



Interactions fonctionnelles et moléculaires de la cavéoline-3 et du canal calcique de type L dans les cellules musculaires squelettiques

Harold Couchoux

► To cite this version:

Harold Couchoux. Interactions fonctionnelles et moléculaires de la cavéoline-3 et du canal calcique de type L dans les cellules musculaires squelettiques. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00283143

HAL Id: tel-00283143

<https://theses.hal.science/tel-00283143>

Submitted on 29 May 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
présentée
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)
présentée et soutenue publiquement le 13 juillet 2007
par

Harold COUCHOUX

**INTERACTIONS FONCTIONNELLES ET MOLÉCULAIRES DE LA
CAVÉOLINE-3 ET DU CANAL CALCIQUE DE TYPE L DANS LES
CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES**

Directeur de thèse : M. Bruno ALLARD, Professeur

JURY :	M. Laurent SCHAEFFER, Directeur de Recherches,	Président
	Mme Bénédicte DARGENT, Directeur de Recherches,	Rapporteur
	Mme Nathalie MACREZ, Chargée de Recherches,	Rapporteur
	M. Bruno ALLARD, Professeur,	Examineur
	Mme Christine BERTHIER, Maître de Conférences,	Examineur
	Mme Kathrin GIESELER, Professeur,	Examineur
	M. Michel RONJAT, Chargé de Recherches,	Examineur

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE INTEGRATIVE, CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
UMR CNRS 5123
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

LISTE DES ABREVIATIONS	p 7
LISTE DES FIGURES.....	p 9
LISTE DES TABLEAUX.....	p 11
INTRODUCTION.....	p 12
HISTORIQUE	p 16
Chapitre 1. Structure cellulaire et moléculaire du muscle squelettique	p 16
1. Introduction, rappels et définitions sur le système musculaire squelettique.....	p 16
1.1. Anatomie du muscle squelettique	p 16
1.2. Le développement du muscle squelettique : myogenèse et maturation	p 17
1.3. La régénération musculaire.....	p 19
1.4. Les cellules satellites : des cellules souches ?.....	p 20
1.5. La fibre musculaire squelettique.....	p 22
1.5.1. une structure syncytiale.....	p 22
1.5.2. Classification des fibres musculaires squelettiques.....	p 22
2. La fibre musculaire squelettique.....	p 23
2.1. Le cytosquelette sarcomérique ou contractile.....	p 23
2.1.1. Organisation des protéines contractiles.....	p 23
2.1.2. Protéines contractiles.....	p 24
2.1.3. les mécanismes de la contraction musculaire : rôle essentiel du Ca^{2+}	p 25
2.1.3.1. Mécanismes généraux de la contraction musculaire.....	p 25
2.1.3.2. Mécanismes moléculaires de la contraction musculaire.....	p 26
2.2. Le cytosquelette exosarcomérique ou non-contractile.....	p 26
2.2.1. Le cytosquelette périmyofibrillaire	p 27
2.2.2. Le cytosquelette sous-sarcolemmal.....	p 27
2.2.2.1. Les costamères.....	p 27
2.2.2.2. Le groupe des intégrines.....	p 28
2.2.2.3. Le groupe de la spectrine.....	p 29
2.2.2.4. Le groupe dystrophine/DAG	p 29
3. Les systèmes membranaires spécifiques	p 30
3.1. Le réticulum sarcoplasmique : morphologie et biogenèse.....	p 30
3.2. Le sarcolemme jonctionnel, extra-jonctionnel et ses microdomaines lipidiques.....	p 31
3.2.1. Les tubules T : morphologie.....	p 32
3.2.2. Les triades	p 32
3.2.3. Les rafts lipidiques	p 32
3.2.4. Les cavéoles : découverte, structure et fonctions physiologiques.....	p 34
3.2.4.1. La famille des cavéolines.....	p 35
3.2.4.2. Découverte de la cavéoline	p 35
3.2.4.3. Les membres de la famille de la cavéoline.....	p 36
3.2.4.4. Propriétés structurales et relations entre les cavéolines.....	p 36
3.2.4.5. Les domaines d'interaction des cavéolines.....	p 38
3.2.4.5.1.1. Le domaine WW	p 38
3.2.4.5.1.2. Le Domaine Scaffolding : CSD	p 39
3.2.4.6. Rôle de la cavéoline dans l'homéostasie du cholestérol.....	p 43
3.2.5. Biogenèse des tubules T et des cavéoles.....	p 44
4. Les tubules T et les cavéoles : plus que de simples microdomaines sarcolemmaux.....	p 48
4.1. Propriétés biochimiques.....	p 48

4.2. Tubules T et cavéoles : des carrefours de la signalisation calcique ?	p 48
Chapitre 2. Microdomaines sarcolemmaux et homéostasie calcique musculaire	p 50
1. Les tubules T	p 50
1.1. Le Récepteur des DiHydroPyridines	p 51
1.1.1. Caractéristiques biophysiques	p 51
1.1.2. Structure moléculaire	p 52
1.1.3. Caractéristiques pharmacologiques du canal calcique de type L	p 55
1.1.4. La double fonction du DHPR	p 56
1.1.4.1. En tant que canal calcique voltage dépendant	p 56
1.1.4.2. En tant que détecteur de potentiel	p 56
1.1.4.2.1. Mouvements de charges membranaires, transmission du signal au RS et libération du Ca^{2+} du RS : les 3 signaux associés au couplage E-C	p 58
1.1.4.2.2. Le couplage électromécanique DHPR-RyR : la transmission du signal au RS	p 60
1.1.4.2.3. Ouverture des RyR : la libération de Ca^{2+} du RS dans le cytosol	p 60
1.1.5. Expression du DHPR et évolution de $I_{Ca,L}$ au cours du développement musculaire	p 60
1.2. Le canal calcique de type T	p 62
1.2.1. Caractéristiques biophysiques	p 62
1.2.2. Structure moléculaire	p 62
1.2.3. Caractéristiques pharmacologiques	p 65
1.2.4. Expression du canal calcique de type T et évolution de $I_{Ca,T}$ au cours du développement musculaire	p 65
2. Cavéoles, rafts lipidiques et homéostasie calcique	p 66
Chapitre 3. Pathologies musculaires associées à des perturbations de l'homéostasie calcique et/ou de la cavéoline-3.....	p 75
1. Surexpression de cavéoline-3	p 76
2. Déficience en cavéoline-3	p 79
2.1 La RMD	p 80
2.2 L'hyperCKémie	p 81
2.3 La myopathie distale	p 81
2.4 La myopathie des ceintures et le système protéolytique du protéasome	p 82
PROBLEMATIQUE	p 85
MATERIEL ET MÉTHODES.....	p 90
1. Fibres intercostales fœtales en survie et culture primaire de myoblastes	p 90
1.1. Mise en survie des fibres intercostales fœtales	p 90
1.1.1. Animaux utilisés.....	p 90
1.1.2. Dissection des cages thoraciques de fœtus	p 90
1.1.3. Dissociation enzymatique des fibres intercostales.....	p 91
1.1.4. Dissociation mécanique et mise en milieu de survie des fibres intercostales	p 91
1.2. Culture primaire	p 92
1.3. Transfection des fibres fœtales en survie et des cultures primaires de myoblastes	p 92
1.3.1. Plasmides d'expression.....	p 92
1.3.2. Fibres fœtales en survie	p 93
1.3.3. Cultures primaires de cellules satellites.....	p 93
1.4. Immunomarquage des fibres en survie et des myotubes en cultures primaires	p 94
1.4.1. Anticorps primaires.....	p 94

1.4. 2. Anticorps secondaires et autres.....	p 94
1.4.3. Protocole d'immunomarquage.....	p 95
2. Fibres adultes de muscle squelettique de souris	p 96
2.1. Animaux utilisés	p 96
2.2. Transfert de gène in situ dans les muscles des pattes postérieures par la technique.....	
d'électroporation	p 97
2.3. Prélèvement des muscles des pattes postérieures	p 97
2.4. Dissociation enzymatique des fibres musculaires adultes	p 98
2.5. Congélation et cryosections des muscles adultes.....	p 98
2.6. Immunomarquage des fibres squelettiques adultes.....	p 98
2.6.1. Anticorps primaires, secondaires et autres.....	p 98
2.6.2. Protocole d'immunomarquage.....	p 99
3. Analyse de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR.....	p 100
3.1. La technique du pull-down	p 100
3.1.1. Production de Cav-3	p 100
3.1.2. Purification des protéines de fusion.....	p 101
3.1.2.1. Purification des protéines de fusion GST.....	p 101
3.1.2.2. Purification des protéines de fusion GST-Cav-3 ^{wt}	p 103
3.1.3. Pull-Down de la Cav-3 par Ca _v 1.1.....	p 104
3.2. La technique de co-immunoprécipitation	p 105
3.2.1. Préparation des vésicules de HSR	p 105
3.2.2. La technique d'immunoprécipitation.....	p 106
3.2.2.1. Solubilisation des vésicules de HSR.....	p 106
3.2.2.2. Préparation des billes de protéine G-Sépharose (Sigma)	p 107
3.2.2.3. Analyse des produits de Co-IP par la technique de western blot	p 108
3.3. Estimation de l'affinité entre la Cav-3 et la boucle I-II de Cav 1.1	p 109
4. Electrophysiologie.....	p 110
4.1. Cellules musculaires squelettiques fœtales et myotubes primaires : la technique de <i>patch clamp</i>	p 110
4. 2. Cellules musculaires squelettiques adultes : la technique du silicone-clamp	p 111
4. 3. Dispositif expérimental et appareillage	p 111
4. 4. Solutions et milieux électrophysiologique.....	p 112
4.5. Mise en œuvre des manipulations et traitement des données	p 113
5. Etudes de nouveaux inhibiteurs du protéasome	p 115
5.1. Culture, transfection et traitement de cultures de C2C12	p 116
5.2. Immunomarquage de la Cav-3 sur cultures de C2C12.	p 116
6. Statistiques.....	p 117

RESULTATS p 119

1^{ère} Partie, Chapitre I – Rôle de la cavéoline-3 sur la fonction des canaux calciques voltage-dépendants dans des cultures primaires de muscle squelettique. p 119

1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 et du DHPR dans les myotubes de cultures primaires de muscle squelettique et les fibres musculaires squelettiques fœtales en survie.....	p 119
1.1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 dans des myotubes squelettiques primaires.	p 120
1.2. Immunolocalisation de la sous-unité Ca _v 1.1 du DHPR et colocalisation avec la Cav-3 dans les myotubes squelettiques primaires.	p 120
2. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les myotubes primaires squelettiques exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L}	p 121
3. Immunolocalisation et de la sous-unité Ca _v 1.1 dans les myotubes primaires squelettiques exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.	p 121

4. Etude des courants calciques voltage-dépendants de type T et L dans des cultures primaires de myotubes squelettiques transfectés par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP..... p 122
5. Quantification de l'immunoréactivité de la sous-unité Ca_v1.1 dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. p 124

1^{ère} Partie, Chapitre II – Rôle de la cavéoline-3 sur la fonction des canaux calciques voltage-dépendants dans des fibres musculaires squelettiques fœtales en survie. p 127

1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 et du DHPR dans les fibres musculaires squelettiques fœtales en survie..... p 128
 - 1.1. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires fœtales en survie. p 128
 - 1.2. Immunolocalisation de la sous-unité Ca_v1.1 du DHPR dans fibres musculaires squelettiques fœtales en survie. p 128
2. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}..... p 129
3. Etude des courants calciques voltage-dépendants de type T et L..... p 129
 - 3.1. Courants calciques voltage-dépendants de fibres fœtales en survie transfectées par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. p 129
4. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les cellules surexprimant la Cav-3^{wt}..... p 130
 - 4.1. Courants calciques voltage-dépendants dans des fibres fœtales surexprimant la Cav-3^{wt}..... p 131

1^{ère} Partie, Chapitre III – Rôle de la cavéoline-3 sur la fonction des canaux calciques voltage-dépendants dans des fibres musculaires squelettiques adultes. p 134

1. Etude par immunofluorescence de la distribution de la cavéoline-3 et du DHPR dans les fibres musculaires squelettiques adultes..... p 134
 - 1.1. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires squelettiques adultes p 135
 - 1.2. Immunolocalisation de la sous-unité Ca_v 1.1 du DHPR dans le muscle adulte et colocalisation avec la Cav-3..... p 136
 - 1.3. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires squelettiques adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP..... p 137
2. Etude du courant calcique voltage-dépendant de type L de fibres musculaires squelettiques adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP..... p 138

2^{ème} Partie : Etude de l'interaction entre la cavéoline-3 et la sous-unité Ca_v 1.1 du DHPR..... p 141

1. Etude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR par co-immunoprécipitation..... p 142
 - 1.1. Co-fractionnement de la Cav-3 et du DHPR dans les vésicules de HSR..... p 142
 - 1.2. Co-immunoprécipitation de la Cav-3 et du DHPR p 143
2. Etude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR par pull-down de la Cav-3 par différents domaines de Ca_v 1.1..... p 144
 - 2.1. Pull down de la Cav-3 entière par les boucles I-II, II-III, III-IV, les domaines N- et C-Terminaux de Ca_v 1.1, ainsi que par la sous-unité β_{1a}..... p 144
 - 2.2 Pull down de la Cav-3 par le peptide AID squelettique (pAID_{sk}) p 146
 - 2.3 Détermination de l'affinité entre la Cav-3 et la boucle I-II de Cav 1.1..... p 147

3^{ème} Partie : Effets d'inhibiteurs du protéasome sur une lignée de cellules musculaires squelettiques exprimant Cav-3^{P104L}..... p 149

1. Evaluation de la cytotoxicité de diverses molécules..... p 149
2. Effet des inhibiteurs du protéasome sur la distribution de la Cav-3 p 150

DISCUSSION.....	p 153
------------------------	--------------

Discussion de la 1 ^{ère} partie	p 153
Discussion de la 2 ^{ème} partie	p 163
Discussion de la 3 ^{ème} partie	p 168
Discussion générale et conclusion.....	p 172

BIBLIOGRAPHIE	p 177
----------------------------	--------------

ANNEXES.....	p 195
---------------------	--------------

Article Allard et coll., 2006	
Article Couchoux et coll., 2007	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-AP	4-aminopyridine
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Alpha interaction Domain
ARN (m)	Acide ribonucléique (messenger)
ATP	Adénosine-tri-phosphate
Bande A	Bande Anisotropique
Bande I	Bande Isotropique
BID	Beta interaction Domain
Cav	Cavéoline
CBD	Caveolin Binding Domain
CK	Créatine Kinase
C-MAD	C-Mediated Attachment Domain
Couplage E-C	Couplage excitation-contraction
CSD	Caveolin Scaffolding Domain
CSP	Codon STOP prématuré
CT	Citerne terminale
CTRL	Contrôle
Cy3	Cyanine 3
DAG	Dystrophine associated protéins
DHPR	Dihydropyridine receptor
DM	Distal Myopathie
DMB	Dystrophie Musculaire de Becker
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
ECC	entrée capacitive de calcium
EGF	Epidermal Growth Factor
GA	Glutaraldéhyde
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-transférase
HA	Hémagglutinine
HCK	HyperCKémie
HDL	High Density Lipoprotein
HVA	High Voltage Activated
$I_{Ca, L}$	Courant calcique de type L
$I_{Ca, T}$	Courant calcique de type T
IP3	Inositol-triphosphate
IP3-R	Inositol-triphosphate-Receptor
JMT	Jonction myotendineuse
JNM	Jonction neuromusculaire
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
KO	Knock Out
Ld	Liquid disordered
LDL	Low Density Lipoprotein
LGMD	Limb Girdle Muscular Dystrophy
Lo	Liquid Ordered

LVA	Low Voltage Activated
Mb	Mégabase
mdx	Muscular dystrophy x-linked
MEC	Matrice extra-cellulaire
MHC	Myosin Heavy Chain
MLC	Myosin Light Chain
M β CD	Methyl Cyclodextrine
NGF	Neuronal Growth Factor
N-MAD	N-Mediated Attachment Domain
nNOS/eNOS	Neuronal/endothelial Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric Oxide
OD	Oligomerization Domain
PA	Potentiel d'action
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldéhyde
PKC	Proteine Kinase C
PM	Poids moléculaire
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
RE	Réticulum Endoplasmique
RMD	Rippling Muscle Disease
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Ryanodine Receptor
SERCA	Sarco Endo plasmic Reticulum ATPase
SOC	store operated channel
SV40	Simian Virus 40
TEA	Tétraéthylammonium
Tm	Tropomyosine
Tn	Troponine
TRP	Transient Receptor Potential
Tubule T/système T	Tubule Transverse/système Transverse
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP 21	Vesicular Integral Protein of 21 KDa
VOC	Voltage operated channel
WT	Wild Type
YFP	Yellow Fluorescent Protein
β -DG	β -Dystroglycane

Seules les abréviations utilisées au moins deux fois dans ce manuscrit sont indiquées dans cette section. De plus, une grande partie provenant de la littérature anglo-saxonne, leur signification n'a pas été traduite.

LISTE DES FIGURES

Verso

Figure 1 :	De la structure générale à l'ultrastructure du muscle squelettique.....	p 16
Figure 2 :	Myogenèse et maturation du muscle squelettique	p 17
Figure 3 :	La fibre musculaire squelettique est une structure syncytiale.....	p 21
Figure 4 :	Arrangement des myofibrilles au sein de la fibre musculaire squelettique.....	p 23
Figure 5 :	Mécanismes moléculaires de la contraction musculaire	p 25
Figure 6 :	Schéma global des trois grands groupes de protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal	p 27
Figure 7 :	Morphologie du réticulum sarcoplasmique.....	p 29
Figure 8 :	Les systèmes d'invagination du sarcolemme.....	p 30
Figure 9 :	Morphologie du système tubulaire transverse	p 31
Figure 10 :	Structure et localisation de la triade et cliché en microscopie électronique des pieds jonctionnels.....	p 32
Figure 11 :	Les différentes morphologies adoptées par les cavéoles.....	p 33
Figure 12 :	Les différents domaines de la cavéoline	p 36
Figure 13 :	Structure primaire et secondaire des domaines WW et leur classification basée sur la spécificité optimale des ligands	p 37
Figure 14 :	Transports vésiculaires et rôle des cavéoles et de la cavéoline dans l'homéostasie du cholestérol	p 40
Figure 15 :	Rôle de la cavéoline dans la structure des cavéoles	p 45
Figure 16 :	Structure schématisée du canal calcique voltage-dépendant de type L	p 51
Figure 17 :	Molécules impliquées dans les flux de calcium à travers le sarcolemme	p 73
Figure 18 :	Les noyaux des fibres musculaires squelettiques de patients dystrophiques adoptent une position centrale (centronucléation)	p 77
Figure 19 :	Caractéristiques histologiques des muscles de souris Cav-3 ^{-/-}	p 79
Figure 20 :	Structure du complexe du protéasome	p 83
Figure 21 :	Schéma du protocole de mise en survie et de culture primaire	p 90
Figure 22 :	Schéma général du protocole de transfection par la technique de Magnétofection®	p 92
Figure 23 :	Epitopes contre lesquels sont dirigés les anticorps utilisés pour les immunomarquages	p 93
Figure 24 :	Schéma du principe de l'immunomarquage indirect avec amplification du signal.....	p 94
Figure 25 :	Schéma du système d'électroporation et du principe de transfert de gène <i>in situ</i> par cette technique...p	96
Figure 26 :	Localisation des muscles Interosseux et <i>Flexor Digitorum Brevis</i> dans la patte postérieure de souris .p	97
Figure 27 :	Schéma général du protocole de co-immunoprécipitation	p 105
Figure 28 :	Structure du TMC-95A et tableau récapitulatif de ses activités inhibitrices du protéasome	p 114
Figure 29 :	Structures du MG132, du TMC-95A, de ses deux composés dérivés A215 et A248, et leurs caractéristiques	p 115
Figure 30 :	Clichés représentatifs de culture primaire de myotubes squelettiques à +5 jours de différenciation en lumière visible et après coloration nucléaire au Hoechst.....	p 119
Figure 31 :	Immunolocalisation de la cavéoline-3 sur des myotubes de cultures primaires	p 120
Figure 32 :	Double immunomarquage de la cavéoline-3 et de la sous-unité Cav1.1 sur des myotubes squelettiques primaires à +6 jours de différenciation	p 121
Figure 33 :	Immunomarquage de la Cav-3 dans des myotubes primaires exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.....p	122
Figure 34 :	Immunomarquage de la sous-unité Cav1.1 dans des myotubes primaires contrôles ou transfectés par la Cav-3 ^{P104L} -YFP	p 123
Figure 35 :	Traces représentatives des courants calciques de type T et L enregistrés aux potentiels indiqués. Courbes I/V des courants calciques de type T et L ou uniquement du type L de myotubes primaires contrôles ou transfectés par la Cav-3 ^{P104L} -YFP.....	p 124

Figure 36 : Paramètres de voltage-dépendance et conductance maximale des canaux calciques de type L de myotubes squelettiques primaires contrôles et exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.	p 125
Figure 37 : Quantification de l'intensité de marquage de la sous-unité Cav1.1 dans des myotubes primaires contrôles ou transfectés par la Cav-3 ^{P104L} -YFP.	p 125
Figure 38 : Fibres musculaires fœtales à +2 jours et à +7 jours de survie.	p 126
Figure 39 : Immunolocalisation de la cavéoline-3 sur des fibres squelettiques fœtales à +5 jours de survie.	p 127
Figure 40 : Immunolocalisation de Ca _v 1.1 dans des fibres musculaires squelettiques fœtales à +7 jours de survie.	p 128
Figure 41 : Immunomarquage de la Cav-3 dans des fibres fœtales en survie exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.	p 129
Figure 42 : Traces représentatives du courant calcique de type L enregistré aux potentiels indiqués sur des fibres fœtales en survie contrôles et transfectées par la Cav-3 ^{wt} -YFP ou par le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP. Courbes I/V du courant calcique de L et courbes des conductances maximales normalisées établies à partir de ces mêmes cellules	p 130
Figure 43 : Paramètres de voltage-dépendance et conductance maximale des canaux calciques de type L de fibres fœtales en survie contrôles ou surexprimant la Cav-3	p 131
Figure 44 : Surexpression de Cav-3 ^{wt} par transfection de myotubes primaires par Cav-3 ^{wt} -YFP et immunomarquage de la Cav-3.	p 132
Figure 45 : Fibres musculaires adultes fraîchement dissociées exprimant la NLS-GFP 14 jours après électroporation	p 133
Figure 46 : Immunolocalisation de la Cav-3 sur des fibres musculaires adultes.	p 134
Figure 47 : Immunolocalisation de la Ca _v 1.1 et colocalisation avec la Cav-3 sur des fibres musculaires adultes	p 135
Figure 48 : Immunolocalisation de la Cav-3 sur des fibres musculaires adultes exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP	p 136
Figure 49 : Traces représentatives du courant calcique de type L enregistré au potentiel indiqué, sur des fibres squelettiques adultes contrôles et transfectées. Courbes I/V du courant calcique de type L obtenues sur les mêmes cellules.	p 137
Figure 50 : Paramètres de voltage-dépendance et conductance maximale des canaux calciques de type L de fibres adultes contrôles ou exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.	p 138
Figure 51 : Western blot anti-Cav-3 sur des vésicules de HSR solubilisées et co-immunoprécipitation de la Cav-3 et de Cav 1.1 sur vésicules de HSR solubilisées	p 142
Figure 52 : Pull-downs de la Cav-3 par les boucles interdomaines de Cav 1.1 et par la sous-unité β1a, et vérification de l'intégrité des préparations par coloration au rouge Ponceau	p 144
Figure 53 : Pull-down de la Cav-3 par les boucles interdomaines de Cav 1.1, par la sous-unité β1a et par le peptide AIDsk	p 145
Figure 54 : Estimation de l'affinité entre la boucle GST/I-II et la Cav-3 entière.	p 146
Figure 55 : Evaluation de la cytotoxicité d'inhibiteurs du protéasome sur culture de myotubes de C2C12	p 148
Figure 56 : Effet des inhibiteurs du protéasome sur la récupération de Cav-3 de type sauvage endogène sur des cultures de C2C12	p 149
Figure 57 : Quantification des effets des molécules inhibitrices de l'activité du protéasome.	p 150

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1 :</u>	Exemples de CBD (Caveolin Binding Domain) identifiés sur diverses protéines	p 39
<u>Tableau 2 :</u>	Nomenclature des canaux calciques voltage-dépendants	p 52
<u>Tableau 3 :</u>	Maladies musculaires héréditaires présentant des altérations de l'homéostasie calcique et/ou des anomalies du type de fibres.....	p 65
<u>Tableau 4 :</u>	Tableau résumant les canaux ioniques localisés dans les rafts lipidiques ou les cavéoles dans le muscle cardiaque.....	p 67
<u>Tableau 5 :</u>	Mutations de la Cav-3 et pathologies musculaires associées à ces mutations.....	p 78
<u>Tableau 6 :</u>	Récapitulatif des mutations de la Cav-3 et pathologies musculaires associées à ces mutations.	p 80
<u>Tableau 7 :</u>	Compositions des Tyrodes utilisés pour la dissection des cages thoraciques des fœtus de souris	p 90
<u>Tableau 8 :</u>	Composition des milieux pour la culture primaire de cellules satellites	p 91
<u>Tableau 9 :</u>	Anticorps et dilutions utilisées pour les expériences d'immunocytochimie	p 94
<u>Tableau 10 :</u>	Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunocytochimie sur fibres fœtales en survie et cultures primaires	p 95
<u>Tableau 11 :</u>	Anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunocytochimie sur fibres musculaires adultes	p 99
<u>Tableau 12 :</u>	Composition du milieu réactionnel de traduction <i>in vitro</i> en extraits de réticulocytes de la Cav-3 en présence ou non de radioactivité	p 101
<u>Tableau 13 :</u>	Composition du tampon de lyse des bactéries	p 102
<u>Tableau 14 :</u>	Tampon de solubilisation des vésicules de HSR.....	p 106
<u>Tableau 15 :</u>	Composition des différents milieux d'enregistrement	p 113
<u>Tableau 16 :</u>	Résumé des protocoles utilisés pour l'enregistrement de $I_{Ca, T}$ et $I_{Ca, L}$ dans les cultures primaires de myotubes squelettiques et les fibres fœtales en survie	p 114
<u>Tableau 17 :</u>	Principaux paramètres du courant calcique voltage dépendant de type L ($I_{Ca, L}$) dans les myotubes squelettiques primaires transfectés par le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.....	p 123
<u>Tableau 18 :</u>	Paramètres de voltage dépendance du courant de type L de fibres squelettiques fœtales en survie contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP	p 130
<u>Tableau 19 :</u>	Paramètres de voltage dépendance du courant de type L de fibres squelettiques fœtales en survie contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3 ^{wt} -YFP	p 131
<u>Tableau 20 :</u>	Paramètres de voltage dépendance du courant de type L de fibres squelettiques adultes contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3 ^{P104L} -YFP.....	p 138
<u>Tableau 21 :</u>	Tableau récapitulatif des différents paramètres étudiés dans les lots de cellules contrôles et exprimant le mutant Cav-3 ^{P104L}	p 139

INTRODUCTION

Les muscles sont les principaux organes chargés du mouvement chez les animaux. Il en existe plusieurs types dont les fonctions diffèrent. Ainsi, on distingue les muscles striés des muscles lisses dont l'organisation ultrastructurale est assez différente. Les muscles striés se subdivisent eux-mêmes en muscle strié squelettique et muscle strié cardiaque.

Le muscle squelettique représente à lui seul 30 à 40 % du poids du corps. Il est nécessaire à la survie (respiration), il assure le maintien de la posture, et occupe un rôle fondamental dans la vie sociale (gestes, paroles ...). C'est également la source essentielle de chaleur dégagée par notre organisme. Son rôle prépondérant reste tout de même le déplacement, c'est-à-dire la production de force engendrant un mouvement, par un mécanisme appelé contraction musculaire. Sous un effet global relativement simple (le raccourcissement de la longueur du muscle) la contraction musculaire regroupe en fait un ensemble de mécanismes complexes, mettant en jeu des systèmes hautement spécialisés, du fait de la structure extrêmement organisée du muscle et des fibres qui le composent. En effet, chaque muscle est constitué d'un ensemble de fibres présentant elles-mêmes un fort degré d'organisation. Ce degré d'organisation très important se retrouve d'une part au niveau de leur membrane plasmique, hétérogène, constituée en réalité par une « mosaïque » de microdomaines membranaires. D'autre part, les fibres musculaires possèdent des systèmes membranaires spécifiques, impliqués dans le stockage et la libération de l'ion de la contraction : le calcium.

Mon travail de thèse s'articulera autour de deux de ces points, le calcium et les microdomaines cavéolaires.

En effet, la membrane plasmique des cellules musculaires squelettiques, le sarcolemme, a la particularité d'être constitué d'une succession de microdomaines fonctionnels. Certains, tels que le réseau tubulaire transverse, ont fait l'objet de nombreuses études. D'autres, plus récemment découverts, restent encore à être clairement caractérisés. C'est notamment le cas des cavéoles, petites invaginations membranaires enrichies en cholestérol, sphingolipides, et en leur protéine marqueur, la cavéoline, dont la fonction précise dans le muscle squelettique reste à être éclaircie.

Nous nous sommes alors plus particulièrement intéressés au lien qu'il pouvait exister entre l'isoforme spécifique de la cavéoline dans le muscle strié, la Cavéoline-3 (Cav-3), et l'un des éléments majeurs de l'homéostasie calcique, le canal calcique de type L, également appelé récepteur des dihydropyridines (DHPR).

Le DHPR est localisé notamment dans la membrane des tubules transverses où il a un rôle essentiel dans le couplage excitation-contraction, mécanisme spécifique liant la dépolarisation du sarcolemme, sous forme d'un potentiel d'action, à la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique.

Le calcium occupe un rôle central dans la physiologie du muscle squelettique, il n'est donc pas étonnant que la moindre perturbation de l'homéostasie calcique puisse provoquer les graves pathologies musculaires que sont les myopathies.

La Cav-3 est elle-même impliquée dans les myopathies, des mutations dans le gène *CAV3* sont à l'origine de pathologies musculaires regroupées sous le terme de cavéolinopathies. La famille des cavéolines a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années, de nombreux rôles leurs ont d'ailleurs été attribués. Cependant, la Cav-3 reste l'isoforme dont la fonction est à ce jour la moins connue, bien que de nombreuses preuves suggèrent un rôle de la Cav-3 dans la physiologie musculaire existent. Elle est en effet associée aux tubules transverses et est localisée dans les cavéoles du muscle adulte, lesquelles contiennent de nombreux éléments de mobilisation du calcium (Isshiki & Anderson, 1999).

En outre, le (les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) des perturbations de l'expression de la Cav-3, en particulier une déficience en Cav-3, sont à l'origine de phénotypes myopathiques restent toujours inconnus. De même, la raison pour laquelle une déficience en Cav-3 est à l'origine de la myopathie des ceintures de type 1C (LGMD-1C) chez certains patients et de myopathie distale ou d'hyperCKémie chez d'autres reste indéterminée.

Une hypothèse de plus en plus défendue serait que des altérations de l'homéostasie calcique joueraient un rôle clé dans les processus dégénératifs primaires associés aux myopathies (Rizzuto & Pozzan, 2003). Bien que la dégénérescence musculaire soit le symptôme prédominant des cavéolinopathies, les mécanismes de régulation de la signalisation calcique n'ont encore jamais été étudiés dans ces pathologies.

La plus étudiée des cavéolinopathies est la LGMD-1C. Elle a pour origine une mutation ponctuelle sur le gène *CAV3* créant une substitution d'une proline par une leucine (P104L) dans le domaine intramembranaire de la Cav-3 (Minetti et coll., 1998).

Grâce à une collaboration avec le laboratoire de R. Parton qui fut le premier à identifier la Cav-3 (Way & Parton, 1996), nous avons obtenu le plasmide codant pour le mutant Cav-3^{P104L}. Ce mutant a un comportement dominant-négatif en créant une déficience quasi-totale en Cav-3 dans les cellules qui l'expriment (Galbiati et coll., 2000).

L'objectif général de ce travail était d'apporter des éléments de réponse aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les cavéolinopathies musculaires, en particulier de la LGMD-1C. Plus spécifiquement, l'objectif était d'étudier la relation entre la Cav-3 et les voies d'entrée du calcium dans le muscle squelettique. Pour cela, nous avons associé des approches physiologiques, biochimiques, moléculaires et cellulaires dans le but de déterminer si le maintien de l'homéostasie calcique était affecté dans les cellules musculaires squelettiques dont l'expression de Cav-3 était perturbée par l'expression du mutant pathologique Cav-3^{P104L}.

L'approche physiologique a consisté à étudier d'un point de vue électrophysiologique les propriétés des canaux calciques des cellules exprimant le mutant.

L'approche moléculaire a quant à elle consisté à tester si la Cav-3 était directement ou indirectement impliquée dans la fonction de protéines de la signalisation calcique. Grâce à une collaboration avec l'équipe de M. Ronjat (Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, CEA Grenoble), qui possédait les plasmides codant pour différentes parties du DHPR sous forme de protéines recombinantes, nous avons étudié si une éventuelle interaction existait entre la Cav-3 et le canal calcique de type L.

Enfin, une autre collaboration avec l'équipe de M. Reboud-Ravaux (Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle, Institut Jacques Monod, Paris), nous a permis de caractériser les effets de nouveaux inhibiteurs du protéasome sur la préservation de la dégradation de la Cav-3 dans des conditions où le mutant dominant négatif Cav-3^{P104L} était exprimé dans une lignée musculaire, les C2C12.

Ainsi, grâce à la combinaison de plusieurs techniques d'analyse, j'ai tenté, au cours de cette thèse, d'apporter des éléments clés de réponse à cette problématique.

Ce manuscrit présente donc les différents éléments de réponses que mon travail de thèse a pu apporter concernant ces problématiques et s'articulera comme suit :

- La première partie de ce mémoire est consacrée aux rappels bibliographiques présentant les données nécessaires à la compréhension de ce travail. Elle comporte trois chapitres. Le premier est consacré aux généralités sur le muscle squelettique. Le deuxième chapitre fait l'état des connaissances actuelles sur les microdomaines sarcolemmaux et l'homéostasie calcique du muscle squelettique. Enfin, le troisième chapitre traite des pathologies musculaires associées à des perturbations de l'expression de la Cav-3.

- Le reste du mémoire concerne les résultats obtenus. Il décrit tout d'abord les méthodes expérimentales, puis les résultats qui seront enfin discutés dans la dernière partie. Les perspectives qui s'ouvrent suite à ce travail seront détaillées dans les discussions spécifiques de chaque problématique et enfin, une conclusion générale conclura ce mémoire.

- Chapitre 1 -

GÉNÉRALITÉS SUR LA STRUCTURE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

1. Introduction, rappels et définitions sur le système musculaire squelettique.

Ce premier chapitre a pour but de détailler la physiologie du muscle squelettique, sa structure (aspects macroscopiques), son ultrastructure (aspects microscopiques, cellulaires), ainsi que les mécanismes de la contraction. Le haut degré d'organisation du tissu musculaire le rendant susceptible à de nombreuses atteintes (pathologies, lésions...) les mécanismes mis en jeu dans des conditions physiopathologiques seront également développés.

1.1. Anatomie du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué d'un ensemble de faisceaux musculaires, chaque faisceau étant lui-même constitué de quelques dizaines à plusieurs milliers de fibres musculaires. Cette organisation donne à l'organe une structure en « poupées russes », chaque couche étant délimitée par une gaine conjonctive. La plus lâche de ces gaines est appelée **endomysium**. Bien qu'elle entoure chaque fibre, elle n'est cependant pas en contact direct en raison de la lame basale sécrétée par chaque fibre. Le faisceau musculaire est individualisé par une enveloppe conjonctive plus épaisse, le **pérимysium**. L'ensemble des faisceaux est enfin entouré d'une enveloppe aponévrotique dense, l'**épимysium**. Toutes ces enveloppes conjonctives fusionnent entre elles aux extrémités et entrent dans la constitution du tendon. Elles assurent la transmission mécanique des forces exercées par les structures contractiles (figure 1).

Au sein de chaque faisceau, les fibres musculaires sont regroupées en unités motrices. Celles-ci sont constituées par un motoneurone et l'ensemble des fibres musculaires qu'il innerve. Le nombre de fibres musculaires constituant une unité est sensiblement proportionnel

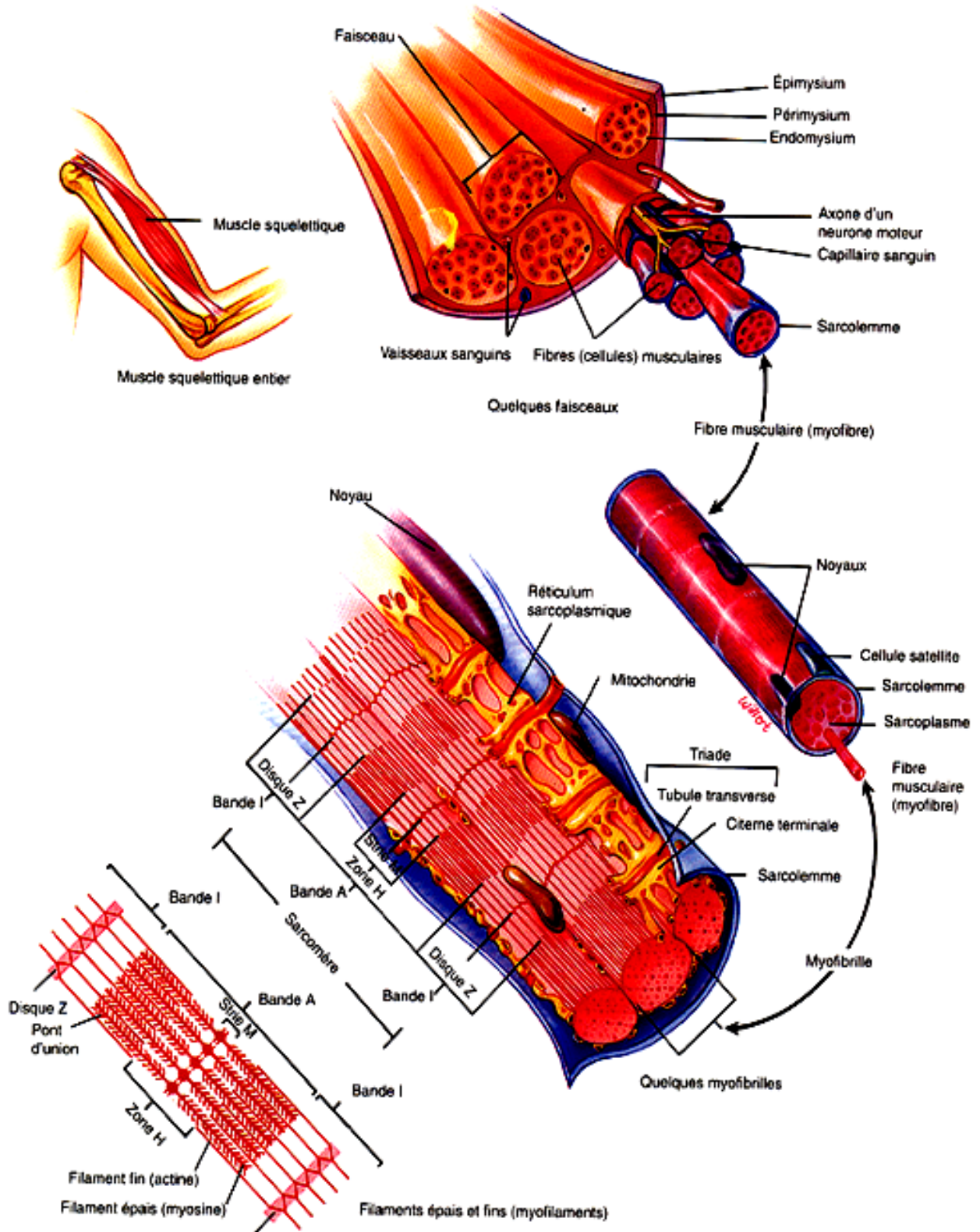


Figure 1. De la structure générale à l'ultrastructure du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont majoritairement délimités par deux tendons qui les relient au squelette. Chaque muscle est lui-même constitué de faisceaux musculaires individualisés par une gaine conjonctive appelée endomysium. Chaque faisceau musculaire est individualisé par le périmysium. L'ensemble des faisceaux est entouré de l'épimysium.

