca(2+) transients suggests that cholesterol differentially regulates the two functions of the DHPR.

Abstract : <http://jp.physoc.org/cgi/content/abstract/555/2/365>

Online Article : <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/555/2/365>

PDF version : <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/555/2/365>



## SECTION 2

# ÉTUDE DE LA REGULATION DU COUPLAGE EXCITATION- CONTRACTION PAR L'OXYDE NITRIQUE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE SOURIS

À l'inverse du cholestérol, l'implication potentielle du NO dans la modulation de la fonction contractile du muscle squelettique a fait l'objet de nombreux travaux, qui s'orientent selon deux axes principaux. D'une part, les mesures de contractilité de faisceaux de muscles ou de fibres musculaires isolées rapportent une inhibition ou une activation de la contraction par le NO, dépendant des conditions expérimentales (Abraham et coll., 1998 ; Andrade et coll., 1998 ; Kobzik et coll., 1994 ; Reid et coll., 1998 ; Richmonds & Kaminski, 2001). Cependant, outre la diversité des résultats, ce type d'approche ne permet pas de conclure sur la modulation du couplage EC, le NO affectant également les propriétés des protéines contractiles (Andrade et coll., 1998 ; Galler et coll., 1997 ; Perkins et coll., 1997). D'autre part, les études menées sur préparations fragmentaires (vésicules de RS et RyR isolé en bicouche) mettent en évidence une modulation de l'activité du RyR par le NO, qui dépend également des conditions d'expérimentation (Aghdasi et coll., 1997 ; Eu et coll., 2000; 2003 ; Hart & Dulhunty, 2000 ; Meszaros et coll., 1996 ; Stoyanovsky et coll. 1997; Suko et coll., 1999 ; Sun et coll., 2001 ; 2003). Toutefois, de telles préparations ne préservent pas l'intégralité des interactions physiologiques du RyR avec d'autres protéines, en particulier le DHPR. En conséquence, il paraît difficile, à partir de ces études, d'intégrer au niveau cellulaire les effets du NO sur le couplage EC. Le but du travail présenté dans cette section était d'étudier de manière approfondie l'effet potentiel du NO sur chaque étape du couplage, dans la fibre musculaire squelettique intacte. Notre démarche expérimentale prenait en compte à la fois l'application de donneurs de NO et l'inhibition de sa synthèse endogène par des inhibiteurs de la NOS.

## Résultats-discussion

### **Article 2 : Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse.**

#### *Le NO comme ouvreur du RyR*

La première étape de notre travail consistait à étudier les effets de donneurs de NO (Sodium Nitroprusside ou SNP ; NOC 12) sur la signalisation calcique intracellulaire. La principale conséquence d'un excès de NO, produit par application de 1-2 mM de SNP ou NOC 12, est une augmentation progressive de la  $[Ca^{2+}]_i$  de repos lors d'une stimulation répétée de la fibre

musculaire (Figure 1). L'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est également observée en absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire (Figure 2), ce qui invalide la possibilité d'un accroissement de l'influx calcique à travers le sarcolemme, via des canaux calciques sarcolemmaux, par exemple le DHPR ou les SOC. L'analyse du déclin du transitoire calcique révèle que les processus d'extrusion de  $Ca^{2+}$  du compartiment cytoplasmique, essentiellement représentés par la SERCA dans le muscle squelettique, sont toujours efficaces en présence de NO (Figure 3). Ceci concorde avec les résultats de Eu et coll. (2000), qui rapportent une action spécifique du NO sur le RyR1, parmi les autres protéines du RS. En conséquence, l'augmentation progressive de  $[Ca^{2+}]_i$  provient d'un effet du NO sur la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS. Les deux fonctions du DHPR ne sont pas affectées dans les fibres soumises aux donneurs de NO (Figures 6, 7) ; l'effet cible donc préférentiellement le RyR, et non l'étape « détection du potentiel » du couplage EC.

#### *L'effet du NO sur les RyR est conditionné par leur activation préalable*

L'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est un phénomène *use-dependent* : 1) la  $[Ca^{2+}]_i$  mesurée au début de l'expérience, avant toute stimulation, est complètement indépendante du temps d'incubation des fibres en présence de SNP ; 2) dans les cellules incubées en SNP, la  $[Ca^{2+}]_i$  de repos n'évolue pas en absence de stimulation ; 3) la vitesse d'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est plus faible lors de l'application de dépolarisations à  $-20$  mV, que lors de dépolarisations à  $+10$  mV (Figure 4). Ainsi, l'activation du RyR semble nécessaire à sa modification par le NO. L'ensemble de ces résultats, nous amène à l'interprétation suivante : le NO agirait sur les RyR qui s'ouvrent en réponse à une dépolarisation ; ces canaux perdraient alors leur contrôle par le potentiel membranaire. Ils resteraient ainsi ouverts ou partiellement ouverts après repolarisation, provoquant une fuite constante de  $Ca^{2+}$  dans l'espace cytoplasmique.

#### *L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ de repos est accompagnée d'une inhibition de la libération de $Ca^{2+}$ activée par la dépolarisation*

L'augmentation progressive de  $[Ca^{2+}]_i$  de repos est accompagnée d'une diminution, progressive elle aussi, de l'amplitude du transitoire évoqué par des dépolarisations à  $+10$  mV (Figures 1, 5). Il est peu probable que ce phénomène provienne d'une inhibition directe du RyR par le NO, celui-ci activant, par ailleurs, le canal. Cette diminution résulterait plutôt de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  ; une inhibition du RyR par le  $Ca^{2+}$  est en effet démontrée chez le mammifère (voir par exemple Delbono, 1995 ; Garcia & Schneider, 1995). Dans notre étude, une diminution de l'amplitude du transitoire à  $-20$  mV est aussi observée, mais semble moins sensible à l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 5). Cette différence de sensibilité à la  $[Ca^{2+}]_i$  de l'amplitude des transitoires évoqués par des dépolarisations à différents potentiels a également été rapportée par Collet & Jacquemond (2002). La figure 10 de leur article montre qu'un accroissement de la  $[Ca^{2+}]_i$  en présence de ryanodine (qui provoque, comme le NO, une fuite de calcium du RS) est accompagné d'une diminution de l'amplitude du transitoire calcique

évoqué pour une dépolarisation à  $-10$  mV mais pas à  $-30$  mV. Ces résultats pourraient constituer un argument en faveur de l'hypothèse d'une libération quantique du calcium émise par Pizarro et coll. (1997) chez l'amphibien, puis par Szentesi et coll. (2000) chez le mammifère. Selon cette hypothèse, la libération de calcium est due à des classes distinctes de canaux qui s'activent chacune à un potentiel précis, de manière quantique. Nos résultats pourraient s'interpréter par l'existence d'au moins deux populations de RyR, qui s'ouvrent respectivement autour de  $-20$  mV et de  $+10$  mV, et qui présentent une sensibilité distincte à l'inactivation par le calcium.

#### *L'action du NO sur le RyR implique une oxydation ou une S-nitrosylation*

L'élévation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoquée par le NO est reversée par l'exposition des fibres au DTT (dithiothréitol, un agent réducteur des groupements thiols) (Figure 10). Ce phénomène a également été observé sur canal isolé en bicouche lipidique (Hart & Dulhunty, 2000 ; Suko et coll., 1999) et indique que l'effet du NO résulte d'une oxydation ou d'une S-nitrosylation de groupements thiols du RyR. Les concentrations de donneurs de NO utilisées dans notre étude (1-2 mM) sont nettement supérieures à celles affectant le RyR dans des études sur vésicules de RS ou canal isolé (voir par exemple Sun et coll., 2003 :  $100\mu\text{M}$  de NOC 12). Nous avons testé des concentrations plus faibles ( $100\mu\text{M}$  de SNP), mais aucun effet n'a été observé. Une explication possible est que le canal a une sensibilité réduite au NO à  $pO_2$  atmosphérique, due à une oxydation supplémentaire par rapport aux conditions de  $pO_2$  tissulaire (Eu et coll., 2000). Cependant, l'absence d'effet du DTT sur nos préparations contrôles contredit cette hypothèse.

*In vitro*, des concentrations millimolaires de SNP produisent des niveaux de NO variant de quelques centaines de nM à quelques  $\mu\text{M}$  (Zou & Cowley, 1997 ; Alonzo-Galicia et coll., 1998), ce qui correspond aux plus fortes concentrations cellulaires estimées (Stamler & Meissner, 2001). Les effets rapportés dans notre étude interviendraient donc dans des conditions de surproduction de NO. En conséquence, cette partie de notre travail ne permet pas de révéler le rôle physiologique du NO produit par le muscle dans la régulation du couplage EC.

### **Article 3 : Nitric Oxide synthase inhibition affects sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ release in skeletal muscle fibres from mouse.**

Dans la deuxième étape de notre travail, nous nous sommes intéressés aux effets de concentrations physiologiques de NO sur le couplage EC. Ces effets furent étudiés de manière indirecte, en bloquant la synthèse endogène de NO, par application d'inhibiteurs de la NOS (N-nitro-L arginine ou L-NNA, S-methyl-L-thiocitrulline ou L-SMT).

### *L'inhibition de la NOS affecte la voltage-dépendance de la libération de calcium*

La  $[Ca^{2+}]_i$  de repos et les variations de calcium intracellulaire évoquées par des dépolarisations de forte amplitude présentent des propriétés similaires dans les fibres contrôles et dans les fibres traitées par les inhibiteurs de la NOS (Figure 1). Les systèmes de régulation de l'homéostasie calcique et le couplage EC ne sont donc pas affectés de manière dramatique par l'absence de production endogène de NO. Toutefois, l'inhibition de la NOS déplace la voltage-dépendance du flux de libération de calcium de 10 à 15 mV vers des valeurs de potentiel plus négatives (Figure 3). Ainsi, des niveaux physiologiques de NO diminueraient l'activation de la libération de calcium du RS lors d'une dépolarisation. Cette modulation, par le NO, de la voltage-dépendance de la libération de calcium fournirait une explication à l'augmentation de la fonction contractile observée précédemment, dans le muscle squelettique, lors de l'inhibition de la NOS (Kobzik et coll., 1994 ; Reid et coll., 1998 ; Richmond & Kaminski, 2001).

### *L'effet d'une inhibition de la NOS cible le RyR.*

Une variation de la voltage-dépendance de la libération de calcium par le RS peut être expliquée par une action du NO sur le détecteur de potentiel du couplage EC. Cependant, nous avons démontré que les mouvements de charges intramembranaires ne sont pas affectés par le traitement (Figure 5), invalidant cette hypothèse. Ainsi, les effets du NO sur la libération de calcium semblent cibler le RyR. L'ensemble des résultats précédemment cités révèle que le NO, à concentrations physiologiques, produit une inhibition tonique de l'activation du canal de libération de calcium du RS lors de dépolarisation.

### *L'application de l'agent oxydant $H_2O_2$ produit un effet similaire à l'inhibition de la NOS*

De récents travaux mettent en évidence des interactions réciproques entre le NO et l'état redox de la préparation dans la modulation de la contractilité du muscle squelettique ou de l'activité du RyR (pour revue, Reid 2001 ; Stamler & Meissner, 2001). Il a par exemple été démontré qu'à faibles concentrations, le NO peut prévenir l'activation du canal de libération de calcium par l'oxydation (Aghdasi et coll., 1997b). Nous avons donc testé les effets de l'application d'un agent oxydant, le  $H_2O_2$ , sur la libération de calcium par le RS. L'exposition de nos cellules à des concentrations millimolaires de  $H_2O_2$  provoque un déplacement de 8 mV de la courbe de voltage-dépendance du flux de libération de calcium vers des potentiels plus négatifs (Figure 6). Ainsi, l'application d'un agent oxydant produit un effet qualitativement similaire à celui observé lors d'une inhibition de la NOS.

## Conclusion

L'ensemble de ce travail démontre que le NO est un régulateur physiologique du couplage EC. Parmi les protéines impliquées dans le couplage EC, le NO module spécifiquement le RyR, de façon différente selon sa concentration. À des niveaux physiologiques, il réduit l'activation du canal lors d'une dépolarisation membranaire ; en excès, il bloque le canal en configuration ouverte. Un effet dépendant de la concentration (activation *versus* inhibition) a également été démontré sur RyR isolé en bicouche lipidique (Hart & Dulhunty, 2000 ; Suko et coll. 1999). Ces effets apparemment contradictoires pourraient être expliqués de la manière suivante, sur la base des travaux d'Aghdasi et coll. (1997a ; 1997b) et de Eu et coll. (2000). Dans nos conditions expérimentales, l'exposition du RyR à une pO<sub>2</sub> atmosphérique provoquerait une oxydation des groupements thiols, associée à une activation du canal. Le NO, à faibles concentrations n'aurait pas d'effets détectables sur l'activité du RyR, mais protégerait ses groupements thiols contre l'oxydation. Ainsi, l'inhibition de la production endogène de NO favoriserait l'oxydation du RyR. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'application d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur nos fibres musculaires produit un effet similaire à l'inhibition de la synthèse endogène de NO (déplacement de la voltage-dépendance de la libération de calcium vers des valeurs de potentiel plus négatives). Dans ce contexte, il serait intéressant de tester les effets de faibles concentrations de donneurs de NO (qui n'affectent pas le RyR dans nos conditions) sur l'activation du canal par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La modification de la voltage-dépendance de la libération de Ca<sup>2+</sup> par l'application d'agents oxydants fait écho au modèle d'Abramson et Salama (1989), qui propose que les transitions entre les états ouvert et fermé du RyR soient accompagnées de l'oxydation ou de la réduction de groupement thiols critiques. À l'inverse des faibles concentrations, de fortes concentrations de NO oxyderaient le RyR, provoquant la formation de ponts dissulfures, et l'activation du canal. Cette formation de ponts dissulfures entre les sous-unités du canal pourrait expliquer son blocage en configuration activée. Des études supplémentaires seront nécessaires pour valider notre hypothèse. En particulier, il serait intéressant de confirmer, dans nos conditions expérimentales la formation de ponts dissulfures lors de l'application de donneurs de NO, et la perte de groupement thiols en cas d'inhibition de la NOS.