à la taille du muscle : il va de 10 fibres au niveau de la musculature extrinsèque du globe oculaire à plusieurs centaines au niveau des muscles de la jambe et même jusqu'à environ 2000 pour le muscle quadriceps.

1.2. Le développement du muscle squelettique : myogenèse et maturation

Le muscle squelettique est un tissu d'origine mésodermique. Des fragmentations de la couche mésodermique intermédiaire de l'embryon, appelées somites, donnent naissance à la plupart des précurseurs myogéniques. La partie ventrale des somites contribue à la formation du cartilage, des côtes et des os de la colonne vertébrale. C'est leur partie dorsale, le dermomyotome, qui donne naissance au derme du tronc et aux muscles squelettiques de l'ensemble du corps et des membres, suite à la migration des cellules musculaires progénitrices du dermomyotome en direction des bourgeons des membres. C'est alors qu'elles vont commencer à exprimer des facteurs de détermination myogénique, constituant ainsi la première étape de la myogenèse, dont le déroulement, désormais clairement établi, est le suivant (figure 2) :

- Du myoblaste présomptif au myoblaste :

Au niveau des somites et des bourgeons des futurs membres, des cellules musculaires progénitrices, les myoblastes présomptifs, s'accumulent et prolifèrent massivement. Toutefois, ils ne synthétisent pas encore de protéines spécifiques du muscle et d'un point de vue morphologique sont identiques aux cellules mésenchymateuses qui les entourent. L'arrêt de la prolifération, l'acquisition d'une forme bipolaire en fuseau et la synthèse de protéines contractiles marquent la différenciation des myoblastes présomptifs en myoblastes. Ces derniers sont des cellules mononucléées post-mitotiques (donc incapables de se diviser) qui ont toutefois la capacité de fusionner entre elles.

- Des myoblastes aux myotubes :

La fusion de plusieurs myoblastes engendre de longs *syncytia* cylindriques multinucléés appelés myotubes. En fonction du stade de développement et de leur morphologie, deux sous populations de myotubes sont identifiables. Tout d'abord, des groupes de **myotubes primaires** sont formés, avant innervation, et s'étendent entre leurs

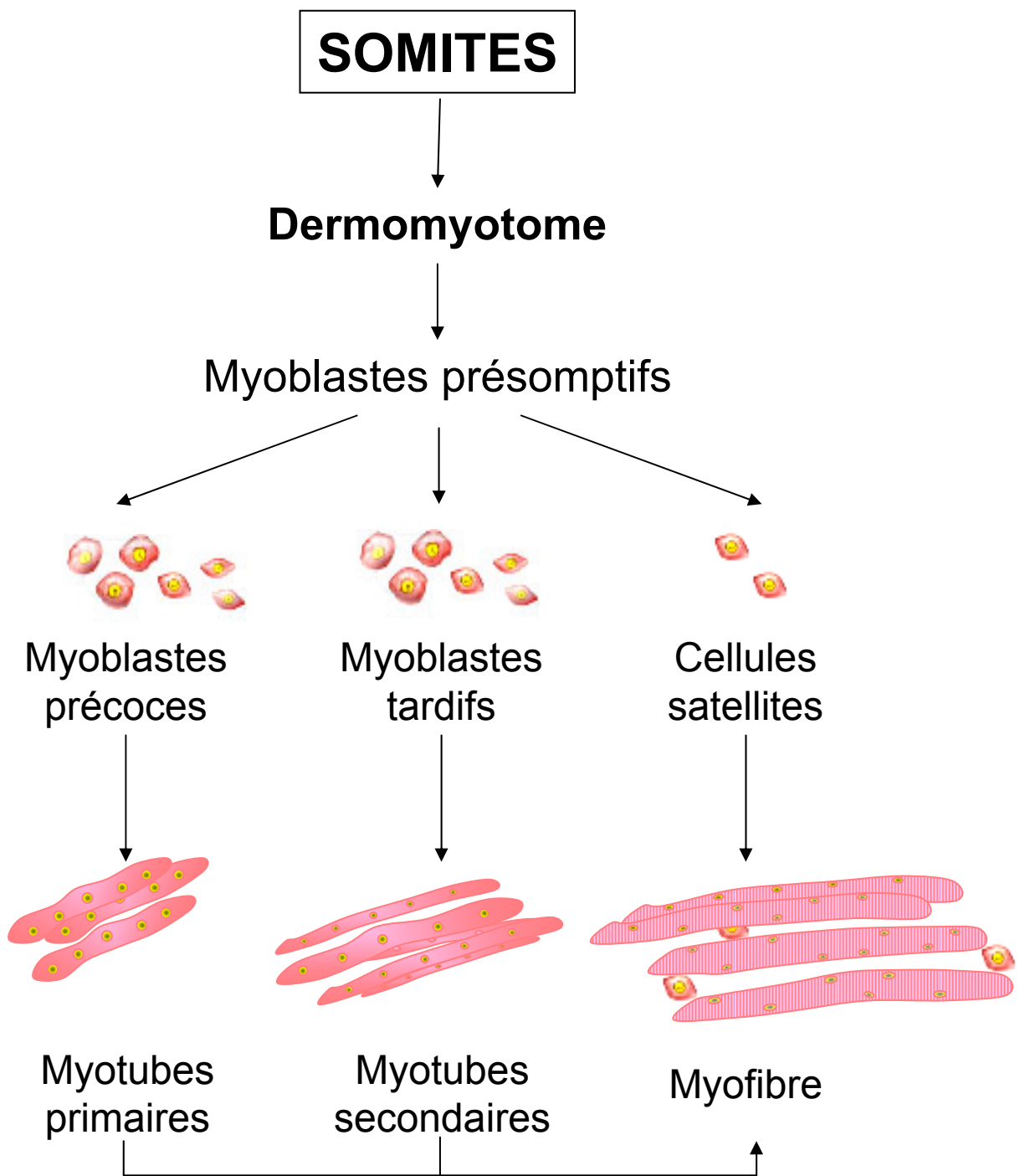


Figure 2. Myogenèse et maturation du muscle squelettique

Les cellules précurseurs des muscles squelettiques, les myoblastes présomptifs, trouvent leur origine dans la partie ventrale des somite : le dermomyotome. Ils se différencient ensuite en divers types de myoblastes. Alors que les myoblastes précoces vont fusionner pour donner des myotubes primaires, les myoblastes tardifs donneront des myotubes secondaires. Les cellules satellites, les seuls cellules précurseurs présentes au stade adulte, ont quant à elles un rôle prépondérant dans les processus de régénération musculaire. La dernière étape de maturation consiste en la différenciation des myotubes en myofibres.

tendons pour constituer l'ébauche du futur muscle. Certains myotubes s'entourent alors individuellement d'une lame basale qui va également recouvrir des cellules mononucléées indifférenciées qui leur sont accolées. Sous le contrôle de l'innervation, ces cellules vont proliférer, se différencier en myoblastes et fusionner avec les myotubes adjacents pour donner des **myotubes secondaires**, qui par la suite vont eux-mêmes s'entourer de leur propre lame basale. Bien que ce processus de différenciation soit général, il arrive toutefois, pour les muscles comportant un très grand nombre de fibres, qu'une troisième, voire une quatrième phase de fusion puisse survenir.

- **Du myotube à la myofibre :**

Le passage de myotube à myofibre se fait par migration des noyaux, alors en position centrale (on parle de centronucléation), à la périphérie de la cellule. Simultanément, les myofibrilles suivent le trajet inverse : initialement en périphérie, elles migrent en position centrale et occupent la quasi-totalité de l'intérieur de la cellule. L'étape finale de la différenciation musculaire est la mise en place du système tubulaire transverse et du RS. Suite à cela, la myofibre présente des striations transversales caractéristiques des fibres musculaires squelettiques adultes.

- **Les cellules satellites :**

Tous les muscles continuent à croître au cours du développement pré- et post-natal, tant en longueur qu'en épaisseur. Ceci implique une augmentation du nombre de fibres dans le muscle, l'addition de nouveaux noyaux et l'augmentation du contenu cytoplasmique des fibres. L'ensemble de ces modifications est assuré par la fusion des myofibres avec des cellules précurseurs myogéniques appelées **cellules satellites**. Les cellules satellites sont des cellules mononucléées, juxtaposées entre la membrane plasmique de la myofibre et sa lame basale. Elles ont la particularité d'avoir quitté le cycle cellulaire au cours des phases précoces de développement et d'être entrées dans une phase dite quiescente, sans activer leur différenciation terminale ni devenir post-mitotiques. Au cours du développement, ces cellules prolifèrent et une partie d'entre elles subit la différenciation terminale et fusionne, alors qu'une autre partie contribue à garder un « stock » de cellules satellites en entrant en phase quiescente. Toutefois, les cellules satellites ont également un rôle majeur dans les phénomènes de régénération musculaire. Sous l'effet d'un traumatisme mécanique, d'une lésion directe du muscle ou lors de maladies musculaires, les cellules satellites sortent de leur

état de quiescence, prolifèrent, et la grande majorité se différencie et fusionne pour former de nouvelles myofibres.

1.3. La régénération musculaire

Contrairement au muscle cardiaque ou au muscle lisse qui ont un faible potentiel régénérateur, le muscle squelettique peut se régénérer de façon extensive et autonome. Cette régénération s'effectue toujours de la même façon, le type de traumatisme important peu (Allbrook, 1981). En effet, la régénération musculaire est toujours précédée d'une réaction dégénérative se manifestant en deux étapes: une phase initiale non-inflammatoire et une phase de dégénérescence inflammatoire.

La phase **initiale non-inflammatoire**, qui se limite aux minutes sinon à l'heure suivant le traumatisme, se caractérise par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire et par la désintégration des organites comme les mitochondries, les ribosomes et les myofibrilles (Hansen-Smith & Carlson, 1979). Cette désintégration des organites est causée par une nécrose et une autodigestion par des protéases intrinsèques à la fibre (Carpenter & Karpati, 1989).

L'envahissement par des cellules du système immunitaire caractérise la deuxième phase de la dégénérescence musculaire. On retrouve des neutrophiles au site de dégénérescence de deux à trois heures post-trauma, et des macrophages entre huit et dix heures post-trauma. La fonction principale des macrophages est de phagocyter les débris cellulaires situés à l'intérieur du tube endomysial ou bien ceux relargués par les fibres endommagées, mais aussi de produire des facteurs chimio-attractants qui vont guider les myoblastes dérivés des cellules satellites, nécessaires à la régénération du tissu. C'est alors que les cellules satellites sont activées (Bischoff, 1994).

Les noyaux situés dans les fibres musculaires sont incapables de progresser vers la mitose. Ce sont donc les cellules satellites les entourant qui forment un réservoir de cellules régénératrices pour les myofibres. Les cellules satellites du muscle squelettique sont normalement dans un état quiescent chez l'adulte. Quand des dommages mineurs ou des blessures surviennent, des signaux sont générés à l'intérieur du muscle. Ceux-ci activent les cellules satellites et stimulent leur migration et leur entrée dans le cycle cellulaire (Tatsumi et coll., 1998).

Environ trois jours après le début de la dégénérescence, les myoblastes, dérivés des cellules satellites, entrent dans une phase de prolifération intensive. À ce moment, l'ancienne lame basale se désintègre et il y a formation d'une nouvelle lame basale par les myotubes

nouvellement formés (Vrako et coll., 1972). On peut distinguer les fibres musculaires qui sont dans un processus de régénération par la position centrale de leurs noyaux. En effet, la dernière étape de la régénération musculaire est le retour des noyaux vers la périphérie de la fibre.

1.4. Les cellules satellites : des cellules souches ?

Les cellules souches sont généralement considérées comme étant associées au renouvellement des tissus (moelle osseuse, épiderme). Ces dernières années, la recherche intensive de thérapies pour guérir les myopathies a fait émerger le rôle potentiel des cellules souches. Considérant la capacité régénératrice du tissu musculaire, on peut se demander si les cellules satellites ne pourraient pas constituer une classe de cellules souches.

La définition d'une cellule souche varie d'un tissu à l'autre mais trois propriétés de base les caractérisent:

- i- la prolifération,
- ii- la production d'une progéniture spécialisée,
- iii- le maintien d'un réservoir de cellules mères (pour revue, voir Potten & Loeffler, 1990).

Les cellules satellites peuvent proliférer et donner naissance à une progéniture spécialisée servant à régénérer le muscle. Cependant, leur capacité à maintenir leur nombre et leur efficacité constants en toute circonstance n'est pas clairement établie. Plusieurs travaux indiquent en effet qu'une réserve de cellules myogéniques (les cellules satellites) persiste suite à une période extensive de prolifération. En l'occurrence, Bischoff et coll. (1994) ont montré que bien que le nombre de noyaux dans les fibres musculaires de rat augmente d'un facteur 4 durant la croissance post-natale, ceci n'affecte pas la fréquence de cellules satellites présentes dans le muscle. De plus, la prolifération de cellules satellites provoquée expérimentalement en induisant des cycles de régénération répétés (par injections hebdomadaires dans un même muscle de marcaïne¹) ont montré que le muscle possédait de grandes capacités régénératrices sans toutefois épuiser le nombre de cellules satellites qu'il contient (Sadeh et coll., 1985). Aussi, à cause du potentiel thérapeutique des cellules satellites humaines pour le traitement des myopathies (thérapie cellulaire), la capacité proliférative *in vitro* de cellules humaines a également été testée. Des clones de cellules satellites humaines isolées de muscles adultes peuvent donner naissance à une progéniture capable de fusionner après 25 à 30 passages², alors que des cellules isolées de fœtus peuvent proliférer de 60 à 70 fois *in vitro* (Ham et coll.,

¹ La marcaïne, ou bupivacaïne, est un anesthésique myotoxique connu pour engendrer des cycles de dégénérescence-régénération lorsqu'elle est injectée en intramusculaire.

² Un passage définit l'action de réensemencer des cellules en phase de prolifération et arrivant à confluence.

1990). La capacité proliférative des cellules satellites diminue donc de façon importante durant les deux premières décennies de la vie de l'Homme pour se stabiliser par la suite (Decary et coll., 1996 et 1997). Rappelons que ce dernier point pourrait en partie expliquer pourquoi, dans le modèle murin de la Myopathie de Duchenne, les souris (*mdx*) présentent un phénotype beaucoup moins invalidant que les patients atteints par cette pathologie. Elles garderaient en effet plus longtemps cette capacité proliférative de leurs cellules satellites, ce qui contrebalancerait les phénomènes de nécrose musculaire.

L'étendue de la capacité migratoire des cellules myogéniques reste controversée. Elle peut être grande ou infime suivant le modèle d'étude. Les cellules myogéniques peuvent présenter 3 types de migration au cours de leur existence dans le muscle adulte. D'abord, les cellules satellites activées peuvent traverser la lame basale pour en sortir ou y entrer. Même si la lame basale est souvent considérée comme une barrière à la migration cellulaire, il semblerait que les cellules satellites activées peuvent la traverser dans les deux directions. Pendant le développement postnatal chez le rat, il a été démontré que des cellules myogéniques, marquées *in vivo* par un rétrovirus, traversaient la lame basale de fibres adjacentes pour ensuite fusionner avec celles-ci (Hughes & Blau, 1990). Il est cependant possible que la lame basale des adultes soit une barrière plus efficace pour ce type de migration. Les cellules myogéniques sont aussi capables de se mouvoir à l'intérieur d'un même muscle. Ainsi, Phillips et coll. (1990) ont démontré que la cryodestruction de l'extrémité du muscle EDL (*Extensor Digitorum Longus*) provoquait une migration de cellules satellites activées de l'extrémité viable du muscle vers son extrémité nécrosée. Dans ce type de dommage, il semblerait qu'un signal chimiotactique constitue « l'indication » du mouvement de migration des cellules myogéniques sous la lame basale (Phillips et coll., 1990). Des migrations intermusculaires ont aussi été observées chez la souris. Il a par exemple été démontré chez la souris qu'en transplantant une lignée myogénique (C2C12), des myoblastes peuvent migrer d'un muscle à l'autre si ce dernier a été endommagé (Watt et coll., 1994). Il n'existe cependant pas encore de données montrant des phénomènes similaires chez l'humain ou le rat, peut être en raison de l'épaisseur accrue de l'épimysium dans ces espèces (Partridge, 1991). Globalement, les cellules myogéniques avec un potentiel de prolifération élevé sont capables de migrations très importantes, mais ceci dans des circonstances particulières de destruction du muscle (Morgan et coll., 1993; Watt et coll., 1994; Bischoff, 1997). Notons que chez l'Homme, globalement, les cellules satellites possèdent un potentiel régénérateur limité puisqu'une lésion importante transforme le tissu musculaire en du tissu cicatriciel fibreux.

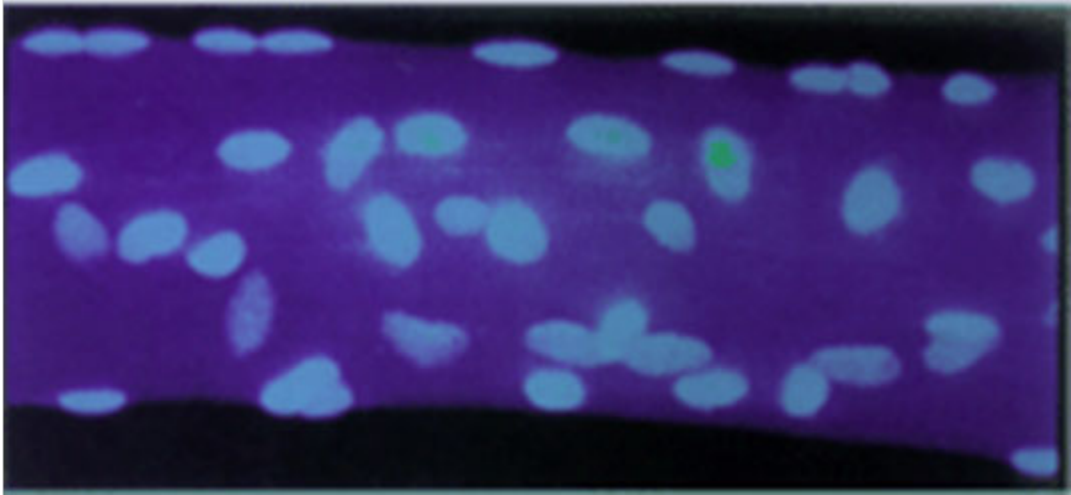


Figure 3. La fibre musculaire squelettique est une structure syncytiale

Observation microscopique d'une fibre musculaire squelettique après coloration des noyaux (ici en bleu ciel) au colorant nucléaire de Hoechst. La fibre musculaire squelettique est une structure syncytiale, elle peut contenir plusieurs dizaines de noyaux situés en périphérie de la fibre, en dessous du sarcolemme.

1.5. La fibre musculaire squelettique

1.5.1. Une structure syncytiale

La fibre musculaire squelettique est un syncytium, c'est-à-dire une cellule plurinucléée issue de la fusion, au cours du développement embryonnaire, des cytoplasmes d'un ensemble de cellules (jusqu'à une centaine). Dans la plupart des muscles, les fibres occupent la longueur totale du muscle et peuvent mesurer de quelques centaines de μm (muscle de l'oreille interne) jusqu'à parfois 20 cm (muscle du grand fessier) chez l'Homme. De structure cylindrique, leur diamètre varie généralement de 10 à 100 μm , les noyaux étant situés en périphérie du cytoplasme (le sarcoplasme), juste en dessous de la membrane cellulaire (le sarcolemme) (figure 3).

1.5.2. Classification des fibres musculaires squelettiques

Initialement, tous les muscles étaient classés en tant que rapides ou lents en fonction de leur vitesse de contraction. Cette classification correspondait aussi à des différences morphologiques établies par Ranvier en 1873, selon lesquelles les muscles rapides apparaissaient blancs et les muscles lents apparaissaient rouges. La couleur rouge est en fait liée à la concentration cytoplasmique en myoglobine, hémoprotéine fixant l'oxygène, ainsi qu'à la concentration en enzymes aérobiques (métabolisme oxydatif) et au fort contenu en capillaires. En d'autres termes, plus le contenu en myoglobine et capillaires est élevé, plus la capacité du muscle est oxydative et plus il apparaît rouge. Par la suite, des études histologiques ont montré qu'il existait une corrélation entre la vitesse de contraction et l'activité ATPasique de la myosine. Ceci a mené à la classification originelle en fibres musculaires de type I (lentes) et de type II (rapides). Actuellement, le type de fibre musculaire peut être déterminé selon des méthodes histologiques, histochimiques, biochimiques et physiologiques (pour revues, voir Berchtold et coll., 2000 ; Pette & Staron, 1990).

De manière synthétique, les 2 types de fibres répondent aux caractéristiques suivantes :

- **Fibres de type I (ou lentes = *Slow Twitch*)** : vitesse de contraction lente, haute résistance à la fatigue. D'un point de vue structural, elles ont un petit diamètre, une forte densité en mitochondries, capillaires et myoglobine, qui leur confèrent un aspect rouge. Elles possèdent peu d'enzymes glycolytiques, mais beaucoup d'enzymes impliquées dans les voies

oxydatives. Par conséquent, ces fibres prédominent dans les muscles qui ont pour but de produire des forces de faible intensité mais maintenues, c'est-à-dire principalement les muscles posturaux (activité de type marche à pied).

- **Fibres de type II (ou rapides = Fast Twitch) :** vitesse de contraction rapide, sensibles à la fatigue. Elles ont un diamètre plus élevé que les fibres de type I. Elles sont impliquées dans les actions nécessitant de développer une force importante. Elles sont elles-mêmes subdivisées en 3 sous-groupes : les fibres de type IIa, IIb et IId/x. Les fibres de **type IIb** sont très sensibles à la fatigue, ont une faible densité en mitochondries et capillaires, et contiennent peu de myoglobine (d'où un aspect blanc) et d'enzymes oxydatives. En revanche, elles sont riches en enzymes glycolytiques et sont mobilisées pour des exercices courts nécessitant une force élevée (de type sprint, saut...). Les fibres de **type IIa** ont une résistance modérée à la fatigue et représente un type intermédiaire entre les extrêmes des fibres de type I et IIb. Elles ont donc une forte densité en mitochondries, mais une densité en capillaires et un contenu en myoglobine moyens. Elles ont à la fois une forte quantité en enzymes oxydatives et glycolytiques. Elles sont donc mobilisées dans les exercices de durée et d'intensité moyenne (de type course de 400 m). Les fibres de **type IId/x**, plus récemment découvertes, possèdent des caractéristiques communes aux fibres IIa et IIb et constituent donc un intermédiaire entre ces deux types.

Selon la composition en type de fibres dans les muscles, ils sont classés en muscle rapides, lents ou mixtes.

2. La fibre musculaire squelettique

2.1. Le cytosquelette sarcomérique ou contractile

2.1.1. Organisation des protéines contractiles

Environ 80% du volume des fibres musculaires squelettiques est occupé par des éléments contractiles, de forme cylindrique, appelés myofibrilles. Les myofibrilles mesurent de 1 à 3 μm de diamètre, sont orientées parallèlement entre elles et à l'axe de la fibre. Elles occupent donc la grande majorité de l'espace intracellulaire, les autres organites (mitochondries, réticulum...) étant contraints à se confiner dans les espaces inoccupés, principalement les aires périnucléaires subsarcolemmales.

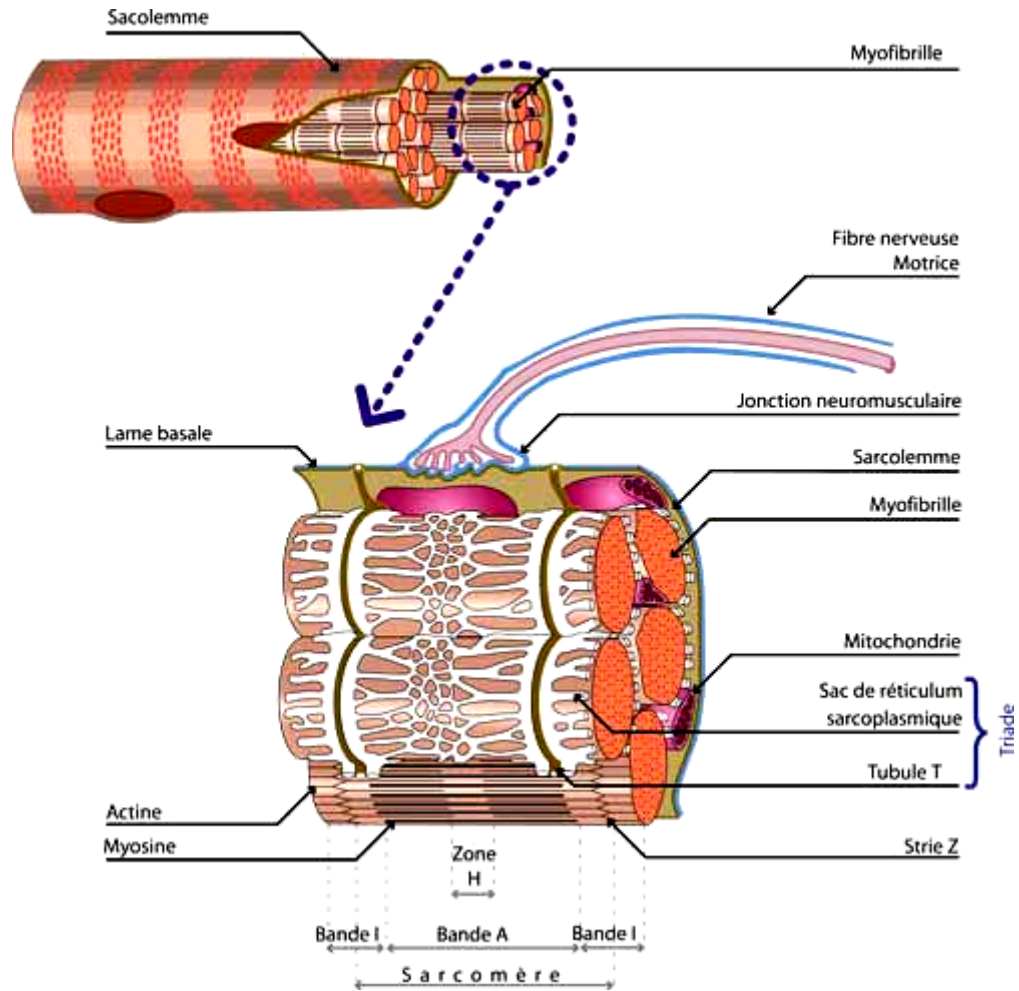


Figure 4. Arrangement des myofibrilles au sein de la fibre musculaire squelettique

Les myofibrilles sont constituées d'une succession de sarcomères, eux-mêmes délimités par deux stries Z. L'alternance de bandes A (d'apparence sombre) et de bandes I (d'apparence plus claire) au sein de chaque sarcomère est à l'origine de la striation caractéristique des fibres musculaires.

A fort grossissement, en lumière polarisée, les myofibrilles présentent des striations suite à l'alternance de bandes sombres appelées bandes A (pour Anisotropique = hétérogène), et de bandes claires, ou bandes I (pour Isotropique = homogène), tout le long de la myofibrille, perpendiculairement à son axe longitudinal. Quand le muscle est au repos, il est possible de distinguer au centre de la bande I une région plus claire appelée zone H (Heller = « plus clair »), elle-même interrompue en son milieu par une ligne sombre nommée ligne M (Mittel = « milieu »). Chaque bande I est également interrompue en son milieu par une zone dense appelé disque Z (ou ligne Z). Les segments compris entre un disque Z et le suivant définissent alors la plus petite unité contractile de la fibre musculaire (de 2 à 3 μm de longueur) : **le sarcomère**. En résumé, une myofibrille peut être définie comme une succession de sarcomères (figure 4).

Ces striations si particulières sont en fait le résultat d'une organisation extrêmement ordonnée des filaments protéiques contractiles des myofibrilles, nommés **myofilaments**. Ils sont essentiellement représentés par des filaments dits « fins » (5 à 7 nm de diamètre) et des filaments dits épais (12 à 16 nm de diamètre). Les filaments fins partent de leur point d'attache sur la ligne Z, traversent la bande I et s'insinuent entre les filaments épais de la bande A, jusqu'à la zone H. Les filaments épais, eux, ont leur point d'attache sur la ligne M et s'étendent de part et d'autre sur toute la bande A.

2.1.2. Protéines contractiles

- **Les myofilaments épais** sont essentiellement formés de l'assemblage régulier de molécules de myosine

Chaque molécule de myosine est un hexamère, formé de 2 chaînes lourdes identiques (MHC : *Myosin Heavy Chain* ; PM = 220 KDa) et de 2 paires de chaînes légères (MLC : *Myosin Light Chain* ; 15 à 30 KDa). Les deux chaînes lourdes de myosine sont accolées l'une à l'autre : leur longue « queue » C-terminale (155 nm) forme un axe torsadé en hélice α , et leur pôle globulaire émerge du filament épais sous la forme d'une « tête » double (19 nm de longueur x 5 nm de largeur). L'émergence des têtes de myosine se fait selon une disposition générale ayant l'apparence d'un pas de vis. Les MLC sont situées vers la partie faisant la transition entre queue et tête de MHC. La partie distale des têtes de myosine possède deux sites de fixation, l'un pour l'ATP et l'autre pour l'actine (composant principal des filaments fins). La tête de myosine possède une activité ATPasique (activité d'hydrolyse de l'ATP)

activée au contact de l'actine au cours de la contraction musculaire. D'un point de vue structural, les molécules de myosine interagissent de manière électrostatique au niveau de leurs queues C-terminales, les têtes étant tournées vers la ligne Z la plus proche. Par conséquent, chaque bande A d'un sarcomère comprend environ 200 molécules de myosine donc l'orientation s'inverse au niveau de la ligne M (orientation dite « tête-bêche » des molécules de myosine).

- **Les myofilaments fins** sont essentiellement composés de polymères d'actine

L'actine est une molécule polypeptidique multimérique. Chez les vertébrés, la polymérisation d'environ 360 monomères d'actine G (Globulaire ; PM = 43 KDa) forme un polymère d'actine F (Filamenteuse), ou plus communément appelé filament d'actine, d'un diamètre d'environ 8 nm. Les filaments s'accrochent par deux pour former une longue double hélice. Les myofilaments fins résultent ainsi de l'association de cette double hélice d'actine et de deux protéines régulatrices : la **tropomyosine** (Tm), dimère filamenteux rigide de renforcement, et la **troponine** (Tn), complexe de trois sous-unités polypeptidiques (I, C et T) disposées à intervalles réguliers le long des filaments d'actine, en regard de chaque tête de myosine, et impliquées dans la régulation de la contraction musculaire par le Ca^{2+} .

2.1.3. Les mécanismes de la contraction musculaire : rôle essentiel du Ca^{2+}

2.1.3.1. Mécanismes généraux de la contraction musculaire

L'initiation de la contraction musculaire a lieu au niveau de la plaque motrice. Cette dernière correspond aux zones de contact du nerf moteur avec les fibres musculaires. La zone au niveau de laquelle se trouve la synapse est la jonction neuromusculaire (JNM). L'influx nerveux se propage sous forme d'un potentiel d'action (PA) le long du nerf moteur, jusqu'aux terminaisons nerveuses de la plaque motrice qui libèrent alors de l'acétylcholine (ACh). L'ACh agit localement sur la fibre musculaire en entraînant l'ouverture de récepteurs canaux perméables au sodium, ce qui a pour effet d'engendrer une dépolarisation locale du sarcolemme.

Cette dépolarisation se propage le long de la membrane plasmique et pénètre profondément dans la fibre au niveau d'invaginations profondes du sarcolemme appelées tubules transverses (ou Tubules T). Via un couplage électromécanique avec le réticulum sarcoplasmique (RS), une grande quantité de Ca^{2+} est libérée du RS dans le cytoplasme. La concentration cytoplasmique de Ca^{2+} intracellulaire passe alors de 100 nM, correspondant à la

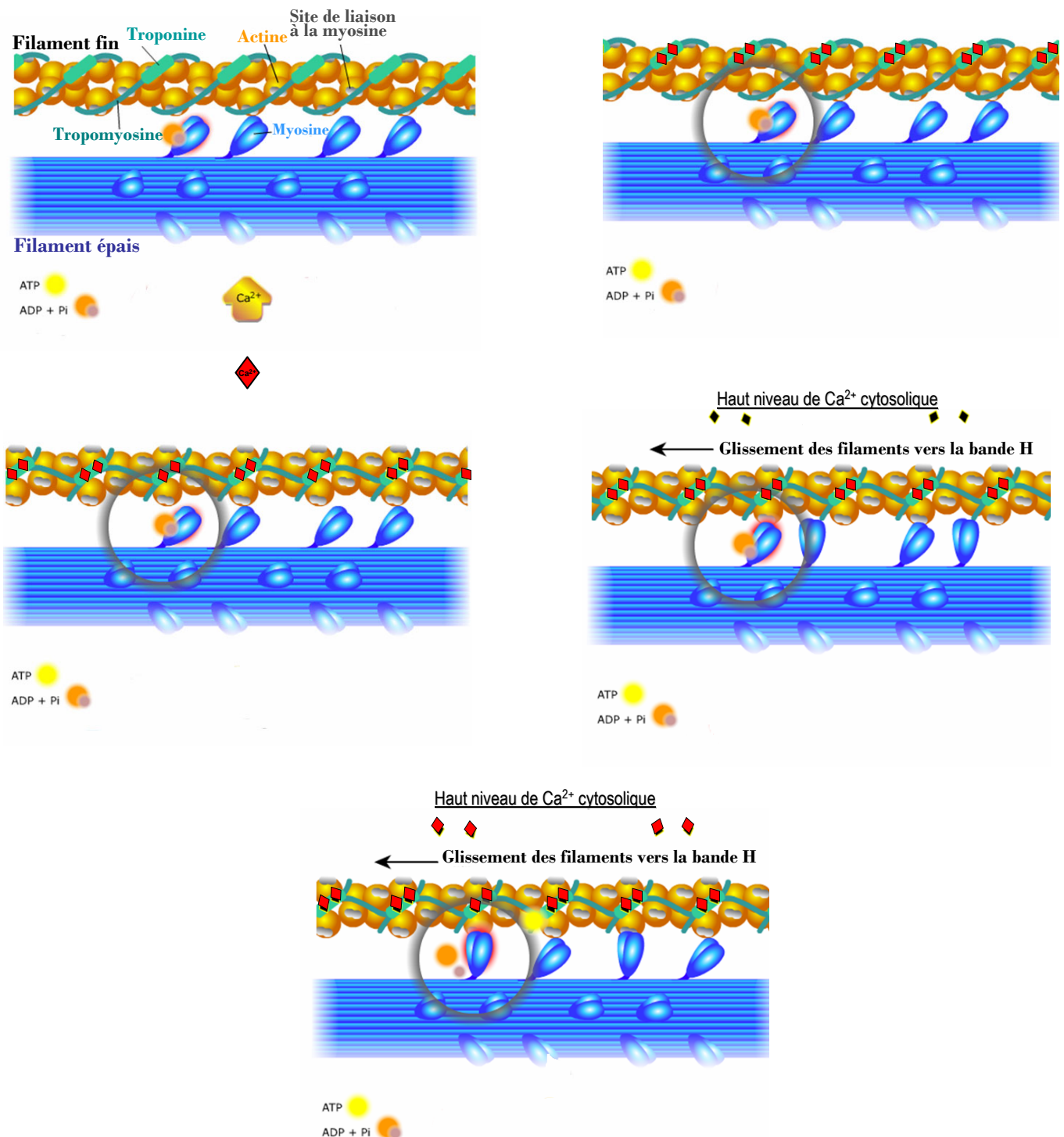


Figure 5. Mécanismes moléculaires de la contraction musculaire

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et sa fixation sur la Troponine C permet le rapprochement des têtes de myosine et des filaments d'actine entraînant le formation de ponts d'actomyosine. L'hydrolyse de l'ATP par la myosine et donc la libération de molécules d'ADP et de Pi provoque un changement de l'angle que forme la tête avec les filaments de myosine légère et donnant un « coup de rame » sur les filaments d'actine, entraînant un glissement des filaments vers la bande H et un raccourcissement des sarcomères.

concentration de repos, à 1 μM , ce qui permet un glissement entre les filaments d'actine et de myosine, en d'autres termes un raccourcissement de la longueur des sarcomères. La fin de la contraction est provoquée par la diminution de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} par repompage des ions Ca^{2+} par le RS, où ils restent stockés jusqu'à la prochaine dépolarisation (pour revue, voir Gordon et coll., 2000).

2.1.3.2. Mécanismes moléculaires de la contraction musculaire

Ces mécanismes concernent essentiellement l'étape de glissement des filaments fins le long des filaments épais. En effet, de manière synthétique, ce glissement se fait par alternance de formations et de ruptures de ponts de liaison entre les têtes de myosine et les filaments d'actine. Du fait de leurs orientations spatiales opposées, les deux groupes de filaments d'actine situés de part et d'autre de la zone H se rapprochent, provoquant le raccourcissement du sarcomère (figure 5).

C'est la formation de ponts de liaison entre les têtes de myosine et les filaments d'actine qui assure ce glissement des filaments. La première étape de formation de ces ponts est un rapprochement des têtes de myosine avec les filaments d'actine, suivi d'une mise en contact, formant des molécules d'actomyosine. Cependant, au repos, ce rapprochement est inhibé par le complexe Troponine/Tropomyosine. Pour que la contraction puisse avoir lieu, il faut que l'activité de ce complexe soit inhibée. C'est l'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} qui va provoquer la fixation de Ca^{2+} sur la Troponine C, levant alors son inhibition sur la Troponine I. La Tropomyosine peut ainsi se déplacer et permettre la formation d'actomyosine. Ce processus s'accompagne de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, par l'activité ATPasique des têtes de myosine, stimulée par le contact avec les molécules d'actine. Il s'en suit la libération de molécules d'ADP et de P_i provoquant un changement de l'angle que forme la tête avec les filaments de myosine légère et donnant un « coup de rame » sur les filaments d'actine, les incitant à glisser vers le centre du sarcomère, à l'origine de la contraction.

2.2. Le cytosquelette exosarcomérique ou non-contractile

Le cytosquelette non-contractile a principalement pour but de convertir les interactions moléculaires produites par l'actine et la myosine dans chaque sarcomère en un mouvement de contraction macroscopique. Cette fonction est assurée par deux sous-groupes de protéines du

cytosquelette non-contractile : d'une part le cytosquelette **périmyofibrillaire**, qui assure un lien et une coordination mécanique entre myofibrilles adjacentes ; et d'autre part le cytosquelette **sous-sarcolemmal**, connectant les myofibrilles périphériques au sarcolemme et, indirectement, à la matrice extracellulaire (MEC) (pour revue, voir Berthier et Blaineau, 1997).

2.2.1. Le cytosquelette périmyofibrillaire

Il est essentiellement composé d'actine γ non-contractile ainsi que de filaments intermédiaires, principalement représentés par la desmine, mais aussi la vimentine et la nestine (cette dernière étant présente seulement dans le muscle immature) (pour revue, voir Clark et coll., 2002). Dans le muscle adulte, les filaments de desmine sont localisés à l'aplomb des stries Z, créant un lien entre myofibrilles adjacentes, et permettant alors à la fois de coordonner la contraction entre les myofibrilles, mais aussi d'assurer l'organisation intermyofibrillaire au cours des cycles contraction/relaxation.

Par ailleurs, un ensemble de protéines spécifiques assurent l'ancrage des filaments intermédiaires aux myofibrilles. Citons entre autres la paranémine, la synémine, la plectine...

2.2.2. Le cytosquelette sous-sarcolemmal

2.2.2.1. Les costamères

Au début des années 1980, Pardo et coll. ont décrit des « complexes protéiques sous sarcolemmaux, enrichis en vinculine, alignés selon la circonférence de la fibre, disposés à intervalles réguliers, à l'aplomb de chaque bande I et s'interrompant au niveau des stries Z ». L'apparence en « côtes » de l'immunomarquage de la vinculine apporta leur nom aux costamères (du latin *costa* = « côte » et du grec *meros* = « partie »). La notion d'un sarcolemme hétérogène mais régulier émergeait alors.

Un microdomaine membranaire étant défini comme une structure membranaire de taille nanométrique, enrichis en certains lipides et protéines, les costamères constituent, au sein du sarcolemme, un microdomaine membranaire spécifique, enrichi en protéines.

Les notions de costamère ou de distribution costamérique se sont vite élargies avec la découverte de protéines sous-sarcolemmales, ayant également une distribution discontinue, régulière, mais disposées à l'aplomb des bandes M et des stries Z (Porter et coll., 1992).

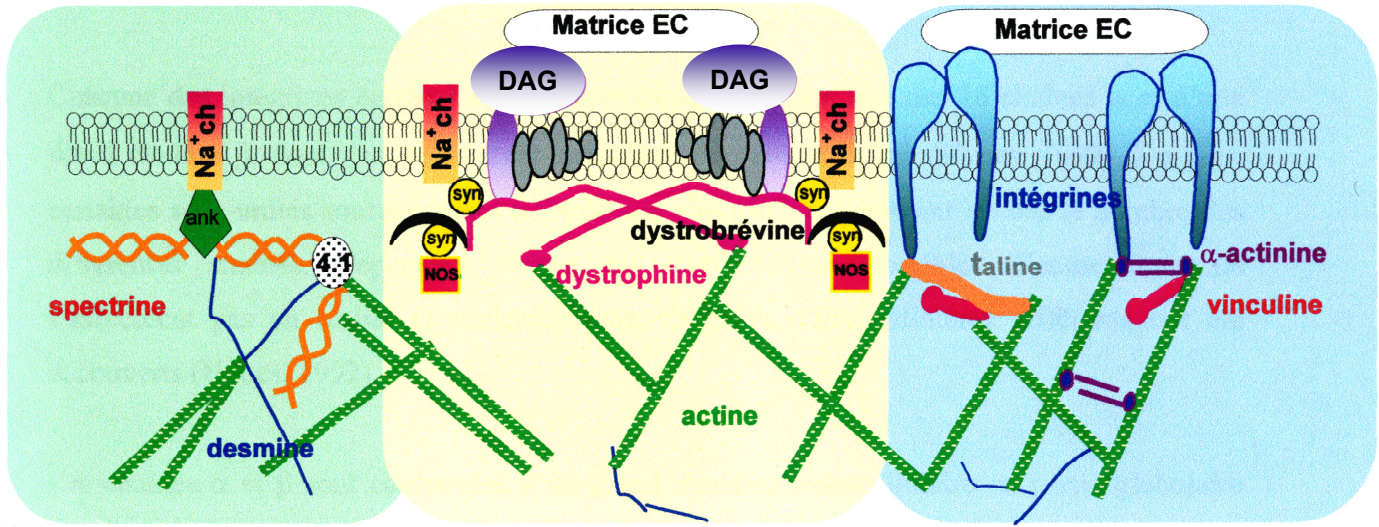


Figure 6. Schéma global des trois grands groupes de protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal

Les protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal appartiennent à trois groupes différents : le groupe des intégrines (à gauche), le groupe de la dystrophine/DAG (au centre) et le groupe de la spectrine (à droite). D'après Berthier & Blaineau, 1997.

Autrement dit, de nos jours, qualifier une distribution de costamérique signifie qu'une protéine présente une distribution sous-sarcolemmale hétérogène, discontinue et répétitive.

De part leur position à l'interface entre le cytosquelette périmyofibrillaire et le sarcolemme, différents rôles ont été attribués aux costamères. Selon Danowski et coll. (1992), ils serviraient à ancrer le cytosquelette périmyofibrillaire au sarcolemme, transmettant alors latéralement la force aux extrémités de la fibre. Par ailleurs, les costamères participeraient à la stabilisation et donc au maintien de l'intégrité du sarcolemme lors de la contraction (Pardo et coll., 1983 ; Porter et coll., 1992). L'importance des costamères dans la physiologie du muscle strié a également émergé par l'étude des origines de dystrophies musculaires et de cardiomyopathies. Les avancées en génétique moléculaire, biochimie et biologie moléculaire ont permis de montrer que les costamères étaient impliqués dans la transduction de signaux métaboliques, la détection du stress mécanique, ainsi que compartimentation de canaux ioniques (Yamada et Geiger, 1997). Ces caractéristiques sont le résultat d'au moins trois groupes de protéines cytosquelettiques sous-sarcolemmales (figure 6) : le groupe des **intégrines**, le groupe de la **spectrine** et le groupe de la **dystrophine/DAG** (DAG pour Dystrophin Associated Proteins) (pour revues, voir Clark et coll., 2002 ; Berthier & Blaineau, 1997). Ce dernier groupe occupe une place majeure dans le contexte de cette thèse, tant au niveau de notre modèle d'étude que d'un point de vue cellulaire et moléculaire. Par conséquent, après une brève description des autres complexes protéiques, nous nous concentrerons sur le groupe dystrophine/DAG.

2.2.2.2. Le groupe des intégrines

Ce groupe est composé de nombreux éléments protéiques, le principal étant l'intégrine, protéine transmembranaire hétérodimérique, composée d'une des 18 chaînes α (MM ~ 150 KDa) complexée à une des 8 chaînes β (MM ~225 KDa), en fonction du type tissulaire (Hynes, 1992). Les intégrines participent à la transmission de signaux dans de nombreux processus biologiques (migration, croissance, différenciation) et assurent l'attachement de l'actine cytosquelettique à la MEC : leur grand domaine extracellulaire se lie directement aux composants de la MEC, alors que la partie cytoplasmique s'associe indirectement à l'actine via d'autres protéines constitutives du complexe, telles que la vinculine, la taline et l' α -actinine (pour revue, voir Calderwood et coll., 2000). L'isoforme $\alpha_7\beta_1$ prédomine dans le muscle squelettique où elle est colocalisée avec la vinculine au niveau

des costamères, mais également au niveau des jonctions neuromusculaires (Belkin et coll., 1996) et myotendineuses (Martin et coll., 1996).

2.2.2.3. Le groupe de la spectrine

Cette famille comprend l'ankyrine, la protéine 4.1, l'actine γ et la spectrine, la principale protéine, découverte dans la préparation éponyme de membranes érythrocytaires (« specters » = spectres, Marchesi & Steers, 1968). La fonction de ce complexe protéique a donc principalement été étudiée dans les érythrocytes, où il joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette, de l'élasticité membranaire et de l'ancrage de protéines membranaires au cytosquelette (pour revue, voir Thomas, 2001). La spectrine érythrocytaire est composée d'une chaîne α (MM $\sim$ 240 KDa) et d'une chaîne β (MM $\sim$ 220 KDa), organisées en hétérodimères antiparallèles. Cependant, dans les tissus non-érythroïdes, tels que le muscle squelettique, l' α -spectrine est indétectable, par contre, la β -spectrine est présente sous différentes isoformes, au niveau des costamères et des JNM (pour revue, voir Berthier & Blaineau, 1997).

2.2.2.4. Le groupe dystrophine/DAG

Ce groupe est composé de plus d'une quinzaine de protéines cytoplasmiques, transmembranaires et extracellulaires, associées les unes aux autres. Il permet de relier l'actine γ non-contractile à la MEC. La dystrophine est le composant central de ce complexe qui inclut également l' α - et le β -dystroglycane, ainsi que les sarcoglycanes, les sarcospanes, les syntrophines et la dystrobrevine (Clark *et coll.*, 2002).

La dystrophine est codée par un gène de 79 exons, le plus long identifié à ce jour, soit sur plus de 2,4 Mb du chromosome sexuel X (locus Xp21.2). Plusieurs formes de la dystrophine sont générées par initiation de transcription au niveau de promoteurs spécifiques du type tissulaire.

Ainsi, 5 promoteurs ont été identifiés mais seulement 3 (promoteurs C = Cerveau, M = Muscle et P = Purkinje) conduisent à l'expression de l'isoforme totale de la dystrophine. La protéine a alors un PM alors 427 kDa, et est composée de 3685 acides aminés (Koenig et coll., 1988). Dans le muscle squelettique, seuls les produits du promoteur M sont détectés. Les deux autres promoteurs (S = Schwann et G = Général) sont situés plus en 3', conduisant à l'expression de formes tronquées en N-terminale appelées apodystrophines ou Dp (pour revue

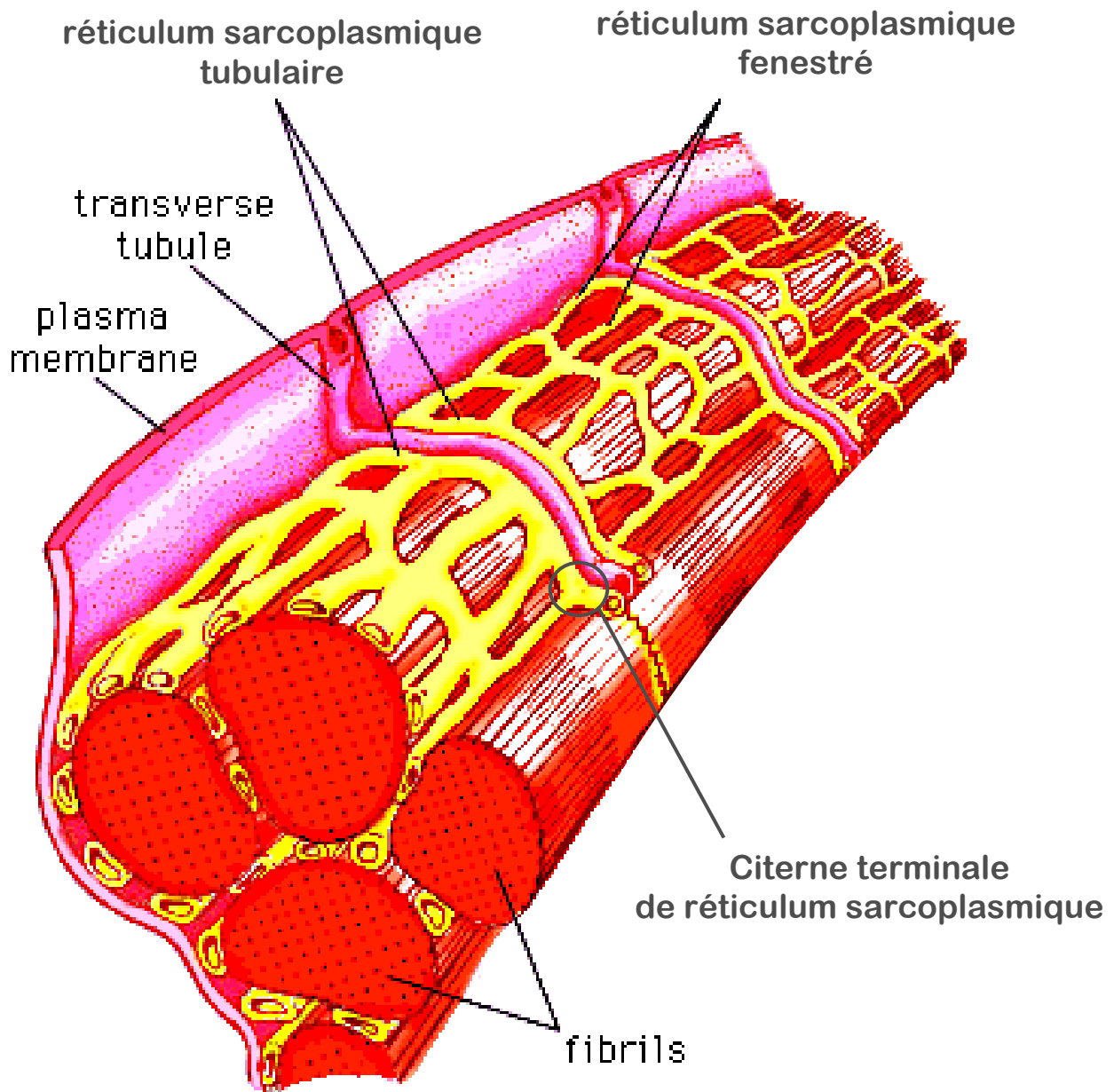


Figure 7. Morphologie du réticulum sarcoplasmique

Le RS est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du Ca^{2+} . Sa structure comporte 3 régions de morphologie différente: le réticulum tubulaire, le réticulum fenestré et les citernes terminales.

Le réticulum fenestré est « perforée » issue de la fusion des membranes des deux faces opposées du RS et permettant une communication directe entre les deux compartiments cytoplasmiques situés de part et d'autre.

Le réticulum sarcoplasmique contigus aux régions tubulaires forme le réticulum sarcoplasmique tubulaire.

Les régions jonctionnelles du RS avec les tubules T forment de gros renflements en forme de « cul de sac » appelés citernes terminales.

sur la super famille de la dystrophine, voir Fabrizio *et coll.*, 1994). Par ailleurs, Feener et coll. (1989) montrèrent qu'en plus de la spécificité tissulaire, la dystrophine subissait l'épissage alternatif au niveau de son extrémité C-terminale, au sein d'un même tissu.

3. Les systèmes membranaires spécifiques

De manière schématique, la cellule musculaire squelettique comporte deux systèmes membranaires. Le premier est constitué par le sarcolemme, en contact avec le milieu extracellulaire. Le second est en contact avec le cytosol, il s'agit du RS (RS). Ces deux systèmes membranaires constituent des éléments clés dans le contrôle de l'activité contractile. L'association d'un tubule T et des deux citernes terminales adjacentes de RS forme une structure caractéristique appelée triade. La membrane du tubule T est alors à proximité du RS. Cette proximité prend toute son importance au cours de l'excitation cellulaire, lorsque le signal électrique émis au niveau de la JNM est transmis au RS, qui libère alors le Ca^{2+} nécessaire à la contraction.

3.1. Le réticulum sarcoplasmique : morphologie et biogenèse

Le RS est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du Ca^{2+} . C'est ce haut niveau de spécialisation du réticulum dans les fibres musculaires qui a amené à la dénomination spécifique de « réticulum sarcoplasmique », alors que ce compartiment est appelé « réticulum endoplasmique » pour les autres types cellulaires.

Sa structure est très particulière et on peut distinguer 3 régions de morphologie différente : le réticulum tubulaire, le réticulum fenestré et les citernes terminales (figure 7).

Le réticulum fenestré est une région plate du RS, « perforée » de part et d'autre suite à la fusion des membranes des deux faces opposées du RS et permettant une communication directe entre les deux compartiments cytoplasmiques situés de part et d'autre. Les bords des régions fenestrées du RS sont contigus aux régions tubulaires où le RS forme des tubules parallèles entre eux, orientés majoritairement de façon longitudinale. Enfin, les régions jonctionnelles du RS avec les tubules T forment de gros renflements en forme de « cul de sac » appelés citernes terminales. L'association d'un tubule T et des deux citernes terminales adjacentes forme une structure caractéristique appelée triade (pour revues, voir Franzini-Armstrong, 1994 et Peachey & Franzini-Armstrong, 1983). Ces différences structurales sont assorties d'une différence fonctionnelle, les citernes terminales étant plus spécialement

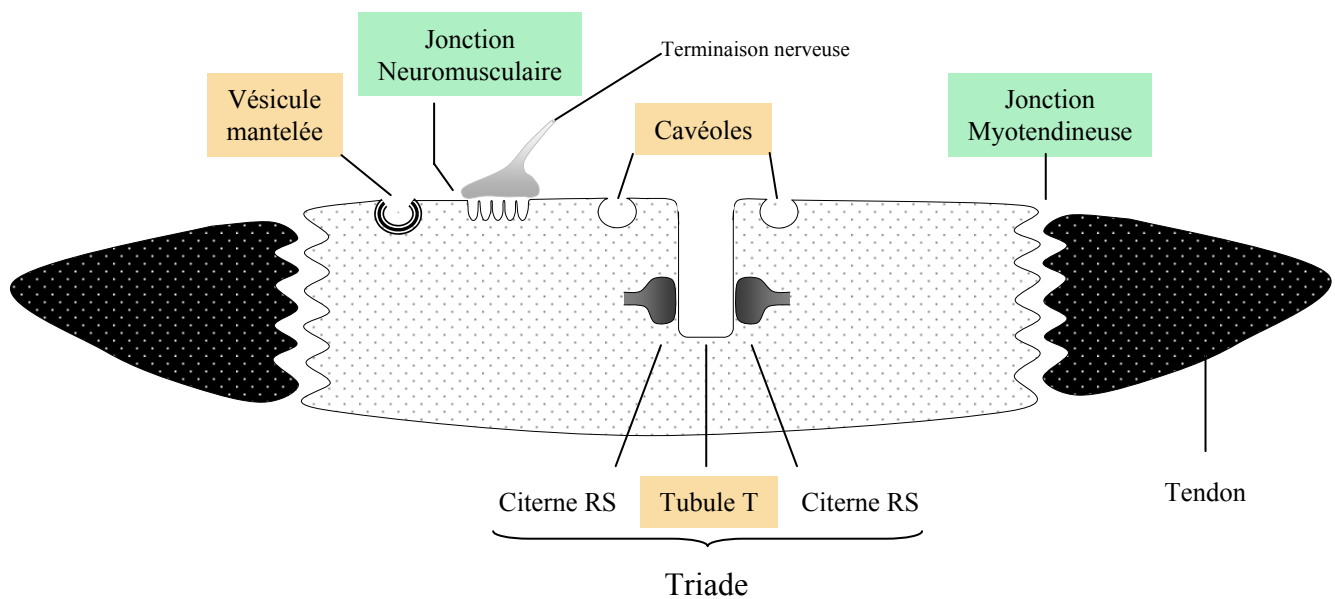


Figure 8. Les systèmes d'invagination du sarcolemme

Représentation schématique des différents systèmes d'invagination membranaire du sarcolemme. De manière synthétique, ces invaginations sont présentes au niveau de deux zones : les zones jonctionnelles (en vert) et extra jonctionnelles (en orange).

impliquées dans la libération du Ca^{2+} lors de la contraction et le RS longitudinal dans sa recapture.

Au cours des phases précoces du développement musculaire, le RS se développe seul, puis le développement du RS et des tubules T est coordonné. 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, reliées par des connexions filamenteuses à la strie Z (Franzini-Armstrong, 1991 ; Takekura et coll., 2001). Le RS jonctionnel est en effet assemblé simultanément à l'appareil contractile. A E17, le RS commence à s'organiser de façon tubulaire au niveau des jonctions bande A-bande I, cependant, la différenciation des 3 zones du RS n'est pas encore établie, toutes ses membranes forment aléatoirement des liaisons avec les tubules T. A partir de ce stade, la maturation du RS coïncide avec celle du système T : le réarrangement des tubules T en position transverse est concomitant au passage des jonctions triadiques en position transversale, ainsi qu'à l'apparition progressive des trois zones du RS. Ce processus est lent, la transition longitudinale-transversale est graduelle, passant par des stades obliques. La majeure partie de cette transition se déroule entre E16 et E18, mais elle peut durer, comme pour le système T, jusqu'à la troisième semaine après la naissance.

3.2. Le sarcolemme jonctionnel, extra-jonctionnel et ses microdomaines lipidiques

La membrane plasmique des fibres musculaires est une véritable mosaïque de domaines fonctionnels. En effet, l'existence au sein de la membrane de régions fonctionnellement distinctes caractérisées par la présence de protéines spécialisées a été démontrée dans le muscle bien avant de nombreux autres types cellulaires. Des approches morphologiques, principalement de microscopie électronique, et immunocytochimiques ont révélé que la surface de la fibre musculaire apparaît composée d'au moins trois structures : l'endomysium, la lame basale et le sarcolemme. Ce dernier n'est pas une surface plane, mais présente de nombreuses invaginations qui accroissent la surface cellulaire (figure 8). Ces invaginations sont majoritairement regroupées au niveau de deux zones : d'une part au niveau des zones jonctionnelles (JNM et JMT), et d'autre part au niveau des zones extra jonctionnelles qui présentent elles-mêmes trois type d'invaginations : les tubules transverses, les cavéoles et les vésicules mantelées. Notre étude portant essentiellement sur le cavéoles et les tubules T, je ne développerai que ces deux derniers systèmes d'invagination membranaires.

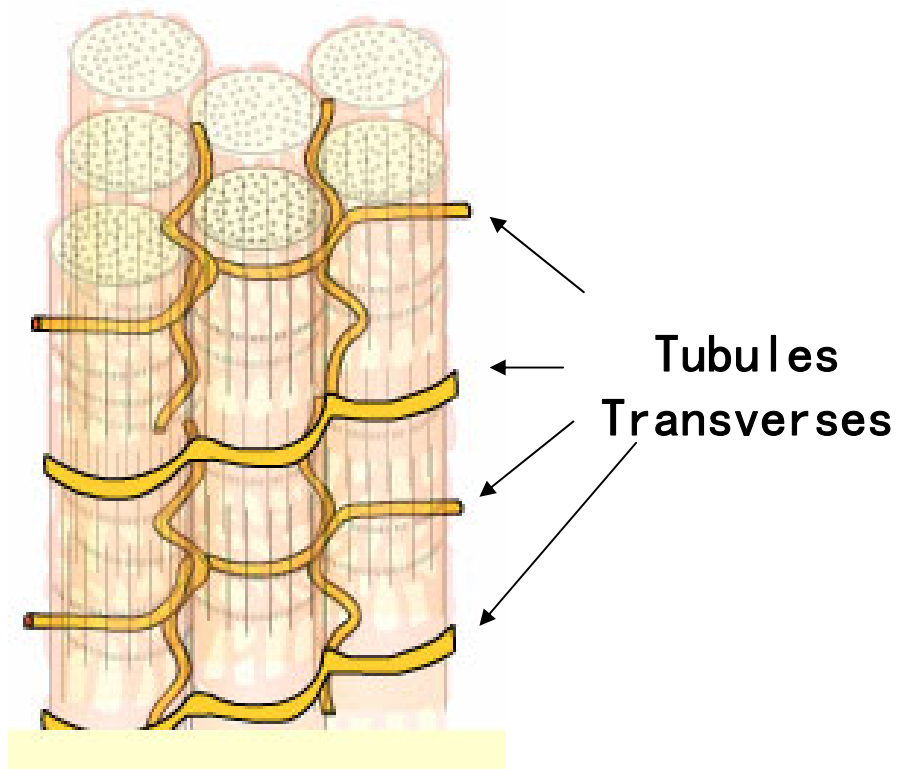


Figure 9. Morphologie du système tubulaire transverse

Chez les mammifères, les tubules transverses (tubules T) pénètrent transversalement la fibre musculaire de part en part au niveau des jonctions bande A/Bande I de chaque sarcomère. L'espace entre chaque tubule T est quasiment entièrement et exclusivement occupé par les myofibrilles.

3.2.1. Les tubules T : morphologie

L'ensemble des tubules T constitue le système tubulaire transverse (système TT). Il forme un réseau d'invaginations de la membrane plasmique spécifique du muscle strié en pénétrant profondément dans la fibre musculaire. Les espaces compris entre les mailles de ce réseau sont occupés par les myofibrilles (figure 9). Les rôles du système TT sont multiples, il permet notamment la propagation rapide du potentiel d'action et l'acheminement de substances nutritives en provenance du milieu extracellulaire jusqu'au cœur de la fibre. Dans le muscle squelettique de mammifère, les tubules T sont situés à la jonction bande A-bande I et ils prennent une forme différente en fonction de leur localisation : on peut distinguer les tubules non jonctionnels (la majorité du système TT), fins, à section approximativement circulaire et à trajectoire sinueuse, des tubules jonctionnels, droits, plats et allongés, entrant dans la formation des triades (pour revue, voir Peachey et Franzini-Armstrong, 1983).

3.2.2. Les triades

La jonction entre les tubules transverses et les citernes terminales de RS sont appelées **jonctions triadiques**. Au niveau de ces sites, l'espace entre les membranes de ces deux compartiments n'est que de 12 à 17 nm. D'un point de vue ultrastructural, la jonction triadique (ou triade) se définit par 1 tubule T auquel sont accolées 2 citernes terminales (CT) de RS (figure 10). En microscopie électronique à transmission, il est même possible de visualiser des structures, appelées **pieds jonctionnels**, qui « pontent » les membranes d'une CT à celle d'un tubule T. L'absence de contraction associée à la perte de ces pieds jonctionnels chez la souris dysgénique atteste de leur rôle fondamental dans le contrôle de l'activité contractile (Rieger et coll., 1987).

3.2.3. Les rafts lipidiques

La composition des membranes cellulaires peut être connue en séparant les différents constituants des cellules et en procédant à leur analyse chimique. C'est de cette manière que l'on a pu déterminer qu'elles sont formées de phospholipides et de protides.

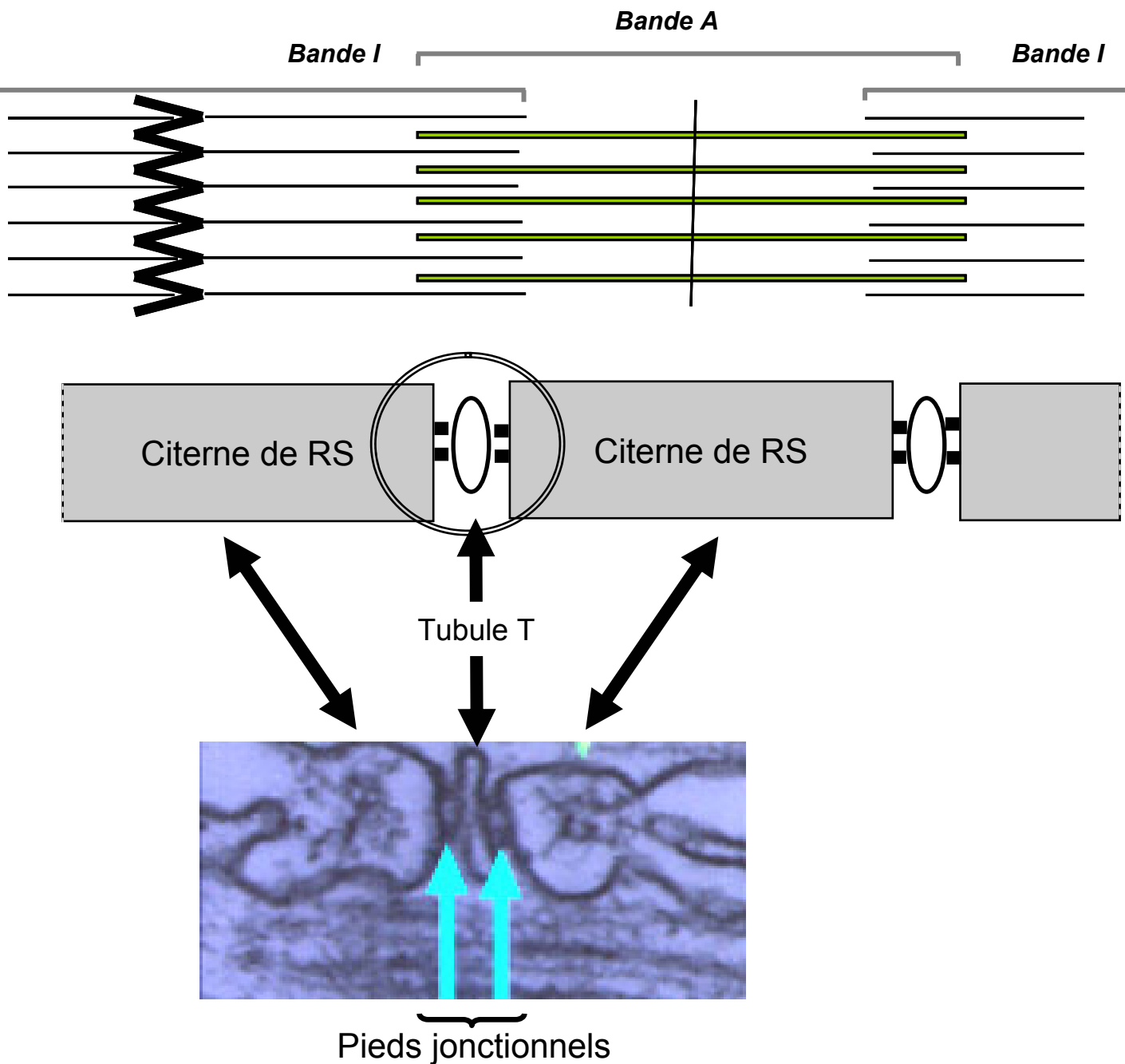


Figure 10. Structure et Localisation de la triade et cliché en microscopie électronique des pieds jonctionnels

Une triade est définie par l’accolement de 2 citernes terminales de RS à 1 tubule T. Ces structures sont régulièrement réparties à l’aplomb des bandes A-bandes I. En microscopie électronique, il est possible de distinguer les pieds jonctionnels qui pontent chaque citerne aux tubules.

L'analyse chimique ne dit cependant rien de la façon dont ces molécules sont disposées. De plus, les observations réalisées avec les microscopes électroniques les plus puissants ne nous permettent pas de visualiser les différentes molécules constitutives des membranes.

En 1971, S. J. Singer et G. Nicholson avancèrent l'hypothèse selon laquelle les protéines membranaires sont dispersées et individuellement insérées dans la double couche de phospholipides et que seules leurs parties hydrophiles en émergent suffisamment pour entrer en contact avec l'eau. Une telle disposition maximise le contact des parties hydrophiles des protéines et des phospholipides avec l'eau tout en fournissant aux parties hydrophobes un milieu exempt d'eau. D'après ce modèle, la membrane est une mosaïque constituée d'une double couche fluide de phospholipides dans laquelle flottent des molécules protéiques, d'où l'expression de mosaïque fluide.

Cholestérol et phospholipides peuvent former une phase liquide ordonnée (lo), phase qui peut coexister avec une phase liquide désordonnée (ld) pauvre en cholestérol – permettant par là même la coexistence de 2 phases dans la membrane globalement liquide.

La membrane biologique serait formée de microdomaines contenant différents lipides et formant des « rafts » fonctionnels (« raft » = radeau en anglo-saxon). En effet, le traitement avec des détergents non ioniques a permis d'isoler des fractions membranaires spécifiques et ces microdomaines lipidiques isolés sont considérés comme représentant l'équivalent biochimique des rafts. La notion de radeaux lipidiques implique un niveau supérieur d'organisation et une notion de ségrégation dynamique à l'intérieur même de la membrane qui ajoute une dimension supplémentaire au modèle classique de mosaïque fluide.

Les rafts ont été proposés comme étant des plateformes lipidiques de composition chimique spécifique (riche en sphingolipides et en cholestérol dans le feuillet externe de la membrane cellulaire) qui permettent de séparer les composants membranaires au sein de la membrane cellulaire.

Les rafts seraient petits (avec des estimations de taille très variable), mais pourraient fusionner dans certaines conditions. Une estimation du nombre de rafts dans la membrane plasmique d'une cellule, basée sur leur composition lipidique, la surface totale membranaire et la taille des microdomaines, serait de l'ordre de 10^5 à 10^6 . Une bonne approximation serait de considérer les rafts comme une phase liquide-ordonnée et le reste de la membrane comme une phase liquide « non-raft ». L'incorporation de protéines dans ces domaines introduit encore un niveau supplémentaire de complexité (pour revue, voir Pike, 2003)

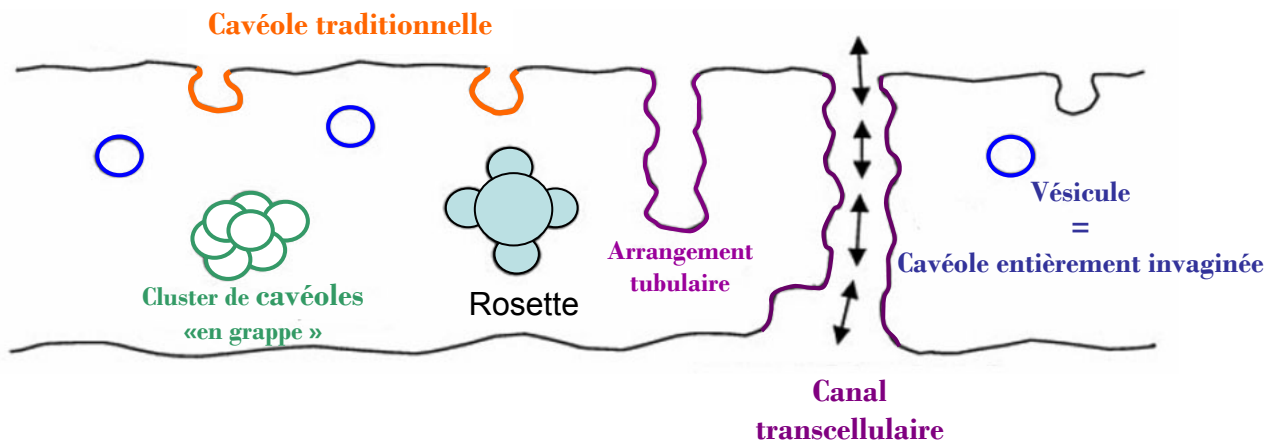


Figure 11. Les différentes morphologies adoptées par les cavéoles

Les cavéoles peuvent exister sous différentes formes, allant de la forme traditionnelle, simple invagination de la membrane plasmique, à la forme vésiculaire dans laquelle l'invagination est telle que la cavéoles se détache de la membrane plasmique.

A partir de ce stade, plusieurs cavéoles peuvent se clustériser pour former des structures dite « en grappe » et en rosette. Les cavéoles traditionnelles peuvent également fusionner et ainsi former des arrangements tubulaires pouvant aller jusqu'à la formation d'un canal transcellulaire si le tubule rejoint la membrane plasmique.

(D'après Razani et coll., 2002.)

Au final, lorsque l'on analyse ces différentes possibilités, il apparaît que les rafts pourraient exister dans différents états, ayant notamment des tailles différentes – ceci pouvant être du à la fusion de différents rafts entre eux ou avec des cavéoles. Les différentes théories actuelles sont tout de même en accord sur un point : les radeaux lipidiques peuvent fusionner en domaines plus larges qui peuvent être visualisés au microscope. L'une des preuves de cette fusion possible entre les rafts sont les cavéoles.

3.2.4. Les cavéoles : découverte, structure et fonctions physiologiques

A l'origine, les cavéoles ont été décrites suite à l'observation en microscopie électronique de petites invaginations membranaires « lisses » (par opposition aux vésicules de clathrine « mantelées »), en forme d'oméga, de 50 à 100 nm de diamètre. Cependant, par la suite, le terme de cavéole s'est étendu et comprend également des vésicules intracellulaires détachées de la membrane plasmique, associées en groupe sous forme de « grappes » ou de « rosettes » (figure 11). Ces formes « non traditionnelles » de rafts lipidiques sont plus présentes dans certains tissus tels que les adipocytes et les cellules endothéliales, sous forme de rosettes, et sont très abondantes dans le muscle en développement sous forme de grappes (Scherer et coll., 1994; Parton et coll., 1997 ; Simionescu et coll., 2002). Par conséquent, les cavéoles ne devraient vraisemblablement pas être considérées comme des structures statiques, mais pouvant prendre diverses formes et structures en s'agglomérant ou en fusionnant les unes aux autres, bien que les processus impliqués dans la formation de ces structures restent inconnus.

Dans le muscle strié, leur présence augmente de 60 à 80% la surface du sarcolemme. Les cavéoles sont généralement regroupées dans une zone en forme d'anneau à l'aplomb des bandes I et stries M, et, très fréquemment, 1 à 4 cavéoles sont présentes autour de l'embouchure des tubules T (pour revue, voir Razani et coll., 2002).

Depuis leur découverte dans les années 1950, la fonction des cavéoles a été matière à de nombreuses spéculations. De nombreux rôles ont ainsi été attribués aux cavéoles et à leur protéine marqueur, la cavéoline.