## **Article 2**

The Journal of Physiology  
Volume 560 (3) : 779-794, 2004

### **Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse**

**Sandrine Pouvreau, Bruno Allard, Christine Berthier and Vincent Jacquemond**

Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, 69622 Villeurbanne Cedex, France

**Corresponding author** V. Jacquemond : Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, Bât. Raphaël Dubois, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Email : [vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr](mailto:vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr)

In skeletal muscle, nitric oxide (NO) is commonly referred to as a modulator of the activity of the ryanodine receptor (RyR) calcium release channel. However the reported effects of NO on isolated SR preparations and single RyR activity are diverse, and how NO affects SR calcium release and intracellular calcium homeostasis under physiological conditions remains poorly documented and hardly predictable. Here, we studied the effects of NO donors on membrane current and intracellular  $[Ca^{2+}]$  in single skeletal muscle fibres from mouse, under voltage-clamp conditions. When fibres were chronically exposed to millimolar levels of sodium nitroprusside (SNP) and challenged by short membrane depolarizations, there was a progressive increase in the resting  $[Ca^{2+}]$  level. This effect was use-dependent with the slope of rise in resting  $[Ca^{2+}]$  being increased twice when the depolarizing pulse level was raised from -20 to +10 mV. Analysis of the decay of the  $[Ca^{2+}]$  transients suggested that cytoplasmic  $Ca^{2+}$  removal processes were largely unaffected by the presence of SNP. Also the functional properties of the dihydropyridine receptor were very similar under control conditions and in the presence of SNP. The resting  $[Ca^{2+}]$  elevation due to SNP was accompanied by a depression of the peak calcium release elicited by pulses to +10 mV. The effects of SNP could be reproduced by the chemically distinct NO donor NOC-12. They could be reversed upon exposure of the fibres to the thiol reducing agent Dithiothreitol. Results suggest that large levels of NO produce a redox-sensitive continuous leak of  $Ca^{2+}$  from the SR, through a limited number of release channels that do not close once they are activated by membrane depolarization. This SR  $Ca^{2+}$  leak and the resulting increase in resting  $[Ca^{2+}]$  may be important in mediating the effects of excess NO on voltage activated calcium release.

Abstract : <http://jp.physoc.org/cgi/content/abstract/560/3/779>

Online Article : <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/560/3/779>

PDF version : <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/560/3/779>

### **Article 3**

Article soumis (2005)

## **Nitric Oxide synthase inhibition affects sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in skeletal muscle fibres from mouse**

**Sandrine Pouvreau and Vincent Jacquemond**

Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, 69622 Villeurbanne Cedex, France

**Corresponding author** V. Jacquemond : Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, Bât. Raphaël Dubois, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Email : [vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr](mailto:vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr)

Nitric oxide (NO) generated by skeletal muscle is believed to regulate force production but how this is achieved remains poorly understood. In the present work we tested the effects of NO-synthase (NOs) inhibitors on membrane current and intracellular calcium in isolated skeletal muscle fibres from mouse, under voltage-clamp conditions. Resting [Ca<sup>2+</sup>] and [Ca<sup>2+</sup>] transients evoked by large depolarizations exhibited similar properties in control fibres and in fibres loaded with tenth millimolar levels of the NOs inhibitor N-nitro-L arginine (L-NNA). Yet, the voltage dependence of calcium release was found to be shifted by ~15 mV towards negative values in the presence of L-NNA. This effect could be reproduced by the other NOs inhibitor S-methyl-L-Thiocitrulline (L-SMT). Separate experiments showed that the voltage dependence of charge movement was unaffected by the presence of L-NNA ruling out an effect on the voltage sensor. A negative shift in the voltage dependence of calcium release was also observed in fibres exposed to the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). Overall, results indicate that physiological levels of NO exert a tonic inhibitory control on the activation of the calcium release channels. Changes in the voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> release activation may be a ubiquitous physiological consequence of redox-related modifications of the ryanodine receptors.

**Keywords:** skeletal muscle, voltage-clamp, intracellular calcium, SR calcium release, nitric oxide

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Mon travail de thèse démontre l'importance de deux facteurs associés aux microdomaines sarcolemmaux, le cholestérol et le NO, dans la modulation de l'homéostasie calcique et donc de la fonction contractile de la fibre musculaire squelettique. Outre leur intérêt fondamental, mes résultats permettent d'affiner la compréhension des mécanismes sous-tendant les nombreuses pathologies musculaires associées à une perturbation de l'un de ces deux facteurs ou, plus généralement, des microdomaines sarcolemmaux.

Depuis la caractérisation, dans de nombreux types cellulaires, de microdomaines membranaires isolés, enrichis en cholestérol, se pose la question du rôle du cholestérol dans la régulation de l'activité des protéines contenues dans ces domaines, et plus généralement de son implication dans la fonction cellulaire. Nous avons démontré que dans le muscle squelettique, le cholestérol du sarcolemme module le couplage EC, au moins en partie par des effets ciblant le DHPR.

Le mécanisme précis de l'inhibition du DHPR constatée lors de la déplétion du sarcolemme en cholestérol reste indéterminé. La deuxième partie de notre étude démontre qu'il est peu probable qu'une altération de la voie du NO (associée aux microdomaines membranaires enrichis en cholestérol) soit impliquée, le NO n'ayant que peu d'effets sur ce canal. Une autre hypothèse repose sur l'existence d'un lien fonctionnel entre le DHPR et la Cav-3, protéine située dans les cavéoles et les tubules T. Ce lien serait perturbé lors d'une déplétion membranaire en cholestérol, la Cav-3 étant alors redistribuée hors des microdomaines sarcolemmaux (Carozzi et coll., 2000). Une voie d'approche de cette hypothèse repose sur des expériences de surexpression ou d'inhibition de l'expression membranaire de la Cav-3 par transfection, associées à des immunomarquages du DHPR et de Cav-3, et des enregistrements de l'activité fonctionnelle du DHPR. Ces expériences sont déjà en cours au sein du laboratoire. Les premiers résultats démontrent, dans un système immature (cultures primaires de cellules musculaires squelettiques de fœtus de souris), l'existence d'une colocalisation entre Cav-3 et le DHPR et suggèrent une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines (Couchoux et coll., 2004). En parallèle, la mise au point d'une technique de transfection efficace dans des cellules musculaires squelettiques adulte permettra de réaliser des études similaires sur des fibres musculaires matures, et donc de définir si les altérations fonctionnelles observées au cours du développement sont reproductibles chez l'adulte .

Dans notre modèle, la déplétion du sarcolemme en cholestérol est également susceptible d'induire une déplétion consécutive de la membrane du RS, par un mécanisme de trafic intracellulaire. De récents travaux (Clarke et coll., 2000) semblent démontrer que la membrane du RS est plus riche en cholestérol que le sarcolemme, contrairement à ce qui était couramment admis (Yeagle, 1985). Le cholestérol du RS pourrait, comme celui de la membrane plasmique, moduler l'activité des protéines de la membrane qui le contient. Ainsi,



Launikonis et Stephenson (2001) rapportent, sur fibre pelée, une inhibition de la SERCA lors d'une déplétion de la membrane du RS en cholestérol. Notre étude, menée sur cellules musculaires intactes, ne permet pas de conclure quant aux effets d'une déplétion membranaire en cholestérol sur les protéines du RS impliquées dans le couplage EC. Une analyse plus poussée des signaux calciques évoqués lors de dépolarisations devra donc être effectuée, afin d'étudier les effets de notre traitement sur l'activité du canal de libération de calcium du RS et de la SERCA, maintenus dans une configuration et un environnement physiologiques.

La caractérisation précise des effets fonctionnels d'une modulation du contenu membranaire en cholestérol dans la fibre musculaire squelettique est de première importance, en raison de son implication potentielle dans certaines pathologies. Une augmentation de l'occurrence de diverses myopathies, bénignes à sévères, a en effet été constatée chez les patients traités aux statines, une classe d'hypocholestérolémiantes (pour revue, Thompson et coll., 2003). Ce phénomène n'est pas, à ce jour, expliqué. Les statines inhibent la synthèse de mévalonate, un intermédiaire de la synthèse endogène du cholestérol. Appliquées *in vitro* sur cellules musculaires cardiaques et lisses, ces statines diminuent le contenu en cholestérol de la membrane plasmique et l'amplitude du courant de type L (Bergdahl et coll., 2003 ; Kirsch et coll., 2003 ; Renaud et coll., 1986). Nous avons démontré, dans le muscle squelettique, qu'une diminution du cholestérol membranaire provoque à une perturbation du courant de type L et du couplage EC. De telles perturbations de l'homéostasie calcique intracellulaire pourraient constituer un des mécanismes pathogènes des statines.

Les microdomaines membranaires enrichis en cholestérol contiennent, par ailleurs, l'enzyme responsable de la synthèse du NO (NO synthase). La nitrosylation des protéines par le NO a récemment émergé comme un nouveau concept de signalisation (pour revue, voir Broillet, 1999 ; Stamler, 2001). Elle constitue la seule modification post traductionnelle de type redox détectée *in vivo* et provoquant des variations de la fonction des protéines dans une échelle de temps physiologique. La nitrosylation des protéines semble être impliquée à la fois dans la physiologie et la pathologie cellulaire (stress nitrosatif). Nous avons démontré que dans le muscle squelettique, le NO module le couplage EC. Cependant, à l'inverse du cholestérol, la modulation du couplage EC par le NO implique des effets qui ciblent principalement le canal de libération de  $Ca^{2+}$  du RS, mais n'affectent pas ou peu le détecteur de potentiel. Ce résultat constitue une différence fondamentale entre le muscle squelettique et le muscle cardiaque, où de nombreux effets du NO sur le canal calcique de type L ont été rapportés (pour revue, Massion et coll., 2003). Les processus d'extrusion du calcium du cytoplasme sont également peu affectés par le NO. Les effets du NO sur le RyR résultent d'une oxydation et/ou d'une S-nitrosylation du canal, et dépendent de la concentration de ce gaz. Ainsi, à des niveaux physiologiques, le NO limite l'activation du RyR lors d'une dépolarisation. En excès, il maintiendrait le canal en configuration ouverte.

Cette partie de notre travail illustre également l'intérêt d'effectuer de telles études sur fibres musculaires intactes. En effet, dans le cas d'un excès de NO, l'activation du RyR (maintenu en configuration ouverte) produit finalement, au niveau de la fibre entière, une dépression du

couplage EC, probablement liée à un phénomène d'inhibition calcium-dépendante du RyR. Les résultats obtenus sur canal isolé ne sont donc pas toujours transposables à la cellule. De plus, de nombreux régulateurs de l'activité du RyR présents au niveau cellulaire interfèrent avec les effets du NO lorsque qu'ils sont appliqués sur préparation fragmentaire. Par exemple, des études menées sur canal isolé ont démontré que la régulation du RyR par la CaM était modifiée en cas de S-nitrosylation (Eu et coll., 2000) ou d'oxydation du récepteur (Zhang et coll., 1999). De même, la liaison du récepteur à la CaM empêche son oxydation (Zhang et coll., 1999). Notre préparation nous permet d'intégrer la majeure partie des interactions entre les différentes voies de signalisation présentes au niveau de la fibre, et donc d'étudier la modulation du couplage EC par le NO, ou tout autre facteur, dans des conditions physiologiques d'environnement cellulaire.

Les concentrations de donneurs de NO utilisées dans notre étude (1-2 mM) produisent *in vitro* des niveaux de NO variant de quelques centaines de nM à quelques  $\mu\text{M}$  (Zou & Cowley, 1997 ; Alonzo-Galicia et coll., 1998), ce qui correspond aux plus fortes concentrations physiologiques cellulaires estimées (Stamler & Meissner, 2001). Ainsi, les effets observés interviendraient dans des conditions de surproduction de NO. Cependant, il faut garder à l'esprit que les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas directement extrapolable à la fibre intacte. Le niveau de NO « disponible » pour le RyR est vraisemblablement nettement inférieur dans la cellule, le NO réagissant avec de multiples cibles, et se fixant sur des tampons tels que la myoglobine et le glutathion (pour revue, Stamler & Meissner, 2001). De plus, le NO produit de façon endogène s'ajoute à celui libéré par les donneurs. Il serait donc approprié d'effectuer un dosage des concentrations de NO obtenues dans nos conditions expérimentales, pour nous permettre l'intégration physiologique quantitative de ces données. Dans cette optique, l'estimation devra porter non seulement sur les niveaux de NO atteints lors de l'application de donneurs, mais également sur les niveaux de NO produit de façon endogène, et résiduels après inhibition de la NOS. Un tel dosage peut être effectué grâce à des injections intracellulaires de l'indicateur fluorescent DAF-2 (4,5-diaminofluoresceine; Silveira et coll., 2003). Des expériences préliminaires réalisées avec cet indicateur sous microscope confocal nous ont montré qu'il était tout à fait possible de visualiser et quantifier l'augmentation de NO intracellulaire dans des fibres musculaires incubées en présence de donneurs de NO.

Les concentrations de donneurs de NO utilisées dans cette étude sont nettement supérieures à celles affectant le RyR dans des études sur vésicules de RS ou canal isolé en bicouche lipidique (voir par exemple Sun et coll., 2003 :  $100\mu\text{M}$  de NOC 12). Nous avons testé des concentrations plus faibles ( $100\mu\text{M}$  de SNP), mais sans résultat. Une explication possible serait que le canal présente une sensibilité réduite au NO à  $p\text{O}_2$  atmosphérique, due à une oxydation 6 à 8 thiols supplémentaires par rapport aux conditions de  $p\text{O}_2$  tissulaire (Eu et coll., 2000). Cependant, la deuxième partie de notre travail montre que l'inhibition de la production endogène de NO provoque une sensibilisation du canal vis-à-vis du potentiel, prouvant ainsi que le NO, à concentration physiologique, module l'activité du canal dans nos conditions expérimentales. De fortes concentrations d'un agent oxydant, le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produisent

des effets similaires. Ainsi, les modulations observées à la fois lors d'un excès de NO ou d'une inhibition de la NO synthase semblent être liées à une perturbation de l'état redox du RyR. L'état redox de notre préparation pourra être testé en étudiant les effets de l'application de DTT, un agent réducteur, sur la voltage-dépendance de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, des expériences complémentaires pourront être menées à  $p\text{O}_2$  tissulaire, afin de vérifier la reproductibilité de nos effets dans de telles conditions.

Dans le muscle squelettique, une forte production de NO est intégrée au processus d'inflammation et aux myopathies inflammatoires. La source principale de ce NO est la iNOS, exprimée par les macrophages et les fibres musculaires (Kaminski et coll., 2001). La eNOS et la nNOS interviennent également dans cette surproduction de NO (El-Dwairi et coll., 1998). L'hypothèse, comme mécanisme pathogène, d'un stress nitrosatif induisant l'apoptose est controversée. Notre travail démontre qu'un excès de NO produit une altération de l'homéostasie calcique intracellulaire dans le muscle squelettique, qui pourrait contribuer, au moins en partie, aux altérations musculaires observées. Par ailleurs, l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est susceptible de produire une activation de la nNOS, enzyme régulée par le calcium et la calmoduline, et d'être ainsi à l'origine d'un phénomène auto-entretenu. À l'inverse, chez la souris *mdx*, la production de NO est diminuée (Brenmann et coll., 1995). Cette diminution semble impliquée dans le phénotype pathologique puisque celui-ci est atténué lorsque la production de NO est restaurée (Wehling et coll., 2001). Notre étude démontre qu'une inhibition de la synthèse de NO provoque une perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Or l'hypothèse d'une augmentation cytosolique, mitochondriale ou sous-sarcolemmale de calcium dans les muscles *mdx*/DMD fait actuellement l'objet de nombreuses études et controverses (pour revue, voir Ruegg & Gillis, 1999). L'étude des répercussions sur le couplage EC de l'inhibition de la voie du NO chez les souris *mdx* constitue donc une perspective majeure de notre travail.

En conclusion, les microdomaines membranaires ont été définis comme des carrefours de signalisation. Ils contiennent de multiples voies de signalisation intracellulaire, et permettraient des interactions croisées entre ces différentes voies. Mon travail de thèse démontre qu'ils concentrent des facteurs impliqués dans la modulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. De nombreuses myopathies, telles que la Dystrophie Musculaire de Duchenne ou la LGMD-1C (*Limb Girdle Muscular Dystrophy*) présentent, dans leur phénotype pathologique, une altération des microdomaines membranaires, associée à une perturbation de la voie du NO. Le phénotype pathologique cellulaire de ces différentes maladies reste méconnu. Nos résultats révèlent qu'à la fois l'altération des microdomaines sarcolemmaux, par diminution du contenu membranaire en cholestérol, et la perturbation de la voie du NO provoquent des altérations de l'homéostasie calcique intracellulaire. Ainsi, une combinaison des deux effets pourrait constituer un mécanisme extrêmement pathogène, impliqué dans ces maladies.

**ANNEXE**

**CALCIUM SIGNALING IN ISOLATED SKELETAL MUSCLE**

**FIBERS INVESTIGATED UNDER**

**« SILICONE VOLTAGE-CLAMP » CONDITIONS.**

La technique de *silicone-clamp* représente un outil puissant pour l'étude de la signalisation calcique intracellulaire dans la fibre musculaire squelettique. Elle permet de s'affranchir des problèmes inhérents à cette préparation cellulaire : la taille des fibres, généralement beaucoup trop importante pour pouvoir imposer, avec une simple électrode de *patch-clamp*, un potentiel uniforme à l'intégralité du sarcolemme ; les contractions importantes susceptibles de se développer en réponse à des dépolarisations supraliminaires, compromettant la possibilité de maintenir le *seal* entre la pointe d'une micropipette de *patch-clamp* et la membrane de la cellule. Cette technique, qui consiste à réduire la surface de membrane interrogée à l'aide d'une graisse silicone isolante, s'est avérée efficace pour l'étude des propriétés des canaux ioniques du sarcolemme et du détecteur de potentiel du couplage EC. Couplée à un dispositif de fluorescence, elle permet les mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  et de transitoire calciques évoqués par des dépolarisations membranaires, qui traduisent la libération de calcium du RS, et son extrusion du compartiment cytoplasmique. L'article présenté dans cette annexe propose une revue des potentialités de cette technique.

## **Article 4**

Cell Biochemistry and Biophysics  
Volume 40 (2) : 225-236, 2004

### **Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under "Silicone Voltage-Clamp" conditions**

**Claude Collet<sup>1</sup>, Sandrine Pouvreau<sup>1</sup>, Laszlo Csernoch, Bruno Allard<sup>1</sup> and Vincent Jacquemond<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Physiologie des Eléments Excitables, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, 69622 Villeurbanne Cedex, France

<sup>2</sup> Department of Physiology, Health Sciences Centre, University of Debrecen, Debrecen, 4012, Hungary

**Corresponding author** V. Jacquemond : Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Claude Bernard - Lyon 1, UMR CNRS 5123, Bât. Raphaël Dubois, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Email : [vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr](mailto:vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr)

In skeletal muscle, release of calcium from the sarcoplasmic reticulum (SR) represents the major source of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation. SR calcium release is under the strict command of the membrane potential, which drives the interaction between the voltage sensors in the t-tubule membrane and the calcium-release channels. Either detection or control of the membrane voltage is thus essential when studying intracellular calcium signaling in an intact muscle fiber preparation. The silicone-clamp technique used in combination with intracellular calcium measurements represents an efficient tool for such studies. This article reviews some properties of the plasma membrane and intracellular signals measured with this methodology in mouse skeletal muscle fibers. Focus is given to the potency of this approach to investigate both fundamental aspects of excitation-contraction coupling and potential alterations of intracellular calcium handling in some muscle diseases.

**Keywords:** Skeletal muscle; voltage-clamp; calcium channel; voltage-sensor; intracellular calcium; SR calcium release; muscle dystrophy

Abstract and citations:

<http://www.humanapress.com/ArticleDetail.pasp?issn=1085-9195&acode=CBB:40:2:225>

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- ABDELMOITY A., PADRE R.C., BURZYNSKI K.E., STULL J.T., LAU K.S. (2000) Neuronal nitric oxide synthase localizes through multiple structural motifs to the sarcolemma in mouse myotubes. *FEBS Letters* 482, 65-70.
- ABRAHAM R.Z., KOBZIK L., MOODY M.R., REID M.B., STAMLER J.S. (1998) Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 177-183.
- ABRAMSON J.J. & SALAMA G. (1989) Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 283-294.
- ADAMS B.A., TANABE T., MIKAMI A., NUMA S., BEAM K.G. (1990) Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* 346, 569-572.
- ADRIAN R.H. & ALMERS W. (1976a) The voltage dependence of membrane capacity. *J. Physiol.* 254, 317-338.
- ADRIAN R.H. & ALMERS W. (1976b) Charge movements in the membrane of striated muscle. *J. Physiol.* 254, 339-360.
- AGHDASI B., REID M.B., HAMILTON S.L. (1997a) Nitric oxide protects the skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel from oxidation induced activation. *J. Biol. Chem.* 272, 25462-25467.
- AGHDASI B., ZHANG J.Z., WU Y., REID M.B., HAMILTON S.L. (1997b) Multiple classes of sulfhydryls modulate the skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel. *J. Biol. Chem.* 272, 3739-3748.
- AHERN C.A., POWERS P.A., BIDDLECOME G.H., ROETHE L., VALLEJO P., MORTENSON L., STRUBE C., CAMPBELL K.P., CORONADO R., GREGG R.G. (2001) Modulation of L-type  $Ca^{2+}$  current but not activation of  $Ca^{2+}$  release by the  $\gamma_1$  subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle. *BMC Physiol.* 1, 8.
- ALDERTON J.M. & STEINHARDT R.A. (2000) Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275, 9452-9460.
- ALDERTON W.K., COOPER C.E., KNOWLES R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- ALONSO-GALICIA M., SUN C.W., FALCK J.R., HARDER D.R., ROMAN R.J. (1998) Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am. J. Physiol.* F370-F378.
- ALTAFAJ X., CHENG W., ESTÈVE E., URBANI J., GRUNWALD D., SABATIER J.M., CORONADO R., DE WAARD M., RONJAT M. (2005) Maurocalcine and domain A of the II-III loop of the dihydropyridine receptor  $Ca_v$  1.1 subunit share common binding sites on the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 4013-4016.
- ANDRADE F.H., REID M.B., ALLEN D.G., WESTERBLAD H. (1998) Effect of nitric oxide on skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.* 509, 577-586.
- ARMSTRONG C.M. & BEZANILLA F. (1973) Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242, 459-461.
- ARMSTRONG C.M., BEZANILLA F., HOROWICZ P. (1972) Twitches in the presence of ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267, 605-608.
- ASHCROFT F.M. (2000) Voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. In "Ion Channels and Disease", ed. by Ashcroft F.M., Academic Press, San Diego. pp. 161-183.

**B**

- BAKKER A.J., HEAD S.I., WILLIAMS D.A., STEPHENSON D.G. (1993)  $\text{Ca}^{2+}$  levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (*mdx*) and normal mice. *J. Physiol.* 460, 1-13.
- BALNAVE C.D. & ALLEN D.G. (1998) Evidence for  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am. J. Physiol.* 274, C940-C946.
- BALSHAW D., GAO L., MEISSNER G. (1999) Luminal loop of the ryanodine receptor: a pore-forming segment? *PNAS* 96, 3345-3347.
- BALSHAW D.M., XU L., YAMAGUCHI N., PASEK D.A., MEISSNER G. (2001) Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 276, 20144-20153.
- BARONE V., BERTOCCHINI F., BOTTINELLI R., PROTASI F., ALLEN P.D., FRANZINI-ARMSTRONG C., REGGIANI C., SORRENTINO V. (1998) Contractile impairment and structural alterations of skeletal muscles from knockout mice lacking type 1 and type 3 ryanodine receptors. *FEBS Letters* 422, 160-164.
- BASTIAANSE E.M.L., ATSMAN D.E., KUIJPERS M.M.C., VAN DER LAARSE A. (1994) The effect of sarcolemmal cholesterol content on intracellular calcium ion concentration in cultured cardiomyocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 313, 58-63.
- BASTIAANSE E.M.L., HOLD K.M., VAN DER LAARSE A. (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc. Res.* 33, 272-283.
- BAYLOR S.M., CHANDLER W.K., MARSHALL M.W. (1983) Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from arsenazo III calcium transients. *J. Physiol.* 344, 625-666.
- BAYLOR S.M. & HOLLINGWORTH S. (2003) Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *J. Physiol.* 551, 125-138.
- BEAM K.G., ADAMS B.A., NIIDOME T., NUMA S., TANABE T. (1992) Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* 360, 169-171.
- BEAM K.G. & KNUDSON C.M. (1988a) Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 91, 781-798.
- BEAM K.G. & KNUDSON C.M. (1988b) Effect of postnatal development on calcium currents and slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 91, 799-815.
- BEAM K.G., KNUDSON C.M., POWELL J.A. (1986) A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature* 320, 168-170.
- BEARD N.A., LAVER D.R., DULHUNTY A.F. (2004) Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 799-815.
- BEARD N.A., SAKOWSKA M.M., DULHUNTY A.F., LAVER D.R. (2002) Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel. *Biophys. J.* 82, 310-320.
- BERCHTOLD M.W., BRINKMEIER H., MÜNTENER M. (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.* 80, 1215-1265.
- BERGDAHL A., PERSSON E., HELLSTRAND P., SWARD K. (2003) Lovastatin induces relaxation and inhibits L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the rat basilar artery. *Pharmacol. Toxicol.* 93, 128-134.
- BERRIDGE M.J., BOOTMAN M.D., LIPP P. (1998) Calcium-a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.
- BERTHIER C. & BLAINEAU S. (1997) Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biology of the cell.* 89, 413-434.
- BERTHIER C., MONTEIL A., LORY P., STRUBE C. (2002)  $\alpha_{1H}$  mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J. Physiol.* 539, 681-691.