3.2.4.1. La famille des cavéolines

Bien que la Cav-3 (spécifique du muscle striée) ne soit pas considérée comme un membre à part entière du complexe dystrophine/DAG (Crosbie et coll., 1998), une partie de ce complexe est localisée dans les cavéoles et la Cav-3 co-immunoprécipite avec de nombreuses protéines du complexe dystrophine/DAG (*ie* α -sarcoglycane, β -dystroglycane et la dystrophine elle-même (Song et coll., 1996; Sotgia et coll., 2000). La cavéoline occupe donc une place important dans l'ultrastructure de la fibre musculaire squelettique.

3.2.4.2. Découverte de la cavéoline

La cavéoline a été identifiée à la suite de recherches de substrats présentant une (ou plusieurs) tyrosine(s) phosphorylée(s) dans des fibroblastes infectés par le virus du sarcome de Rous : v-Src (Glenney et Zokas, 1989). Quatre protéines prédominantes ont été identifiées. Parmi celles-ci, une protéine de 22 KDa semblait être fortement corrélée au potentiel de transformation des cellules infectées, lui suggérant un rôle dans l'oncogenèse cellulaire. Par la suite, l'équipe de Rothberg fit l'observation que des immunomarquages de cette protéine de 22 KDa donnait une localisation membranaire, sous forme de points, rappelant le profil obtenu suite à un marquage des cavéoles, les amenant alors naturellement à établir un lien entre cette protéine de 22 KDa et les cavéoles (pour revue, voir Rothberg et coll., 1992). Cette hypothèse fut confirmée par les observations en microscopie électronique suite à un marquage de cette protéine de 22 KDa à l'or colloïdal. Ceci établit clairement que les cavéoles et cette protéine étaient étroitement associées, et que cette dernière était un composant structural majeur des cavéoles. Par ailleurs, l'utilisation d'agents séquestrant le cholestérol, connus pour déstructurer les cavéoles, entraînait une délocalisation de cette protéine. De plus amples observations en microscopie électronique suite au marquage de cette protéine montrèrent par la suite que les cavéoles semblaient être composées de séries d'anneaux striés, concentriques. Le nom de cavéoline fut alors attribué à cette protéine associée de manière très stricte aux cavéoles (Rothberg et coll., 1992).

3.2.4.3. Les membres de la famille de la cavéoline

Le clonage et le séquençage du gène correspondant à la cavéoline, par Glenney en 1992, a indiqué que cette protéine était en fait identique au produit d'un autre gène cloné de manière concomitante : VIP 21 (Vesicular Integral Protein of 21 KDa), protéine présente dans des vésicules dérivées du trans-Golgi, impliquant par la même la cavéoline dans le transport vésiculaire. Cette protéine fait en réalité partie d'une famille protéique et on y fait référence sous le nom de cavéoline-1 (Cav-1).

Par la suite, deux autres membres de la famille de cavéolines ont été décrits : la Cav-2 et la Cav-3. Ces protéines sont également localisées exclusivement dans les cavéoles ce qui en fait des marqueurs spécifiques des microdomaines cavéolaires. Le profil d'expression de la Cav-1 et de la Cav-2 est très distinct de celui de la Cav-3, voir exclusifs. Cav-1 et Cav-2 sont très fortement exprimées dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les pneumocytes, alors que la Cav-3 est la protéine spécifique du tissu musculaire (cardiaque, squelettique et lisse). Cependant, le muscle lisse fait exception puisqu'on retrouve les 3 cavéolines dans ce type cellulaire, probablement en raison de son statut hybride « fibroblastique/musculaire ». Le profil d'expression « exclusif » de la Cav-1 et de la Cav-3 laisse penser que bien qu'ayant un au degré d'identité, ces deux protéines possèdent probablement des fonctions différentes *in vivo*.

3.2.4.4. Propriétés structurales et relations entre les cavéolines

La grande majorité des travaux portant sur la structure de la cavéoline ont été menés sur la Cav-1 qui a alors servi d'archétype pour les autres cavéolines.

Les premiers travaux constatèrent que la protéine était résistante à l'extraction au carbonate de sodium, ce qui indique que la cavéoline est probablement en partie intramembranaire (Sargiacomo et coll., 1993). D'une manière générale, les divers travaux effectués par la suite convergent tous vers la topologie suivante pour la Cav-1 :

i) Les extrémités N et C terminales de la protéine sont cytoplasmiques, d'après les observations suivantes : des anticorps dirigés contre les parties N et C terminales ne détectent la protéine que si les membranes ont été perméabilisées avec des détergents (Dupree et coll., 1993). De plus, la Cav-1 associée à la membrane est sensible à la protéolyse (Monier et coll., 1995), indiquant que les parties non transmembranaires sont cytoplasmiques.

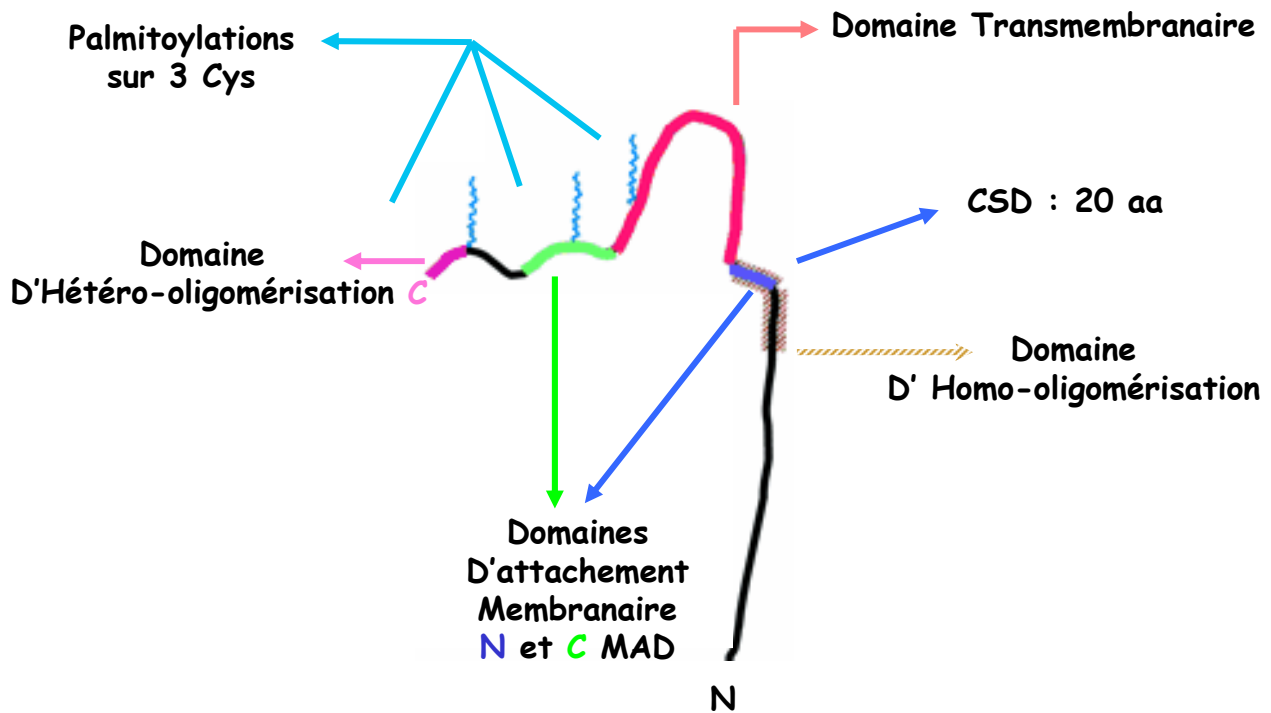


Figure 12. Les différents domaines de la cavéoline

La cavéoline est une succession de domaines structuraux et fonctionnels. Ainsi, elle possède en C terminal un domaine d'hétéro-oligomérisation, puis un domaine d'attachement à la membrane qui précède le domaine transmembranaire. A la limite membrane/cytoplasme se situe le domaine scaffolding (CSD) auquel fait suite un domaine d'homo-oligomérisation. De plus, en C terminal, la cavéoline serait vraisemblablement palmitoylée sur 3 cystéines.

ii) Il existe des sites de phosphorylation et palmitoylation sur les parties N et C terminales de la protéine (Li et coll., 1996).

L'ensemble de ces observations a mené à décrire la cavéoline comme une protéine pénétrant et ressortant de la membrane plasmique. Par ailleurs, l'inaccessibilité de la protéine à la biotinylation de la surface cellulaire indique qu'elle est ancrée dans le feuillet interne de la membrane. Enfin, l'analyse de la séquence de la Cav-1 indique qu'elle contiendrait une région hydrophobe (résidus 102-134). Toutefois, une longueur de 32 acides aminés ne permet pas à une protéine de former une tête d'épingle à travers la bicouche de phospholipides. Par conséquent, la prise en compte globale de tous ces éléments suggère fortement que ces 32 résidus constituent en fait une tête d'épingle située uniquement dans le feuillet interne de la bicouche lipidique. Toutefois, la protéine, même délétée de ce segment garde sa localisation membranaire (Schlegel et Lisanti, 2000). La capacité de liaison de la cavéoline à la membrane résiderait en fait dans les résidus 82-100 de sa partie N-terminale et dans les résidus 135-150 de sa partie C terminales (Schlegel & Lisanti, 2000), désormais nommés respectivement N-MAD (N-Mediated Attachment Domain) et C-MAD (C-Mediated Attachment Domain) (figure 12). Cette localisation membranaire est de plus stabilisée par des palmitoylations sur les Cystéines 133, 143 et 156 de la partie C terminale.

Outre, une structure et une topologie bien particulières, les cavéolines possèdent également une autre particularité, celle de former des oligomères. En effet, en conditions peu dénaturantes, la cavéoline-1 migre sous forme de complexes de haut poids moléculaire (350 à 400 kDa) (Sargiacomo et coll., 1995). Les analyses biochimiques de ces complexes ont révélé qu'ils étaient majoritairement constitués de Cav-1 (donc des homo oligomères), et qu'ils étaient capables de se dissocier seulement sous des conditions de détergent très drastiques et de température, indiquant une forte stabilité de ces homo oligomères, déterminés comme comportant un nombre de 14 à 16 monomères. Ces complexes se formeraient juste à la sortie du réticulum endoplasmique, avant le transit des oligomères du Golgi à la membrane (Monier et coll., 1995). Le domaine responsable de l'oligomérisation de la cavéoline (OD pour *Oligomerization Domain*) est localisé dans la région 61-101 (Sargiacomo et coll., 1995).

Un autre degré de complexité s'est ajouté à la topologie et la structure de la cavéoline suite à la découverte que les complexes de haut poids moléculaire contenaient également parfois de la Cav-2, qui était également capable de se dimériser avec la Cav-1 et de former alors des hétéro oligomères. Toutefois, en absence de Cav-1, la Cav-2 est incapable de former

de gros complexes homo oligomériques et reste retenue au niveau de l'appareil de Golgi sous forme de monomères et de dimères (Scherer et coll., 1996).

La Cav-3 et la Cav-1 sont identiques¹ à 65% et similaires² à 85%. D'après cette haute similarité de séquence, située en particulier au niveau de leurs domaines transmembranaire et d'oligomérisation, les mêmes propriétés de structure ont été attribuées à la Cav-3. A raison, puisque la Cav-3 est également capable de former des complexes de haut PM (350 à 400 kDa) localisés dans les cavéoles (Tang et coll., 1996). Toutefois, bien que similaire en de nombreux points, la Cav-3 n'est capable de former des hétérodimères ni avec la Cav-2, ni avec la Cav-1 (Das et coll., 1999).

3.2.4.5. Les domaines d'interaction des cavéolines

Comme nous venons de le voir, d'un point de vue structural, la cavéoline possède plusieurs domaines responsables de sa localisation et de la formation de dimères voire d'oligomères. Nous avons également vu que la cavéoline pouvait interagir avec des protéines telles que la dystrophine et ses glycoprotéines associées. La cavéoline peut alors être perçue comme un « patchwork » de domaines structuraux et fonctionnels (figure 12). A ce jour, deux domaines d'interaction ont été caractérisés sur la cavéoline : un domaine dit WW et un domaine CSD pour *Caveolin Scaffolding Domain* (Domaine d'Assemblage de la Cavéoline).

3.2.4.5.1. Le domaine WW

Ce domaine a été découvert en 1994. C'est le plus petit domaine d'interaction décrit à ce jour, avec 35 résidus seulement, il peut être présent une ou plusieurs fois dans une même protéine. On le retrouve dans chez toutes les espèces (levure, plantes, vers, Homme). Le motif qui le caractérise, et duquel il tient son nom, est représenté par 2 résidus Tryptophanes (W), espacés de 20 à 22 acides aminés. Plus précisément, le domaine WW est structuré en feuillets bêta anti-parallèles, les limites des feuillets étant les tryptophanes. Le cœur du domaine comptant également d'autres acides aminés aromatiques, tels que des tyrosines (Y) et une proline (P) hautement conservée, 2 résidus avant le W en C terminal (figure 13A). Ces résidus

¹identité : elle définit la proportion des paires de résidus identiques entre deux séquences alignées (s'exprime généralement en %).

²similarité : elle mesure la ressemblance entre deux séquences. Le degré de similarité est quantifié par un score basé sur le % de similarité (% identité + % substitutions conservatives) des séquences. Un fort degré de - 38 - similarité implique généralement une homologie de structure secondaire.

aromatiques très conservés confèrent au domaine WW sa spécificité envers des ligands riches en prolines.

Ainsi, jusqu'à présent, 3 classes de domaines WW ont été décrites. Ces classes ont des ligands différents, bien que leurs domaines WW soient quasiment identiques. D'une manière générale, tous les domaines WW se lient à de petits motifs riches en prolines, la différence entre les classes ne réside donc pas dans le motif du domaine WW, mais dans celui présent sur le ligand (figure 13B) (pour revue, voir Ilsley et coll., 2002).

3.2.4.5.2. Le Domaine Scaffolding : CSD

De manière générale, une protéine « scaffolding » est une protéine d'assemblage (scaffold = échafaudage en anglo-saxon), c'est-à-dire capable d'interagir avec de nombreuses autres molécules en les concentrant, en les organisant et parfois même en régulant leur activité (Pawson & Scott, 1997). Depuis la découverte de la cavéoline, une multitude d'études furent réalisées dans le but de déterminer son ou ses rôles potentiels.

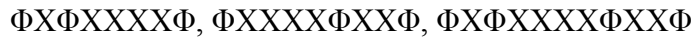
En 1994, Lisanti et coll. constatèrent que de nombreuses molécules appartenant à diverses voies de signalisation étaient localisées au niveau des cavéoles des cellules endothéliales. Ils émettent alors l'hypothèse que les cavéoles seraient des organites spécialisés dans la transduction du signal ; la cavéoline serait alors une protéine scaffolding concentrant diverses molécules du signal et permettant ainsi des interactions rapides entre les différentes voies de signalisation cellulaire. Désormais, il existe de nombreuses preuves en faveur d'un tel rôle. La première preuve fut amenée par l'observation qu'un peptide de 20 acides aminés, correspondant au domaine 82-101 de la cavéoline, représentait un inhibiteur potentiel des protéines G hétérotrimériques dans l'hydrolyse du GTP (Li et coll., 1995) ce qui fut confirmé et retrouvé dans d'autres molécules de signalisation. Ce motif de 20 acides aminés étant à l'origine de différentes interactions et parfois de la modulation de l'activité de ces molécules, il fut appelé logiquement le domaine scaffolding de la cavéoline (CSD pour Caveolin Scaffolding Domain).

Par la suite, ce motif a été utilisé en phage display dans le but i) de trouver des partenaires potentiels de la cavéoline ii) de déterminer un motif consensus de liaison au domaine scaffolding de la cavéoline (Couet et coll., 1997). Par alignement de séquence des protéines interagissant avec le CSD, des motifs consensus appelés CSB (pour Caveolin Binding Domain) ont été décrits comme répondant au CSD :

Motifs du CBD	Protéine concernée
FTFKDLYFKMF	Protéine Gi2 α
FSAAPFSGW	eNOS
WSFGILLY	Famille Src Kinase
WSYGVTVW	Récepteur à l'EGF
WAYGVLLY	PKC α

Tableau 1. Exemples de CBD (caveolin Binding Domain) identifiés sur diverses protéines

Le motif originellement décrit est le suivant : $\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$, où Φ est un acide aminé aromatique et X représente n'importe quel acide aminé. Ce motif se lie au CSD (Caveolin Scaffolding Domain) de la cavéoline. Sa découverte a permis d'identifier de nombreuses protéines comportant intégralement ou en partie ce motif. (D'après Okamoto et coll., 1998)



où Φ est un résidu aromatique (Phe, Tyr ou Trp) et X peut être n'importe quel résidu (Couet et coll., 1997).

Ces motifs ont alors été nommés « domaines de liaison à la cavéoline » (CBD pour Caveolin Binding Domain) (voir tableau 1 pour des exemples de CBD de protéines interagissant avec le CSD de la cavéoline).

Cependant, il est important de noter que la présence ou l'absence de tels motifs ne suffit pas à affirmer qu'une protéine est un partenaire de la cavéoline, ou qu'une interaction aura lieu à ce niveau, de nombreuses protéines possédant le CBD sur leur séquence primaire n'interagissant pas avec la cavéoline. Afin de démontrer l'implication de ce motif dans l'interaction avec la cavéoline, la stratégie principale est de créer des protéines délétées de ce domaine et de vérifier si l'interaction persiste ou non. Récemment, il a été montré que la Cav-1 interagissait avec un échangeur (Na^+ , K^+)/ H^+ , nommé NHE7, non pas par son CSD, mais par son domaine d'attachement membranaire C-MAD (Lin et coll., 2006).

En raison de la forte homologie générale de séquence entre les divers membres de la famille des cavéolines, il est apparu naturel d'attribuer des fonctions identiques à la Cav-2 et la Cav-3. Cependant, le domaine CSD de la Cav-2 est assez divergent de celui de la Cav-1, alors que celui de la Cav-3 est très proche. L'homologie de séquence (et donc de structure) mènerait à des homologies de fonction. Il a donc dans un premier temps été supposé que la Cav-3 assumerait le même rôle que la Cav-1, c'est-à-dire une protéine scaffolding, dans le muscle. Il a en effet été démontré que la Cav-3, via son domaine scaffolding, interagissait, concentrait et régulait diverses protéines telles que la eNOS (Feron et coll., 1996), la nNOS (Venema et coll., 1997) et la phosphofructokinase M (Scherer et Lisanti., 1997). En revanche, peu de choses sont connues en ce qui concerne la Cav-2, il a toutefois été démontré que le CSD de la Cav-2 était responsable de sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi dans des cellules Caco-2 (Breuza et coll., 2002). Cependant, rien n'a encore été démontré sur un éventuel rôle de la Cav-2 dans la signalisation cellulaire.

Concernant les mécanismes d'interaction entre le CSD et le CBD, peu de choses sont connues. Néanmoins, la présence d'acides aminés aromatiques régulièrement espacés sur ces motifs impliquerait qu'il s'agirait d'interactions hydrophobes par juxtaposition linéaire des noyaux de ces résidus aromatiques.

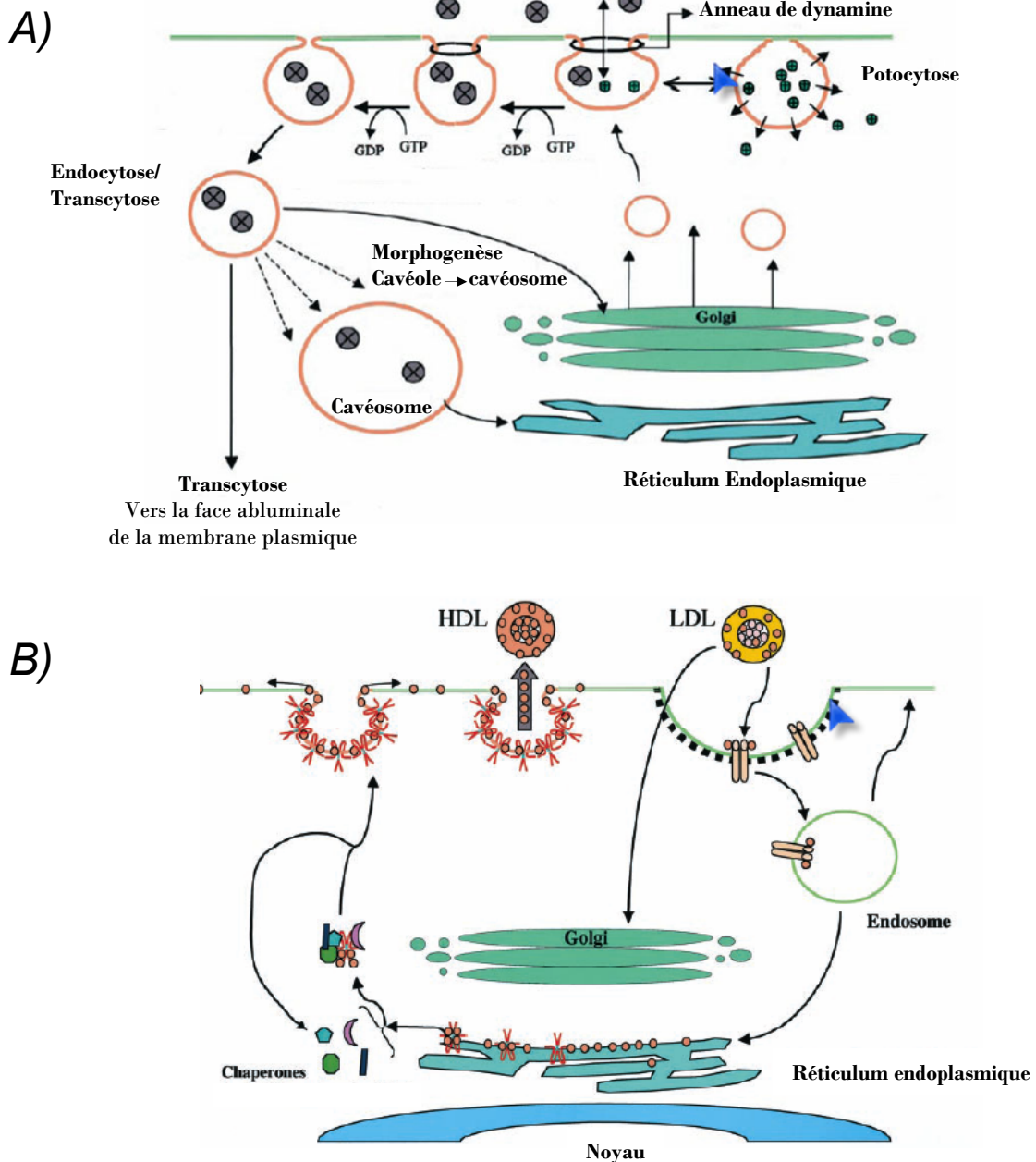


Figure 14. Transports vésiculaires (A) et rôle des cavéoles et de la cavéoline dans l'homéostasie du cholestérol (B)

(A) Les cavéoles représentent une voie d'entrée sélective de diverses molécules selon différents mécanismes (transcytose, endocytose et potocytose)

(B) Le cholestérol libre intracellulaire dérive de deux sources principales : les LDL circulants ou le cholestérol synthétisé *de novo*. La cavéoline peut fixer le cholestérol dans le RE et le transporter aux cavéoles où il peut soit retourner dans la circulation sous forme de HDL, soit être incorporé à la membrane plasmique.

(D'après Razani et coll., 2002.)

Ainsi, à la fois sur des bases historiques et sur les avancées de la recherche en ce qui concerne les cavéoles et la cavéoline, trois rôles majeurs leur ont successivement été attribués : celui de **transport vésiculaire de macromolécules, de régulation dans l'homéostasie du cholestérol et de carrefour dans la signalisation cellulaire** (pour revues, voir Williams & Lisanti, 2005 ; Razzani & Lisanti 2002).

- Sur des bases purement ultrastructurales, les invaginations de la membrane plasmique que forment les cavéoles ont d'abord laissé penser qu'elles avaient un rôle dans le **transport vésiculaire de macromolécules** (cf. figure 14A pour les différents mécanismes).

La première fonction à être attribuée aux cavéoles dans le transport de macromolécules était la pinocytose. Dans ce mécanisme, qui est quelque sorte un type d'endocytose non spécifique, la cellule absorbe des gouttelettes de liquide extracellulaire, et les redirige sous forme de minuscules vésicules, vers les lysosomes en vue de leur assimilation. Comme tous les solutés dissous dans les gouttelettes sont englobés sans discrimination, la pinocytose ne constitue pas une forme de transport spécifique.

Par la suite, on s'est aperçu que les cavéoles pouvaient également être impliquées dans les mécanismes de **transcytose et d'endocytose**.

Le terme de **transcytose** fut utilisé pour la première fois par Simionescu pour qualifier les mouvements de macromolécules de la lumière des cellules endothéliales vers l'espace interstitiel par des vésicules membranaires. Ce mécanisme a par la suite été démontré grâce à l'utilisation de traceurs marqués tels que des protéines sériques marquées à l'or ou des anticorps. Aussi, Schnitzer et coll. (1995) démontrèrent une accumulation d'anticorps spécifiques des cavéoles dans l'espace interstitiel d'endothélium de souris 50 fois supérieure à celle d'un anticorps contrôle. La génération par la suite de souris Cav-1 déficientes en cavéoles (et donc ne présentant pas de cavéoles) confirma ce résultat puisqu'aucune accumulation d'anticorps spécifique n'a alors été détectée dans l'espace interstitiel de ces souris.

L'endocytose (du grec *endon* (dedans) et *kutos* (cellule)) était un mécanisme de pénétration de macromolécules depuis l'espace extracellulaire vers le cytosol généralement attribué à des vésicules membranaires couvertes de

clathrine. Cependant, certaines macromolécules semblaient pénétrer la cellule par une voie ne faisant pas intervenir les vésicules à clathrine, mais bien les cavéoles. Ainsi, il apparaît en réalité que les cavéoles peuvent lier et faire pénétrer de nombreuses macromolécules telles que les toxines du Choléra et du Tétanos, l'albumine, la phosphatase alcaline, mais aussi le virus SV40 ou encore certaines bactéries comme *E. Coli* (pour revue, voir Razani & Lisanti (2001)). Les phénomènes d'endocytose de molécules par les cavéoles dans le muscle squelettique ne sont pas clairement établis. En effet, de nombreuses protéines impliquées dans la formation de vésicules, telles que NSF, SNAP, VAMP, sont capables d'interagir avec la Cav-1, mais rien n'est à ce jour établi en ce qui concerne la Cav-3, spécifique du muscle strié (Razani et coll., 2002). D'ailleurs, dans les fibres musculaires squelettiques adultes, il n'est pas possible d'observer d'agrégats de cavéoline dans le cytoplasme, alors que les tissus exprimant la Cav-1 présentent un pool important de cavéoline au niveau de petites vésicules cytoplasmiques. En revanche, le signal à l'origine des phénomènes d'endocytose n'est toujours pas déterminé. De même, prédire quelles sont les cavéoles qui seront capables d'un tel phénomène n'est pas possible. Par ailleurs, la cible des vésicules d'endocytose est également inconnue. Pour la toxine du Choléra, les vésicules sont transportées de manière rétrograde à des endosomes, puis l'appareil de Golgi, le RE (Lencer et coll., 1999). Pour le virus SV40, l'internalisation des cavéoles fusionne avec des vésicules non-endosomales, non-lysosomales, enrichies en Cav-1 et appelées cavéosomes (Pelkmans et coll., 2001).

Enfin, les cavéoles ont également un rôle dans une dernière forme de transport de macromolécules : la **potocytose**. Bien qu'inclus dans le transport vésiculaire, ce n'en est pas un à proprement parler. En effet, la potocytose (du grec *potos*, boire et *kutos*, cellule) est un mécanisme selon lequel il y aurait selon un mécanisme inconnu à ce jour, un resserrement du « col » des cavéoles (par un mécanisme inconnu à ce jour), créant ainsi un microenvironnement plus ou moins isolé de l'espace interstitiel et du cytosol de la cellule. Ceci aurait pour effet d'augmenter la concentration locale de molécules éventuellement présentes dans les cavéoles, les poussant à diffuser à travers la membrane plasmique. La plupart des molécules utilisant cette voie de pénétration se lient dans un premier temps à une molécule « récepteur » elle-même ancrée dans les cavéoles *via* une ancre GPI, ce qui est notamment le cas du virus de Ebola.

3.2.4.6. Rôle de la cavéoline dans l'homéostasie du cholestérol

Du fait d'une part de la sensibilité des cavéoles aux agents séquestrant le cholestérol, et d'autre part de la capacité de la cavéoline à lier le cholestérol, l'hypothèse d'un rôle des cavéoles et de la cavéoline dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol semblait évidente.

Rappelons tout d'abord que le traitement de cellules à la filipine, la nystatine et la cyclodextrine, des agents séquestrant le cholestérol, entraîne un aplatissement des cavéoles.

Par ailleurs, le cholestérol est capable de réguler la transcription de la Cav-1 (Bist et coll.1997) et de stabiliser la protéine (Franck et coll. 2002).

Enfin, la preuve la plus flagrante d'un rôle de la cavéoline dans l'homéostasie du cholestérol a été fournie par la découverte que la Cav-1 était capable de réguler le taux de cholestérol cellulaire en modulant à la fois l'influx et l'efflux de cholestérol de la cellule (figure 14B), la cavéoline-1 pouvant lier 1 à 2 molécules de cholestérol (Murata et coll. 1995).

Le cholestérol intracellulaire libre dérive de deux sources principales : la pénétration de LDL du sérum (*Low Density Lipoproteins*) ou par synthèse *de novo*. L'extrusion du cholestérol superflux se fait principalement par association du cholestérol libre avec des lipoprotéines de haut PM, formant ainsi des HDL (*High Density Lipoproteins*). L'homéostasie du cholestérol est donc un équilibre entre **influx, efflux et synthèse** de cholestérol.

En terme **d'influx**, afin de maintenir un niveau constant de cholestérol en son sein, la cellule peut « capter » le cholestérol extracellulaire via les LDL circulant dans le sérum. La pénétration de ces LDL, et donc le passage de la membrane plasmique, se ferait vraisemblablement via les cavéoles.

En terme **d'efflux**, la cellule se décharge de son cholestérol excédentaire par les HDL. Les cavéoles et la cavéoline auraient un rôle dans ce phénomène puisque la sous-expression de Cav-1, par une stratégie antisens, mène à la diminution de l'efflux du cholestérol (Fielding et coll., 1999). Au contraire, la surexpression de Cav-1 entraîne l'accumulation plasmatique de HDL (Frank et coll. 2001).

Enfin, la **synthèse de novo** de cholestérol a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) pour ensuite être transporté à la membrane plasmique. Le mécanisme de transport

entre le RE et la membrane plasmique restait peu connu jusqu'à la découverte que la cavéoline pouvait endosser cette fonction. En effet, le cholestérol n'est réparti dans la membrane plasmique qu'à la seule condition qu'il y ait d'abord transport du cholestérol dans les cavéoles, lequel étant assuré par la cavéoline en association avec d'autres protéines chaperonnes.

Depuis la découverte des cavéoles, le groupe de Lisanti s'est intensivement impliqué dans la recherche de fonctions physiologiques pour les cavéoles et les cavéolines. Ils furent les premiers à attribuer la fonction de « **signalosome** » aux cavéoles, suite à l'observation qu'elles contenaient un grand nombre de protéines du signal, notamment telles que des tyrosines kinases, des protéines G... et que, par conséquent, elles pourraient jouer le rôle de carrefour de signalisation, notamment grâce à la cavéoline en tant que protéine scaffolding serait capable d'interagir avec de nombreuses protéines.

3.2.5. Biogenèse des tubules T et des cavéoles

Chez la souris, le développement myofibrillaire dans le diaphragme commence, dans les myotubes, par la formation périphérique de myofibrilles et le positionnement central des noyaux au 14^{ème} jour de développement (E14). La transition myotube-myofibre commence à E16-E17 quand les myofibrilles remplissent quasiment tout l'espace intracellulaire de la fibre et que les noyaux migrent en périphérie. Dans les phases précoces du développement musculaire, les tubules T sont absents. Ce n'est qu'à partir de E15 que les tubules T apparaissent sous forme de petites invaginations tubulaires de la surface de la membrane plasmique. A ce stade, les tubules T sont peu nombreux et sont retrouvés préférentiellement à la périphérie de la cellule, là où les myofibrilles commencent à se former. A E16, les tubules sont plus longs, plus fréquents et pénètrent plus profondément dans la fibre. La plupart d'entre eux a alors une orientation longitudinale et est connectée à la surface par de courts segments transversaux. A ce stade, seules de courtes portions du système TT forment des liaisons avec le RS. Au moment du passage au stade myofibre (E16-E17), bien que les striations caractéristiques soient clairement visibles, les tubules T gardent majoritairement une orientation longitudinale, avec parfois des liens entre eux. La naissance a lieu à E19, mais l'orientation transversale du système TT ne prend place qu'entre le jour de la naissance et la troisième semaine de vie post natale (Takekura, Flucher & Franzini-Armstrong, 2001). Il

s'agit donc d'une période pendant laquelle le système TT suit son processus de maturation. Celui-ci consiste en :

- i- L'augmentation de la densité de Tubules T,
- ii- L'augmentation du nombre de connexion avec le RS, c'est-à-dire du nombre de triades,
- iii- Le basculement des tubules T et des triades qui prennent une position transversale simultanément à leur positionnement au niveau des jonctions bande A-bande I des sarcomères.

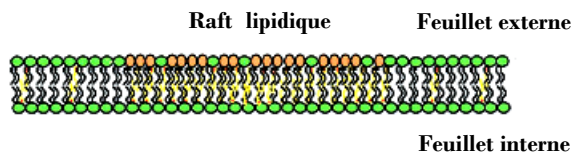
Il est à noter que le développement des cellules musculaires en culture n'atteint jamais complètement cette structure du système TT caractéristique du muscle adulte, suggérant que l'innervation et/ou le profil d'activité jouent un rôle essentiel dans les processus de maturation musculaire.

La **biogenèse cavéolaire** est dépendante à la fois d'un composant lipidique, le cholestérol, et d'un composant protéique, la cavéoline.

L'importance cruciale du cholestérol est devenue évidente suite à l'observation que le traitement de cellules par des agents séquestrant le cholestérol, tels que la nystatine, la filipine ou la cyclodextrine, entraînait une disparition ou au moins une forte diminution de la surface cavéolaire (Rothberg et coll., 1992 ; Pouvreau et coll., 2004). Par ailleurs, le contenu cellulaire en cholestérol doit atteindre un niveau « seuil » pour que le processus de formation des cavéoles s'amorce (Hailstones et coll., 1998). Cependant, la seule nécessité du cholestérol pour la biogenèse cavéolaire n'est pas suffisante puisque la déplétion en cholestérol n'est pas uniquement sélective des cavéoles, mais affecte d'autres vésicules dérivées du réseau post-golgien.

Le rôle de la cavéoline s'est vite imposé comme évident. La surexpression de Cav-1, dans des cellules n'exprimant pas cette protéine de manière endogène et ne présentant pas de cavéoles, suffit à provoquer la synthèse *de novo* de vésicules et d'invaginations membranaires de 50 à 100 nm de diamètre (Fra et coll., 1995; Engelman et coll., 1997; Li et coll., 1998). Inversement, une déficience en Cav-1 dans des cellules l'exprimant de manière endogène entraîne une perte de cavéoles (Galbiati et coll., 1998; Liu et coll., 2001). De plus, ces deux composants sont eux-mêmes étroitement liés. La Cav-1 interagit en effet avec les deux

A)



B)

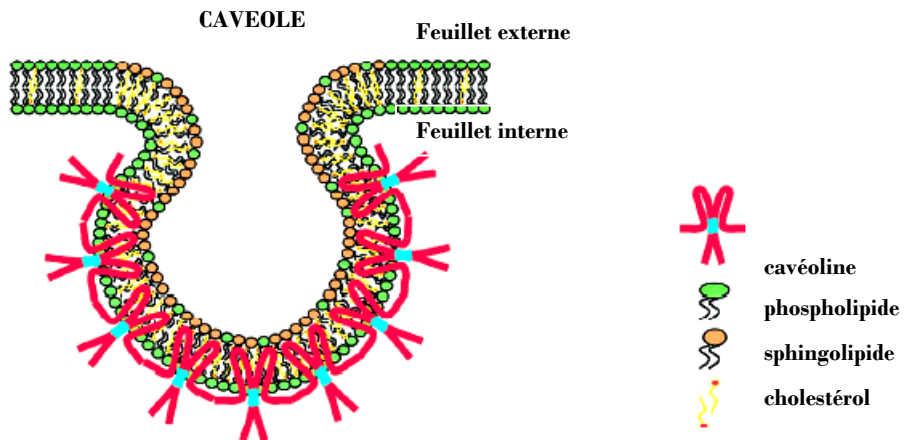


Figure 15. Rôle de la cavéoline dans la structure des cavéoles

Des homo-oligomères de 1 à 16 cavéolines quitteraient le réticulum endoplasmique pour atteindre des rafts lipidiques (A). La structure même de la cavéoline serait à l'origine de la forme en Ω renversé caractéristique des cavéoles (B). (D'après Razani et coll., 2002.)

composants structuraux lipidiques principaux des cavéoles, à savoir le cholestérol et les sphingolipides, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Fra et coll., 1995; Thiele et coll., 2000), et présente une affinité particulièrement forte pour le cholestérol, la Cav restant associée au cholestérol même en présence d'un détergent « fort » tel que le SDS (Murata et coll., 1995). Le mécanisme selon lequel la membrane est déformée et acquiert cette structure typique des cavéoles semble être le résultat d'une action synergique de la cavéoline et du cholestérol. Selon le modèle proposé par Razani et coll. (2002), la Cav formerait des homo-oligomères de 1 à 16 éléments au niveau du Réticulum Endoplasmique. Ces homo-oligomères subiraient une 2^{ème} étape d'oligomérisation pendant leur migration à la membrane plasmique, vraisemblablement au niveau du *trans*-Golgi. Les oligomères interagiraient entre eux créant un large réseau sur la face cytoplasmique de la bicouche phospholipidique. Ce réseau agirait de manière synergique avec le cholestérol en déformant la membrane, la courbant jusqu'à lui donner une forme d' Ω renversé caractéristique des invaginations cavéolaires (figure 15).

De part leur similarité d'un point de vue biochimique, les cavéoles sont parfois considérées comme une forme spécialisée de raft lipidique. Cependant, cette généralisation peut être discutée. En effet, l'appartenance exclusive de certaines protéines à l'une ou l'autre de ces structures implique une différence de fonction entre ces microdomaines (Kurzchalia & Parton, 1999). Le cas de la cavéoline est le plus illustratif : un microdomaine membranaire enrichi en cholestérol, sphingolipides et cavéoline est défini comme une cavéole. Le cavéoline est alors un marqueur sélectif des cavéoles, permettant l'analyse spécifique de ces microdomaines.