- BERTOCCHINI F., OVITT C.E., CONTI A., BARONE V., SCHÖLER H.R., BOTTINELLI R., REGGIANI C., SORRENTINO V. (1997) Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *EMBO* 16, 6956-6963.
- BEURG M., AHERN C.A., VALLEJO P., CONKLIN M.W., POWERS P.A., GREGG R.G., CORONADO R. (1999) Involvement of the carboxy-terminus region of the dihydropyridine receptor  $\beta$ 1a subunit in excitation-contraction coupling of skeletal muscle. *Biophys. J.* 77, 2953-2967.
- BEURG M., SUKHAREVA M., STRUBE C., POWERS P.A., GREGG R.G., CORONADO R. (1997) Recovery of  $\text{Ca}^{2+}$  current, charge movements, and  $\text{Ca}^{2+}$  transients in myotubes deficient in dihydropyridine receptor  $\beta$ 1 subunit transfected with  $\beta$ 1 cDNA. *Biophys. J.* 73, 807-818.
- BIEDERER C.H., RIES S.J., MOSER M., FLORIO M., ISRAEL M.A., MCCORMICK F., BUETTNER R. (2000) The basic helix-loop-helix transcription factors myogenin and Id2 mediate specific induction of caveolin-3 gene expression during embryonic development. *J. Biol. Chem.* 275, 26245-26251.
- BIJLENGA P., LIU J.H., ESPINOS E., HAENGGELI C.A., FISCHER-LOUGHEED J., BADER C.R., BERNHEIM L. (2000) T-type  $\alpha$ 1H  $\text{Ca}^{2+}$  channels are involved in  $\text{Ca}^{2+}$ v signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *PNAS* 97, 7627-7632.
- BIRNBAUMER L., CAMPBELL K.P., CATTERALL W.A., HARPOLD M.M., HOFMANN F., HORNE W.A., MORI Y., SCHWARTZ A., SNUTCH T.P., TANABE T., TSIEN R.W. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13, 505-506.
- BISCHOFF R. (1994) The satellite cell and muscle regeneration. In "Myology", ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 97-133.
- BISHOP J.E. & AL-SHAWI M.K. (1988) Inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by  $\text{Mg}^{2+}$  at high pH. *J. Biol. Chem.* 263, 1886-1892.
- BLAIR A., SHAUL P.W., YUHANNA I.S., CONRAD P.A., SMART E.J. (1999) Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J. Biol. Chem.* 274, 32512-32519.
- BLAUSTEIN M.P. & LEDERER W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79, 763-854.
- BLOCK B.A., IMAGAWA T., CAMPBELL K.P., FRANZINI-ARMSTRONG C. (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular component of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 107, 2587-2600.
- BOLOTINA V., OMELIANENKO V., HEYES B., RYAN U., BREGESTOVSKI P. (1989) Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 415, 262-268.
- BRENMAN J.E., CHAO D.S., XIA H., ALDAPE K., BRETT D.S. (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.
- BRILLANTES A.B., ONDRIAS K., SCOTT A., KOBRINSKY E., ONDRIASOVA E., MOSCHELLA M.C., JAYARAMAN T., LANDERS M., EHRLICH B.E., MARKS A.R. (1994) Stabilisation of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513-523.
- BROILLET M.C. (1999) S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1036-1042.
- BRUM G. & RIOS E. (1987) Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2. *J. Physiol.* 387, 489-517.
- BRUM G., FITTS R., PIZARRO G., RIOS E. (1988a) Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* 398, 475-505.



- BRUM G., RIOS E., STEFANI E. (1988b) Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 398, 441-473.
- BRUM G., STEFANI E., RIOS E. (1987) Simultaneous measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  currents and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in single skeletal muscle fibers of the frog. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 681-685.
- BRUTON J., TAVI P., AYDIN J., WESTERBLAD H., LÄNNERGREN J. (2003) Mitochondrial and myoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in single fibres from mouse limb muscles during repeated tetanic contractions. *J. Physiol.* 551, 179-190.
- BRUTON J., TAVI P., AYDIN J., WESTERBLAD H., LÄNNERGREN J. (2003) Mitochondrial and myoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in single fibres from mouse limb muscles during repeated tetanic contractions. *J. Physiol.* 551, 179-190.

## C

- CALLAWAY C., SERYSHEV A., WANG J.P., SLAVIK K.J., NEEDLEMAN D.H., CANTU C. 3<sup>RD</sup>, WU Y., JAYARAMAN T., MARKS A.R., HAMILTON S.L. (1994) Localization of the high and low affinity [ $^3\text{H}$ ] ryanodine binding sites on the skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *J. Biol. Chem.* 269, 15876-15884.
- CAMPBELL D.T. (1983) Sodium channel gating currents in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 82, 679-701.
- CAPUTO C. (2001) Calcium release in skeletal muscle: from  $\text{K}^+$  contractures to  $\text{Ca}^{2+}$  sparks. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 485-504.
- CARROLL S.L., KLEIN M.G., SCHNEIDER M.F. (1997) Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 501, 573-588.
- CAROZZI A.J., IKONEN E., LINDSAY M.R., PARTON R.G. (2000) Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic.* 1, 326-341.
- CATTERALL W.A. (1991) Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* 64, 871-874.
- CATTERALL W.A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
- CHALLET C., MAECHLER P., WOLLHEIM C.B., RUEGG U.T. (2001) Mitochondrial calcium oscillations in C2C12 myotubes. *J. Biol. Chem.* 276, 3791-3797.
- CHANDLER W.K., RAKOWSKI R.F., SCHNEIDER M.F. (1976) Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol.* 254, 285-316.
- CHANG W.J., IANACCONE S.T., LAU K.S., MASTERS B.S.S., MCCABE T.J., MCMILLAN K., PADRE R.C., SPENCER M.J., TIDBALL J.G., STULL J.T. (1995a) Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *PNAS* 93, 9142-9147.
- CHANG H.M., REITSTETTER R., MASON R.P., GRUENER R. (1995b) Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J. Membrane Biol.* 143, 51-63.
- CHAO D.S., SILVAGNO F., BREDT D.S. (1998) Muscular dystrophy in *mdx* mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 71, 784-789.
- CHAUDARI N., BEAM K.G. (1993) mRNA for cardiac calcium channel is expressed during development of skeletal muscle. *Dev. Biol.* 155, 507-515.
- CHENG H., LEDERER W.J., CANNELL M.B. (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744.
- CHEUNG A., DANTZIG J.A., HOLLINGWORTH S., BAYLOR S.M., GOLDMAN Y.E., MITCHISON T.J., STRAIGHT A.F. (2002) A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat. Cell. Biol.* 4, 83-88.

- CHU A., DIAZ-MUNOZ M., HAWKES M.J., BRUSH K., HAMILTON S.L. (1990) Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol. Pharmacol.* 37, 735-741.
- CHUN L.G., WARD C.W., SCHNEIDER M.F. (2003) Ca<sup>2+</sup> sparks are initiated by Ca<sup>2+</sup> entry in embryonic mouse skeletal muscle and decrease in frequency postnatally. *Am. J. Cell. Physiol.* 285, C686-C697.
- CLAPHAM D.E., RUNNELS L.W., STRÜBING C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387-396.
- CLARK K.A., MCELHINNY A.S, BECKERLE M.C., GREGORIO C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637-706.
- CLARKE M.S.F., VANDERBURG C.R., BAMMAN M.M., CALDWELL R.W., FEEBACK D.L. (2000) In situ localization of cholesterol in skeletal muscle by use of a monoclonal antibody. *J. Appl. Physiol.* 89, 731-741.
- COGNARD C., LAZDUNSKI M., ROMEY G. (1986) Different types of Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *PNAS* 83, 517-521.
- COLLET C., CSERNOCH L., JACQUEMOND V. (2003) Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and *mdx* mice. *Biophys. J.* 84, 251-265.
- COLLET C. & JACQUEMOND V. (2002) Sustained release of calcium elicited by membrane depolarization in ryanodine-injected mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 82, 1509-1523.
- COLLET C., MA J. (2004) Calcium-dependent facilitation and graded deactivation of store-operated calcium entry in fetal skeletal muscle. *Biophys. J.* 87, 268-275.
- COLLET C., POUVREAU S., CSERNOCH L., ALLARD B., JACQUEMOND V. (2004) Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under “Silicone Voltage-Clamp” conditions. *Cell Biochem. Biophys.* 40, 225-236.
- COLLET C., STRUBE C., CSERNOCH L., MALLOUK N., OJEDA C., ALLARD B., JACQUEMOND V. (2002) Effects of extracellular ATP on freshly isolated mouse skeletal muscle cells during pre-natal and post-natal development. *Pflugers Arch.* 443, 771-778.
- CONKLIN M.W., AHERN C.A., VALLEJO P., SORRENTINO V., TAKESHIMA H., CORONADO R. (2000) Comparison of Ca<sup>2+</sup> sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (type 1 or type 3). *Biophys. J.* 78, 1777-1785.
- CONKLIN M.W., BARONE V., SORRENTINO V., CORONADO R. (1999) Contribution of ryanodine receptor type 3 to Ca<sup>2+</sup> sparks in embryonic mouse skeletal muscle. *Biophys. J.* 77, 1394-1403.
- CONTI A., GORZA L., SORRENTINO V. (1996) Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem. J.* 316, 19-23.
- COUCHOUX H., ALLARD B., LEGRAND C., BERTHIER C. (2005) Evidence for a functional interaction between caveolin-3 and L-type calcium channel in mouse skeletal muscle myotubes. *15<sup>ème</sup> Colloque Canaux Ioniques, Giens.*
- CRAIG R. (1994) The structure of the contractile filaments. In “*Myology*”, ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 134-175.
- CRIBBS L.L., LEE J.H., YANG J., SATIN J., ZHANG Y., DAUD A., BARCLAY J., WILLIAMSON M.P., FOX M., REES M., PEREZ-REYES A. (1998) Cloning and characterization of  $\alpha$ 1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ. Res.* 83, 103-109.
- CSERNOCH L. (1999) Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Acta Physiol. Hung.* 86, 77-97.

- CSERNOCH L., JACQUEMOND V., SCHNEIDER M.F. (1993) Microinjection of strong calcium buffers suppresses the peak of calcium release during depolarization in frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 101, 297-333.
- CSERNOCH L., SZENTESI P., KOVACS L. (1999) Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 520, 217-230.
- CSERNOCH L., ZHOU J., STERN M.D., BRUM G., RIOS E. (2004) The elementary events of  $\text{Ca}^{2+}$  release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J. Physiol.* 557, 43-58.

## D

- DE JONGH K.S., MERRICK D.J., CATTERALL W.A. (1989) Subunits of purified calcium channels: a 212-kDa form of  $\alpha 1$  and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent  $\beta$  subunit. *PNAS* 86, 8585-8589.
- DE JONGH K.S., WARNER C., COLVIN A.A., CATTERALL W.A. (1991) Characterization of the two size forms of the  $\alpha 1$  subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *PNAS* 88, 10778-10782.
- DELBONO O. (1991) Calcium current activation and charge movement in denervated mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 451, 187-203.
- DELBONO O. (1995)  $\text{Ca}^{2+}$  modulation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release channels in rat skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.* 146, 91-99.
- DELBONO O. & CHU A. (1995)  $\text{Ca}^{2+}$  release channels in rat denervated skeletal muscles. *Exp. Physiol.* 80, 561-574.
- DELBONO O., RENGANATHAN M., MESSI M.L. (1997) Regulation of mouse skeletal muscle L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel by activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *J. Neurosci.* 17, 6918-6928.
- DELBONO O. & STEFANI E. (1993) Calcium transients in single mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 463, 689-707.
- DE SMEDT H., MISSIAEN L., PARYS J.B., HENNING R. H., SIENAERT I., VANLINGEN S., GIJSENS A., HIMPESENS B., CASTEELS R. (1997) Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem. J.* 322, 575-583.
- DEVAL E., LEVITSKY D.O., CONSTANTIN B., RAYMOND G., COGNARD C. (2000) Expression of the sodium/calcium exchanger in mammalian skeletal muscle cells in primary culture. *Exp. Cell. Res.* 255, 291-302.
- DEVAL E., RAYMOND G., COGNARD C. (2002)  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange activity in rat skeletal myotubes: effect of lithium ions. *Cell Calcium* 31, 37-44.
- DIRKSEN R.T. & BEAM K.G. (1995) Single calcium channel behavior in native skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 105, 227-247.
- DIRKSEN R.T. & BEAM K.G. (1996) Unitary behavior of skeletal, cardiac and chimeric L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels expressed in dysgenic myotubes. *J. Gen. Physiol.* 107, 731-742.
- DIRKSEN R.T. & BEAM K.G. (1999) Role of calcium permeation in dihydropyridine receptor function. Insight into channel gating and excitation-contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* 114, 393-403.
- DONALDSON P.L. & BEAM K.G. (1983) Calcium current in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J. Gen. Physiol.* 82, 449-468.
- DONOSO P. & HIDALGO C. (1989) Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 978, 8-16.

- DREJA K., VOLDSTEDLUND M., VINTEN J., TRANUM-JENSEN J., HELLSTRAND P., SWARD K. (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1267-1272.
- DULHUNTY A.F., LAVER D.R., GALLANT E.M., CASAROTTO M.G.; PACE S.M., CURTIS S. (1999) Activation and inhibition of skeletal RyR channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR Ser<sup>687</sup> and FKBP12. *Biophys. J.* 77, 189-203.
- DULHUNTY A.F., JUNANKAR P.R., STANHOPE C. (1992) Extra-junctional ryanodine receptors in the terminal cisternae of mammalian skeletal muscle fibres. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 247, 69-75.

## E

- EL-DWAIRI Q., COMTOIS A., GUO Y., HUSSAIN N.A. (1998) Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am. J. Physiol.* 274, C770-C779.
- EL-HAYEK R., ANTONIU B., WANG J., HAMILTON S.L., IKEMOTO N. (1995) Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 22116-22118.
- EL-HAYEK R. & IKEMOTO N. (1998) Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor  $\alpha_1$  subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochem.* 37, 7015-7020.
- ELTIT J.M., HIDALGO J., LIBERONA J.L., JAIMOVICH E. (2004) Slow calcium signals after tetanic electrical stimulation in skeletal myotubes. *Biophys. J.* 86, 3042-3051.
- ENDO M., TANAKA M., OGAWA Y. (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 228, 34-36.
- ERTEL E.A., CAMPBELL K.P., HARPOLD M.M., HOFMANN F., MORI Y., PEREZ-REYES E., SCHWARTZ A., SNUTCH T.P., TANABE T., BIRNBAUMER L., TSIEN R.W., CATTERALL W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.
- ESTEVE E., SMIDA-REZGUI S., SARKOZI S., SZEGEDI C., REGAYA I., CHEN L., ALTAFAJ X., ROCHAT H., ALLEN P., PESSAH I.N., MARTY I., SABATIER J.M., JONA I., DE WAARD M., RONJAT M. (2003) Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca<sup>2+</sup> release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278, 37822-37831.
- EU J.P., HARE J.M., HESS D.T., SKAF M., SUN J., CARDENAS-NAVINA I., SUN Q.I., DEWHIRST M., MEISSNER G., STAMLER S. (2003) Concerted regulation of skeletal muscle contractility by oxygen tension and endogenous nitric oxide. *PNAS* 100, 15229-15234.
- EU J.P., SUN J., XU L., STAMLER S., MEISSNER G. (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* 102, 499-509.

## F

- FATT P. & KATZ B. (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol.* 115, 320-370.
- FELDER E. & FRANZINI-ARMSTRONG C. (2002) Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *PNAS* 99, 1695-1700.
- FELDER E., PROTASI F., HIRSCH R., FRANZINI-ARMSTRONG C., ALLEN P.D. (2002) Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys. J.* 82, 3144-3149.