- **Vers une origine cavéolaire des tubules T :** Les premières analyses en microscopie électronique des cavéoles dans le muscle strié ont mené à l'hypothèse que le système T dérivait de la coalescence et de la fusion de plusieurs cavéoles (Ishikawa, 1968). D'un point de vue morphologique, de part et d'autre des ouvertures des tubules T, des groupes de 1 à 4 cavéoles sont fréquemment présents. Par ailleurs, des analyses moléculaires et cellulaires tendant à confirmer cette hypothèse. Il est possible de détecter *in vivo* des ARNm de Cav-3, la forme de cavéoline spécifique du muscle strié, à partir du 10^{ème} jour de gestation, dans les somites en développement et le cœur, soit bien avant la formation des tubules transverses (Biederer et coll., 2000). De plus, il a été montré que le Cav-3 et les tubules T sont au moins transitoirement associés au cours du développement musculaire

(Parton et coll., 1997) et, bien que cela soit encore sujet à controverse, dans le muscle totalement différencié (Ralston & Ploug, 1999). Elle est également présente à la JNM et la JMT (Rahkila et coll., 2001). Enfin, les souris Cav-3^{-/-}, déficientes en Cav-3, présentaient des malformations du système T (perte de l'orientation transversale des tubules T) (Galbiati et coll., 2001). Par ailleurs, les muscles des patients LGMD-1C, eux aussi déficients en Cav-3, présentent des tubules T avec des ouvertures en vacuoles sous-sarcolemmales et une prolifération anormale du système T à l'origine de la formation de structure en nid d'abeille (Galbiati et coll., 2000).

Au début des années 1990, l'équipe de Yuan a proposé un modèle de biogenèse des tubules T en accord avec celui d'Ishikawa, faisant intervenir des vésicules de transfert post golgiennes contenant déjà certains éléments de la future triade (Yuan et coll., 1991). Ces vésicules, bourgeonnant de l'appareil de Golgi, fusionneraient répétitivement avec la membrane plasmique de surface, formant de plus en plus grosses invaginations membranaires, décrites en « collier de perles ». Dans ce modèle, le bourgeonnement de ces vésicules post-golgiennes, puis la fusion répétée des cavéoles constituerait une dynamique d'incorporation des protéines au sein des tubules T. Ce mécanisme implique réarrangement des microdomaines membranaires simultanément à un phénomène de diffusion, ou tout au moins un phénomène de déplacement du matériel protéique contenu dans les cavéoles jusque dans les tubules T en cours de formation.

Dans le muscle adulte, il est possible que le maintien de la quantité de DHPR au sein des tubules T soit le résultat de l'incorporation de vésicules contenant des complexes oligomériques formés de la Cav-3, du DHPR et de la dysferline (Ampong et coll., 2005). Ces trois protéines sont en effet colocalisées dans le muscle adulte où elles s'associent. Il est alors plus vraisemblable que dans le muscle totalement différencié, ces vésicules s'incorporent directement au sein d'un tubule T. En effet, une étude menée sur des cellules épithéliales CV1 a montré qu'une fois à la membrane plasmique, il n'existait pas de phénomène d'échange entre les cavéoles et donc que ces dernières constituent des domaines membranaires stables (Tagawa et coll., 2005).

Ainsi, il existerait un phénomène de plasticité des microdomaines membranaires tels que les cavéoles et les tubules T en fonction du développement. Ces structures seraient alors moins stables et plus sujettes à des remaniements dans le muscle en différenciation que dans le muscle adulte différencié.

4. Les tubules T et les cavéoles : plus que de simples microdomaines sarcolemmaux

4.1. Propriétés biochimiques

Comme définis précédemment, les microdomaines membranaires sont des structures de taille nanométrique, enrichies en certains lipides et protéines. Ce sont précisément ces particularités qui confèrent aux cavéoles et aux tubules T leurs propriétés biochimiques.

Bien que cavéoles et tubules T ont une composition lipidique différente et spécifique du reste du sarcolemme. Ils sont en effet enrichis en cholestérol et sphingolipides (glycosphingolipides et sphingomyéline) (Razani et coll., 2001). Ils restent en quelque sorte isolés, dans la membrane plasmique de surface, sous forme d'îlots au sein desquels les protéines ont une mobilité restreinte. En outre, cette composition lipide particulière leur confère d'une part une densité fortement réduite comparée au reste de la membrane, et d'autre part une résistance aux détergents non ioniques légers tels que le Triton X 100. Ces propriétés sont d'ailleurs à la base de l'identification, de la purification et de la caractérisation des cavéoles (Brown & Rose, 1992 ; Lisanti et coll., 1994).

4.2. Tubules T et cavéoles : des carrefours de la signalisation calcique ?

Les premières expériences attribuant aux cavéoles **un éventuel rôle dans la régulation des entrées de Ca^{2+}** remontent à 1974, quand l'observation fut faite en microscopie électronique qu'une grande partie des précipités de Ca^{2+} (par utilisation d'oxalate de potassium) dans le muscle lisse était localisée dans des cavéoles ou des vésicules sub-sarcolemmales ressemblant aux vésicules cavéolaires (Popescu et coll., 1974). L'hypothèse émise était alors que les cavéoles séquestraient le Ca^{2+} et avaient alors un rôle dans la translocation du Ca^{2+} extra cellulaire vers le cytosol au cours des cycles de contraction-relaxation du muscle lisse. Cette hypothèse fut confirmée et l'interprétation alla plus loin quand Sugi et collaborateurs observèrent que ces précipités de Ca^{2+} diminuaient grandement dans les cellules stimulées (Sugi et coll., 1982), suggérant une décharge du Ca^{2+} des cavéoles vers le cytoplasme en réponse à la contraction musculaire, mécanisme analogue à celui des tubules T dans le muscle squelettique. Ce fut le début des recherches sur le rôle des cavéoles dans la signalisation calcique, hypothèse qui fut par la suite largement étayée (pour revue, voir Isshiki et Anderson, 2003) et sera développée en détail dans le chapitre suivant.

- **Les tubules T** : On sait que dans le muscle adulte, l'entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme depuis le milieu extérieur se fait majoritairement par le DHPR. Le Ca^{2+} peut être considéré en tant que second messenger, puisqu'il joue un rôle universel dans les mécanismes de transduction des signaux d'activation extracellulaires contrôlant la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Mais surtout, le Ca^{2+} joue le rôle fondamental de déclencheur de la réponse contractile car il est directement impliqué dans le couplage E-C.

- **Les cavéoles** : Depuis leur découverte en 1955, de nombreux rôles ont été attribués aux cavéoles et aux cavéolines. Un intérêt particulier commence à se porter sur le rôle des cavéoles et de la cavéoline dans l'homéostasie calcique. Cependant, un des rôles clairement admis serait une implication des cavéoles dans la signalisation cellulaire, en compartimentant des molécules signal qui interagiraient avec la cavéoline. Ainsi, dans un premier temps, nous détaillerons cette dernière fonction. Puis, dans un second temps, nous nous attarderons plus sur leur rôle spécifique dans la signalisation calcique.

- Chapitre 2 -

MICRODOMAINES SARCOLEMMAX ET HOMÉOSTASIE CALCIQUE MUSCULAIRE

Le contrôle spatial et temporel de la signalisation calcique est essentiel à de nombreuses activités cellulaires telles que la fécondation, les phénomènes sécrétoires, la motilité et la division cellulaire. Dans le muscle squelettique, l'ion Ca^{2+} est impliqué dans les plasticités morphologique et fonctionnelle de la cellule. C'est l'activité coordonnée de processus essentiellement membranaires qui contrôle la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et se porte garante de l'intégrité et de la fonction de la cellule musculaire. De ce fait, il n'est donc pas étonnant que l'ensemble des mécanismes contrôlant la signalisation calcique puisse être confiné dans des domaines sarcolemmaux restreints, contenant des molécules à la fois régulatrices et d'ancrage, dans le but d'optimiser les réponses cellulaires à divers stimuli. Nous venons de voir que le sarcolemme n'était pas homogène, mais représentait en fait une mosaïque de microdomaines. Dans la cellule musculaire squelettique, ces microdomaines sarcolemmaux sont essentiellement représentés par les tubules T et les cavéoles. Le rôle des tubules T dans l'homéostasie calcique n'est plus à démontrer, en revanche, une éventuelle implication des cavéoles constitue désormais une hypothèse émergente en ce qui concerne le maintien de l'homéostasie calcique de nombreux types cellulaires et en particulier de muscle squelettique.

1. Les tubules T

Comme nous l'avons vu précédemment, l'accolement de deux citernes de RS à un tubule T forme une structure appelée triade. Il est même possible de visualiser des structures, appelées **pieds jonctionnels**, qui « pontent » les membranes d'une CT à celle d'un tubule T. À ce niveau, les membranes des deux systèmes ne sont séparées que de 12 à 17 nm. En s'intéressant de plus près à ces structures, à l'échelle moléculaire, ces pieds jonctionnels correspondent en fait à l'image en microscopie électronique de structures protéiques de très haut PM : les Récepteurs à la Ryanodine (RyR). Il s'agit en fait d'un canal calcique (sensible

à la liaison de l'alcaloïde végétal appelé ryanodine, d'où son nom) situé dans la membrane du RS. Il fait face au DHPR, ancrés dans la membrane des tubules T. Cet arrangement hautement organisé (pour revue, voir Franzini-Armstrong et coll., 1998) est essentiel à la physiologie du muscle squelettique dans un mécanisme appelé « couplage excitation-contraction », dans lequel le DHPR serait couplé physiquement au RyR, ce qui serait responsable de l'ouverture des RyR au cours de l'excitation cellulaire, et donc de la sortie de Ca^{2+} responsable de la contraction musculaire (ce mécanisme sera détaillé ultérieurement).

Ainsi, le **DHPR aurait une double fonction : celle de canal calcique voltage dépendant (dit de type L) et celle de détecteur de potentiel**. Dans un premier temps, je commencerai par décrire les caractéristiques structurales et biophysiques du DHPR en tant que canal calcique, puis, dans un second temps, je décrirai brièvement sa fonction « détecteur de potentiel » ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans le couplage E-C.

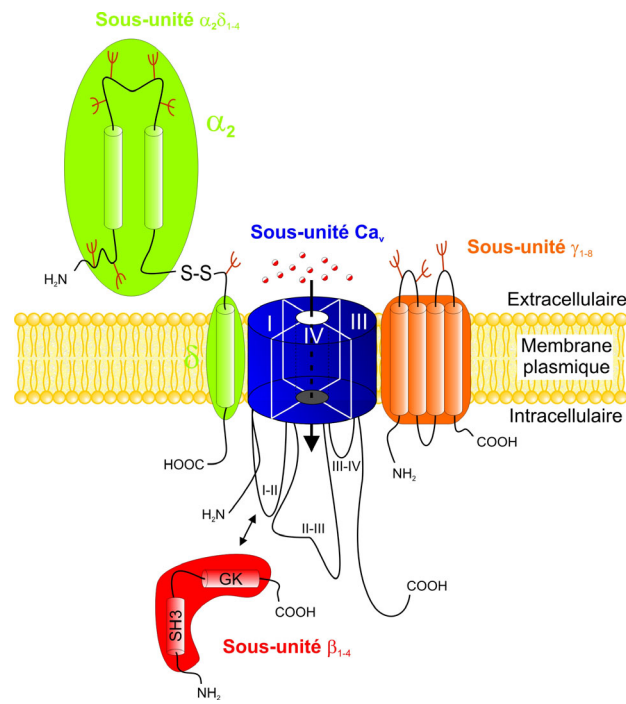
1.1. Le Récepteur des DiHydroPyridines

Dans de nombreux cas les canaux calciques sont activés par des variations de potentiel membranaire. Ces canaux sont alors dits voltage dépendants (dépendants du potentiel). Ils sont présents aussi bien sur des cellules excitables que non excitables. Il existe différents types de canaux calciques : classés T, L N, P/Q et R. A l'origine, la classification est fondée sur des critères électrophysiologiques (seuil d'activation et cinétique) et pharmacologiques. Depuis, la classification a été affinée sur des bases moléculaires. Ces canaux présentent des différences de sensibilité aux toxines qui ont souvent donné leur nom « pharmacologique » aux canaux. Ainsi le canal de type L est caractérisé par sa sensibilité aux dihydropyridines contenant à la fois des agonistes comme le BayK et des antagonistes de nature dihydropyridiniques comme la nifédipine, il est par conséquent couramment appelé Récepteur des DiHydroPyridines ou DHPR.

1.1.1. Caractéristiques biophysiques

Conductances du canal : la notion de résistance membranaire R ou R_m (exprimée en $M\Omega$ ou $G\Omega$) traduit l'opposition au passage des ions. Inversement, la notion de conductance membranaire G (exprimé en μS , nS ou pS) traduit la facilitation du passage des ions. Les deux sont reliés par la relation : $R = 1/G$.

A)



B)

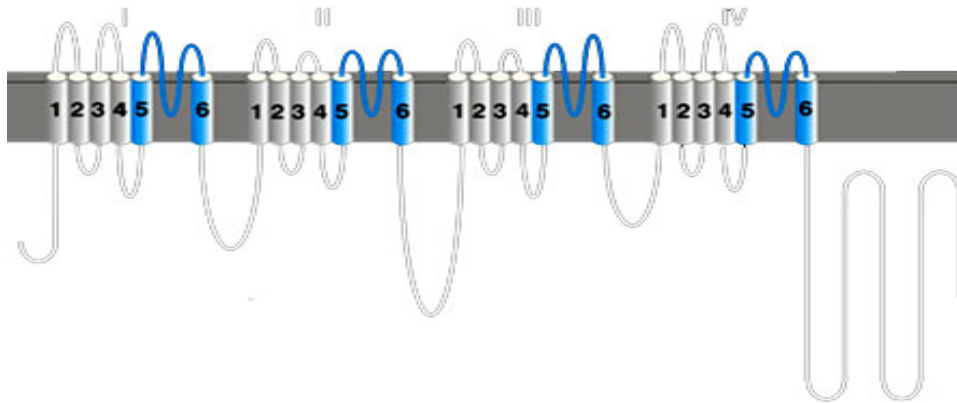


Figure 16. Structure schématique du canal calcique voltage-dépendant de type L

- A) Organisation structurale des sous-unités constituant la canal calcique voltage dépendant de type L ou DHPR (d'après Weiss N., 2006)
- B) Topologie membranaire présumée de la sous-unité α_{1s} . Chaque domaine (I à IV) est constitué de 6 segments transmembranaires reliés entre eux par des « linkers ». Les boucles interdomaines ainsi que les portions N- et C-terminales sont cytoplasmiques. Les segments en bleu sont les parties impliquées dans la formation du pore du canal.

La conductance unitaire du canal de type L est de 14 pS en présence de 110 mM de Ba^{2+} (Dirksen & Beam, 1995). La conductance macroscopique maximale est, quant à elle, de l'ordre de 55 à 200 S/F en présence de 2 - 2.5 mM de Ca^{2+} , sur des fibres adultes fraîchement dissociées (Collet et coll., 2003 ; Delbono et coll., 1997 ; Szentsi et coll., 2001).

Voltage-dépendance du canal : le canal calcique de type L est un canal dit « à haut seuil » ou HVA (*High Voltage Activated* = activé à haut potentiel en anglo-saxon). Il s'active pour à des potentiels > -30 mV.

1.1.2. Structure moléculaire

Le DHPR squelettique est un large complexe multimérique composé de 5 polypeptides associés de manière non covalente. Le pore étant formé par la sous-unité α_{1s} (175 à 212 KDa), et de 3 sous-unités auxiliaires, β_{1a} (52 à 65 kDa), γ_1 (30 à 33 kDa) et α_2 - δ_1 qui forment en fait une unique sous-unité où α_2 (120 à 150 kDa) et δ_1 (17 à 33 kDa) sont reliées de manière covalente par des ponts disulfures. Le tout forme un complexe membranaire hétéro-oligomérique d'environ 430 KDa (pour revue, voir Ríos & Pizarro, 1991).

Dans le muscle squelettique, la forme majoritairement responsable du courant calcique de type L est α_{1s} (Ca_v 1.1). Elle constitue la sous-unité pore de α_1 .

La sous-unité α_{1s} : elle est responsable de l'influx d'ions Ca^{2+} à travers la membrane. De plus, elle porte les fonctions de base du canal, à savoir la sélectivité aux ions Ca^{2+} , le détecteur de potentiel et le site de fixation des dihydropyridines. L'analyse de la séquence primaire de la sous-unité α_1 prédit 24 segments transmembranaires en hélice α , arrangés en 4 domaines transmembranaires homologues, par la suite nommés I à IV, reliés par des boucles intracellulaires (figure 16), les boucles sont nommées en fonction des domaines qu'elles lient, par exemple, la boucle reliant les domaines I et II est communément appelée « boucle I-II ».

Chaque domaine est lui-même constitué de 6 segments transmembranaires, S1 à S6, en hélice α , eux-mêmes reliés par des segments intra- ou extra-cellulaires appelés *linkers* (comme pour les boucles inter domaines, le linker entre S5 et S6 sera appelé linker S5-S6).

Sous unité (ex nomenclature)	Sous unité (nomenclature actuelle)	Gène	Type de canal	Localisation principale
α_{1S}	Ca _v 1.1	CACNA1S	L	Muscle squelettique
α_{1C}	Ca _v 1.2	CACNA1C	L	Cœur, muscle lisse, glande pituitaire, surrénales
α_{1D}	Ca _v 1.3	CACNA1D	L	Cerveau, pancréas, rein, ovaire, cochlée
α_{1F}	Ca _v 1.4	CACNA1F	L	Rétine
α_{1A}	Ca _v 2.1	CACNA1A	P/Q	Cerveau, cochlée, glande pituitaire
α_{1B}	Ca _v 2.2	CACNA1B	N	Cerveau, système nerveux
α_{1E}	Ca _v 2.3	CACNA1E	R?	Cerveau, cochlée, glande pituitaire, rétine
α_{1G}	Ca _v 3.1	CACNA1G	T	Cerveau, système nerveux
α_{1H}	Ca _v 3.2	CACNA1H	T	Cerveau, cœur, foie, rein, muscle squelettique en développement
α_{1I}	Ca _v 3.3	CACNA1I	T	Cerveau

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

Les canaux sont classés d'après leur sous-unité α_1 . La nomenclature actuelle est une adaptation de celle des canaux potassiques. Elle utilise un système numérique pour définir des familles et des sous-familles de canaux calciques selon la similarité de leur séquence primaire. Le nom du canal indique alors l'ion perméant et le régulateur physiologique principal est mis en indice (ex : canal calcique voltage-dépendant = Ca_v). Le numéro d'identification correspond à la famille du gène de la sous-unité α_1 du canal et à l'ordre de découverte de cette sous-unité au sein de la famille.

Les segments S4 de chaque domaine contient des résidus chargés positivement, il est considéré, par analogie de structure et donc de fonction avec le canal sodique voltage dépendant, comme le site responsable de la fonction « détecteur de potentiel ».

Le linker S5-S6 contient un groupe d'acides aminés hydrophobes donc supposé être localisés dans la membrane. Ils formeraient alors la région **pore du canal**, responsable à la fois de la sélectivité et de la perméabilité du canal pour les ions Ca^{2+} . En effet, 4 résidus glutamates (1 dans chaque région pore) chargés négativement sont nécessaires pour la forte affinité au Ca^{2+} et donc influencent la sélectivité et la perméabilité du canal (Yang et coll., 1993). Le linker S5-S6 du domaine I serait même hautement impliqué dans la conductance unitaire des canaux calciques de type L (Dirksen et coll., 1997).

La sous-unité α_1 est commune à tous les canaux calciques voltage dépendants. A ce jour, 10 allèles ont été identifiés, tous codant pour une sous-unité α_1 . La complexité se situe dans le fait que l'ARNm codant pour α_1 peut être soumis à l'épissage alternatif, parfois tissu dépendant. Par exemple, la séquence de l'ADN complémentaire de α_{1s} prédit une protéine de 212 KDa. Or, deux formes ont pu être isolées : une forme minoritaire totale de 212 KDa ($\alpha_{1(212)}$) et une forme majoritaire courte de 175 KDa ($\alpha_{1s(175)}$) qui serait générée par clivage protéolytique post traductionnel de la partie C-terminale de $\alpha_{1(212)}$. (De Jongh et coll., 1989, 1991). Cependant, une classification a été établie et est largement admise. Elle classe les protéines selon des critères structurels en 3 groupes (tableau 2) : Ca_v1 et Ca_v2 , produisant un courant de type HVA (dont fait partie l' α_1 du canal de type L) et Ca_v3 produisant elle un courant de type LVA (*Low Voltage Activated* = activé à bas potentiel en anglo-saxon, tel que le canal calcique de type T) (Ertel et coll., 2000).

La sous-unité β_{1a} : c'est une protéine cytoplasmique ou associée à la membrane d'environ 60 KDa, codée par 4 gènes. L'épissage alternatif de la protéine β_1 produit au moins 3 isoformes. L'isoforme β_{1a} , de 524 résidus, est présente exclusivement dans le muscle squelettique. Les deux autres isoformes, β_{1b} et β_{1c} , sont exprimées de manière prédominante dans le cerveau, le cœur et la rate (Powers et coll., 1992). Cependant, grâce à une sonde correspondant à l'ADNc de β_1 , l'isoforme β_{1b} a pu être identifiée pour la première fois dans le muscle squelettique, alors que des études précédentes montraient que l'isoforme β_{1b} était exclusivement exprimée dans le cerveau. Cette étude montra d'ailleurs l'apport de techniques

telles que la RT-PCR, plus sensible comparativement à la technique du northern blot. Cependant, l'implication physiologique d'autres sous-unités que la β_{1a} reste à déterminer. En effet, cette isoforme est à la fois majoritaire et essentielle aux fonctions principales du muscle squelettique.

Au niveau de leur séquence primaire, les sous-unités β partagent : deux domaines conservés situés dans la région centrale de la protéine (domaines D2 et D4) ; un domaine *linker* entre D2 et D4, appelé D3 ; et des extrémités N- et C-terminales (D1 et D5, respectivement) (Perez-Reyes & Schneider, 1995).

La sous-unité β interagit avec $\alpha 1$ via un motif, comportant 30 résidus hautement conservés, présents dans le domaine D4, appelé BID (pour *β interaction domain* = domaine d'interaction de β en anglo-saxon). Ce motif se lie avec une forte affinité à la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ (De Waard et coll., 1994) au niveau d'un motif de 18 résidus nommé AID (pour *α interaction domain* = domaine d'interaction d' α en anglo-saxon).

La sous-unité β_{1a} agirait à 3 niveaux dans la fonction du DHPR :

- i) la sous-unité β augmente l'expression membranaire des canaux calciques, ce qui implique qu'elle soit essentielle au transport du DHPR à la membrane depuis les aires péri nucléaires (Chien et coll., 1995; Neuhuber et coll., 1998; Bichet et coll., 2000).
- ii) Elle module l'activité du canal et les cinétiques de courant calcique de type L (Gregg et coll., 1996 ; Strube et coll., 1996 ; Beurg et coll., 1997) en accélérant les cinétiques d'activation, en ralentissant les cinétiques d'inactivation et en déplaçant la voltage-dépendance vers des potentiels plus positifs. β augmenterait également le couplage entre les mouvements de charges du segment S4 (segment détecteur de potentiel) et l'ouverture du pore du canal (Neely et coll., 1993; Kamp et coll., 1996; Olcese et coll., 1996). On constate en effet chez les souris $\beta^{-/-}$ une diminution de l'amplitude du courant calcique de type L.
- iii) β_1 serait essentielle au déclenchement des transitoires calciques, c'est-à-dire de la sortie de Ca^{2+} du RS via le RyR, lui suggérant un rôle dans le couplage E-C (Beurg et coll., 1999a,b; Sheridan et coll., 2003).

La sous-unité $\alpha_2\text{-}\delta$: cette sous-unité est en fait constituée de deux portions reliées de manière covalente par un pont disulfure. α_2 est fortement glycosylée et constitue la partie N-terminale de la sous-unité (extracellulaire) et δ la partie C-terminale (membranaire). Ces deux portions sont en fait codées par un seul gène, pour lequel 3 allèles ont été identifiés. Le peptide δ contient un unique segment transmembranaire. L'hypothèse qu'il servirait à ancrer α_2 à la bicouche lipidique a alors été émise (Jay et coll., 1991 ; Brickley et coll., 1995).

La sous-unité γ : elle contient 22 résidus et a un PM d'environ 30 KDa. Sa séquence primaire prédit 4 segments hydrophobes transmembranaires, ces extrémités N- et C-terminales étant cytosoliques. Elle est codée par 5 allèles différents, mais dans le muscle squelettique, seule l'isoforme γ_1 est exprimée. Afin de déterminer la fonction de la sous-unité γ , de nombreuses études portant sur des souris KO pour γ (souris γ_{null}) ont été réalisées. En l'occurrence, il semblerait que cette sous-unité ne soit pas essentielle ni à l'association, ni à l'expression fonctionnelle des autres sous-unités du DHPR entre elles (α_{1s} , et $\alpha_2\text{-}\delta_1$ et β_{1a}), puisqu'elles sont d'une part toujours capables de s'associer et de générer une conductance calcique, et d'autre part, elles gardent un niveau d'expression de type sauvage chez les souris γ_{null} , qui, d'ailleurs, sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier. Cependant, l'absence de la sous-unité γ ralentit les cinétiques d'inactivation du canal et augmente l'amplitude des courants calciques dans le muscle squelettique (Freise et coll., 2000 ; Ahern et coll., 2001). γ soutiendrait donc l'inhibition du courant de type L, probablement par interaction fonctionnelle avec α_{1s} . En effet, chez les souris dysgéniques (déficientes en α_{1s}), γ_1 ne s'associe plus au DHPR, ce qui signifie vraisemblablement qu'il existe une interaction directe entre α_{1s} et γ_1 , hypothèse confirmée par la co-immunoprécipitation de ces 2 sous-unités (Arikkath et coll., 2002).

1.1.3. Caractéristiques pharmacologiques du canal calcique de type L

Ce canal est caractérisé par sa sensibilité aux DHP, qui peuvent se comporter soit comme des agonistes ($\pm$ Bay K 8644), ou comme des antagonistes (tels que la nifédipine, nitrendipine, PN-200/110) du récepteur. Par ailleurs, de nombreux cations (Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} et Ni^{3+}) ont une perméabilité réduite et de ce fait bloquent également le canal, notamment en se fixant à un (des) site(s) de haute affinité dans le pore du canal, certains avec une affinité même meilleure que celle du Ca^{2+} (Lansman et coll., 1986). Certaines molécules, ou certains

ions, ont un effet dépendant du potentiel de maintien de la membrane, et donc de l'état du canal : au repos *versus* activé (Beam & Knudson, 1988; Lansman et coll., 1986). Par exemple, l'affinité du Cd^{2+} est la plus forte à des potentiels intermédiaires, vers 0 mV. Toutefois, tous les ions divalents ne bloquent pas le canal, il est en effet perméable aux ions Ba^{2+} , Mg^{2+} et Sr^{2+} . D'autres molécules, organiques, telles que les phénylalkylamines (D600, verapamil) et les benzothiazépines (diltiazem) inhibent également l'activité du DHPR. Enfin, le canal peut être inhibé par les protons, probablement en raison de résidus glutamate présents dans le pore du canal et sensibles à la protonation et au pH. Cependant, cette inhibition n'est pas totale mais se caractérise par une réduction de la conductance du canal, induisant des états de sous conductance (Pietrobon et coll., 1989, pour revue, voir Jones, 1998).

1.1.4. La double fonction du DHPR

1.1.4.1. En tant que canal calcique voltage dépendant

Le canal calcique de type L est, comme nous l'avons vu, un canal voltage-dépendant à haut seuil d'activation.

Lorsque la membrane est à son potentiel de repos (environ -80 mV), les canaux calciques sont fermés. Sous l'effet d'une différence de potentiel, ou d'une dépolarisation, ces canaux s'ouvrent et le Ca^{2+} entre dans la cellule suivant le gradient électrochimique par diffusion passive. En effet, le sarcolemme est à l'interface entre le milieu extracellulaire « riche » en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e = 2,5 \text{ mM}$) et le milieu intracellulaire « pauvre » en Ca^{2+} (au repos, $[\text{Ca}^{2+}]_i = 100 \text{ nM}$) (Perry, 1974). Le gradient électrochimique est donc très élevé, en faveur d'une entrée de Ca^{2+} dans la cellule à l'origine d'un courant Ca^{2+} .

De manière synthétique, le canal présente 3 états cinétiques : fermé (non conducteur), ouvert (conducteur) et inactivé. Ce dernier état est observé quand le canal est activé par des dépolarisations soutenues. Dans ce cas, le canal passe dans un état non conducteur, inactivé, son ouverture est donc transitoire, même si la dépolarisation persiste. Lorsqu'il est activé, le canal est responsable d'un courant calcique de type L (*Long Lasting* : prolongé). Ce courant se caractérise par des cinétiques d'activation et d'inactivation particulièrement lentes : les valeurs du temps nécessaire pour atteindre le maximum de l'amplitude du courant après dépolarisation varie entre 100 à 250 ms (fibres dissociées, 2 ou 2,5 mM Ca^{2+}), mais elles

dépendent de la dépolarisation appliquées (Collet et coll., 2003 ; Donaldson & Beam, 1983 ; Szentesi et coll., 2001).

1.1.4.2. En tant que détecteur de potentiel

Le couplage « excitation-contraction » peut parfois être retrouvé sous l'appellation couplage « dépolarisation-contraction ». En effet, l'activation de la réponse contractile du muscle squelettique au repos dépend du changement du potentiel interne de la cellule à des potentiels plus positifs que le potentiel de repos de la cellule.

Au début des années 1950, Hodgkin et Huxley suggérèrent qu'un des moyens possibles de « sentir » (sensing en anglo-saxon) les changements de potentiel membranaire et d'y répondre impliquerait des molécules dipolaires chargées, présentes au sein de la membrane, qui changeraient de position ou d'orientation lorsque le champ électrique de la membrane est modifié. Dans l'hypothèse où ces molécules ne diffusent pas et restent confinées dans la membrane, leur repositionnement et leur réorientation devraient donner naissance à des courants de déplacement en réponse à la variation de potentiel transmembranaire. Ces courants de déplacement sont des propriétés caractéristiques de tout dipôle électrique soumis à des changements de champs électrique. Par la suite, ces mouvements de charges ont largement été étudiés et leur existence a été démontrée pour la première fois dans le muscle par Schneider et Chandler (1973).

Dans le muscle squelettique, la majeure partie de ces mouvements de charges aurait un rôle fondamental dans le couplage E-C. Ces mouvements de charges constituent en effet le premier signal associé au couplage E-C et sont essentiels au déclenchement des étapes suivantes du couplage E-C, à savoir le couplage électro-mécanique et la libération de Ca^{2+}

Le DHPR remplirait ainsi cette fonction de *voltage sensor*. Les nombreuses études menées sur la fibre musculaire squelettique ont permis de déterminer grâce à des approches pharmacologiques et génétiques que le DHPR jouait à la fois le rôle de canal calcique voltage dépendant de type L mais aussi un rôle de détecteur de potentiel. En effet, l'utilisation de substances pharmacologiques de la famille des dihydropyridines et des phénylalkylamines suggéra que le DHPR était la molécule présente au sein de la membrane des tubules T qui servait de voltage sensor pour la libération de Ca^{2+} du RS. Feldmeyer et collaborateurs (1990) ont, entre autres, démontré que l'utilisation de la phénylalkylamine D600 était capable de bloquer la restauration de l'activité de contraction ainsi que celle de récupération des

mouvements de charges pendant une repolarisation faisant suite à une dépolarisation soutenue. Ces résultats semblaient confirmer ceux obtenus quelques années auparavant par Ríos et Brum (1987) qui furent les premiers à émettre l'hypothèse du DHPR en tant que voltage sensor suite à l'observation que la nifédipidine, une DHP, inhibait à la fois les mouvements de charges et la libération de Ca^{2+} dans la fibre partiellement dépolarisée. Enfin, la restauration de l'activité mécanique, des mouvements de charges et du couplage E-C chez les souris dysgéniques (déficientes en sous-unité α_{1s}) (Tanabe et coll., 1988) qui présentent normalement une absence de couplage E-C et une diminution des mouvements de charges (Beam et coll., 1986), identifia clairement le DHPR comme « le » site de la détection du potentiel.

Chez les canaux voltage-dépendants, le segment S4 contient entre 4 à 8 résidus basiques chargés positivement (arginines ou lysines), tous séparés par un résidu hydrophobe. Aggarwal & MacKinnon (1996) et Seoh et coll (1996) montrèrent que plusieurs des résidus basiques de S4 et un résidu acide du S2 participeraient à la détection de potentiel, avec des contributions différentes. Ainsi, les résidus les plus « extracellulaires » seraient plus fortement impliqués dans le *voltage sensing*, alors que les résidus les plus « intracellulaires » seraient plutôt impliqués dans la stabilisation de la protéine dans sa conformation finale (Tiwari-Woodruff et coll., 1997) (pour revue sur la détection de potentiel dans les canaux voltage-dépendants, voir Bezanilla, 2000).

De manière plus « macroscopique », les mouvements de charges initiés au sein du segment S₄ seraient à l'origine d'un déplacement de la boucle II-III de la sous-unité α_{1s} . Il existe de nombreuses preuves expérimentales qu'une partie de la boucle II-III déclencherait l'ouverture du RyR.

1.1.4.2.1. Mouvements de charges membranaires, transmission du signal au RS et libération du Ca^{2+} du RS : les 3 signaux associés au couplage E-C

Le couplage E-C repose sur l'intervention d'une ``commande calcique''. Elle repose sur des variations de la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ à l'intérieur des cellules musculaires, elle-même sous la dépendance directe de la différence de potentiel transmembranaire. Elle intervient dans le mécanisme des ponts d'union actine-myosine à la base de la contraction musculaire.

Le potentiel d'action initié au niveau de la plaque motrice se déplace de proche en proche grâce à l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants, distribuant la dépolarisation aux tubules T qui se dépolarisent et induisent une libération d'ions Ca^{2+} du RS vers le milieu intracellulaire de la fibre musculaire.

Cette libération d'ion Ca^{2+} s'effectue grâce à l'intervention de deux types de récepteurs :

i/ **le récepteur des dihydropyridines (DHPR)**, localisé au niveau de la membrane des tubules transverses ;

ii/ **le récepteur à la ryanodine (RyR)**, localisé au niveau de la membrane des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique.

Le fonctionnement du couplage E-C peut être divisé de manière conceptuelle en 3 étapes clés (Ríos et coll., 1992) :

- 1) la détection du potentiel (*voltage sensing* en anglo-saxon) : au niveau des DHPR des tubules T ;
- 2) la transmission du signal au RyR : qui lie la détection de potentiel au sein des tubules T au RS par couplage électro-mécanique;
- 3) la libération du Ca^{2+} du RS dans le cytosol par les RyR.

Des preuves d'une éventuelle implication des mouvements de charge dans le couplage entre la dépolarisation membranaire et la contraction musculaire ont rapidement été apportées sur la base d'observations principalement effectuées sur le muscle de grenouille. La première preuve fut apportée par la découverte qu'à la fois les mouvements de charges, mais aussi la force de contraction, diminuaient de manière simultanée et similaire sous l'effet d'une dépolarisation soutenue. Par ailleurs, les mouvements de charges disparaissaient et réapparaissaient de manière concomitante à la capacité de la fibre à se contracter de nouveau ou à libérer du Ca^{2+} du RS (Chandler et coll., 1976). Enfin, Eisenberg et collaborateurs (1983) apportèrent la preuve d'une implication d'un des acteurs du couplage E-C, le DHPR lui-même, dans l'origine des mouvements de charges intramembranaires. En effet, le D600, une phénylalkylamine se liant de manière spécifique au DHPR, était capable de bloquer la restauration de l'activité de contraction ainsi que celle de récupération des mouvements de

charges pendant une repolarisation faisant suite à une dépolarisation soutenue. Il fut dès lors attribuée une fonction de « détecteur de potentiel » au DHPR (fonction «*voltage sensor*») qui sera développée en détail ultérieurement.

1.1.4.2.2. Le couplage électromécanique DHPR-RyR : la transmission du signal au RS

Au repos, la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme des fibres musculaires est très basse. L'arrivée du potentiel d'action musculaire au niveau de structures spécialisées que sont les triades va provoquer un flux de Ca^{2+} depuis le RS vers le cytoplasme de la cellule. Mais comment une dépolarisation du sarcolemme des tubules T peut-elle induire une libération de Ca^{2+} du RS, qui est un compartiment intracellulaire ?

La réponse réside dans la structure du DHPR et son interaction avec le RyR. Sous l'effet d'une dépolarisation du sarcolemme, le détecteur de potentiel subirait un changement de conformation qui ouvrirait le canal calcique du RS (le RyR) selon un modèle vulgairement représenté comme « l'ouverture d'un bouchon ». il s'agirait en fait du déplacement de la partie inhibitrice de la boucle II-III, attachée au RyR au repos, qui céderait sa place à la partie activatrice, induisant l'ouverture du RyR. En raison du mécanisme de transduction du signal électrique en signal mécanique, l'interaction entre le DHPR et le RyR est qualifiée de « couplage électromécanique ».

1.1.4.2.3. Ouverture des RyR : la libération de Ca^{2+} du RS dans le cytosol

Le gradient de concentration du Ca^{2+} est fortement en faveur d'une sortie d'ions du RS. Suite à l'ouverture des RyR, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente alors rapidement dans tout le myoplasme, atteignant plusieurs dizaines de μM en quelques millisecondes. Cette augmentation va constituer un signal déclencheur de la contraction en levant l'inhibition de la TnC sur la TnI, permettant la formation d'actomyosine, l'hydrolyse d'ATP et enfin le glissement des filaments contractiles d'actine et de myosine entre eux.

1.1.5. Expression du DHPR et évolution de $I_{Ca,L}$ au cours du développement musculaire

De nombreuses études ont été menées sur l'expression fonctionnelle et protéique, ainsi que sur la localisation du DHPR dans le muscle au cours de son développement, notamment en ce qui concerne Ca_v 1.1. Ces études portent à la fois sur les ARNm et la protéine. Je tenterai ici de faire la synthèse et de regrouper les informations obtenues par chaque approche à la fois dans le muscle en développement et dans des cultures primaires ou de la lignée myogénique C₂C₁₂, et de les corrélérer à l'évolution du courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$).