- FELDMEYER D., MELZER W., POHL B. (1990) Effects of gallopamil on calcium release and intramembrane charge movements in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 421, 343-362.
- FELDMEYER D., MELZER W., POHL B., ZOLLNER P. (1992) Modulation of calcium current gating in frog skeletal muscle by conditioning depolarisation. *J. Physiol.* 457, 639-653.
- FESSENDEN J.D., WANG Y., MOORE R.A., CHEN S.R., ALLEN P.D., PESSAH I.N. (2000) Divergent functional properties of ryanodine receptor types 1 and 3 expressed in a myogenic cell line. *Biophys. J.* 79, 2509-2525.
- FIELDING C.J. & FIELDING P.E. (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochem. Biophys. Acta.* 1529, 210-222.
- FILL M. & COPELLO J.A. (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82, 893-922.
- FILL M., CORONADO R., MICKELSON J.R., VILVEN J., MA J.J., JACOBSON B.A., LOUIS C.F. (1990) Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys. J.* 57, 471-475.
- FLOCKERZI V., OEKEN H.J., HOFMANN F., PELZER D., CAVALIE A., TRAUTWEIN W. (1986) Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323, 66-68.
- FLUCHER B.E. (1992) Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev. Biol.* 154, 245-260.
- FLUCHER B.E., CONTI A., TAKESHIMA H., SORRENTINO V. (1999) Type 3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 146, 621-629.
- FLUCHER B.E. & FRANZINI-ARMSTRONG C. (1996) Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *PNAS* 93, 8101-8106 .
- FLUCHER B.E., PHILLIPS J.L., POWELL J.A. (1991) Dihydropyridine receptor  $\alpha$  subunits in normal and dysgenic muscle in vitro: expression of  $\alpha 1$  is required for proper targeting and distribution of  $\alpha 2$ . *J. Cell. Biol.* 115, 1345-1356.
- FOHR U.G., WEBER B.R., MUNTENER M., STAUDENMANN W., HUGHES G.J., FRUTIGER S., BANVILLE D., SCHAFER B.W., HEIZMANN C.W. (1993) Human alpha and beta parvalbumins. Structure and tissue-specific expression. *Eur. J. Biochem.* 215, 719-727.
- FORD L.E. & PODOLSKY R.J. (1970) Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 167, 58-59.
- FRANCO-OBREGON A. & LANSMAN J.B. (2002) Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the *mdx* mouse. *J. Physiol.* 539, 391-407.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. (1991) Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Dev. Biol.* 146, 353-363.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. (1994) The sarcoplasmic reticulum and the transverse tubules. In "Myology", ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 176-199.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. & FISCHMAN D.A. (1994) Morphogenesis of skeletal muscle fibers. In « Myology », ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 74-96.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. & JORGENSEN A. O. (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 509-534.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. & NUNZI G. (1983) Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4, 233-252.

- FRANZINI-ARMSTRONG C. & PROTASI F. (1997) Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77, 699-729.
- FRANZINI-ARMSTRONG C., PROTASI F., RAMESH V. (1999) Shape, size, and distribution of Ca<sup>2+</sup> release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* 77, 1528-1539.
- FRAYSSE B., ROUAUD T., MILLOUR M., FONTAINE-PÉRUS J., GARDAHAUT M.F., LEVITSKY D.O. (2001) Expression of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in skeletal muscle. *Am. J. Cell. Physiol.* 280, C146-C154.
- FRIEDRICH O., EHMER T., FINK R.H.A. (1999) Calcium currents during contraction and shortening in enzymatically isolated murine skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 517, 757-770.
- FRYER M.W., LAMB G.D., NEERING I.R. (1989) The action of ryanodine on rat fast and slow intact skeletal muscles. *J. Physiol.* 414, 399-413.
- FRYER M.W. & STEPHENSON D.G. (1996) Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 493, 357-370.
- FUCHTBAUER E.M., ROWLERSON A.M., GOTZ K., FRIEDRICH G., MABUCHI K., GERGELY J., JOCKUSCH H. (1991) Direct correlation of parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activity on frozen sections of rodent muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 355-361.

## G

- GALBIATI F., ENGELMAN J.A., VOLONTE D., ZHANG X.L., MINETTI C., LI N., HOU H. JR., KNEITZ B., EDELMANN W., LISANTI M.P. (2001a) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 21425-21433.
- GALBIATI F., RAZANI B., LISANTI M.P. (2001b) Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* 7, 435-441.
- GALBIATI F., VOLONTE D., CHU J.B., LI N., 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, 9689-9694.
- GALLER S., HILBER K., GOBESBERGER A. (1997) Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 434, 242-245.
- GANITKEVICH V.Y. (2003) The role of mitochondria in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> cycling. *Exp. Physiol.* 88, 91-97.
- GARCIA J., AMADOR M., STEFANI E. (1989) Relationship between myoplasmic calcium transients and calcium currents in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 94, 973-986.
- GARCIA J. & BEAM K.G. (1994) Measurement of calcium transients and slow calcium current in myotubes. *J. Gen. Physiol.* 103, 107-123.
- GARCIA J. & SCHNEIDER M.F. (1993) Calcium transient and calcium release in rat fast-twitch skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 463, 709-728.
- GARCIA J. & SCHNEIDER M.F. (1995) Suppression of calcium release by calcium or procaine in voltage-clamped rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 485, 437-445.
- GARCIA J., TANABE T., BEAM K.G. (1994) Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptor. *J. Gen. Physiol.* 103, 125-147.
- GARCIA M.C., DIAZ A.F., GODINEZ R., SANCHEZ J.A. (1992) Effect of sodium deprivation on contraction and charge movement in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 13, 354-365.

- GARCIA-CARDENA G., MARTASEK P., MASTERS B.S.S., SKIDD P.M., COUET J., LI S., LISANTI M.P., SESSA W.C. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 272, 25437-25440.
- GILLIS J.M. (1997) Inhibition of mitochondrial calcium uptake slows down relaxation in mitochondria-rich skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 18, 473-483.
- GILLIS J.M., THOMASON D., LEFEVRE J., KRETSINGER R.H. (1982) Parvalbumins and muscle relaxation: a computer stimulation study. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 3, 377-398.
- GIMPL G., BURGER K., FAHRENHOLZ F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10929-10974.
- GLEASON M.M., MEDOW M.S., TULENKO T. (1991) Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ. Res.* 69, 216-227.
- GONOI T. & HASEGAWA S. (1988) Post-natal disappearance of transient calcium channels in mouse skeletal muscle: effects of denervation and culture. *J. Physiol.* 491, 617-637.
- GORDON A.M., HOMSHER E., REGNIER M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 80, 853-924.
- GRABNER M., DIRKSEN R.T., SUDA N., BEAM K.G. (1999) The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the bi-directional coupling with the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 21913-21919.
- GREGG R.G., MESSING A., STRUBE C., BEURG M., MOSS R., BEHAN M., SUKHAREVA M., HAYNES S., POWELL J.A., CORONADO R., POWERS P.A. (1996) Absence of the  $\beta$  subunit (*cchb1*) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the  $\alpha_1$  subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *PNAS* 93, 13961-13966.
- GROZDANOVIC Z. (2001) NO message from muscle. *Microsc. Res. Tech.* 55, 148-153.
- GROVER A.K. & KHAN I. (1992) Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* 13, 9-17.
- GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN R.Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- GUO W. & CAMPBELL K.P. (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270, 9027-9030.
- GURROLA G.B., AREVALO C., SREEKUMAR R., LOKUTA A.J., WALKER J.W., VALDIVIA H.H. (1999) Activation of ryanodine receptors by Imperatoxin A et a peptide segment of the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 7879-7886.
- GYORKE S. & PALADE P. (1992) Effects of perchlorate on excitation-contraction coupling in frog and crayfish skeletal muscle. *J. Physiol.* 456, 443-451.

## H

- HAILSTONES D., SLEER L.S., PARTON R.G., STANLEY K.K. (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid. Res.* 39, 369-379.
- HAIN J., NATH S., MAYRLEITNER M., FLEISCHER S., SCHINDLER H. (1994) Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Biophys. J.* 67, 1823-1833.
- HART J.D.E. & DULHUNTY A.F. (2000) Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding. *J. Membrane Biol.* 173, 227-236.

- HAUSCHKA S.D. (1994) The embryonic origin of muscle. In "Myology", ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 3-73.
- HEADY T.N., GOMORA J.C., MACDONALD T.L., PEREZ-REYES E. (2001) Molecular pharmacology of T-type  $Ca^{2+}$  channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 339-350.
- HEIZMANN C.W., BERCHTOLD M.W., ROWLERSON A.M. (1982) Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *PNAS* 79, 7243-7247.
- HENRIKSEN E.J., BOUREY R.E., RODNICK K.J., KORANYI L., PERMUTT M.A., HOLLOSZY J.O. (2000) Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 279, E593-598.
- HENROTTE J.G. (1951) A crystalline constituent from myogen of carp muscles. *Nature* 169, 968-969.
- HESS P., LANSMAN J.B., TSIEN R.W. (1986) Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations: Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.* 88, 293-319.
- HIDALGO C. (1985) Lipid phase of transverse tubule membranes from skeletal muscle. An electron paramagnetic resonance study. *Biophys. J.* 47, 757-764.
- HIDALGO C. & DONOSO P. (1995) Luminal calcium regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biosci. Rep.* 15, 387-397.
- HILL A.V. (1948) On the time required for diffusion and its relation to processes in muscle. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 135, 446-453.
- HILL A.V. (1949) The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 136, 399-420.
- HIRSCHFIELD W., MOODY M.R., O'BRIEN W.E., GREGG A.R., BRYAN R.M.JR., REID M.B. (2000) Nitric oxide release and contractile properties of skeletal muscles from mice deficient in type III NOS. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278, R95-R100.
- HOCKERMAN G.H., PETERSON B.Z., JOHNSON B.D., CATTERALL W.A. (1997) Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 361-396.
- HODGKIN A.L. & HUXLEY A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544.
- HOFMANN T., SCHAEFER M., SCHULTZ G., GUDERMANN T. (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J. Mol. Med.* 78, 14-25.
- HOPF F.W., REDDY P., HONG J., STEINHARDT R.A. (1996) A capacitive calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J. Biol. Chem.* 271, 22358-22367.
- HORWITZ A.F., SCHOTLAND D.L., FRANZINI-ARMSTRONG C. (1994) The plasma membrane of muscle fiber: composition and structure. In "Myology", ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 200-201.
- HOTH M. & PENNER R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- HUERTA M., MUNIZ J., VASQUEZ C., MARIN J.L., TRUJILLO X. (1991) Sodium/calcium exchange in tonic skeletal muscle fibers of the frog. *Jpn. J. Physiol.* 41, 933-944.
- HUXLEY A.F. & NIEDERGERKE R. (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173, 971-973
- HUXLEY H.E. & HANSON J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 194, 973-6.



**I**

- IKEMOTO N., ANTONIU B., KANG J.J., MESZAROS L.G., RONJAT M. (1991) Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 30, 5230-5237.
- IKEMOTO N., YAMAMOTO T. (2000) The luminal  $Ca^{2+}$  transient controls  $Ca^{2+}$  release/re-uptake of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 858-863.
- IKEMOTO T., TAKESHIMA H., IINO M., ENDO M. (1998) Effect of calmodulin on  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release of skeletal muscle from mutant mice expressing either ryanodine receptor type1 or type3. *Pflügers Arch.* 437, 43-48.
- INESI G. & DE MEIS L. (1989) Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum. Roles of back-inhibition, leakage and slippage of the calcium pump. *J. Biol. Chem.* 264, 5929-5936.
- INESI G. & SAGARA Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular  $Ca^{2+}$  transport ATPases. *J. Membr. Biol.* 141, 1-6.
- ISAEVA E.V. & SHIROKOVA N. (2003) Metabolic regulation of  $Ca^{2+}$  release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 547, 453-462.
- ISHII T., SUNAMI O., SAITOH N., NISHIO H., TAKEUCHI T., HATA F. (1998) Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase by nitric oxide. *FEBS Letters* 440, 218-222.
- ISHIKAWA H., SAWADA H., YAMADA E. (1983) Surface and internal morphology of skeletal muscle. In "Handbook of Physiology", ed. by Peachey L.D., Adrian R.H. & Geiger S.R., American Physiological Society, Baltimore. Section 10 pp. 1-21.

**J**

- JACQUEMOND V. (1997) Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73, 920-928.
- JACQUEMOND V., CSERNOCH L., KLEIN M.G., SCHNEIDER M.F. (1991) Voltage-gated and calcium-gated calcium release during depolarization of skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 60, 867-873.
- JAIMOVICH E., CARRASCO M.A. (2002) IP3 dependent  $Ca^{2+}$  signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol. Res.* 35, 195-202.
- JAYARAMAN T., BRILLANTES A.M., TIMERMAN A.P., FLEISCHER S., ERDJUMENT-BROMAGE H., TEMPST P., MARKS A.R. (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 267, 9474-9477.
- JONES S.W. (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 299-312.
- JORGENSEN A.O., SHEN A. C-Y., ARNOLD W., LEUNG A.T., CAMPBELL K.P. (1989) Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J. Cell Biol.* 109, 135-147.
- JOUAVILLE L.S., PINTON P., BASTIANUTTO C., RUTTER G.A., RIZZUTO R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *PNAS* 96, 13807-13812.

**K**

- KAMEYA S., MIYAGOE Y., NONAKA I., IKEMOTO T., ENDO M., HANAOKA K., NABESHIMA Y., TAKEDA S. (1999)  $\alpha_1$ -syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274, 2193-2200.