D'une manière générale, l'amplitude du courant calcique de type L augmente fortement au cours du développement musculaire (Shimahara & Bourmaud, 1991 ; Strube et coll., 2000). Parallèlement, Brillantes et coll. (1994) ont rapporté, dans le muscle fœtal de lapin, une augmentation de 2 fois de la quantité d'ARNm codant pour toutes les sous-unités du DHPR (Brillantes et coll., 2006). La quantité d'ARNm continuerait même d'augmenter atteignant jusqu'à 16 fois son niveau fœtal, à l'exception de la sous-unité γ , n'augmentant que de 8 fois. Le facteur déclenchant pourrait être la sollicitation et le stress auxquels le muscle est soumis après la naissance et serait dépendant de l'influence de facteurs de croissance. Dans le muscle intercostal de fœtus de souris, Strube et collaborateurs (2000) ont rapporté une augmentation de 100% de la conductance du courant macroscopique entre les stades E₁₄ et E₁₉ (jour de la naissance). Cependant, la densité de canaux fonctionnels a été montrée comme restant constante entre ces deux stades, l'augmentation de la conductance macroscopique s'expliquant en fait par une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux (P_o ; *Conductance macroscopique = conductance unitaire x densité de canaux fonctionnels x P_o*). Ceci est accompagné d'un déplacement vers de potentiels plus négatifs de la courbe de la densité de courant en fonction du potentiel, ainsi que d'une accélération des cinétiques d'inactivation, les cinétiques d'activation restant inchangées. Les variations de la quantité de canaux exprimés sont également corrélées à un vaste réarrangement des systèmes membranaires dans lesquels sont localisés ces canaux. Une étude réalisée sur muscle de fœtus de lapin a en effet montré qu'à E19 (5 jours avant la naissance chez le lapin), le DHPR adoptait une distribution sous forme de petits points distribués à la fois à la périphérie, mais également à l'intérieur des fibres musculaires. A E24, le DHPR est essentiellement localisé à la périphérie des fibres musculaires, puis, aux premiers et deuxième jours après la naissance, le DHPR est à nouveau réparti sur l'ensemble du cytosol en coupe transversale. 10 jours après

la naissance, le DHPR est localisé au niveau de doubles stries intracellulaires, régulièrement réparties correspondant aux Tubules T (Yuan et coll., 1991).

Dans la lignée myogénique C₂C₁₂, l'ARNm de la sous-unité α_{1s} n'est pas détecté dans les cellules au stade myoblaste. Dès que les myoblastes commencent à fusionner, la transcription est induite et la quantité d'ARNm augmente de 20 fois (Varadi et coll., 1989). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par Romey et coll. (1989) sur des myotubes primaires en culture. Les résultats montrent en effet que la fin de la phase proliférative des myoblastes et le début de leur fusion en myotubes est marquée par un fort accroissement du nombre de sites de liaison d'une dihydropyridine (la PN-200/110), suggérant une forte augmentation du nombre de DHPR. Malgré la forte augmentation du nombre d'ARNm ainsi que de la quantité de protéine codant pour le canal, $I_{Ca, L}$ continue d'évoluer lors du développement post-natal. Ainsi, dans le muscle squelettique de rat, le niveau d' α_{1s} reste au niveau de celui de la naissance pendant les 10 premiers jours de vie puis augmente considérablement pour atteindre, au jour 20, un niveau quasiment équivalent à celui du muscle adulte (Morton et coll., 1989). Chez la souris, Gonoï & Hasegawa (1988) rapportèrent une augmentation de l'amplitude du courant calcique d'un facteur 4 entre le 1^{er} et le 30^{ème} jour post-natal, qui, selon Beam & Knudson (1988) serait simultanée à l'accroissement du système tubulaire transverse, et s'accompagnerait d'un déplacement de la courbe de la densité de courant en fonction du potentiel du courant $I_{Ca, L}$ vers des potentiels plus positifs, à l'inverse de ce qui a été décrit chez le fœtus entre E₁₄ et E₁₉.

1.2. Le canal calcique de type T

Dans les cellules musculaires squelettiques en développement, deux types de courants calciques peuvent être enregistrés : le courant calcique de type L $I_{Ca, L}$, que nous venons de voir, et le courant calcique de type T $I_{Ca, T}$, qui diffère du type L tant au niveau de sa localisation que de ses cinétiques. Le canal calcique de type T est exprimé de façon transitoire et l'ARNm codant pour la sous-unité α_1 est détecté dès E14 et diminue progressivement dès la naissance pour disparaître entre 3 et 4 semaines après la naissance (Beam & Knudson 1988b ; Berthier et coll., 2002).

1.2.1. Caractéristiques biophysiques

Sa caractéristique principale, qui le différencie d'ailleurs de l'autre courant calcique voltage dépendant, $I_{Ca, L}$, est son seuil d'activation très négatif (ou « bas »). Le canal est donc dit à bas seuil ou *Low Voltage Activated* dans la littérature anglo-saxonne (LVA) par opposition au canal calcique de type L qui est un *High Voltage Activated* channel (HVA).

Par ailleurs, ses cinétiques d'activation et d'inactivation sont plus rapides que celle de $I_{Ca, L}$. le courant est dit transitoire, le temps au pic est court et il s'inactive rapidement pendant une dépolarisation prolongée.

L'amplitude du courant augmente jusqu'à ce que la conductance calcique de ces canaux atteigne son maximum vers -40 mV environ. Puis, l'amplitude de $I_{Ca, T}$ décroît au fur et à mesure que E_m approche E_{Ca} . En revanche, $I_{Ca, T}$ se caractérise par une déactivation lente qui génère un courant de queue de longue durée.

1.2.2. Structure moléculaire

La sous-unité α_1 : elle constitue, comme pour le DHPR, la sous-unité pore du canal. Trois isoformes de α_1 peuvent être à l'origine d'un courant calcique de type T : α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} . Dans le muscle squelettique, la sous-unité principale est α_{1H} ou $Ca_v3.2$ (Berthier et coll., 2002 ; Cribbs et coll., 1998; Williams et coll., 1999). Elle est codée par le gène CACNA1H porté par le chromosome 16p13.3 dont la séquence prédit une protéine d'environ 2350 aminoacides. L'analyse prédictive de la séquence primaire de la protéine révèle de nombreuses similarités avec la sous-unité α_1 des HVA. Ainsi, la sous-unité α_{1H} est également composée de 4 domaines homologues (I-IV), contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1-S6). Par ailleurs, le segment S4 porte également des résidus chargés positivement ayant vraisemblablement un rôle dans la voltage dépendance du canal, en induisant sous l'effet d'une dépolarisation un changement de sa conformation et donc de son ouverture. Cependant, bien que les sous-unités α_1 des HVA et des LVA soient similaires d'un point de vue conformationnel, elles ne partagent que 20% d'identité au niveau de leur séquence primaire (Lee et coll. 1999). Les régions où l'on retrouve la plus grande diversité se situent principalement dans les boucles inter domaines et les *linkers* inter segments. Ainsi, les principales différences résident dans le fait que :

- i- la boucle I-II est plus grande que celle du canal de type L ;
- ii- elle ne possède pas de domaine AID (Walker & De Waard, 1998), en revanche elle possède un site consensus d'interaction avec les protéine G (De Waard et coll., 1997) ;

- iii- à la différence de α_{1s} , des résidus aspartate remplacent les résidus glutamate dans la boucle P (pore) entre les domaines III et IV. Ainsi, la charge négative est conservée, mais il apparaît que cela altère les propriétés du courant, dont la sélectivité et la perméabilité du canal. ;
- iv- une grande variabilité existe entre les différents membres des LVA en ce qui concerne les parties N- et C-terminales, comparée à la famille des HVA. Ainsi, certains rôles tels que l'adressage, la stabilisation du canal et/ou la modulation de son activité peuvent être attribués aux différents produits de l'épissage alternatif de α_1 .

Le canal calcique de type T possède-t-il des sous-unités auxiliaires ?

C'est en effet la question qui reste posée et ce depuis plusieurs années. L'éventuelle implication de sous-unités régulatrices reste controversée, sans doute car les canaux LVA n'ont toujours pas été purifiés. Comme nous l'avons vu pour le DHPR, les sous-unités auxiliaires des HVA ont un rôle dans la modulation du transport intracellulaire de la sous-unité pore α_1 et dans l'assemblage et l'incorporation membranaire des différentes sous-unités du canal. Les propriétés électrophysiologiques du canal peuvent également être modulées par certaines sous-unités. La purification de canal de type T endogène est donc nécessaire pour à la fois établir quelles sous-unités sont éventuellement présentes et quelle est leur structure. Afin d'apporter des éléments de réponse en attendant que le canal soit purifié, deux stratégies ont été utilisées : d'une part l'inhibition par stratégie antisens des différentes sous-unités des HVA afin d'évaluer les conséquences sur la fonction du type T ; d'autre part, au contraire la co-expression de la sous-unité α_1 du canal de type T avec des sous-unités des HVA dans un système hétérologue (pour revues sur les LVA, voir Yunker et McEnery, 2003 ; Perez-Reyes, 2003).

Concernant la sous-unité β , la stratégie antisens aussi bien que la stratégie de coexpression de β avec la sous-unité Ca_v 3.1 du canal LVA de type G, isoforme principalement neuronale, n'ont peu ou pas eu d'effet sur le courant de type T alors que cela entraîne une diminution de l'amplitude des courants de type L et N. Cela laisse supposer que la sous-unité α_1 n'est pas associée à une sous-unité β , et qu'elle n'est nécessaire ni à l'expression, ni à la fonction des canaux de type T (Laurangier et coll., 1998). Par ailleurs, les

sous-unité α_1 des différents LVA ne comportent pas le domaine AID d'interaction entre la boucle I-II et la β .

De nombreuses études apportent des résultats contradictoires sur l'éventuel rôle d'une **sous-unité $\alpha_2\delta$** . Il semblerait que la coexpression d' α_1 et d' $\alpha_2\delta$ dans un système hétérologue potentialise l'expression du canal à la membrane, bien que celui l'atteigne même en absence d' $\alpha_2\delta$. Par ailleurs, $\alpha_2\delta$ serait impliquée dans la modulation des cinétiques d'activation et d'inactivation du canal. Enfin, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par l'expression de la portion δ seule, suggérant ainsi que la portion α_2 est suffisante et nécessaire à la modulation de l'adressage et de l'activité du canal.

Concernant la sous-unité γ , la co-expression, dans un système hétérologue, de α_{1G} et de différentes isoformes de γ (au moins 8 isoformes ont été identifiées) a montré que certaines isoformes de γ pouvaient modifier les propriétés biophysiques du canal recombinant, mais seulement sous certaines conditions, notamment de stimulation. Par conséquent, il n'existe pas de preuves claires sur une association de α_1 avec γ , et, si toutefois elle existait, ses effets seraient propres à un type cellulaire, voire un sous-type.

1.2.3. Caractéristiques pharmacologiques

Contrairement, au canal de type L, le canal calcique de type T se caractérise par sa faible sensibilité aux DHP, phénylalkylamines et benzothiazépines (Mc Donald et coll., 1994). Il est également sensible à certains agents hypertenseurs tels que l'amyloride et le mibéfradil.

Bien que peu ou pas sensibles à certains agents pharmacologiques, les canaux calciques de type T sont très sensibles à certains cations divalents. Le courant de type T est notamment bloqué par l'utilisation de Co^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} et de Ni^{2+} (Cognard et coll., 1986).

Enfin, comme pour le canal de type L, et probablement en raison des homologies structurales, les protons agissent également comme inhibiteurs de $\text{I}_{\text{Ca, T}}$. Par ailleurs, bien qu'inhibé par la majeure partie des cations divalents, le canal est perméable au Ba^{2+} , mais, à l'inverse du canal calcique de type L, le courant généré par le passage du Ba^{2+} dans le canal n'engendre pas d'états de sous conductance, la conductance restant identique à celle du Ca^{2+} .

1.2.4. Expression du canal calcique de type T et évolution de $\text{I}_{\text{Ca, T}}$ au cours du développement musculaire

Disease	Gene Products	Chromosomal Location/ Responsible Gene	Presumed Function	Role in Disease
Duchenne muscular dystrophy (DMD), murine muscular dystrophy (mdx) Limb girdle muscular dystrophies (LGMD)	Dystrophin	X p21	Connection of cytoskeleton and DAG complex	Loss of mechanical membrane stability
LGMD1A	?	5q22?		
LGMD1B	?	1q11-21/?		
LGMD1C	Caveolin 3	3p25/CAV3	Invaginations of plasma membrane	Disruption of caveolae formation
LGMD2A	<i>n</i> -Calpain	15q15/CANP3	Protease	Loss of proteolytic activity
LGMD2B	Dysferlin	2q13/DYSF		
LGMD2C	γ -Sarcoglycan	13q/SGCG	Connects dystrophin to the ECM	Instability of DAG complex
LGMD2D	α -Sarcoglycan	17q21/SGCA	Connects dystrophin to the ECM	Instability of DAG complex
LGMD2E	β -Sarcoglycan	4q12/SGCB	Connects dystrophin to the ECM	Instability of DAG complex
LGMD2F	δ -Sarcoglycan	5q33/SGCD	Connects dystrophin to the ECM	Instability of DAG complex
Congenital muscular dystrophy (CMD), murine dystrophia muscularis-2J (Dy2J)	Laminin α 2 chain	6q/LAMA2	ECM component	
Malignant hyperthermia (MH)				
MHS1	Ryanodine receptor	19q13.1/RyR1	Ca ²⁺ release from SR	Excessive Ca ²⁺ release
MHS2	?	17q11.2-q24/?		Increased cytoplasmic Ca ²⁺
MHS3	?	7q/?		Increased cytoplasmic Ca ²⁺
MHS4	?	3q13.1/?		Increased cytoplasmic Ca ²⁺
MHS5	L-type Ca ²⁺ channel (DHP receptor)	1q31/CACLN1A3	Ca ²⁺ channel of TT system, voltage sensor	Changed inactivation properties; RyR activation
MHS6	?	5p/?		Increased cytoplasmic Ca ²⁺
Brody's disease	SERCA1	16p12/ATP2A1	Uptake of Ca ²⁺ into SR	Loss of function, reduced Ca ²⁺

Tableau 3. Maladies musculaires héréditaires présentant des altérations de l'homéostasie calcique et/ou des anomalies du type de fibres. D'après Berchtold et coll., 2000.

De très nombreuses pathologies musculaires présentent des altérations de l'homéostasie calcique. Ces maladies peuvent être dues à des mutations de gènes dont le produit est impliqué directement dans la régulation du calcium intracellulaire (par exemple : RyR, DHPR, SERCA), mais peuvent également provenir de mutations sur d'autres protéines (protéines du cytosquelette principalement).

Le courant calcique de type T est enregistré de manière transitoire dans le muscle squelettique immature. Dans les myocytes en développement, la densité de $I_{Ca, T}$ augmente transitoirement (Berthier et coll., 2002 ; Shimahara & Bournaud, 1991). En effet, sur fibres fœtales de souris fraîchement dissociées, des travaux menés au laboratoire ont montré une augmentation de la densité de $I_{Ca, T}$ entre les stades E14 et E16 (Berthier et coll., 2002). Par la suite, à la fois la densité de canaux de type T et des ARNm diminuent jusqu'à E19, jour de la naissance chez la souris (Beam & Knudson, 1988 ; Berthier et coll., 2002). Cette diminution se poursuit après la naissance, pour disparaître totalement vers 3 à 4 semaines chez le rat et environ 17 jours chez la souris.

L'expression transitoire du canal dans le muscle immature suggère qu'il jouerait un rôle dans les processus de maturation musculaire lors du développement ou de la régénération. Ainsi, Garcia & Beam (1994) démontrèrent que le courant calcique de type T pouvait entraîner la libération de Ca^{2+} du RS. L'utilisation de bloqueurs des canaux de type T, tels que le mibefradil (Liu et coll., 1999), l'amiloride et le Ni^{2+} (Bijlenga et coll., 2000) atténue la fusion des myoblastes chez l'Homme. Toutefois, Bidaud et coll. (2006) démontrèrent, sur la lignée myogénique C₂C₁₂ ainsi que sur des cultures primaires de cellules satellites de souris, que le courant calcique de type T n'était pas nécessaire à la fusion des myoblastes en myotubes chez la souris. De plus, l'utilisation d'oligonucléotides antisens contre α_{1H} , atténue d'~80% $I_{Ca, T}$ dans les myotubes néoformés (Bijlenga et coll., 2000). Il est également important de noter que l'isoforme α_{1H} , spécifique du muscle, n'est pas la seule exprimée au cours du développement : des ARNm d' α_{1G} et d' α_{1I} ont également été détectés dans le muscle immature (Berthier et coll., 2002).

Bien que de fortes variations d'expression aient été observées concernant le canal calcique de type T, ses propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques varient très peu au cours du développement. Ainsi, les paramètres d'activation, d'inactivation et V_{rev} restent inchangés entre E14 et E19. Il en est de même pour les paramètres de voltage-dépendance tels que les valeurs de seuil et $V_{1/2}$, respectivement de - 45 mV et - 25 mV en 10 mM Ca^{2+} , à tous les stades du développement (Berthier et coll., 2002).

En ce qui concerne les cellules musculaires en culture, une étude réalisée par Bidaud et coll (2006) montre que dans les myoblastes de la lignée C₂C₁₂ aucun courant calcique n'est enregistré. Les premiers myotubes apparaissent au 3^{ème} jour de différenciation et s'accompagne de l'apparition d'un courant de type L (seuil à -30 mV, pic à + 10 mV) sensible à la nitrendipine, une DHP. Cette étude ne rapporte pas la présence dans les myotubes C₂C₁₂

d'un courant LVA de type T, bien que la présence d'ARNm de $\text{Ca}_v 3.2 (\alpha_{1H})$ ait été détectée. En revanche, dans les myotubes en culture primaire, en plus du courant de type L, un courant de type T a été enregistré dans ~30% des cas (seuil à -60 mV, pic à -40 mV).

Contrairement au canal calcique de type L, le canal calcique de type T n'est pas localisé dans les tubules T. En effet, aux stades précoces de développement musculaire, deux types de courants calciques ont pu être enregistrés après détubulation. La détubulation consiste à incuber les cellules en présence de glycérol qui a pour effet de rompre la continuité entre la membrane plasmique et les tubules transverses. L'un de ces courants était à bas seuil et présentait des cinétiques lentes. L'autre courant était un courant à haut seuil, présentant des cinétiques rapides. Les canaux calciques à l'origine de ces courants ont alors été identifiées comme étant respectivement le canal de type L et le canal de type T. A des stades plus tardifs, les myotubes présentaient des sarcomères, avec des structures triadiques matures. Après détubulation, seul un courant calcique aux cinétiques rapides pouvait encore être enregistré. Les auteurs conclurent que le canal calcique de type L, à l'origine de ce courant rapide, restait localisé au niveau de la membrane de surface au cours du développement alors que les canaux calciques de type L migraient dans les tubules transverses. (Romey et coll., 1989).

2. Cavéoles, rafts lipidiques et homéostasie calcique

Le maintien de l'homéostasie calcique est un facteur essentiel à la physiologie du muscle squelettique du fait de la régulation de nombreuses fonctions, dont la fonction principale, la fonction contractile, par le Ca^{2+} . La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ doit de ce fait être finement régulée en terme de temps et d'espace. Des mutations ou des anomalies dans une ou plusieurs des protéines impliquées dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire mènent très souvent à de nombreuses pathologies musculaires (tableau 3). Par ailleurs, un certain nombre de microdomaines membranaires, dont les rafts lipidiques et les cavéoles ont un rôle important dans l'adressage, l'ancrage, le contrôle de nombreuses protéines dont des transporteurs et canaux ioniques impliquées dans l'homéostasie calcique. Ainsi les rafts lipidiques et les cavéoles agiraient dans la régulation à la fois spatiale et temporelle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Trois types d'approches peuvent être utilisés afin de déterminer si une protéine est présente dans les rafts ou les cavéoles.

Channel-subunit	Membrane localization	Cell type studied
Kv1.4	Non-caveolar lipid raft	HEK cells
Kv1.4	Bulk plasma membrane	Pancreatic beta-cells
Kv1.5	Caveolae	L-cells, Ventricular cardiomyocytes
Kv1.5	Non-caveolar lipid raft	Atrial cardiomyocytes
Kv2.1	Non-caveolar lipid raft	L-cells
Kv4.2	Subtype of lipid rafts	HEK cells
Kir2.1	Cholesterol enriched lipid raft	Aortic endothelial cells
Kir3.1	Subtype of lipid rafts	CHO cells, neurons
Kir6.1	Cholesterol enriched lipid rafts	Rat aortic SMC
Kir6.2	Bulk plasma membrane	Pancreatic beta-cells
K _{Ca} channel	Subtype of lipid rafts	MDCK cells
Nav1.5	Caveolae	Ventricular myocytes
Cav1.2	Caveolae	Cardiomyocytes, SMC, Pancreatic beta-cells
IP3-receptor	Caveolae	Various
HCN4	Caveolae	Sinus-node cardiomyocytes
Connexin-43	Caveolae	Alveolar epithelial cells, Various transfected cell types

Tableau 4. Tableau résumant les canaux ioniques localisés dans les rafts lipidiques ou les cavéoles dans le muscle cardiaque. D'après Maguy et coll., 2006.

Le muscle cardiaque est l'objet de nombreuses études sur la régulation de la fonction des canaux ioniques, leurs rôles dans la physiologie cardiaque n'étant plus à démontrer. Ainsi, de nombreux canaux ont été identifiés au niveau de rafts lipidiques cavéolaires, non cavéolaires ou enrichis en cholestérol. Parmi eux, nous retrouvons des canaux potassiques (Kv, Kir) des canaux sodiques (Na_v), des échangeurs et des récepteurs.

- **l'approche biochimique** : du fait de leur enrichissement en cholestérol et sphingolipides, les rafts et les cavéoles sont insolubles dans des détergents non ioniques. L'organisation du cholestérol et des sphingolipides est tellement stable que les détergents « doux » ne suffisent pas à solubiliser ces complexes. Les rafts/cavéoles sont alors séparés du reste de la membrane grâce à leur densité. L'utilisation de gradients de sucrose permet notamment d'isoler ces microdomaines.
- **L'approche par immunocytochimie** : qui consiste à observer une éventuelle colocalisation de protéines. Cette approche est utile en ce qui concerne les cavéoles car elles possèdent un marqueur protéique spécifique, la cavéoline. En revanche, l'absence de marqueur spécifique, ou du moins un marqueur présent dans toutes les populations de rafts, rend cette approche plus complexe pour ce type de microdomaine.
- Enfin, la dernière approche est une **approche fonctionnelle** qui consiste à étudier les propriétés des différentes protéines dans des situations où ces microdomaines sont déstructurés. Cela se fait principalement par utilisation d'agents séquestrant le cholestérol tels que la Méthyl- β -CycloDextrine (M β CD).

Le paragraphe suivant s'intéressera à détailler certaines familles de protéines localisées dans les rafts lipidiques et/ou les cavéoles et qui présentent une interaction éventuelle avec la cavéoline. Je concentrerai ce travail sur les protéines transmembranaires de type canaux et transporteurs ioniques.

Dans un premier temps, je ferai la synthèse des éléments localisés dans les rafts/cavéoles ayant un rôle autre que celui de maintien de l'homéostasie calcique. Puis, dans un second temps, je m'attarderai sur les canaux et transporteurs directement impliqués dans le maintien de l'homéostasie calcique.

De très nombreux types de canaux ont été démontrés comme étant localisés dans les rafts ou les cavéoles. Les études correspondantes visaient principalement à déterminer la localisation membranaire de canaux afin de déterminer leur environnement protéique. Ainsi, la découverte de la localisation d'un canal dans un microdomaine lipidique tel que les rafts ou

les cavéoles ouvre de nombreuses perspectives quand à l'étude d'éventuels partenaires d'interaction qui pourraient alors avoir un rôle dans la régulation et/ou l'adressage de sous-unités des canaux. Par exemple, dans le muscle cardiaque, qui a été l'objet de nombreuses études de ce type, nous pouvons retrouver de nombreuses protéines membranaires (l'ensemble de ces canaux est résumé dans le tableau 4).

Je présenterai dans ce qui suit les grandes familles de protéines membranaires non impliquées dans l'homéostasie calcique qui ont été localisées dans les microdomaines lipidiques du muscle cardiaque (d'après Maguy et coll., 2006) :

- i- canaux potassiques** : ils constituent le type de canal le plus fréquemment retrouvé dans les cavéoles et/ou rafts lipidiques, qu'ils soient de la famille *Shab* (ou K_v2 , tels que $K_v2.1$), de la famille *Shaker* (ou K_v1 , tels que $K_v1.5$ ou $K_v1.4$) ou de la famille *Shal* (ou K_v4 tels que $K_v4.2$ et $K_v4.3$). Sont également présents dans les rafts des membres de la famille des canaux potassiques rectifieurs entrants (ou K_{ir} pour K^+ *inward rectifier*) tels que $K_{ir2.1}$ et $K_{ir3.1}$. Il a également été identifié des K_{ATP} (canaux potassiques sensibles à l'ATP intracellulaire) et des K_{Ca} (canaux potassiques activés par le Ca^{2+} intracellulaire).
- ii- canaux sodiques** : jusqu'à présent, seul un membre de la famille des Na_v ($Na_v1.5$) a été identifié dans les cavéoles des myocytes ventriculaires.
- iii- canaux de type HCN** : dans le cœur, les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide binding channels*) auraient un rôle important dans l'automatisme cardiaque.

L'homéostasie calcique intracellulaire se définit comme la capacité qu'a la cellule à conserver l'équilibre ionique entre le compartiment intracellulaire (le cytosol) et le compartiment extracellulaire, et ce, malgré diverses contraintes. Le maintien de cette homéostasie calcique est un point clé de la physiologie musculaire squelettique. Je vais désormais m'intéresser plus particulièrement aux protéines impliquées dans l'homéostasie calcique musculaire. Trois mécanismes complémentaires interviennent conjointement dans le maintien de l'homéostasie calcique :

1) le flux net de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique ;

- 2) **la fixation du Ca^{2+} libre sur des protéines cytoplasmiques (rôle de protéines « tampons calciques ») ;**
- 3) **les mouvements de libération et de repompage du Ca^{2+} dans les compartiments intracellulaires, représentés principalement dans le muscle par le RS;**

Le Ca^{2+} tient en effet un rôle majeur dans de nombreux types cellulaires. Aussi, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer des mécanismes de régulation des différents acteurs du maintien de l'homéostasie calcique, regroupés sous le terme de « calciosome ». Ces études ont été menées non seulement dans le muscle, en raison du rôle fondamental du Ca^{2+} dans l'activité contractile, mais aussi dans d'autres types cellulaires où le Ca^{2+} joue un rôle dans différentes fonctions, telles que l'activité sécrétoire.

Popescu et coll. (1974) furent les premiers à émettre l'hypothèse d'un rôle des cavéoles dans le maintien de l'homéostasie calcique et allèrent même jusqu'à suggérer que les cavéoles représenteraient une voie d'entrée préférentielle du Ca^{2+} extracellulaire. De nos jours, il existe de nombreuses preuves d'un rôle des cavéoles dans le maintien de l'homéostasie calcique, et, comme détaillé ci-dessous, de nombreuses protéines impliquées dans les trois mécanismes fondamentaux qui la conditionnent ont été montrées comme y étant enrichies.

1) le flux net de Ca^{2+} à travers le sarcolemme

o Extrusion du calcium :

Dans les cellules, le gradient électrochimique du Ca^{2+} est en faveur d'une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le cytosol. L'extrusion du Ca^{2+} hors de la cellule nécessite donc de l'énergie pour aller à l'encontre de la *driving force*. Cette énergie est apportée notamment par l'hydrolyse de l'ATP, mécanisme par lequel les Ca^{2+} -ATPases sont responsables de l'extrusion du Ca^{2+} .

Il a été démontré que les Ca^{2+} -ATPases de fibroblastes en culture (Fujimoto 1993), de cellules du corpuscule de Meissner (Tachibana & Nawa, 1992), de cellules de l'endothélium pulmonaire de rat (Schnitzer et coll., 1995) et de cellules hépatocytaires (Ogi et coll., 2000)

était localisée dans des microdomaines membranaires enrichis en cavéoline et sensibles à la M β CD, c'est-à-dire des cavéoles. Par la suite, il a même été démontré dans les cellules épithéliales de tubules rénaux, qu'une Ca²⁺ATPase était également localisée dans des cavéoles, et que cette pompe était active uniquement dans ces microdomaines (Tortelote et coll., 2004).

Un autre élément clé de la régulation du Ca²⁺ intracellulaire est l'échangeur sodium-Ca²⁺ (NCX pour Na⁺-Ca²⁺ eXchanger). L'échangeur Na⁺/Ca²⁺ a pour principal rôle l'extrusion des ions Ca²⁺ du cytoplasme en utilisant l'énergie du gradient de sodium entrant dans la cellule. Suite à l'activation du transporteur, trois ou quatre ions Na⁺ sont échangés contre un ion Ca²⁺ à chaque cycle, ce qui lui confère un fonctionnement électrogène. Cet échangeur est particulièrement important dans le muscle cardiaque (isoforme NCX1), où, avec la pompe SERCA (SarcoEndoplasmic Reticulum Pump) il représente la protéine la plus importante dans la régulation de l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes. Il a été démontré que cet échangeur était localisé dans les cavéoles du muscle cardiaque et qu'il co-immunoprécipitait avec la Cav-3 (Bossuyt et coll., 2002).

o entrée de calcium dans le cytosol :

On considère que les voies d'entrée du calcium du milieu extra- vers le milieu intracellulaire se font principalement par deux types de canaux :

- **Les Voltage-Operated Channels (VOC)** : ou canaux dépendants du potentiel, activés par une dépolarisation membranaire.
- **Les Store Operated Channels (SOC)** : qui, par définition, sont sensibles aux stocks intracellulaires de Ca²⁺ et seraient activés par une déplétion des stocks internes de Ca²⁺.

Dans le muscle squelettique adulte, l'entrée de Ca²⁺ depuis le milieu extérieur se fait principalement par un VOC : le canal calcique voltage dépendant de type L (ou DHPR). Plusieurs études suggèrent que le DHPR serait, en plus de sa localisation au niveau des tubules T, localisé dans les cavéoles. Jorgensen et coll. (1989) furent les premiers à observer en microscopie électronique que le DHPR avait une répartition annexe à celle de tubules T, sous forme de petits clusters disposés sous la membrane, à proximité des tubules T. La taille et la répartition ordonnée des structures dans lesquelles se situait le marquage laissaient

présager une distribution cavéolaire du DHPR. Par la suite, Darby et coll. (1999) observèrent que les cavéoles de muscle lisse trachéal de chien contenait le canal calcique de type L ainsi que d'autres protéines impliquées dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Enfin, Pouvreau et coll. (2002) montrèrent que la déstructuration des cavéoles par la M β CD modifiait les propriétés du DHPR. Les VOC d'autres types cellulaires sont également localisés dans les cavéoles, le DHPR serait notamment localisé dans les cavéoles dans le muscle cardiaque (Balijipalli et coll., 2006).

Une autre voie d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule musculaire squelettique est représentée par les SOC. Ces canaux seraient activés, selon un mécanisme encore inconnu, quand les stocks de Ca^{2+} intracellulaires sont déplétés. Cet influx de Ca^{2+} dépendant des stocks intracellulaires de Ca^{2+} est appelé **entrée capacitive de calcium (ECC)** et serait initiée au niveau des SOC (pour revue, voir Parekh & Penner, 1997). Cette entrée capacitive de calcium a lieu dans de nombreuses cellules, bien que la sélectivité aux ions Ca^{2+} et la taille du courant engendré puissent varier fortement selon le type cellulaire.

La nature moléculaire des SOC reste indéterminée, mais ils existent de multiples arguments expérimentaux en faveur d'un rôle de protéines de la famille des TRP (*Transient Receptor Potential*). Plusieurs homologues mammifères du gène *trp*, identifié chez la drosophile (Montell & Rubin, 1989) ont été proposés comme candidats codant pour les TRP. Le produit du gène *trp* de la drosophile constituerait en effet des canaux perméables au Ca^{2+} qui s'assembleraient en un complexe de signalisation, comprenant la protéine scaffolding INAD, la calmoduline, la phospholipase C_β , la rhodopsine, la PKC ainsi que plusieurs sous-unités de la protéine G. Liu et coll. (2000) proposèrent plus particulièrement *trp1* comme gène candidat responsable de la présence d'une entrée capacitive de calcium dans les cellules épithéliales salivaires. Le produit de ce gène, TRP1 était en effet localisé à la membrane plasmique et une augmentation ou une diminution du taux de TRP1 étaient respectivement corrélées à une augmentation ou une diminution de l'amplitude des ECC. La réponse fut apportée par Lockwich et coll. (2000) qui montrèrent que TRP1 formait un complexe de signalisation, localisé dans les cavéoles, et coprécipitait avec la Cav-1, la sous-unité $\text{G}_{\alpha\text{q/11}}$ et le récepteur à l' IP_3 de type 3. L'équipe d'Ambudkar a par ailleurs démontré qu'un autre membre de la famille des TRP, TRP3, avait également une localisation cavéolaire (Lockwich et coll., 2001) dans des cellules HEK (exprimant la Cav-1 de manière endogène). Par ailleurs, TRP3 coimmunoprécipitait avec l' IP_3R , la pompe SERCA, la PLC_β , la sous-unité $\text{G}_{\alpha\text{q/11}}$ (activateur de la phospholipase C_β) et la Cav-1.

2) Protéines « tampons calciques » :

La faible concentration de Ca^{2+} cytoplasmique est la résultante à la fois de sa pénétration limitée dans la cellule, de mécanismes d'extrusion à l'extérieur, et de l'accumulation de Ca^{2+} dans certains organites intracellulaires. De plus, il existe des protéines susceptibles de fixer le Ca^{2+} de manière passive : la calséquestrine, la calréticuline, la calbindine, la calrétinine et la parvalbumine. La concentration cytoplasmique de Ca^{2+} libre ou ionisé est donc faible mais subit des variations du fait de divers transferts entre le milieu extérieur et la cellule et entre divers organites intracellulaires. Darby et coll. (2000) ont rapporté l'observation selon laquelle les cavéoles des cellules endothéliales de la trachée de chien contenaient de la calréticuline et de la calséquestrine, deux des protéines de liaison du Ca^{2+} intracellulaire. La calséquestrine est principalement admise comme étant une protéine luminale du RS jonctionnel. C'est une protéine de stockage du Ca^{2+} qui confère au RS sa forte capacité de rétention du Ca^{2+} . La calréticuline est une protéine membranaire multifonctionnelle qui fixerait essentiellement le Ca^{2+} au sein du réticulum (principalement le muscle lisse). Une localisation cytosolique de ces protéines au niveau des cavéoles paraît surprenante bien qu'il ait déjà été démontré qu'elles pourraient être localisées dans d'autres compartiments cellulaires que le réticulum. La calréticuline a notamment été détectée dans le plasma circulant (Sueyoshi et coll., 1991) et à la surface de fibroblastes et de cellules de mélanome en culture (White et coll., 1995 ; Gray et coll., 1995).

3) Libération et repompage du calcium dans les compartiments intracellulaires;

Le récepteur à l'inositol triphosphate (IP_3) (IP_3R) et la pompe SERCA sont deux acteurs importants des mouvements de libération et de repompage du Ca^{2+} dans de nombreux types cellulaires.

Le rôle de l' IP_3R dans la physiologie du muscle squelettique a longtemps été discuté suite à l'observation par Vergara et coll. (1985) et Volpe et coll. (1985) que les fibres musculaires squelettiques pelées d'amphibien et de rat étaient capables de développer une force après ajout d' IP_3 , ce qui amena ces deux groupes à suggérer que l' IP_3 était impliquée dans le couplage E-C. Bien que désormais l' IP_3 ne soit plus considéré comme un élément du couplage E-C, il n'est pas exclu qu'il ait un rôle dans la modulation de ce couplage.

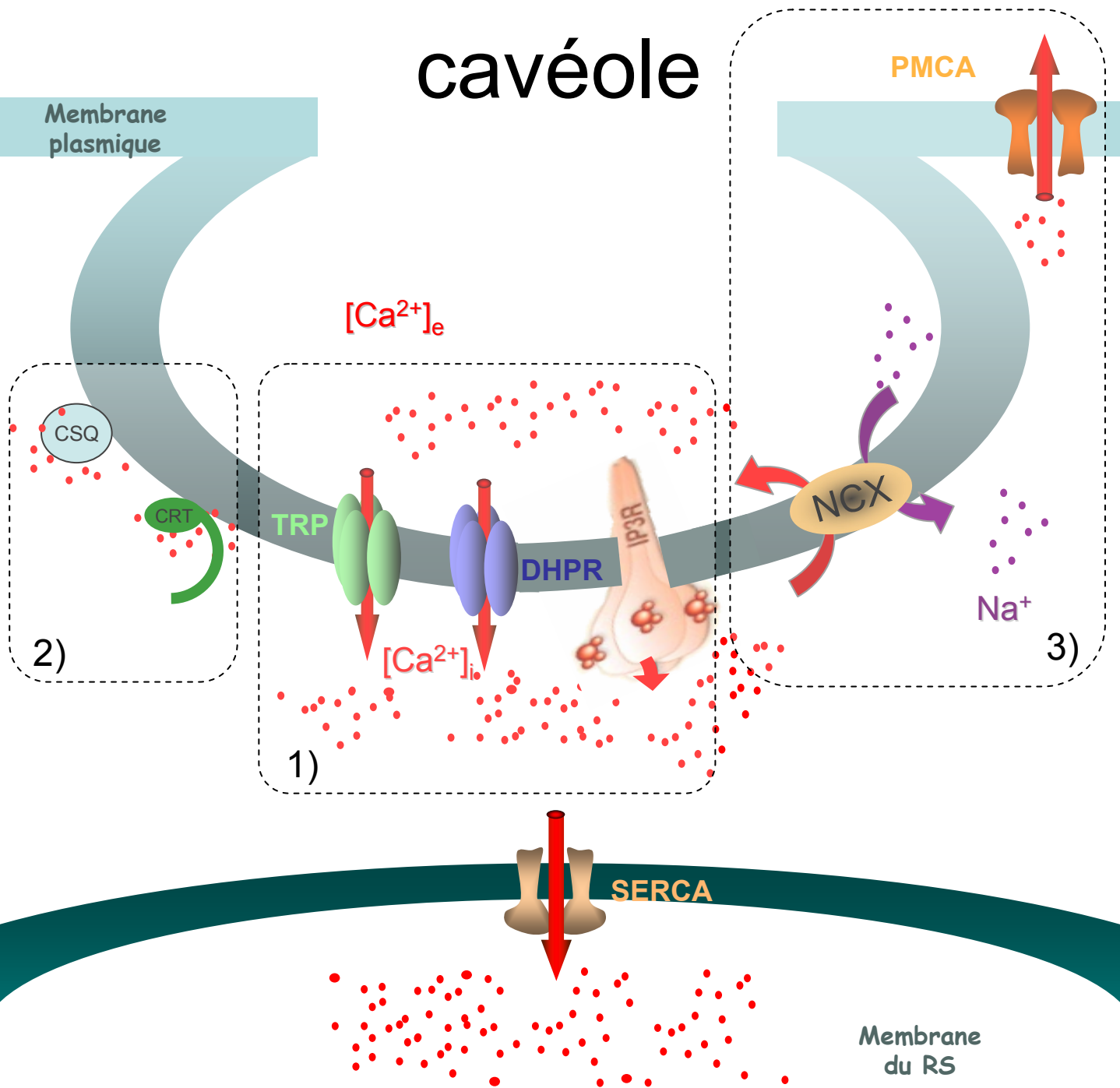


Figure 17. Molécules impliquées dans les flux de calcium à travers le sarcolemme

De nombreuses protéines ont été montrées comme étant d'une part localisées dans les cavéoles, et d'autre part impliquées dans le passage de calcium à travers la membrane plasmique. Ces molécules peuvent être regroupées en 3 grands groupes : les protéines responsable d'une entrée de calcium dans le cytosol (1), celles qui fixent le calcium (2) et enfin celles impliquées dans une extrusion du calcium vers le milieux extracellulaire ou des stocks intracellulaires (3).

Dans le muscle lisse, une propriété étonnante attribuée aux cavéoles est d'initier des vagues et des « étincelles » calciques (sparks). Une vague calcique est le résultat de l'augmentation transitoire de la $[Ca]_i$ organisée à la fois dans le temps et dans l'espace. La capacité des cavéoles à compartimentaliser la machinerie impliquée dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire pourrait expliquer ce phénomène. Les observations suivantes ont été effectuées sur le muscle lisse où l' IP_3R occupe un rôle majeur. La stimulation de l' IP_3R par l' IP_3 entraîne l'ouverture de ce canal perméable aux ions Ca^{2+} qui laisse alors entrer massivement le Ca^{2+} et provoque une vague calcique. Bien que les mécanismes impliqués n'ont, à ce jour, pas été démontrés dans le muscle squelettique, il est tout de même intéressant de noter à quel point les cavéoles peuvent être impliquées dans des mécanismes complexes de régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Aussi, les cavéoles contiennent à la fois le récepteur à l' IP_3 ainsi que l'ensemble des récepteurs connus pour stimuler la synthèse d'InsP3 : $G_{\alpha q/11}$, le récepteur à la bradykinine B2, le récepteur à l'endothéline ET_A , le récepteur à l'EGF et au PDGF, (pour revue, voir Isshiki & Anderson, 2003). Grâce à la microscopie confocale, il a à ce titre été démontré que des vagues calciques étaient initiées en réponse à des agonistes inducteurs de la production d' IP_3 , tels que la bradykinine et l'ATP, au niveau de domaines enrichis en cavéoline (Isshiki et coll., 2003).

Enfin, de récentes études attribuent désormais un rôle des mitochondries dans les processus de pompage et de séquestration du calcium intracellulaire (pour revue, voir Gunther et coll., 2004).

L'ensemble de ces résultats attribue un rôle important aux cavéoles dans l'activité de libération et de repompage du Ca^{2+} de nombreux types cellulaires, même si un rôle similaire dans le muscle squelettique ou éventuellement sur le RyR reste à être démontré.

Par ailleurs, la co-immunoprécipitation de la pompe SERCA avec la protéine TRP3 (Lockwich et coll., 2001) montre que les cavéoles pourraient directement être impliquées dans les phénomènes de repompage du Ca^{2+} intracellulaire. En effet, la pompe SERCA est une pompe calcique localisée dans la membrane du réticulum (endoplasmique ou sarcoplasmique) à activité ATPasique. C'est le principal site de repompage du Ca^{2+} du cytosol vers l'intérieur du réticulum. Les auteurs ont alors proposé un modèle dans lequel TRP3, l' IP_3R et la pompe

SERCA seraient en étroite relation au niveau des cavéoles, tout du moins dans celles des cellules épithéliales.

L'ensemble des molécules impliquées dans les flux de Ca^{2+} à travers le sarcolemme est résumé sur la figure 17.

- Chapitre 3 -

PATHOLOGIES MUSCULAIRES ASSOCIÉES À DES PERTURBATIONS DE LA CAVÉOLINE-3

L'ensemble des pathologies touchant le muscle est regroupé sous le terme de **myopathies** (du grec *myo* : muscle et *pathos* : maladie).

Depuis la découverte qu'une même mutation pouvait entraîner des phénotypes différents de myopathies, le concept simpliste :

1 gène → 1 protéine → 1 pathologie

n'est plus valide et devrait plutôt être remplacé par le concept suivant :

1 gène → 1 protéine → X pathologies

La dénomination des myopathies, basée sur la protéine à l'origine de la pathologie attribue ainsi le terme de cavéolinopathie à l'ensemble des pathologies associées à des altérations génétiques de la cavéoline ou celui de dystrophinopathie pour la dystrophine, etc.... A ce sujet, il convient alors de noter la différence entre dystrophinopathie et dystrophie. La **dystrophinopathie qualifie une myopathie associée à une mutation sur le gène codant pour la dystrophine**. Une dystrophie définit au sens étymologique l'altération d'un tissu ou d'un organe liée à un trouble nutritionnel. Par analogie de phénotype entre la dystrophinopathie (de Duchenne notamment) et les diverses myopathies, une **dystrophie est désormais un terme général synonyme de myopathie**. Les dystrophies musculaires constituent le groupe numériquement le plus important des affections musculaires primitives, et celui dont les conséquences fonctionnelles ou vitales sont les plus graves.

De grandes avancées ont été effectuées en ce qui concerne les gènes et les protéines impliquées dans les diverses dystrophies, mais autant de questions sont soulevées. En l'occurrence, la question fondamentale qui reste à être élucidée est la suivante :

« Quels sont les mécanismes fondamentaux précoces selon lesquels des mutations de la Cav-3 conduisent à la dégénérescence musculaire ? »

Grâce aux avancées techniques dans les domaines de la génétique et de la biologie moléculaire, de nombreuses études ont tenté d'apporter des éléments clef de compréhension du rôle de la Cav-3 dans le muscle. Ainsi, la génération d'animaux KO ou surexprimant la Cav-3 ainsi que l'utilisation de stratégies antisens ont apporté quelques éléments de réponse bien que les résultats contradictoires apportés par ces modèles n'ont en rien permis de définir un rôle précis de cette protéine dans la physiologie musculaire. Ainsi, une inhibition de l'expression de la Cav-3, par stratégie antisens, dans des cultures de C₂C₁₂ inhibe la fusion des myoblastes en myotubes (Galbiati et coll., 1999). Toutefois, des études menées par ce même laboratoire sur des lignées dérivant de muscles de souris Cav-3^{-/-} ou surexprimant le Cav-3 ont donné des résultats contradictoires : la perte de la Cav-3 induirait la fusion des myoblastes alors que sa surexpression la réduirait (Volonte et coll., 2003). A l'inverse, l'équipe de Nixon a montré que l'inhibition de l'expression de la Cav-3 chez le Zebrafish était associée à la fois à une désorganisation des myofibrilles et à une diminution de la fusion des myoblastes (Nixon et coll., 2005).

D'un point de vue physiopathologique, les myopathies associées à des mutations de la Cav-3 sont regroupées sous le terme de cavéolinopathies. Etrangement, bien que la plupart des mutations de la Cav-3 résultent en un même phénotype, à savoir l'absence de cavéoline à la membrane plasmique et de cavéoles, de nombreuses pathologies différentes ont été décrites (RMD, LGMD, HCK, DMD...). Toutefois, et de manière tout aussi surprenante, la surexpression de cavéoline peut également mener à un phénotype myopathique. Ce chapitre a ainsi pour but de récapituler les pathologies musculaires associées à des perturbations de la Cav-3 (absence ou surexpression), puis, je m'attarderai sur la LGMD-1C, une cavéolinopathie qui a constitué le principal modèle d'étude de ma thèse.

1. Surexpression de cavéoline-3

En 2000, l'équipe de Lisanti a généré des souris transgéniques surexprimant la Cav-3. Par analyse histologique des muscles de ces souris, ils montrèrent que la surexpression de

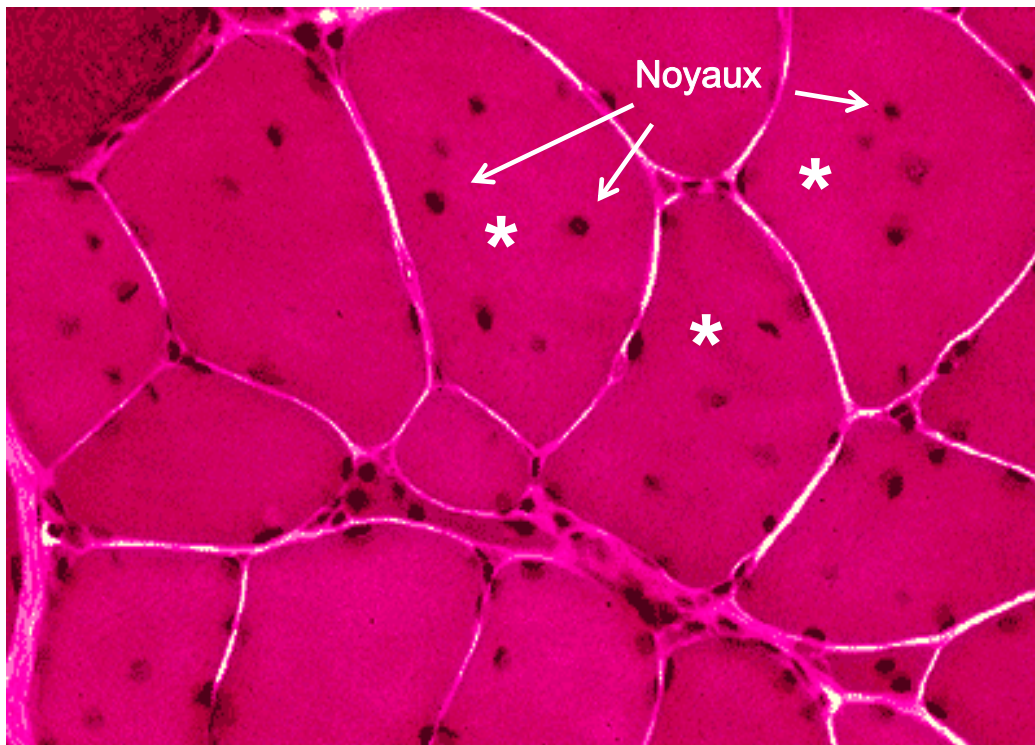


Figure 18. Les noyaux des fibres musculaires squelettiques de patients dystrophiques adoptent une position centrale (centronucléation)

Coupe de muscle d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne marquée à l'hématoxyline-éosine. Alors que certaines fibres présentent des noyaux situés en périphérie, sous le sarcolemme, d'autres présentent une centronucléation (*). L'hétérogénéité dans la taille des fibres est également une caractéristique du muscle dystrophique.

cav-3 entraînait une augmentation du nombre de cavéoles ; une diminution de l'expression de la dystrophine et du β -DG ; une prépondérance de fibres hypertrophiées, nécrotiques ; avec une forte proportion de fibres en cours de régénération présentant une centronucléation typique. D'un point de vue sérique, les souris présentaient un très fort taux de créatine kinase (CK, enzyme clé du métabolisme musculaire), reflétant l'état de nécrose des fibres musculaires (Galibiati et coll., 2000). En d'autres termes, ces souris présentaient l'ensemble des caractéristiques permettant de conclure que la surexpression de Cav-3 suffisait à entraîner le développement d'un phénotype myopathique de type DMD.

Cas de la DMD et de la DMB : deux myopathies dues à des mutations dans le gène de la dystrophine et surexprimant la Cav-3

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et la Dystrophie Musculaire de Becker (DMB) sont deux maladies très proches. Elles entraînent toutes deux une faiblesse musculaire au niveau des mêmes muscles et elles sont transmises de la même façon. Cependant, la faiblesse et le handicap qui en résultent sont moins graves dans la DMB.

La DMD a été décrite pour la première fois par Edward Meryon en 1852. Le physiologiste français G. Duchenne de Boulogne, vers 1860, a ensuite mieux caractérisé la maladie qui porte son nom. Déjà avant la fin du 19^{ème} siècle, il était noté que des cas sporadiques étaient beaucoup moins fréquents que les cas familiaux et que les cas antécédents dans les familles touchées se situaient du côté de la mère. Ceci mena naturellement dans les années cinquante, à l'identification de cette maladie comme étant récessive et liée au chromosome X (Stephens & Tyler, 1951).

La maladie transmise par la mère non atteinte affecte donc majoritairement les garçons avec une incidence d'environ 1/3500 chez les nouveaux nés mâles partout à travers le monde ; les filles sont habituellement des porteuses asymptomatiques. C'est l'une des dystrophies les plus sévères et elle se caractérise par une perte progressive de la force musculaire perceptible dès l'âge de 2 ou 3 ans. La détérioration des muscles atteint une telle amplitude que vers l'âge de 10 ans, les patients, rendus invalides par la perte de force dans les bras et les jambes, sont confinés à la chaise roulante. Par ailleurs, cette pathologie se caractérise par des taux sériques de Créatine Kinase très élevés ce qui met en évidence les dommages généralisés du tissu musculaire. Le tissu musculaire des patients DMD subit perpétuellement des phases de dégénération/régénération. Ainsi, les coupes de muscles présentent un mélange de fibres en

Mutations de la Cav-3	Pathologies musculaires associées			
	LGMD-1C	RMD	DM	HCK
R26Q	LGMD-1C	RMD	DM	HCK
D27E	LGMD-1C	RMD	DM	-
P28L	-	-	-	HCK
A45T	LGMD-1C	RMD	-	-
A45V	-	RMD	-	-
T63P	LGMD-1C	-	-	-
ΔTFT63-65	LGMD-1C	-	-	-
L86P	-	RMD	-	-
A92T	LGMD-1C	RMD	-	-
P104L	LGMD-1C	RMD	-	-

Tableau 5. Mutations de la Cav-3 et pathologies musculaires associées à ces mutations.

D'après Woodman et coll., 2004

Quatre myopathies distinctes ont été identifiées comme étant associées à des mutations de la Cav-3, mais 10 mutations de la Cav-3 sont répertoriées. Ces myopathies incluent la myopathie des ceintures de type 1C (LGMD 1C), la maladie des muscles ondulants (RMD), la myopathie distale (DM) et l'hyperCKémie (HCK)

nécrose et de fibres en régénération avec des noyaux centraux (figure 18). De plus, il y a une augmentation progressive du tissu conjonctif (fibrose) qui finira par remplacer tout le muscle. Les patients meurent généralement d'une insuffisance respiratoire, cardiaque ou d'infections pulmonaires au cours de la deuxième décennie.

Il a fallu plusieurs années afin d'établir le lien entre la dystrophie de Duchenne et le produit du gène porté par le chromosome X. Ainsi, vers la fin des années 1970, les premières observations permettant de localiser le gène de la dystrophine furent effectuées (Lindenbaum et coll, 1979). Ses études montrèrent que les rares filles souffrant de la dystrophie musculaire de Duchenne avaient des altérations sur le bras court du chromosome X. Plusieurs études ont ensuite démontré la présence du gène responsable de la maladie dans le locus p21 du chromosome X (Davies et coll 1983, Boyd et coll, 1987). Ainsi, en 1987, Kunkel identifia le produit génique de la dystrophie musculaire de Duchenne et le nomma dystrophine en rapport avec la maladie avec laquelle cette protéine était associée. Le gène de la dystrophine est le plus grand identifié jusqu'à présent, avec environ 2 millions de paires de bases et 73 exons. L'ARNm fait environ 14 kb et la protéine a un PM d'environ 427 kDa. La très grande taille du gène de la dystrophine (qui occupe près de 1 % du chromosome X), explique qu'environ le tiers des cas de Dystrophie de Duchenne soit du à de nouvelles mutations.

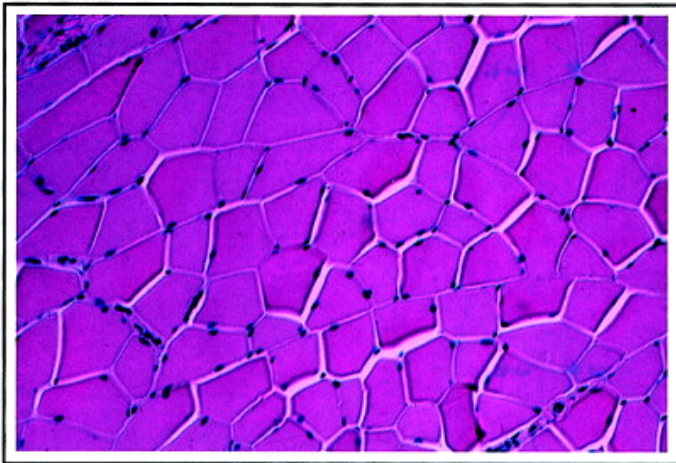
L'analyse du gène de la dystrophine a démontré que la dystrophie musculaire de Duchenne n'était pas la seule maladie ayant pour cause une mutation dans le gène de la dystrophine. La dystrophie musculaire de Becker est en effet une forme allélique beaucoup moins sévère de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les remaniements génétiques responsables des anomalies de fonctionnement du gène sont :

- o Des délétions responsables de 65% des myopathies de Duchenne et 85 % des myopathies de Becker
- o Des duplications responsables de 6% des myopathies de Duchenne
- o Le reste des remaniements génétiques comprend des microdélétions, des substitutions impliquant un unique nucléotide, des insertions et des mutations lors de l'épissage (*splicing mutations*).

Le plus fréquemment (65% des cas de DMD), la mutation délétion induit un décalage du cadre de lecture, entraînant l'apparition d'un codon STOP prématuré (CSP). Il y a alors arrêt précoce de la traduction, engendrant la formation d'une protéine de dystrophine

Type sauvage



Cav-3 KO

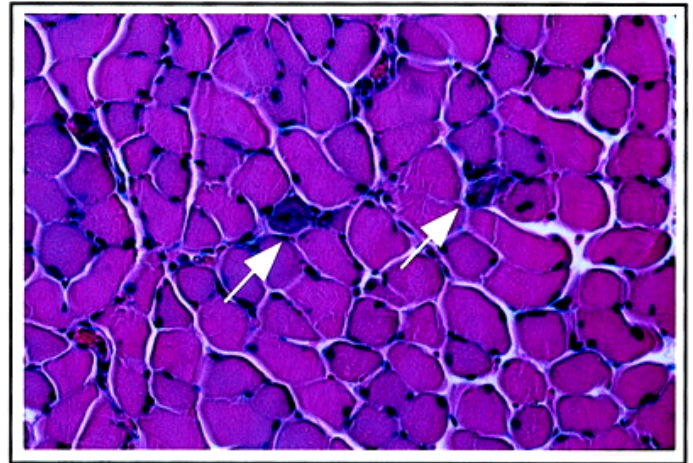


Figure 19. Caractéristiques histologiques des muscles de souris Cav-3^{-/-}

Coupes de muscles de souris témoins et Cav-3^{-/-} colorées à l'hématoxyline-éosine. Les muscles des souris déficientes en Cav-3 (droite) présentent de nombreuses anomalies comparés aux muscles de souris témoins (gauche), à savoir : des différences de tailles des fibres, des fibres centronucléées, des fibres nécrotiques avec des infiltrats de cellules lymphocytaires (flèches). (D'après Razani et coll., 2002)

tronquée, non fonctionnelle, qui sera vite dégradée, et par voie de conséquence l'absence de dystrophine dans les cellules.

L'absence de dystrophine est également responsable d'autres altérations du cytosquelette. En effet, le complexe des DAG (*Dystrophin Associated Glycoproteins*) est lui aussi perturbé puisque les muscles myopathiques présentent également une déficience en bon nombre de ces protéines, en particulier en β -DG.

Dès le début des années 1980, avec le développement des techniques de microscopie électronique, Bonilla et coll. (1981) firent l'observation que la membrane des cellules musculaires de patients DMD présentait un plus grand nombre de cavéoles comparés aux muscles de sujets sains. Plus récemment, Vaghy et coll. (1998) décrivent que la souris mdx (modèle murin de la DMD) avait également un plus grand nombre de cavéoles et que la cavéoline était en 2 à 3 fois plus grande quantité. L'élévation de la quantité de cavéoline fut confirmée chez les patients DMD l'année suivante (Repetto et coll., 1999).

Il n'est pas encore établi comment une déficience en dystrophine peut entraîner une surexpression de Cav-3. En revanche, il semblerait que cette surexpression altérerait la stoechiométrie du complexe DAG. En effet, la cavéoline interagit avec le β -DG au niveau d'un domaine étant également impliqué dans l'interaction avec la dystrophine. Or, il a été démontré chez les souris β -DG^{-/-} qu'il y avait une désorganisation totale du complexe DAG en absence de β -DG, provoquant par la même l'apparition d'un phénotype myopathique léger (Galbiati et coll., 2000). Il se pourrait qu'une surexpression de la Cav-3 provoque une compétition avec le β -DG pour le site d'interaction avec la dystrophine, dans laquelle la cavéoline l'emporterait. Le β -DG serait alors exclu du complexe DAG, provoquant l'apparition du phénotype myopathique, comme il l'est observé chez les souris β -DG^{-/-}.

2. Déficience en cavéoline-3

Le rôle direct d'une déficience en Cav-3 dans la genèse d'un phénotype myopathique a été mis en évidence grâce à l'élaboration de souris transgéniques KO sur le gène *CAV3* par les équipes de Lisanti (Galbiati et coll., 2001) et de Kikuchi (Hagiwara et coll., 2000).

Ces souris étaient viables, fertiles, sans réellement présenter d'anomalies générales. L'ensemble de la musculature striée ne présentait pas de cavéoles, confirmant le rôle des cavéolines dans la formation des cavéoles. Ce n'est qu'à la suite d'analyses histologiques que

Mutations de la Cav-3	Pathologies associées à la mutation de la Cav-3			
	RMD	DM	HCK	LGMD-1C
R26Q	X	X	X	X
D27E	X	X		X
P28L	X		X	
A45T	X			X
A45V	X			
T63P	X			X
ΔTFT	X			X
L86P	X			
A92T	X			X
P104L	X			X
C82A	X			X
N32K	X			X
V43E	X			X

Tableau 6. Récapitulatif des mutations de la Cav-3 et pathologies musculaires associées à ces mutations. D'après Woodman et coll., 2004

Quatre myopathies distinctes ont été identifiées comme étant associées à des mutations de la Cav-3, mais 13 mutations de la Cav-3 sont répertoriées. Ces myopathies incluent la myopathie des ceintures de type 1C (LGMD 1C), la maladie des muscles ondulants (RMD), la myopathie distale (DM) et l'hyperCKémie (HCK)

ces équipes se sont aperçues que ces souris présentaient des anomalies caractéristiques des phénotypes myopathiques. En effet, ils observèrent notamment des fibres de tailles variables, caractéristiques de phénomènes de dégénérescence-régénération, des fibres nécrotiques, et des infiltrations de cellules mononucléées correspondant vraisemblablement à des cellules immunitaires (figure 19). Ces caractéristiques ont conduit à qualifier le phénotype myopathique observé comme étant « léger à modéré », se rapprochant plus du phénotype de la myopathie des ceintures (LGMD) que de celui de la DMD.

Par ailleurs, l'analyse en microscopie électronique de coupes de muscles de souris adultes *CAV3*^{-/-} montra la présence de modifications du système tubulaire transverse avec apparition de profils tubulaires à orientation longitudinale et avec un aspect dilaté.

Les 3 cavéolines possèdent toutes un domaine de 12 acides aminés hautement conservé dans toutes les espèces considérées, y compris le nématode *C. elegans* (Tang et coll., 1997). La grande majorité des pathologies musculaires associées à la Cav-3 présente des mutations dans ce domaine. Il est intéressant de noter que des mutations sur ce domaine dans les formes non musculaires de la cavéoline sont également à l'origine de pathologies sévères, telles que divers types de cancer ou encore le diabète.

L'observation la plus intéressante, bien que la plus surprenante, est qu'une même mutation puisse être associée à divers types cliniques de myopathies. Par exemple, une mutation de la Cav-3 peut être à l'origine de la myopathie des ceintures de type 1C (LGMD 1C) et de la Maladie des muscles ondulants (RMD) ; d'autres mutations sont associées à la fois à la RMD et à une myopathie distale (DM), voire même à une Hyper Créatine Kinase-émie (HCK) (tableau 5). A priori, le seul point commun entre ces pathologies semble être la déficience en Cav-3 consécutive à une mutation de la protéine.

2.1 La RMD

La RMD est une maladie plutôt rare, associée à un phénotype myopathique plutôt léger, caractérisé par une rigidité des muscles, un phénomène d'ondulation du muscle lorsqu'il est soumis à un choc ou un étirement, une légère hypertrophie musculaire et un taux de CK sérique modérément élevé¹ (Robert et coll., 2005).

C'est une maladie autosomale récessive due à des mutations sur le gène de la Cav-3, responsables d'une forte diminution de la quantité de Cav-3 voire une déficience totale,

associée à une absence de cavéoles dans le muscle squelettique. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent en générale vers la fin de l'enfance ou le début de l'adolescence.

La première mutation découverte dans la Cav-3 remonte à 1998 chez un patient atteint de LGMD (Minetti et coll., 1998). Par la suite, une dizaine de mutations ont été reportées et ce n'est qu'en 2001 que Betz et coll. découvrirent que des patients présentant toutes les caractéristiques de la RMD avaient une mutation sur la Cav-3 (A45T). À ce jour, plus d'une douzaine de mutations de la Cav-3 associées à la RMD ont été décrites (tableau 6).

2.2 L'hyperCKémie

L'hyperCKémie (HCK) est considérée comme une pathologie associée à des mutations de la Cav-3 bien que ce soit plus une caractéristique des phénomènes de dégénérescence musculaire qu'un phénotype propre à une dystrophie. On peut tout de même identifier deux formes d'HCK : une forme sporadique et une forme familiale (Carbone et coll., 2000).

La **forme sporadique**, c'est-à-dire répartie de manière hétérogène, sans lien de lieu ni de cause apparents, présente plutôt des niveaux de CK 4 à 8 fois plus élevés que la moyenne et est associée un phénotype myopathique plutôt léger, principalement une variabilité de taille des fibres.

La **forme familiale** présente des niveaux de CK élevés : 4 à 17 fois la normale. Elle est associée à un phénotype myopathique plus grave que la forme sporadique avec une variabilité de taille des fibres, mais aussi la présence de fibres hypertrophiques, nécrose.

2.3 La myopathie distale (DM)

La myopathie distale se traduit par une faiblesse des muscles des membres distaux, c'est-à-dire les muscles situés le plus loin de la racine des membres. Au niveau des membres supérieurs, il s'agit principalement des muscles de l'avant-bras et de la main, pour les membres inférieurs, ceux de la jambe et du pied. Jusqu'à présent, seulement 2 mutations de la Cav-3 ont été décrites comme étant associées à la DM (Fischer et coll., 2003). Le phénotype myopathique est léger, avec d'un point de vue histologique une variabilité de tailles des fibres, un assez grand nombre de fibres centronucléées et une prédominance de fibres de type I.

2.4 La myopathie des ceintures et le système protéolytique du protéasome

La myopathie des ceintures, ou LGMD, est une myopathie proximale, c'est-à-dire touchant la racine des membres (Mathews & Moore, 2003). Elle tient son nom des zones atteintes, en effet, une faiblesse des muscles des ceintures pelviennes (du bassin) et scapulaires (des épaules) en est à l'origine. La progression des LGMD peut être rapide ou lente, il existe une extrême variabilité dans les manifestations cliniques, certaines formes étant beaucoup plus handicapantes que d'autres.

D'une manière générale, les symptômes cliniques sont une faiblesse des ceintures pelvienne et scapulaire, une hypertrophie des mollets, un taux de CK de 4 à 25 fois supérieur à la moyenne, avec parfois l'apparition de crampes douloureuses après exercice (myalgies post-exercice). Au niveau histologique, les muscles des patients LGMD présentent des signes non spécifiques de myopathie, à savoir des foyers nécrotiques, des fibres centronucléées et une fibrose modérée.

Les dystrophies musculaires des ceintures sont un groupe hétérogène de maladies des muscles. Ce sont des maladies génétiques que l'on distingue selon leur mode de transmission, autosomal dominant ou autosomal récessif et qui restent rares, concernant globalement 5 personnes sur 1 million, bien que certaines formes puissent être dix fois plus fréquentes dans certains endroits propices au regroupement communautaire (Ile de la Réunion, Pays Basque, communauté Amish).

Jusqu'à présent, 3 gènes ont été identifiés à l'origine de LGMD autosomales dominantes et 10 à l'origine de LGMD autosomales récessives. Les LGMD sont ainsi classées en LGMD de type 1 lorsqu'elles sont à transmission dominante (7 formes identifiées jusqu'à aujourd'hui) et de type 2 (10 formes identifiées jusqu'à aujourd'hui) quand elles sont à transmission récessive. La lettre ajoutée après le type de LGMD définit la protéine mutée à l'origine de la myopathie, la première à avoir été identifiée portant la lettre A. Notre étude porte sur la LGMD de type 1C, c'est donc une myopathie des ceintures autosomale dominante, due à des mutations sur la Cav-3 (tableau 6). Il s'agit du troisième type de LGMD à avoir été identifié.

Dans mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la mutation Cav-3^{P104L}. Il s'agit d'une substitution d'une Proline en position 104 par une

¹Le concentration normale de CK sérique est de 0-200 U/L. Les patients atteints de RMD présentent souvent un niveau de CK de l'ordre de 150 à plus de 1000 U/L. - 83 -

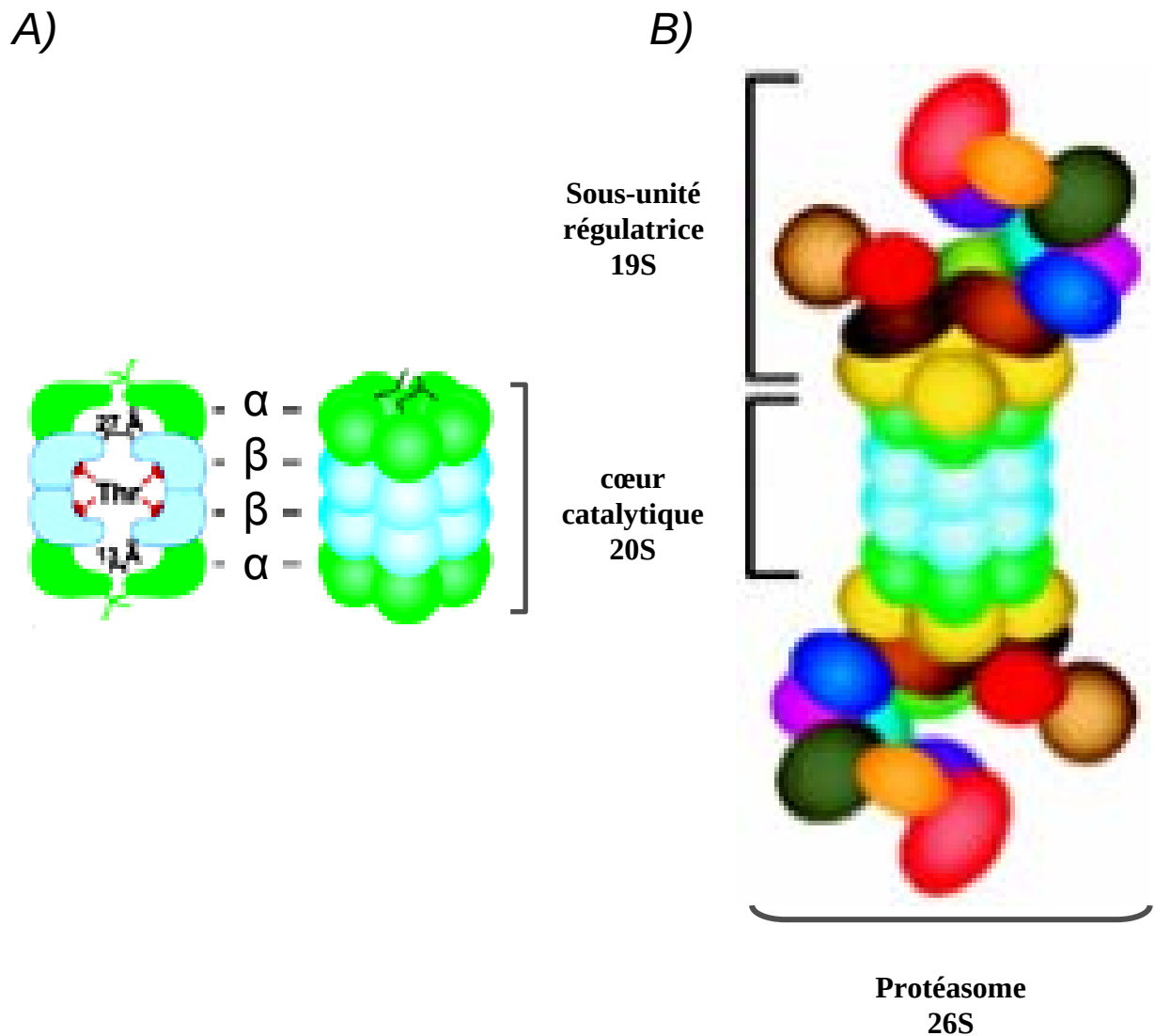


Figure 20. Structure du complexe du protéasome

- A) La sous-unité composant le cœur catalytique, ou sous-unité 20S, est constituée de 14 sous-unités différentes α et β assemblées en quatre anneaux.
- B) Le protéasome est un complexe multmérique comportant la sous-unité cœur catalytique de 20S et deux sous-unités régulatrices de 19S, le tout formant le complexe du protéasome ou protéasome 26S

Leucine. Cette mutation survient donc dans le domaine transmembranaire de la cavéoline (76-108 sur la Cav-3).

En 1998, l'équipe de Lisanti a identifié cette mutation au sein de deux familles italiennes présentant toutes les caractéristiques de la LGMD. L'analyse histologique de biopsies de muscles de ces patients a révélé que les cellules musculaires présentaient de 85 à 90% moins de cavéoline membranaire qu'un muscle sain (Minetti et coll., 1998). Cette équipe s'est alors intéressée à l'origine de cette déficience en cavéoline ainsi qu'à l'expression et à la localisation de la protéine mutée. Grâce à un système d'expression hétérologue dans les cellules NIH-3T3¹, ils ont notamment pu démontrer que la cavéoline mutée était retenue au niveau de l'appareil de Golgi où elle formait des hétéro-oligomères avec la cavéoline de type sauvage, endogène. Ces agrégats de haut poids moléculaire avaient une demi-vie très courte, abaissée à 45-60 minutes, soit 5 à 7 fois inférieur à la durée de demi-vie de la protéine native (Galbiati et coll., 1999).

Par la suite, cette même équipe démontra que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie protéolytique du protéasome (par exemple par le MG-132, le MG-115, la lactacystine) était capable de rétablir la Cav-3 de type sauvage à la membrane. Par ailleurs, la Cav-3 mutante se trouvait non plus localisé au niveau de l'appareil de Golgi, mais plutôt au niveau du réticulum endoplasmique. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome entraînait l'accumulation intracellulaire de Cav-3 ubiquitinylée. Suite à ces observations, les auteurs postulèrent que dans la LGMD-1C l'absence de Cav-3 s'explique par sa dégradation par le protéasome. Par ailleurs, ils conclurent également qu'il s'agissait vraisemblablement du mécanisme par lequel la Cav-3 mutante agissait de manière dominante négative, c'est-à-dire que l'allèle codant la protéine défectueuse est celui qui confère le phénotype dominant par inhibition de la fonction de la protéine codée par l'allèle sauvage.

Le stimulus activateur de la dégradation protéique serait une mauvaise conformation de la protéine mutante. En effet, une proline est un acide aminé introduisant des « coudes » dans la structure secondaire des protéines, il est ici substitué par une leucine, neutre en ce qui concerne la structuré secondaire des protéines. La Cav-3 ayant la propriété de s'homodimériser, l'association d'une cavéoline de type sauvage et d'une cavéoline mutante entraînerait la formation d'oligomères de haut PM, retenus au niveau de l'appareil de Golgi en l'attente d'être ubiquitinylés et dégradés par le protéasome.

Le système protéolytique du protéasome

Ce système étant directement impliqué dans la physiopathologie de la LGMD-1C, décrirai par conséquent rapidement sa structure et son fonctionnement général.

◇ **Structure du complexe du protéasome :** Le protéasome est en fait un complexe multimérique composé de 3 sous-unités : 1 sous-unité constituant le coeur catalytique du complexe, le protéasome 20S, porteur des activités protéolytiques, et de 2 sous-unités de 19S ayant une fonction régulatrice de l'activité catalytique de la 20S. Plus en détail, chaque protéasome 20S est composé de 14 sous-unités différentes assemblées en quatre « anneaux ». Les deux anneaux internes, constitués de sous-unités β , portent les sites actifs responsables des activités protéolytiques. Les anneaux externes sont formés de sous-unités α sur lesquelles se lient différents complexes régulateurs du protéasome 20S. L'empilement de ces anneaux délimite une structure symétrique de 26S avec en son centre une chambre catalytique renfermant au moins cinq activités peptidasiques de type trypsine, chymotrypsine et post-acide (figure 20). Le protéasome 20S est ainsi capable d'hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques. Les anneaux constituent une barrière physique limitant l'accès des substrats à la chambre protéolytique délimitée par les anneaux. Cette architecture complexe prévient tout d'abord l'hydrolyse incontrôlée des protéines intracellulaires. En effet, pour être dégradé, le substrat devra être dénaturé avant d'accéder à la chambre catalytique.

◇ **Fonctions générales du complexe protéolytique du protéasome :** ce système est également appelé système protéolytique ubiquitine¹-protéasome-dépendant. En effet, la protéolyse par ce système fait intervenir deux étapes :

- 1) l'ubiquitination des substrats contrôlée par les ubiquitine-ligases ;
- 2) la dégradation sélective des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S.

Cette voie de la protéolyse assure des fonctions de « ménage cellulaire » correspondant au renouvellement basal de la majorité des protéines tissulaires et à l'élimination des protéines anormalement conformées ou produites en excès. Il intervient également plus ou moins directement dans de nombreuses autres fonctions biologiques.

¹Les cellules NIH-3T3 représentent une lignée fibroblastique isolée à partir d'embryons de souris de souche NIH Swiss.