- KAMINSKI H.J. & ANDRADE F.H. (2001) Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromusc. Dis.* 11, 517-524.
- KIRSCH C., ECKERT G.P., MUELLER W.E. (2003) Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem. Pharmacol.* 65, 843-856.
- KIRSCH W.G., UTTENWEILER D., FINK R.H.A. (2001) Spark- and ember-like elementary Ca<sup>2+</sup> release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 537, 379-389.
- KLEIN M.G., CHENG H., SANTANA L.F., JIANG Y.H., LEDERER W.J., SCHNEIDER M.F. (1996) Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379, 455-458.
- KLEIN M.G., LACAMPAGNE A., SCHNEIDER M.F. (1997) Voltage dependence of the pattern and frequency of discrete Ca<sup>2+</sup> release events after brief repriming in frog skeletal muscle. *PNAS* 94, 11061-11066.
- KNUDSON C.M., STANG K.K., JORGENSEN A.O., CAMPBELL K.P. (1993) Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J. Biol. Chem.* 268, 12637-12645.
- KOBZIK L., REID M.B., BREDT D.S., STAMLER J. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372, 546-548.
- KOVACS L., RIOS E., SCHNEIDER M.F. (1979) Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibres. *Nature* 279, 391-396.
- KOMAZAKI S., NISHI M., TAKESHIMA H., NAKAMURA H. (2001) Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Develop. Growth. Differ.* 43, 717-723.
- KUREBAYASHI N. & OGAWA Y. (2001) Depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 533, 185-199.

## L

- LACAMPAGNE A., KLEIN M.G., SCHNEIDER M.F. (1998) Modulation of the frequency of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release events (Ca<sup>2+</sup> sparks) by myoplasmic [Mg<sup>2+</sup>] in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 111, 207-224.
- LACAMPAGNE A., LEDERER W.J., SCHNEIDER M.F., KLEIN M.G. (1996) Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca<sup>2+</sup> release events in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 497, 581-588.
- LACAMPAGNE A., WARD C.W., KLEIN M.G., SCHNEIDER M.F. (1999) Time course of individual Ca<sup>2+</sup> sparks in frog skeletal muscle recorded at high time resolution. *J. Gen. Physiol.* 113, 187-198.
- LAI F.A., ERICKSON H.P., ROUSSEAU E., LIU Q.Y., MEISSNER G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331, 315-319.
- LAMB G.D. (1986) Asymmetric charge movement in contracting muscle fibres in the rabbit. *J. Physiol.* 376, 63-83.
- LAMB G.D. & WALSH T. (1987) Calcium currents, charge movement and dihydropyridine binding in fast- and slow-twitch muscles of rat and rabbit. *J. Physiol.* 393, 595-617.
- LAMB G.D., EL-HAYEK R., IKEMOTO N., STEPHENSON D.G. (2000) Effects of dihydropyridine receptor II-III loop peptides on Ca<sup>2+</sup> release in skinned skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279, C891-C905.
- LÄNNERGREN J., WESTERBLAD H., BRUTON J. (2001) Changes in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> detected with Rhod-2 in single frog and mouse skeletal muscle fibres during and after repeated tetanic contractions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 265-275.

- LAUNIKONIS B.S., BARNES M., STEPHENSON D.G. (2003) Identification of the coupling between skeletal muscle store-operated  $Ca^{2+}$  entry and the inositol trisphosphate receptor. *PNAS* 100, 2941-2944.
- LAUNIKONIS B.S., STEPHENSON D.G. (2001) Effects of membrane cholesterol manipulation on excitation-contraction coupling in skeletal muscle of the toad. *J. Physiol.* 534, 71-85.
- LEONG P. & MACLENNAN D.H. (1988) A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domain II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 7791-7794.
- LIBERONA J.L., POWELL J.A., SHENOI S., PETHERBRIDGE L., CAVIEDES R., JAIMOVICH E. (1998) Differences in both inositol 1,4,5-trisphosphate mass and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle Nerve* 21, 902-909.
- LISANTI M.P., SCHERER P.E., VIDUGIRIENE J., TANG Z., HERMANOWSKI-VOSATKA A., TU Y.H., COOK R.F., SARGIACOMO M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell. Biol.* 126, 111-126.
- LIU Y., CARROLL S.L., KLEIN M.G., SCHNEIDER M.F. (1997) Calcium transients and calcium homeostasis in adult mouse fast-twitch skeletal muscle fibers in culture. *Am. J. Physiol.* 272, C1919-C1927.
- LIU Q.Y., LAI F.A., ROUSSEAU E., JONES R.V., MEISSNER G. (1989) Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 55, 415-424.
- LOHN M., FURSTENAU M., SAGACH V., ELGER M., SCHULZE W., LUFT F., HALLER H., GOLLASCH M. (2000) Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ. Res.* 87, 1034-1039.
- LORENZON N.M. & BEAM K.G. (2000) Calcium channelopathies. *Kidney Int.* 57, 794-802.
- LUFF A. & ATWOOD H.L. (1972) Membrane properties and contraction of single muscle fibers in the mouse. *Am. J. Physiol.* 222, 1435-1440.
- LU X., XU L., MEISSNER G. (1994) Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 6511-6516.
- LYTTON J., WESTLIN M., BURK S.E., SHULL G.E., MACLENNAN D.H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267, 14483-14489.

## M

- MA J. & PAN Z. (2003) Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells. *Front. Biosci.* 8, 242-255.
- MACCLESKEY E.W. & ALMERS W. (1985) The Ca channel in skeletal muscle is a large pore. *PNAS* 82, 7149-7153.
- MACDONALD T.F., PELZER S., TRAUTWEIN W., PELZER D.J. (1994) Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 74, 365-507.
- MACKRILL J.J. (1999) Protein-protein interactions in intracellular  $Ca^{2+}$ -release channel function. *Biochem. J.* 337, 345-361.
- MACLENNAN D.H. & KRANIAS. E.G. (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 566-577.
- MADSEN K., ERTBJERG P., DJURHUUS M.S., PEDERSEN P.K. (1996) Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 271, E1044-E1050.
- MARECHAL G. & GAILLY P. (1999) Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1088-1102.

- MARTENS J.R., NAVARRO-POLANCO R., COPPOCK E.A., NISHIYAMA A., PARSHLEY L., GROBASKI T.D., TAMKUN M.M. (2000) Differential targeting of shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 7443-7446.
- MARTONOSI A.N. & PIKULA S. (2003) The network of calcium regulation in muscle. *Acta. Biochim. Pol.* 50, 1-30.
- MARTONOSI A.N. (1994) Regulation of calcium by the sarcoplasmic reticulum. In «*Myology*», ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 553-584.
- MARTY I., ROBERT M., VILLAZ M., DE JONGH K., LAI Y., CATTERALL W.A., RONJAT M. (1994) Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *PNAS* 91, 2270-2274.
- MARX S.O., ONDRIAS K., MARKS A.R. (1998) Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptor). *Science* 281, 818-821.
- MASSION P.B., FERON O., DESSY C., BALLIGAND J.L. (2003) Nitric Oxide and cardiac function. Ten years after, and continuing. *Circ. Res.* 93, 388-398.
- MEISSNER G. (1984) Adenine nucleotide stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 259, 2365-2374.
- MEISSNER G., DARLING E., EVELETH J. (1986) Kinetics of rapid Ca<sup>2+</sup> release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides. *Biochemistry* 25, 236-244.
- MEISSNER G. & EL-HASHEM A. (1992) Ryanodine as a functional probe of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. *Mol. Cell. Biochem.* 114, 119-123.
- MEISSNER G. (1994) Ryanodine receptors/Ca<sup>2+</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485-508.
- MEISSNER G. (2002) Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front. Biosci.* 7, d2072-d2080.
- MELZER W. & DIETZE B. (2001) Malignant hyperthermia and excitation-contraction coupling. *Acta Physiol. Scand.* 171, 367-378.
- MELZER W., HERRMANN-FRANK A., LÜTTGAU H.C. (1995) The role of Ca<sup>2+</sup> ion in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 59-116.
- MELZER W., RIOS E., SCHNEIDER M.F. (1984) Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 45, 637-641.
- MELZER W., SCHNEIDER M.F., SIMON B.J., SZUCS G. (1986) Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 373, 481-511.
- MESZAROS L.G., MINAROVIC I., ZAHRADNIKOVA A. (1996) Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *FEBS Letters* 380, 49-52.
- MICHALAK M., FAMULSKI K., CARAFOLI E. (1984) The Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase in skeletal muscle sarcolemma. Calmodulin dependence, regulation by cAMP-dependent phosphorylation, and purification. *J. Biol. Chem.* 259, 15540-15547.
- MICKELSON J.R., BEAUDRY T.M., LOUIS C.F. (1985) Regulation of skeletal muscle sarcolemmal ATP-dependent calcium transport by calmodulin and cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 127-136.
- MINETTI C., BADO M., BRODA P., SOTGIA F., BRUNO C., GALBIATI F., VOLONTE D., LUCANIA G., PAVAN A., BONILLA E., LISANTI M.P., CORDONE G. (2002) Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am. J. Pathol.* 160, 265-270.

- MINETTI C., SOTGIA F., BRUNO C., SCARTEZZINI P., BRODA P., BADO M., MASETTI E., MAZZOCCO M., EGEO A., DONATI M.A., VOLONTE D., GALBIATI F., CORDONE G., BRICARELLI F., LISANTI M.P., ZARA F. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18, 365-368.
- MISSIAEN L., ROBBERECHT W., VAN DEN BOSCH L., CALLEWAERT G., PARYS J.B., WUYTACK F., RAEYMAEKERS L., NILIUS B., EGGERMONT J., DE SMEDT H. (2000) Abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and disease. *Cell Calcium* 28, 1-21.
- MITCHELL R.D., SIMMERMAN H.K., JONES L.R. (1988) Ca<sup>2+</sup> binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.* 263, 1376-1381.
- MONTELL C., BIRNBAUMER L., FLOCKERZI V. (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cel.* 108, 595-598.
- MONTELL C., RUBIN G.M. (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.
- MOSCHELLA M.C., WATRAS J., JAYARAMAN T., MARKS A.R. (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in skeletal muscle: differential expression in myofibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 390-400.
- MOSS R.L., LAUER M.R., GIULIAN G.G., GREASER M.L. (1986) Altered Ca<sup>2+</sup> dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 61, 6096-6099.
- MOUNIER Y., HOLY X., STEVENS L. (1989) Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch.* 415, 136-141.
- MÜNTENER M., KÄSER L., WEBER J., BERCHTOLD M.W. (1995) Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. *PNAS* 92, 6504-6508.
- MUNTZ L. (1990) Cellular and biochemical aspects of muscle differentiation. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B, 215-225.
- MURAYAMA T., OBA T., KATAYAMA E., OYAMADA H., OGUCHI K., KOBAYASHI M., OTSUKA K.L., OGAWA Y. (1999) Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from Rabbit diaphragm. *J. Biol. Chem.* 272, 17297-17308.
- MURAYAMA T. & OGAWA Y. (1997) Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* 272, 24030-24037.
- MURAYAMA T. & OGAWA Y. (2002) Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 305-311.

## N

- NAKAI J., SEKIGUCHI N., RANDO T.A., ALLEN P.D., BEAM K.G. (1998) Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 273, 13403-13406.
- NAKANE M., SCHMIDT H.H.H.W., POLLOCK J.S., FOSTERMANN U., MURAD F. (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters* 316, 175-180.
- NICOLL D.A., LONGONI S., PHILIPSON K.D. (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science* 250, 562-565.
- NICOLL D.A., OTTOLIA M., LU L., LU Y., PHILIPSON K.D. (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* 274, 910-917.
- NISHI M., KOMAZAKI S., KUREBAYASHI N., OGAWA Y., NODA T., IINO M., TAKESHIMA H. (1999) Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking Mitsugumin29. *J. Cell. Biol.* 147, 1473-1480.

## O

- ODERMATT A., BECKER S., KHANNA V.J., KURZYDLOWSKI K., LEISNER E., PETTE D., MACLENNAN D.H. (1998) Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 12360-12369.
- OGATA T. & YAMASAKI Y. (1985) Scanning electron microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white, and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res.* 241, 251-256.
- OGAWA Y., KUREBAYASHI N., MURAYAMA T. (1999) Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Adv. Biophys.* 36, 27-64.
- OGAWA Y., KUREBAYASHI N., MURAYAMA T. (2000) Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 65-70.
- O'REILLY F., ROBERT M., JONA I., SZEGEDI C., ALBRIEUX M., GEIB S., DE WAARD M., VILLAZ M., RONJAT M. (2002) FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys. J.* 82, 145-155.

## P

- PAN Z., YANG D., NAGARAJ R.Y., NOSEK T.A., NISHI M., TAKESHIMA H., CHENG H., MA. J. (2002) Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking *mg29*. *Nat. Cell. Biol.* 4, 379-383.
- PARDO J.V., D'ANGELO SILICIANO J., CRAIG S.W. (1983) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *PNAS* 80, 1008-1012.
- PAREKH A.B. & PENNER R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Phys. Rev.* 77, 901-930.
- PARTON R.G., WAY M., ZORZI N., STANG E. (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 136, 137-154.
- PAULS T.L., COX J.A., BERCHTOLD M.W. (1996a) The  $Ca^{2+}$ -binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings. *Biochim. Biophys. Acta.* 1306, 39-54.
- PAULS T.L., DURUSSEL I., CLARK I.D., SZABO A.G., BERCHTOLD M.W., COX J.A. (1996b) Site-specific replacement of amino acid residues in the CD site of rat parvalbumin changes the metal specificity of this  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -mixed site toward a  $Ca^{2+}$ -specific site. *Eur. J. Biochem.* 242, 249-255.
- PEACHEY L.D. & FRANZINI-ARMSTRONG C. (1983) Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In "*Handbook of Physiology*", ed. by Peachey L.D., Adrian R.H. et Geiger S.R., American Physiological Society, Baltimore. Section 10 pp. 23-71.
- PEREZ-REYES E. (1998) Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 313-318.
- PEREZ-REYES E. (1999) Three for T: analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 660-669.
- PEREZ-REYES E. (2003) Molecular physiology of Low-Voltage-Activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83, 117-161.
- PERKINS W. J., HAN Y. S., SIECK G.C. (1997) Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J. Appl. Physiol.* 83, 1326-1332.
- PERRY S.V. (1994) Activation of the contractile mechanism by calcium. In "*Myology*", ed. by Engel A.G. & Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San Francisco. pp. 200-201.

- PETTE D. (1998) Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol. Scand.* 162, 367-376.
- PIZARRO G., FITTS R., URIBE I., RIOS E. (1989) The voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Ion dependence and selectivity. *J. Gen. Physiol.* 94, 405-428.
- PIZARRO G., CSERNOCH L., URIBE I., RIOS E. (1992) Differential effects of tetracaine on two kinetic components of calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 457, 525-538.
- PIZARRO G., SHIROKOVA N., TSUGORKA A., RIOS E. (1997) "Quantal" calcium release operated by membrane voltage in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 501, 289-303.
- PORTER G.A., DMYTRENKO G.M., WINKELMANN J.C., BLOCH R.J. (1992) Dystrophin colocalizes with  $\beta$ -spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 117, 997-1005.
- POTTER J.D., ROBERTSON S.P., JOHNSON J.D. (1981) Magnesium and the regulation of muscle contraction. *Fed. Proc.* 40, 2653-2656.
- POWELL J. A., PETHERBRIDGE L., FLUCHER B. E. (1996) Formation of triads without the dihydropyridine receptor  $\alpha$  subunits in cell lines from dysgenic skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 134, 375-387.
- POWERS P.A., LIU S., HOGAN K., GREGG R.G. (1992) Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 267, 22967-22972.
- PROTASI F. (2002) Structural interaction between RyRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci.* 7, d650-d658.
- PROTASI F., FRANZINI-ARMSTRONG C., ALLEN P.D. (1998) Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release unit in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 140, 831-842.
- PROTASI F., TAKEKURA H., WANG Y., CHEN S.R.W., MEISSNER G., ALLEN P.D., FRANZINI-ARMSTRONG C. (2000) RyR1 and RyR3 have different roles in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. *Biophys. J.* 79, 2494-2508.
- PRZYBYLSKI R.J., SZIGETI V., DAVIDHEISER S., KIRBY A.C. (1994) Calcium regulation of skeletal myogenesis. II. Extracellular and cell surface effects. *Cell Calcium* 15, 132-142.
- PUTNEY J.W.JR, BROAD L.M., BRAUN F.J., LIEVREMONT J.P., BIRD G.S. (2001) Mechanisms of capacitive calcium entry. *J. Cell. Sci.* 114, 2223-2229.

## Q

- QUEDNAU B.D., NICOLL D.A., PHILIPSON K.D. (2004) The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Eur. J. Physiol.* 447, 543-548.

## R

- RADERMACHER M., RAO V., GRASSUCCI R., FRANK J., TIMERMAN A.P., FLEISCHER S., WAGENKNECHT T. (1994) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 127, 411-423.
- RAKOWSKI R.F., BEST P.M., JAMES-KRACKE M.R. (1985) Voltage dependence of membrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 6, 403-433.
- RAKOWSKI R.F., BEST P.M., JAMES-KRACKE M.R. (1985) Voltage dependence of membrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 6, 403-433.
- RALSTON E. & PLOUG T. (1999) Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.* 246, 510-515.

- RAYMACKERS J.M., GAILLY P., COLSON-VAN SCHOOR M., PETTE D., SCHWALLER B., HUNZIKER W., CELIO M.R., GILLIS J.M. (2000) Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation. *J. Physiol.* 527, 355-364.
- RAZANI B., SCHLEGEL A., LISANTI M.P. (2000) Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 113, 2103-2109.
- RAZANI B., WOODMAN S.E., LISANTI M.P. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54, 431-467.
- REID M.B. (1998) Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol. Scand.* 162, 401-409.
- REID M.B., KOBZIK L., BREDT D.S., STAMLER J.S. (1998) Nitric Oxide modulates excitation-contraction coupling in the diaphragm. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 119, 211-218.
- REIKEN S., LACAMPAGNE A., ZHOU H., KHERANI A., LEHNART S.E., WARD C., HUANG F., GABURJAKOVA M., GABURJAKOVA J., ROSEMBLIT N., WARREN M.S., HE K., YI G., WANG J., BURKHOFF D., VASSORT G., MARKS A.R. (2003) PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J. Cell. Biol.* 160, 919-928.
- RENAUD J.F., SCHMID A., ROMÉY G., NANO J.L., LADZUNSKI M. (1986) Mevinolin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis, drastically depresses  $Ca^{2+}$  channel activity and uncouples excitation from contraction in cardiac cells in culture. *PNAS* 83, 8007-8011.
- RENGANATHAN M., SONNTAG W.E., DELBONO O. (1997) L-type  $Ca^{2+}$  channel-insulin-like growth factor-1 receptor signaling impairment in aging rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 784-789.
- REPETTO S., BADO M., BRODA P., LUCANIA G., MASETTI E., SOTGIA F., CARBONE I., PAVAN A., BONILLA E., CORDONE G., LISANTI M.P., MINETTI C. (1999) Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne Muscular Dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 547-550.
- RIEGER F., PINCON-RAYMOND M., TASSIN A.M., GARCIA L., ROMÉY G., FOSSET M., LADZUNSKI M. (1987) Excitation-contraction uncoupling in the developing skeletal muscle of the muscular dysgenesis mouse embryo. *Biochimie* 69, 411-417.
- RICHMONDS C.R. & KAMINSKI H.J. (2001) Nitric oxide synthase expression and effects of nitric oxide modulation on contractility of rat extraocular muscle. *FASEB. J.* 15, 1764-1770.
- RIOS E. & BRUM G. (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325, 717-720.
- RIOS E., KARHANEK M., MA J., GONZALEZ A. (1993) An allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 102, 449-481.
- RIOS E., MA J.J., GONZALEZ A. (1991) The mechanical hypothesis of excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 12, 127-135.
- RIOS E. & PIZARRO G. (1988) Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *NIPS* 3, 223-226.
- RIOS E. & PIZARRO G. (1991) Voltage sensor and calcium channels of excitation-contraction coupling. *Physiol. Rev.* 71, 849-908.
- RIOS E., PIZARRO G., STEFANI E. (1992) Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 109-133.
- RIOS E. & STERN M.D. (1997) Calcium in close quarters: Microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 47-82.



- RIZZUTO R., BERNARDI P., POZZAN T. (2000) Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* 529, 37-47.
- ROBERTSON S.P., JOHNSON J.D., POTTER J.D. (1981) The time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biophys. J.* 34, 559-569.
- ROMEY G., GARCIA L., DIMITRIADOU V., PINCON-RAYMOND M., RIEGER F., LADZUNSKI M. (1989) Ontogenesis and localization of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian skeletal muscle in culture and role in excitation-contraction coupling. *PNAS* 86, 2933-2937.
- ROSEMBLATT M., HIDALGO C., VERGARA C., IKEMOTO N. (1981) Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256, 8140-8148.
- ROTHBERG K;G., HEUDER J.E., DONZELL W.C., YING Y.S., GLENNEY J.R., ANDERSON R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682
- ROUSSEAU E., SMITH J.S., MEISSNER G. (1987) Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 253, C364-C368.
- RUEGG U.T. & GILLIS J.M. (1999) Calcium homeostasis in dystrophic muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 351-352.
- RUFF R.L. (1989) Calcium sensitivity of fast- and slow-twitch human muscle fibers. *Muscle Nerve* 12, 32-37.

## S

- SACCHETTO R., MARGRETH A., PELOSI M., CARAFOLI E. (1996) Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 237, 483-488.
- SAIKI Y., EL-HAYEK R., IKEMOTO N. (1999) Involvement of the Glu<sup>724</sup>-Pro<sup>760</sup> region of the dihydropyridine receptor II-III loop in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *J. Biol. Chem.* 274, 7825-7832.
- SALVIATI G., BETTO R., DANIELI BETTO D., ZEVIANI M. (1984) Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -transport activity of single human muscle fibres. *Biochem. J.* 224, 215-225.
- SALZBERG S., MANDELBAUM M., ZALCBERG M., SHAINBERG A (1995) Interruption of myogenesis by transforming growth factor  $\beta$ 1 or EGTA inhibits expression and activity of the myogenic-associated (2'-5') oligoadenylate synthetase and PKR. *Exp. Cell Res.* 219, 223-232.
- SANDOW A. (1965) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol. Review.* 17, 265-320.
- SARKOZI S., SZEGEDI C., SZENTESI P., CSERNOCH L., KOVACS L., JONA I. (2000) Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 131-138.
- SCHNEIDER M.F. (1981) Membrane charge movement and depolarization-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 507-517.
- SCHNEIDER M.F. (1994) Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 463-484.
- SCHNEIDER M.F. (1999)  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in frog skeletal muscle: generation by one, some, or many SR  $\text{Ca}^{2+}$  release channels? *J. Gen. Physiol.* 113, 365-371.
- SCHNEIDER M.F. & CHANDLER W.K. (1973) Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242, 244-246.
- SCHNEIDER M.F. & SIMON B.J. (1988) Inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 405, 727-745.

- SCHNIER A., LÜTTGAU H.C., MELZER W. (1993) Role of extracellular metal cations in the potential dependence of force inactivation in skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 14, 565-572.
- SCHNITZER J.E., OH P., PINNEY E., ALLARD J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell. Biol.* 127, 1217-1232.
- SCHWALLER B., DICK J., DHOOT G., CARROLL S., VRBOVA G., NICOTERA P., PETTE D., WYSS A., BLUETHMANN H., HUNZIKER W., CELIO M.R. (1999) Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am. J. Physiol.* 276, C395-C403.
- SCHWARTZ L.M., MCCLESKEY E.W., ALMERS W. (1985) Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. *Nature* 314, 747-751.
- SEGAL S.S., BRETT S.E., SESSA W.C. (1999) Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am. J. Physiol.* 277, H1167-H1177.
- SEMBROWICH W.L., QUINTINSKIE J.J., LI G. (1985) Calcium uptake in mitochondria from different skeletal muscle types. *J. Appl. Physiol.* 59, 137-141.
- SEN L., BIALECKI R.A., SMITH E., SMITH T.W., COLLUCCI W.S. (1992) Cholesterol increases the L-type voltage-sensitive calcium channel current in arterial smooth muscle cells. *Circ. Res.* 71, 1008-1014.
- SHIMAHARA T. & BOURNAUD R. (1991) Barium currents in developing skeletal muscle cells of normal and mutant mice foetuses with "muscular dysgenesis". *Cell Calcium* 12, 727-733.
- SHIN D.W., PAN Z., KIM E.K., LEE J.M., BHAT M.B., PARNES J., KIM DO H., MA J. (2003) A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 278, 3286-3292.
- SHIROKOVA N., GARCIA J., PIZARRO G., RIOS E. (1996)  $Ca^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 107, 1-18.
- SHIROKOVA N., GARCIA J., RIOS E. (1998) Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 512, 377-384.
- SHIROKOVA N., SHIROKOV R., ROSSI D., GONZALEZ A., KIRSCH W.G., GARCIA J., SORRENTINO V., RIOS E. (1999) Spatially segregated control of  $Ca^{2+}$  release in developing skeletal muscle of mice. *J. Physiol.* 521, 483-485.
- SILVAGNO F., XIA H., BREDY D.S. (1996) Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 11204-11208.
- SILVEIRA L.R., PEREIRA-DA-SILVA L., JUEL C., HELLSTEN Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Rad. Biol. Med.* 35, 455-464.
- SIMON B.J. & BEAM K.G. (1985) Slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 85, 1-19.
- SIMON B.J. & HILL D.A. (1988) Charge movement and SR calcium release in frog skeletal muscle can be related by a Hodgkin-Huxley model with four gating particles. *Biophys. J.* 61, 1109-1116.
- SLACK J.P., GRUPP I.L., FERGUSON D.G., ROSENTHAL N., KRANIAS E.G. (1997) Ectopic expression of phospholamban in fast-twitch skeletal muscle alters sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  transport and muscle relaxation. *J. Biol. Chem.* 272, 18862-18868.
- SMITH J.S., IMAGAWA T., MA J., FILL M., CAMPBELL K.P., CORONADO R. (1988) Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92, 1-26.
- SMITH J.S., ROUSSEAU E., MEISSNER G. (1989) Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ. Res.* 64, 352-359.

- SOMLYO A.V., GONZALEZ-SERRATOS H.G., SHUMAN H., MCCLENNAN G., SOMLYO A.P. (1981) Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J. Cell. Biol.* 90, 577-594.
- SONG K.S., SCHERER P.E., TANG Z.L., 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. *J. Biol. Chem.* 271, 15160-15165.
- SORENSEN M.M., DA SILVA A.C., GOUVEIA C.S., SOUSA V.P., OSHIMA W., FERRO J.A., REINACH F.C. (1995) Concerted action of the high affinity calcium binding sites in skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* 270, 9770-9777.
- SORRENTINO V. & REGGIANI C. (1999) Expression of the ryanodine receptor type 3 in skeletal muscle. A new partner in excitation-contraction coupling? *Trends Cardiovasc. Med.* 1/2, 54-61.
- SORRENTINO V. & VOLPE P. (1993) Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 98-103.
- SOTGIA F., KYUNG LEE J., DAS K., BEDFORD M., PETRUCCI T.C., MACIOCE P., SARGIACOMO M., DAGNA BRICARELLI F., MINETTI C., SUDOL M., LISANTI M.P. (2000) Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of  $\beta$ -dystroglycan: identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J. Biol. Chem.* 275, 38048-38058.
- STAMLER J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.
- STAMLER J.S., LAMAS S., FANG F.C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683.
- STAMLER J.S. & MEISSNER G. (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81, 209-237.
- STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1981) Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. *J. Physiol.* 317, 281-302.
- STERN M.D., PIZARRO G., RIOS E. (1997) Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 110, 415-440.
- STOKES D.L. & WAGENKNECHT T. (2000) Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum. Structure and function of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur. J. Biochem.* 267, 5274-5279.
- STOYANOVSKY D., MURPHY T., ANNO P.R., KIM Y.M., SALAMA G. (1997) Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21, 19-29.
- STRUBE C., BEURG M., GEORGESCAULD D., BOURNAUD R., SHIMAHARA T. (1994) Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and independent calcium transient in fetal myotubes. *Pflügers Arch.* 427, 517-523
- STRUBE C., BEURG M., POWERS P.A., GREGG R.G., CORONADO R. (1996) Reduced  $\text{Ca}^{2+}$  current, charge movement, and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in skeletal muscle deficient in dihydropyridine receptor  $\beta_1$  subunit. *Biophys. J.* 71, 2531-2543.
- STRUBE C., BOURNAUD R., INOUE I., SHIMAHARA T. (1992) Intramembrane charge movement in developing skeletal muscle cells from fetal mice. *Pflügers Arch.* 421, 572-577.
- STRUBE C., TOURNEUR Y., OJEDA C. (2000) Functional expression of the L-type calcium channel in mice skeletal muscle during prenatal myogenesis. *Biophys. J.* 275, 1282-1292.
- SUH-KIM H., WEI X., KLOS A., PAN S., RUTH P., FLOCKERZI V., HOFMANN F., PEREZ-REYES E., BIRNBAUMER L. (1996) Reconstitution of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. Functional interaction among alpha 1, beta, gamma and alpha 2 delta subunits. *Receptors Channels* 4, 217-225.

- SUN J., XU L., EU J.P., STAMLER J.S., MEISSNER G. (2003) Nitric Oxide, NOC-12 and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms: an allosteric function for O<sub>2</sub> in S-nitrosylation of the channel. *J. Biol. Chem.* 278, 8184-8189.
- SUN J., XIN C., EU J.P., STAMLER J.S., MEISSNER G. (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *PNAS* 98, 11158-11162.
- SUNADA Y., OHI H., HASE A., OHI H., HOSONO T., ARATA S., HIGUCHI S., MATSUMARA K., SHIMIZU T. (2001) Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum. Mol. Gen.* 10, 173-178.
- SUKO J., DROBNY H., HELLMANN G. (1999) Activation and inhibition of purified skeletal muscle calcium release channel by NO donors in single channel current recordings. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 271-287.
- SZENTESI P., COLLET C., SARKOZI S., SZEGEDI C., JONA I., JACQUEMOND V., KOVACS L., CSERNOCH L. (2001) Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 118, 355-375.
- SZENTESI P., JACQUEMOND V., KOVACS L., CSERNOCH L. (1997) Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 505, 371-384.
- SZENTESI P., KOVACS L., CSERNOCH L. (2000) Deterministic inactivation of calcium release channels in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 528, 447-456.
- SZENTESI P., SZAPPANOS H., SZEGEDI C., GONCZI M., JONA I., CSERI J., KOVACS L., CSERNOCH L. (2004) Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys. J.* 86, 1436-1453.
- SZUCS G., PAPP Z., CSERNOCH L., KOVACS L. (1991) Kinetic properties of intramembrane charge movement under depolarized conditions in frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 98, 365-378.

## T

- TAKEKURA H., FLUCHER B.E, FRANZINI-ARMSTRONG C. (2001) Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev. Biol.* 239, 204-214.
- TAKEKURA H., BENNETT L., TANABE T., BEAM K. G., FRANZINI-ARMSTRONG C. (1994) Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys. J.* 67, 793-803.
- TAKEKURA H., NISHI M., NODA T., TAKESHIMA H., FRANZINI-ARMSTRONG C. (1995) Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *PNAS* 92, 3381-3385.
- TAKESHIMA H., LINO M., TAKEKURA H., NISHI M., KUNO J., MINOWA O., TAKANO H., NODA T. (1994) Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556-559.
- TAKESHIMA H., NISHIMURA S., MATSUMOTO T., ISHIDA H., KANGAWA K., MINAMINO N., MATSUO H., UEDA M., HANAOKA M., HIROSE T. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439-445.
- TAKESHIMA H., YAMAZAWA T., IKEMOTO T., TAKEKURA T., NISHI M., NODA T., IINO M. (1995) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J.* 14, 2999-3006.
- TALON S., HUCHET-CADIOU C., LÉOTY C. (1999) Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> release in rat fast- and slow-twitch skinned muscle fibres. *Eur. J. Physiol.* 438, 804-816.

- TALON S., HUCHET-CADIOU C., LÉOTY C. (2000) Rapid cooling-induced contractures in rat skinned skeletal muscle fibres originate from sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release through ryanodine and inositol trisphosphate receptors. *Eur. J. Physiol.* 441, 108-117.
- TANABE T., BEAM K.G., ADAMS B.A., NIIDOME T., NUMA S. (1990) Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346, 567-569.
- TANABE T., BEAM K.G., POWELL J.A., NUMA S. (1988) Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336, 134-139.
- TANABE T., TAKESHIMA H., MIKAMI A., FLOCKERZI V., TAKAHASHI H., KANGAWA K., KOJIMA M., MATSUO H., HIROSE T., NUMA S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.
- TANG Z., SCHERER P.E., OKAMOTO T., SONG K., CHU C., KOHTZ D.S., NISHIMOTO I., LODISH H.F., LISANTI M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261.
- TARRONI P., ROSSI D., CONTI A., SORRENTINO V. (1997) Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 19808-19813.
- THIELE C., HANNAH M.J., FAHRENHOLZ F., HUTTNER W.B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell. Biol.* 2, 42-49.
- THOMPSON P.D., CLARKSON P., KARAS R.R. (2003) Statin-associated myopathy. *JAMA* 289, 1681-1690.
- TRIPATHY A., RESCH W., XU L., VALDIVIA H.H., MEISSNER G. (1998) Imperatoxin A induces subconductance states in  $Ca^{2+}$  release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 111, 679-690.
- TRIPATHY A., XU L., MANN G., MEISSNER G. (1995) Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptor). *Biophys. J.* 69, 106-119.
- TSIEN RW, HESS P., MCCLESKEY E.W., ROSENBERG R.L. (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 265-290.
- TSUGORKA A., RIOS E., BLATTER L. (1995) Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269, 1723-1726.
- TUPLING A.R., ASACHI M., MACLENNAN D.H. (2002) Sarcoplipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  uptake and impairs contractile function. *J. Biol. Chem.* 277, 44740-44746.

## U

- URSU D., SEBILLE S., DIETZE B., FREISE D., FLOCKERZI V., MELZER W. (2001) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J. Physiol.* 533, 367-377.

## V

- VAGHY P.L., FANG J., WU W., VAGHY L.P. (1998) Increased caveolin-3 level in mdx mouse muscles. *FEBS Letters* 431, 125-127.
- VANDEBROUCK C., MARTIN D., COLSON-VAN SHOOR M., DEBAIX H., GAILLY P. (2002) Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 158, 1089-1096.

- VARADI G., LORY P., SCHULTZ D., VARADI M., SCHWARTZ A. (1991) Acceleration of activation and inactivation by the  $\beta$  subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 352, 159-162.
- VENEMA V.J., JU H., ZOU R., VENEMA R.C. (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 272, 28187-28190.
- VERGARA J., TSIEN R.Y., DELAY M. (1985) Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *PNAS* 82, 6352-6356.
- VINER R.I., FERRINGTON D.A., WILLIAMS T.D., BIGELOW D.J., SCHONEICH C. (1999) Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in skeletal muscle. *Biochem. J.* 340, 657-669.
- VOLPE P., SALVIATI G., DI VIRGILIO F., POZZAN T. (1985) Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal. *Nature* 316, 347-349.

## W

- WAGENKNECHT T. & RADERMACHER M. (1995) Three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 369, 43-46.
- WAGENKNECHT T. & RADERMACHER M. (1997) Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 258-265.
- WAKAYAMA Y., INOUE M., MURAHASHI M., SHIBUYA S., JIMI T., KOJIMA H., ONIKI H. (1997) Ultrastructure localization of  $\alpha$ 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. *Acta Neuropathol.* 94, 455-464.
- WALKER D. & DE WAARD M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 21, 148-154.
- WANG Z.M., MESSI M.L., DELBONO O. (1999) Patch-clamp recording of charge movement,  $\text{Ca}^{2+}$  current, and  $\text{Ca}^{2+}$  transients in adult skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 77, 2709-2716.
- WARD C.W., PROTASI F., CASTILLO D., WANG Y., CHEN S.R.W., PESSAH I.N., ALLEN P.D., SCHNEIDER M.F. (2001) Type 1 and type 3 ryanodine receptors generate different  $\text{Ca}^{2+}$  release event activity in both intact and permeabilized myotubes. *Biophys. J.* 81, 3216-3230.
- WARD C.W., REIKEN S., MARKS A.R., MARTY I., VASSORT G., LACAMPAGNE A. (2003) Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *FASEB J.* 17, 1517-1519.
- WARD C.W., SCHNEIDER M.F., CASTILLO D., PROTASI F., WANG Y., CHEN S.R.W., ALLEN P.D. (2000) Expression of ryanodine receptor RyR3 produces  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in dyspedic myotubes. *J. Physiol.* 525, 91-103.
- WEHLING M., SPENCER M.J., TIDBALL J.G. (2001) A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell. Biol.* 155, 123-131.
- WIER W.G. (1990) Cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in mammalian ventricle: dynamic control by cellular processes. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 467-485.
- WILLIAMS M.E., WASHBURN M.S., HANS M., URRUTIA A., BRUST P.F., PRODANOVICH P., HARPOLD M.M. (1999) Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J. Neurochem.* 72, 791-799.
- WINGERTZAHN M.A. & OCHS R.S. (1998) Control of calcium in skeletal muscle excitation-contraction coupling : implications for malignant hyperthermia. *Mol. Genet. Metab.* 65, 113-120.

WU Y. & HAMILTON S.L. (1998) Functionnal interactions of cytoplasmic domains of the skeletal Ca<sup>2+</sup> release channel. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 312-319.

WUYTACK F., RAEYMAEKERS L., MISSIAEN L. (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32, 279-305.

## Y

YEAGLE P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 822, 267-287.

YOSHIDA Y & IMAI S. (1997) Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* 74, 125-137.

## Z

ZAVECZ J.H., ANDERSON WM., ADAMS B. (1991) Effect of amiloride on diaphragmatic contractility: evidence of a role for Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *J. Appl. Physiol.* 70, 1309-1314.

ZHANG J.Z., WU Y., WILLIAMS B.Y., RODNEY G., MANDEL F., STRASBURG G.M., HAMILTON S.L. (1999) Oxidation of the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel alters calmodulin binding. *Am. J. Physiol.* 276, C46-C53.

ZHOU J., BRUM G., GONZALEZ A., LAUNIKONIS B.S., STERN M.D., RIOS E. (2003a) Ca<sup>2+</sup> sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J. Gen. Physiol.* 122, 95-114.

ZHOU J., BRUM G., GONZALEZ A., LAUNIKONIS B.S., STERN M.D., RIOS E. (2003b) Ca<sup>2+</sup> sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J. Gen. Physiol.* 122, 95-114.

ZORZATO F., FUJII J., OTSU K., PHILLIPS M., GREEN N.M., LAI F.A., MEISSNER G., MACLENNAN D.H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 2244-2256.

ZOT H.G. & POTTER J.D. (1982) A structural role for the Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.* 257, 7678-7683.

ZOU A.P. & COWLEY A.W. (1997) Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study. *Hypertension* 29, 194-198.

ZUCCHI R. & RONCA-TESTONI S. (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* 49, 1-51.

---

**RÉGULATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION PAR LE CHOLESTEROL ET L'OXYDE NITRIQUE  
DANS LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE SOURIS.**

Le couplage excitation-contraction (EC) du muscle squelettique s'articule sur les interactions entre le détecteur de potentiel membranaire (récepteur des dihydropyridines, DHPR), et le canal calcique du réticulum (récepteur de la ryanodine, RyR). Le DHPR est localisé dans les tubules transverses et les cavéoles, deux structures sarcolemmales enrichies en cholestérol. De plus, les cavéoles contiennent la synthèse de l'oxyde nitrique (NO). Le travail présenté apporte des éléments nouveaux concernant la modulation fonctionnelle du couplage EC par le cholestérol et le NO, à l'aide d'une approche d'électrophysiologie cellulaire combinée à des mesures de fluorescence. La teneur membranaire en cholestérol régule les fonctions de canal calcique et de détecteur de potentiel du DHPR. Le NO cible spécifiquement le RyR. À des niveaux physiologiques, il module l'activation du canal lors d'une dépolarisation ; en excès, il maintient certains RyR en configuration activée.

---

**RÉGULATION OF EXCITATION CONTRACTION COUPLING BY CHOLESTEROL AND NITRIC OXIDE IN  
ISOLATED SKELETAL MUSCLE FIBERS FROM MOUSE.**

Excitation-contraction (EC) coupling of skeletal muscle depends upon interactions between the membrane voltage-sensor (dihydropyridine receptor, DHPR), and the sarcoplasmic reticulum calcium release channel (ryanodine receptor, RyR). The DHPR stands within two membrane structure enriched in cholesterol, the transverse tubule system and the caveolae. Caveolae also contain the nitric oxide (NO) synthase. The present work provides new insights into the functional modulation of EC coupling by cholesterol and NO, using electrophysiological techniques and fluorescence measurements on isolated muscle cells. The membrane cholesterol content regulates the voltage-sensing and calcium channel function of the DHPR. NO specifically affects the RyR function. At physiological levels, NO modulates the channel activation by membrane depolarization; excess NO maintains some RyR within an activated state.

---

**DISCIPLINE**      **Physiologie**

---

**MOTS-CLÉS**      Calcium intracellulaire, canaux calciques, cholestérol, couplage excitation-contraction, muscle squelettique, oxyde nitrique

Intracellular calcium, calcium channel, cholesterol, excitation-contraction coupling, skeletal muscle, nitric oxide

---

Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire  
UMR CNRS 5123

Université Claude Bernard-LYON 1

43 boulevard du 11 novembre 1918

69622 Villeurbanne Cedex