PROBLEMATIQUE

Bien qu'une absence de Cav-3 suite à des mutations de la Cav-3 constitue le facteur originel des cavéolinopathies, les mécanismes qui conduisent aux phénomènes de dégénérescence musculaire caractéristiques de cette pathologie restent à ce jour indéterminés.

Depuis quelques années, un nombre croissant d'études tendent à attribuer un rôle au calcium dans les phénomènes dégénératifs. Des perturbations de l'homéostasie calcique sont effectivement à l'origine de nombreux dysfonctionnements cellulaires et seraient impliquées dans les mécanismes généraux de dégénérescence musculaire des myopathies (Mallouk et coll., 2000; Rizzuto & Pozzan, 2003).

La $[Ca^{2+}]_i$ doit être finement régulée en terme de temps, d'espace et d'amplitude pour assurer une signalisation intracellulaire optimale. Du fait de l'importance du Ca^{2+} et des mécanismes complexes mis en jeu dans le maintien de l'homéostasie calcique, des mutations ou des anomalies dans une ou plusieurs des protéines impliquées dans ces mécanismes, pourraient être impliquées dans de nombreuses pathologies, telles que les myopathies.

En dépit de l'importance du Ca^{2+} dans la physiologie et la physiopathologie musculaire, il existe peu d'exemples de maladies génétiques pour lesquelles des altérations directes de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique ont été montrées comme étant responsables de la dégénérescence musculaire, probablement en raison du phénotype, souvent létal, qui en résulte. Il est également très plausible qu'un grand nombre de myopathies qui n'ont pas pour origine des mutations de protéines impliquées dans le maniement du Ca^{2+} présentent cependant des perturbations de l'homéostasie calcique.

Ainsi, c'est par l'étude d'une myopathie sévère dont la protéine défectueuse à l'origine de la maladie n'est pas impliquée dans l'homéostasie calcique, qu'est née l'hypothèse qu'une perturbation précoce de l'homéostasie calcique pourrait être responsable des phénomènes de dérégulation cellulaire tardifs aboutissant à la dérégulation musculaire.

En effet, cette hypothèse est apparue suite à l'observation que les muscles de patients atteints par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), la forme la plus fréquente et la plus sévère des myopathies, présentaient une accumulation de Ca^{2+} , et d'une manière générale, le contenu total en Ca^{2+} était augmenté d'un facteur de 2,4 dans les biopsies de

patients DMD (Betorini et coll., 1984 ; Jackson et coll., 1985) ainsi que chez la souris *mdx* (*muscular dystrophy X-linked*) le modèle murin de la DMD (Gailly et coll., 1993 ; Hopf et coll., 1996). Plus tard, des études sur cellules intactes ont montré que un niveau de Ca^{2+} intracellulaire de repos plus élevé dans des myotubes primaires de muscles de patients DMD et dans les fibres de souris *mdx* (Turner et coll., 1988 ; Fong et coll., 1990). Une surcharge calcique globale intracellulaire reste cependant sujette à controverse. En effet, l'équipe de Gillis (1996) n'a pas mis en évidence d'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni de manière chronique, ni après des stimulations répétées, peut être car cette surcharge serait restreinte au compartiment sous sarcolemmal (Mallouk et coll., 2000). Cette élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ serait directement responsable d'une élévation du catabolisme protéique.

Par ailleurs, de récentes études tendent à impliquer les cavéoles et la cavéoline dans l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique. Tout d'abord, l'identification d'une cavéoline spécifique du muscle soulève la question du rôle spécifique de cette protéine. En effet, une isoforme de la cavéoline, spécifique du muscle, nommée cavéoline-M ou Cav-3 a récemment été identifiée (Way & Parton, 1995). Au cours du développement musculaire, la Cav-3 et le calcium constituent deux éléments essentiels à la fusion des myoblastes. Par ailleurs, il a été montré que la Cav-3 s'associait au cours du développement avec les tubules transverses (Parton et coll., 1997). Les cavéoles sont par ailleurs situées de part et d'autre des entrées des tubules T et ces tubules dériveraient eux-mêmes de la fusion de plusieurs cavéoles eu cours du développement musculaire (Ishikawa, 1968). Enfin, il a été démontré au laboratoire que le traitement de fibres fœtales fraîchement dissociées par la Méthyl- β -cyclodextrine, un agent séquestrant le cholestérol, entraînait une diminution de la surface cavéolaire ainsi qu'une diminution de l'amplitude du courant calcique de type L, mais pas de type T (Pouvreau et coll., 2004).

D'un point de vue pathologique, la génération de souris CAV^{-/-} conforte l'idée d'un rôle de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique. En effet, ces souris présentent une forte diminution de la surface cavéolaire et une désorganisation du système T (Razani et coll., 2001). De plus, différentes pathologies rares telles que la myopathie des ceinture de type 1C (LGMD-1C), la maladie des muscles ondulants (RMD) ou l'hyperCKémie (HCK) ont pour étiologie commune une déficience héréditaire en Cav-3, due à des mutations sur le gène CAV3. Les maladies musculaires associées à la Cav-3 (les cavéolinopathies) sont toutes issues d'une mutation sur l'un des 12 acides aminés conservés quelle que soit l'espèce (Razani et coll., 2002). La plus fréquente de ces pathologies est la LGMD-1C. Jusqu'à

présent, 1 délétion et 6 mutations dans le gène CAV3 ont été identifiées comme étant à l'origine de la LGMD-1C. Parmi celles-ci, la mutation P104L, où une proline se substitue à une leucine en position 104, nous a plus particulièrement intéressés. En effet, lorsque cette mutation survient sur un seul allèle de CAV3, le phénotype myopathique l'emporte, d'où l'appellation de mutant dominant négatif.

Ainsi, l'objectif général de cette étude était de caractériser le rôle de la cavéoline-3 dans l'homéostasie calcique des cellules musculaires squelettiques.

Les principales voies d'entrée du calcium de l'extérieur vers le compartiment intracellulaire des fibres musculaires squelettiques sont représentées par les canaux calciques voltage-dépendants de type T et L. Alors que les deux types de canaux sont présents dans le muscle immature, seul le canal calcique voltage-dépendant de type L est présent dans le muscle adulte. Le maintien de l'homéostasie calcique est un facteur critique de la physiologie du muscle squelettique. Des altérations de cette homéostasie peuvent en effet être à l'origine de graves myopathies (Mallouk et coll., 2000; Rizzuto & Pozzan, 2003). De même, des mutations dans le gène CAV3 sont à l'origine de diverses myopathies (Volonte et coll., 2003). La mieux caractérisée des mutations de la Cav-3 est la substitution P104L, à l'origine d'un type de myopathie des ceintures : la LGMD-1C (Minetti et coll., 1998; Betz et coll., 2001). Ce mutant exerce un effet dominant négatif en formant des complexes instables avec la Cav-3 endogène, qui s'accumulent dans l'appareil de Golgi et sont dégradés par la voie protéasomale (Galbiati et coll., 1999a ; Galbiati et coll., 1999b ; Sunada et coll., 2001 ; Carozzi et coll., 2002).

Bien que de nombreuses études sur les cavéolinopathies aient été menées, les conséquences d'une déficience en Cav-3 sur l'homéostasie calcique du muscle squelettique n'avaient jusqu'à présent jamais été étudiées.

Notre travail a consisté ainsi plus spécifiquement à étudier les propriétés des canaux calciques voltage-dépendants dans des cellules musculaires squelettiques contrôles et exprimant le mutant pathologique dominant négatif Cav-3^{P104L}.

Ce travail comporte à la fois des approches électrophysiologiques, immunocytologiques et biochimiques. En fonction du système cellulaire d'étude et de l'approche, ce travail comporte trois parties :

1^{ère} partie : Quels sont les effets d'une déficience en Cav-3 sur l'homéostasie calcique du muscle squelettique ?

Nous avons en premier lieu travaillé sur des cultures primaires de myotubes squelettiques, car ce système se prête bien aux expériences d'électrophysiologie et présente un rendement de transfection suffisant pour notre étude. Cependant, les cultures primaires de myotubes représentent un système en cours de différenciation et la Cav-3 est elle-même impliquée dans les phénomènes de différenciation musculaire. Ce travail constitue le chapitre I.

Nous avons dans un deuxième temps également travaillé sur des fibres fœtales en survie, qui, bien que présentant un rendement de transfection moindre, présentent l'avantage d'être à un stade de maturation auquel les structures membranaires telles que les tubules T sont déjà présents et bien formés. Ce travail constitue le chapitre II.

Enfin, la mise au point du système de transfert de gène *in situ* par la technique d'électroporation nous a permis d'étudier les effets de l'expression d'une expression transitoire du mutant pathologique Cav-3^{P104L} sur un système totalement différencié, les fibres musculaires squelettiques adultes. Ce travail constitue le chapitre III.

2^{ème} partie : existe-t-il une interaction entre la Cav-3 et le DHPR dans le muscle squelettique ?

Les résultats obtenus dans la première partie suggèrent fortement une interaction entre la Cav-3 et le DHPR. La cavéoline est une protéine capable d'interagir et de réguler l'activité de nombreuses molécules. Plusieurs molécules sont d'ailleurs localisées dans les cavéoles et interagissent avec la cavéoline. Parmi ces molécules se trouvent des molécules des voies de signalisation cellulaires (Lisanti et coll., 1994), des enzymes (nNOS, Garcia-Cardena et coll., 1997), des protéines du cytosquelette (β -dystroglycane, Sotgia et coll., 2000), mais également des canaux ioniques tels que les canaux TRP (Brazier et coll., 2003), les KCa (Wang et coll., 2005).

Nous avons par conséquent analysé par différentes techniques si la Cav-3 et la sous-unité Ca_v 1.1 interagissaient. Grâce à une collaboration avec l'équipe de Michel Ronjat (Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, CEA Grenoble).

Ce groupe possédait les plasmides codant pour les différentes boucles cytoplasmiques du canal calcique de type L ainsi que la sous-unité β_{1a} sous forme de protéines recombinantes. Grâce à la technique de pull-down en utilisant les constructions du DHPR, combinées à une approche par co-immunoprécipitation de la Cav-3 dans des vésicules de triades, nous avons étudié si une interaction existait entre la Cav-3 et le canal calcique de type L ou β_{1a} .

3^{ème} partie : quels sont les effets cellulaires de nouveaux inhibiteurs du protéasome sur la restauration de Cav-3 endogène membranaire ?

Dans la LGMD-1C, la dégradation de Cav-3 sauvage exprimée par l'allèle non muté serait induite par la voie ubiquitine-protéasome qui serait responsable de la protéolyse du complexe oligomérique de Cav-3 sauvage avec la forme mutante P104L exprimée par l'allèle muté (Galbiati *et al.*, 2000). Cette hypothèse est soutenue par des résultats obtenus dans des cellules HEK (lignée cellulaire non musculaire) co-exprimant de façon ectopique la Cav-3 sauvage et le mutant Cav-3^{P104L} et dans lesquelles l'inhibition du protéasome par le MG132 a permis de reverser l'effet dominant négatif de P104L et de restaurer la localisation membranaire de Cav-3 sauvage (Galbiati *et al.*, 2000). Cependant aucun travail concernant l'importance du protéasome dans la dégradation de Cav-3 et les conséquences de son inhibition n'a été réalisé dans le muscle squelettique. Nous avons récemment initié une collaboration avec le groupe de M. Reboud-Ravaux du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle (FRE CNRS 2852, Université Paris 6), un laboratoire spécialisé dans la biochimie des protéases et de leurs inhibiteurs (Papapostolou *et coll.*, 2002). Jusqu'à présent, les inhibiteurs du protéasome décrits dans la littérature, comme la bortezomib, le MG-132 et la lactacystine, se lient de manière covalente aux sous-unités protéolytiques actives du protéasome et induisent la mort cellulaire par apoptose. Une des hypothèses actuelle est qu'une inactivation au contraire réversible et ponctuelle du protéasome pourrait notamment permettre de réduire les effets cytotoxiques des inhibiteurs (Groll *et coll.*, 2001) et ainsi permettre notamment leur utilisation dans de nouvelles voies thérapeutiques.

Le groupe de M. Reboud-Ravaux a ainsi conçu et caractérisé biochimiquement de nouveaux inhibiteurs du protéasome qui sont des analogues cycliques et linéaires de l'inhibiteur naturel non-covalent TMC-95A (Basse *et coll.*, 2006). Notre but est de tester si le traitement de cellules différenciées de muscle squelettique exprimant Cav-3^{P104L} par ces inhibiteurs pourrait restaurer activement l'expression sarcolemmale de la Cav-3 endogène sauvage et la fonction du DHPR.

MATERIEL 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.

1. Fibres intercostales fœtales en survie et culture primaire de myoblastes

1.1. Mise en survie des fibres intercostales fœtales

1.1.1. Animaux utilisés

Les expériences ont été réalisées sur fœtus de souris Swiss OF1 au stade embryonnaire E₁₈, provenant de souris à gestation datée, obtenues à la suite d'accouplement d'une nuit. E₀ est déterminé par la présence du bouchon vaginal le matin suivant la mise en accouplement (Charles Rivers, l'Arbresle, France).

1.1.2. Dissection des cages thoraciques de fœtus

La technique utilisée pour isoler les fibres intercostales embryonnaires a été décrite par Strube et coll. (1992). La composition des solutions utilisées pour la dissection est donnée dans le tableau ci-dessous.

Type de Tyrode	Composition
Tyrode 2,5 Ca²⁺ (mM)	135 NaCl ; 5 KCl ; 2,5 CaCl ₂ ; 1 MgCl ₂ ; 10 HEPES ; 10 Glucose ; 0,1 Thiamine ; 5 Pyruvate ; NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 ajusté avec NaOH
Tyrode 0 Ca²⁺ (mM)	140 NaCl ; 4 KCl ; 1 MgCl ₂ ; 10 HEPES ; 10 Glucose ; 0,1 Thiamine ; 5 Pyruvate ; NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 ajusté avec NaOH

Tableau 7. Compositions des tyrodes utilisés pour la dissection des cages thoraciques de fœtus de souris.

Une souris gestante au stade E₁₈ a été sacrifiée par dislocation cervicale, puis les fœtus ont été prélevés par laparotomie, déposés dans une boîte contenant un papier absorbant imbibé de tyrode, et maintenus à ~37°C sous lampe chauffante.

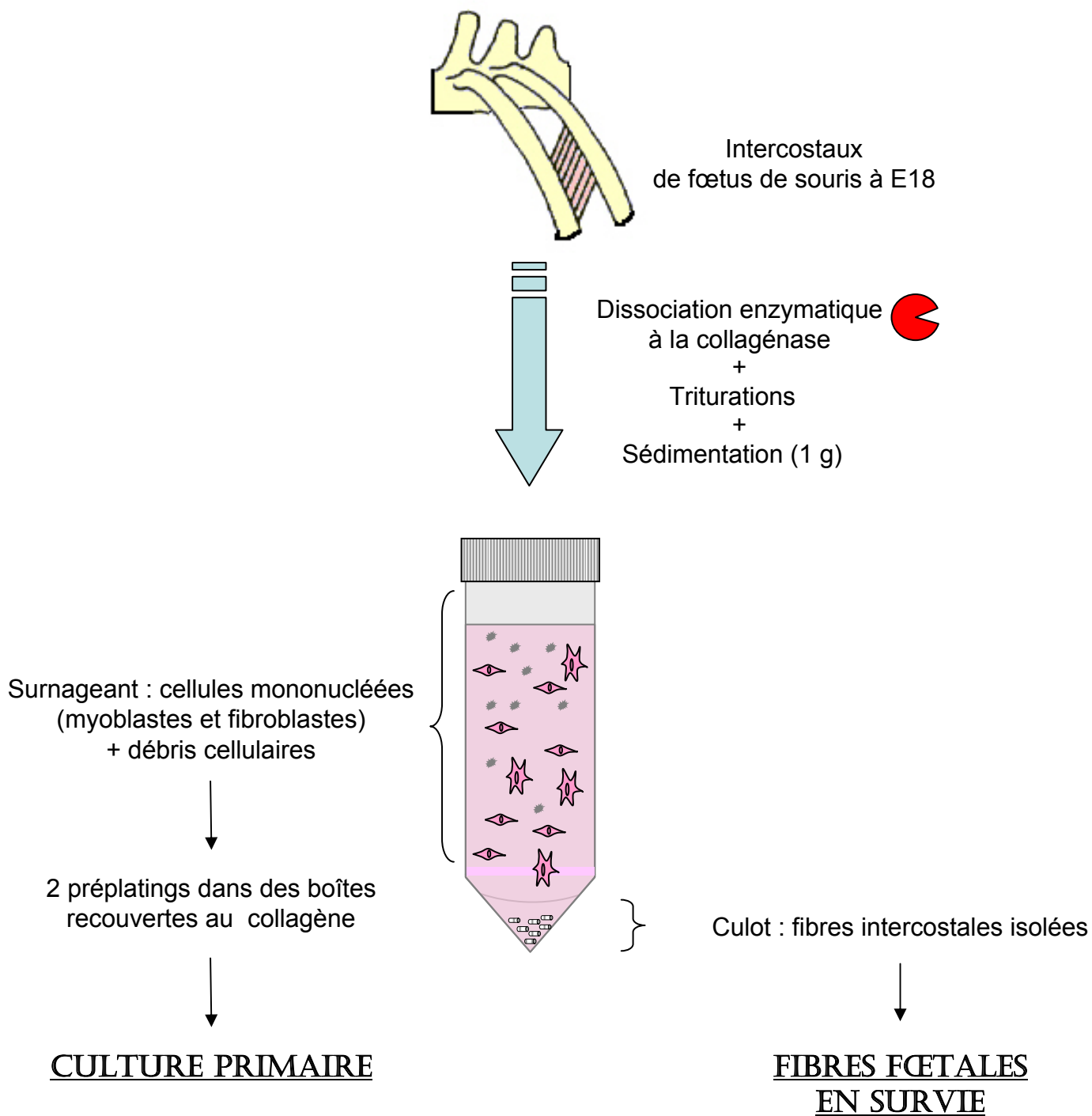


Figure 21. Schéma du protocole de survie et de culture primaire

Après prélèvement des cages thoraciques de fœtus de souris à E18, les cellules musculaires squelettiques fœtales de muscles intercostaux sont dissociées dans de la collagénase de type I, puis isolées par trituration. Les fibres sont ensuite séparées des cellules mononucléées grâce à une étape de sédimentation. Le surnageant, contenant les myoblastes, servira à l'établissement des cultures primaires après élimination d'une partie des fibroblastes par deux étapes de préplating, alors que les fibres fœtales contenues dans le culot seront mises dans des conditions propres à leur survie.

La dissection débute par le sacrifice du fœtus par décapitation. L'arrière train est ensuite coupé au niveau du bassin, laissant apparaître les viscères. Toutes les étapes suivantes ont été effectuées sous loupe binoculaire, dans du tyrode 2,5 mM Ca^{2+} supplémenté (tableau 7).

Le fœtus a été épinglé au niveau des épaules et des coudes par des minuties au fond d'une cuve tapissée de Rhodorsil. Le diaphragme ainsi que les viscères ont tout d'abord été retirés, puis une minutie mise dans la colonne vertébrale a permis de fixer la cage thoracique au fond de la boîte. La peau, puis les couches de muscle plaquées contre la cage thoracique ont été retirées à l'aide de microciseaux. La cage thoracique a ensuite été coupée de part et d'autre de la colonne vertébrale, puis plaquée sur le fond de la boîte afin de l'étendre au maximum. Les feuillets de fibres intercostales sont alors visibles. Les tissus adhérant à la cage thoracique, comme des fragments du diaphragme, ont été éliminés minutieusement et la cage a ensuite été coupée de part et d'autre du sternum en 2 demi-cages avant l'étape de dissociation enzymatique.

1.1.3. Dissociation enzymatique des fibres intercostales

Les fibres intercostales sont dissociées dans un mélange collagénase de type I (Sigma) et trypsine (Sigma) diluées dans du Tyrode sans Ca^{2+} supplémenté, à des concentrations de 3 mg/mL et 1 mg/mL respectivement, à raison de 1 mL de solution enzymatique pour 4 ½ cages. La dissociation a duré 14 minutes à 37°C, puis les demi-cages ont été rincées dans le Tyrode avant d'être triturées.

1.1.4. Dissociation mécanique et mise en milieu de survie des fibres intercostales

Toutes les opérations suivantes ont été effectuées dans des conditions stériles.

Le protocole d'isolement des fibres foetales pour la survie, résumé dans la figure 21, est inspiré du protocole décrit par Rahkila et coll. (1996). Pour 4 demi-cages thoraciques, la dissociation mécanique a été réalisée par 10 cycles d'aspiration/refoulement successifs à l'aide d'une pipette stérile de 10 mL dans un tube conique de 50 mL contenant 7 mL de milieu de prolifération pour culture primaire (tableau 8A). La suspension cellulaire a ensuite été transférée dans un tube de 15 mL contenant 8 mL du même milieu. Après une étape de

% (v/v)	Milieu de Prolifération	Milieu de Différenciation	Milieu de Congélation
DMEM	74,6	85	4 mL de THEM
L-Glutamine 1% final	1	1	-
Pen-Strep 100µg/mL final	0.4	0.4	-
HEPES 20 mM final	2	2	-
SVF	10	-	-
HS	10	10	1.5
EEC	2	1.25	0.5
DMSO	-	-	2

Tableau 8A. Composition des milieux pour la culture primaire de cellules satellites.

% (v/v)	Milieu de Prolifération	Milieu de Différenciation	Milieu de Congélation
DMEM	76,6	86,6	4 mL de THEM
L-Glutamine 1% final	1	1	-
Pen-Strep 100µg/mL final	0.4	0.4	-
HEPES 20 mM final	2	2	-
SVF	10	-	-
HS	10	10	1.5
DMSO	-	-	2

Tableau 8B: composition des milieux pour la culture de C2C12.

sédimentation de 15 minutes, le surnageant, contenant les débris cellulaires, mais également enrichi en cellules mononucléées telles que fibroblastes et cellules satellites, a été aspiré et le culot de sédimentation, enrichi en fibres fœtales, a été délicatement resuspendu dans 8 mL de milieu de survie (tableau 8A). Enfin, cette suspension cellulaire a été ensemencée dans des boîtes de culture à raison de 2 mL par boîte de culture de diamètre 35 mm (Corning) préalablement *coatées* (recouvertes) avec une solution à 0.01 % de collagènes (^m/_w dans de l'acide acétique 0,1 N ; Collagens from Calf Skin, Calbiochem).

1.2. Culture primaire

Pour réaliser la culture primaire de cellules satellites, le surnageant issu de l'étape de sédimentation a été soumis à 2 étapes de sédimentation de 10 minutes dans des boîtes de 75 cm² (Falcon) coatées au collagène (Collagen from Calf Skin, Calbiochem). Cette étape dite de « pré-plating » a pour but d'enrichir la préparation en cellules satellites par élimination des fibroblastes : ces derniers ayant une forte affinité pour le collagène, ils adhèrent en quelques minutes, alors que les cellules satellites restent en suspension.

Au terme de cette étape, 500 µL de la suspension cellulaire ont été déposés au centre de boîtes de 35 mm. Après 2 heures, soit le temps nécessaire à l'adhérence des cellules, 1,5 mL de milieu de prolifération a été ajouté.

Pour les cultures primaires comme pour les survies, les cellules ont été placées en incubateur à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, à 5 % de CO₂. Les milieux ont été changés quotidiennement.

1.3. Transfection des fibres fœtales en survie et des cultures primaires de myoblastes

1.3.1. Plasmides d'expression

Les plasmides d'expression contenant les ADN_C codant pour la GFP (pEGFP), la NLS-GFP (pNLS-EGFP) ainsi que la YFP (pEYFP) ont été obtenus chez Clontech.

L'ADN_C codant pour la Cav-3^{wt} marquée à la YFP et l'ADN_C codant pour la protéine de fusion associant Cav-3^{P104L} et l'épitope d'Hémagglutinine du virus Influenza au niveau C-

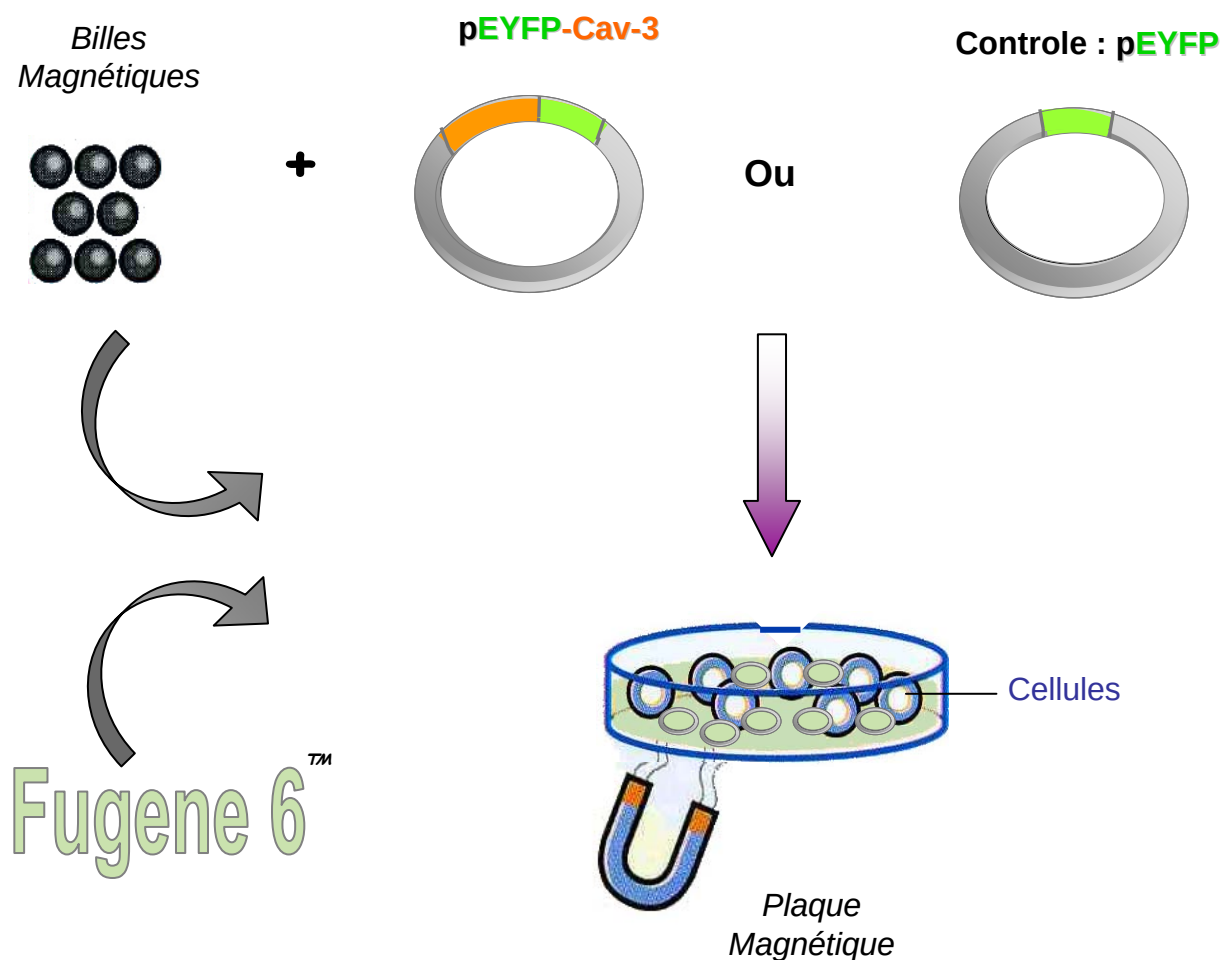


Figure 22. Schéma général du protocole de transfection par la technique de Magnétofection®

Le principe de la technique de Magnétofection consiste à former un complexe comprenant ADN plasmidique/nanoparticules de fer/agent transfectant (ici le Fugene 6). Sous l'effet d'un champ magnétique, ce complexe est adsorbé à la surface des cellules en culture, favorisant ainsi la pénétration de l'ADN et augmentant par conséquent le rendement de transfection.

terminal ("tag HA") ont tous deux été gracieusement fournis par R. Parton (University of Queensland, Australia).

La protéine de fusion Cav-3^{P104L} également taggée en C-terminale par la YFP a été obtenue par sous clonage de son ADNc dans le plasmide pEYFP en utilisant les sites de restriction Kpn I/BamHI.

1.3.2. Fibres fœtales en survie

Les fibres fœtales intercostales en survie ont été transfectées par l'un des plasmides d'expression à J₀+2, où J₀ = jour de mise en survie,

Une préparation lipidique, le FuGENE 6 (Roche), a été utilisée comme agent transfectant en proportions FuGENE : ADN de 3:1, soit 6 µL de FuGENE 6 dilués dans 94 µL de milieu sans sérum (DMEM) auxquels 2 µL d'ADN à 1µg/µL ont été ajoutés. Afin d'améliorer le rendement de transfection, nous avons utilisé la technique de magnétofection® (Oz Biosciences) qui consiste à complexer l'ADN et l'agent transfectant à des nanoparticules métalliques, qui, sous l'action d'un champ magnétique, entraînent l'adsorption de l'ADN à la surface des cellules et donc favorisent sa pénétration (Figure 22). Par conséquent, 2 µL d'une solution de nanoparticules de fer (CombiMag) ont été ajoutés au mélange ADN/FuGENE 6.

Le milieu de survie a tout d'abord été remplacé par un milieu contenant 10% de sérum de cheval décomplémenté, afin d'accélérer le métabolisme cellulaire et donc de favoriser la transfection. Les boîtes ont ensuite été déposées sur une plaque magnétique (Oz Biosciences) et le mélange ADN/FuGENE 6/CombiMag a été ajouté et l'ensemble placé dans l'incubateur. Après 15 minutes d'incubation, la plaque a été retirée et les cellules ont été remises dans l'incubateur.

Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu de survie. Les fibres ont été maintenues dans ce même milieu 5 à 6 jours avant d'effectuer les analyses cytologiques ou électrophysiologiques.

1.3.3. Cultures primaires de cellules satellites

Les myoblastes ont été transfectés à 70-80 % de confluence, soit environ 3 jours après mise en culture. La technique utilisée est la même que pour les survies, à savoir l'utilisation

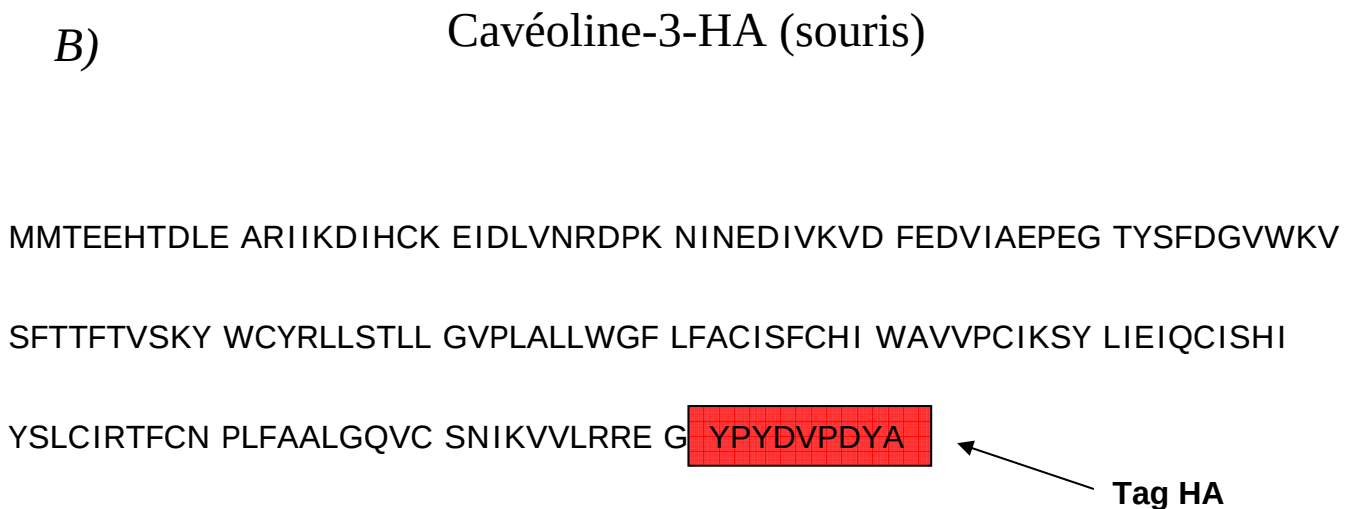
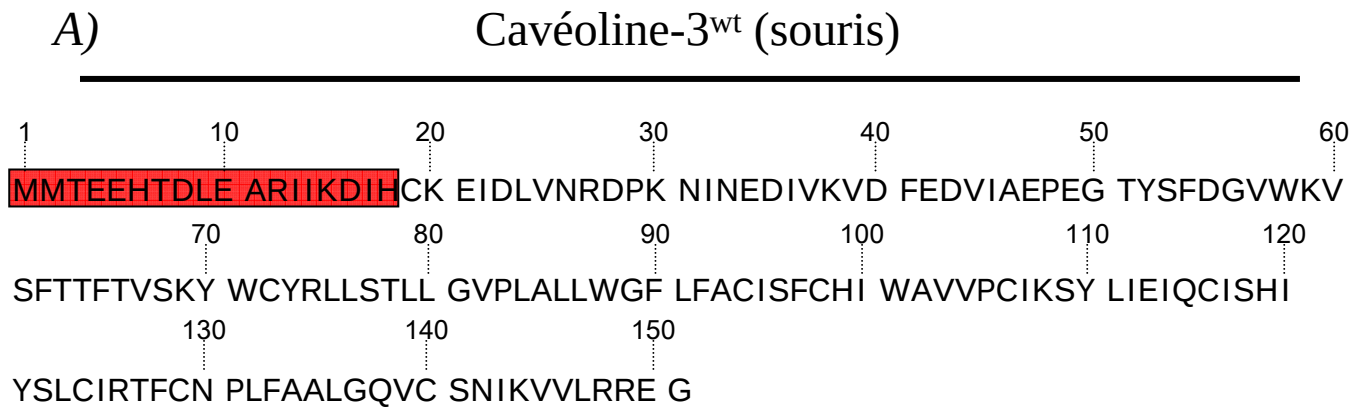


Figure 23. Epitopes de la Cav-3 reconnus par les anticorps utilisés

- A) L'anticorps anti-Cav-3 polyclonal est dirigé contre un épitope situé sur la partie N-Terminale de la Cav-3 (acides aminés 1-18).
- B) L'anticorps anti-épitope HA reconnaît le tag de la protéine de fusion Cav-3-HA situé sur sa partie C-terminale.

de FuGENE 6 combinée à la magnétofection. Toutefois, au moment de la transfection, le milieu de prolifération a été remplacé par un milieu de différenciation, plus pauvre en sérum, et qui induit la fusion des myoblastes en myotubes (tableau 8A). Les analyses cytologiques et électrophysiologiques ont été réalisées 4 à 6 jours après transfection.

1.4. Immunomarquage des fibres en survie et des myotubes en cultures primaires

1.4.1. Anticorps primaires

Un anticorps polyclonal spécifique de la Cav-3, dirigé contre un peptide comprenant les acides aminés 1-18, a été utilisé (PA1-066, Affinity Bioreagents).

Pour le DHPR, un anticorps monoclonal dirigé contre la sous unité Ca_v 1.1 du canal a été utilisé (clone mAB 1a ; Chemicon International).

Un anticorps monoclonal anti-épitope HA (Sigma) a été utilisé pour le marquage des protéines taggées HA.

Les caractéristiques de ces anticorps sont décrites dans le tableau 9, les épitopes contre lesquels ils sont dirigés sont schématisés sur la figure 23.

Anticorps primaires	Dilution	Hôte	Fournisseur
Anti-DHPR monoclonal clone mAB427	1/500	Souris	Chemicon
Anti-Cav-3 polyclonal	1/1000	Lapin	Affinity BioReagents

Tableau 9. Anticorps et dilutions utilisées pour les expériences d'immunocytochimie

1.4. 2. Anticorps secondaires et autres

Les divers anticorps secondaires ainsi que leurs conditions d'utilisation sont regroupés dans le tableau suivant.

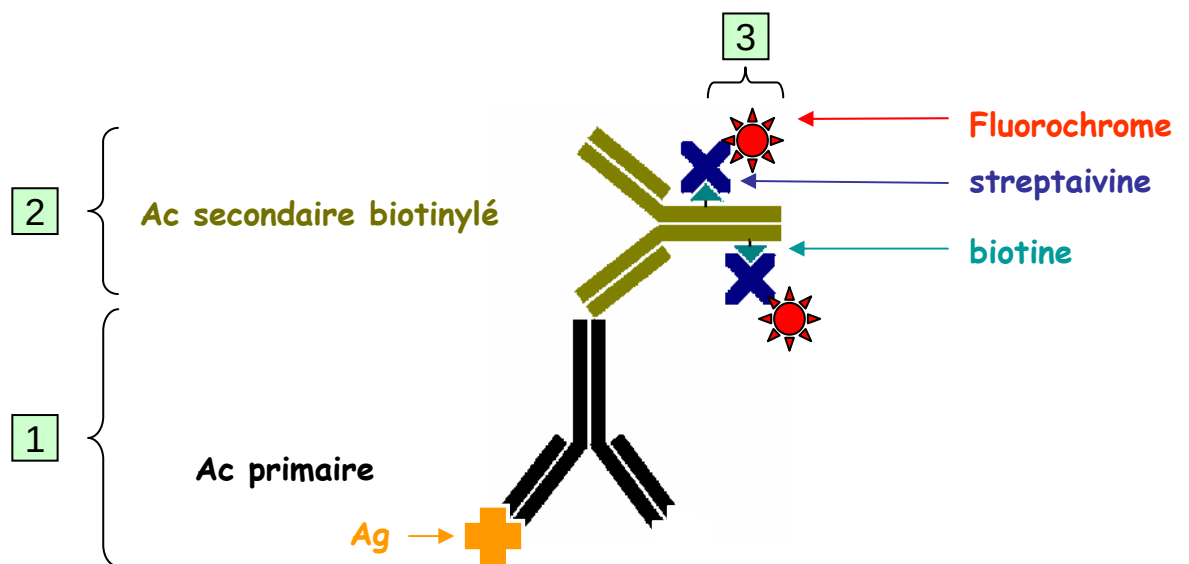


Figure 24. Schéma du principe de l'immunomarquage indirect avec amplification du signal

La technique d'immunomarquage permet d'identifier un antigène (Ag) au sein d'une population hétérogène, après fixation et perméabilisation de la membrane plasmique cellulaire si nécessaire. Dans la technique d'immunomarquage indirect, l'anticorps (Ac) marqué, ou Ac primaire, n'est pas spécifique de l'Ag mais un second anticorps dirigé contre l'Ac primaire). Dans la méthode utilisée ici, l'Ac secondaire est couplé à plusieurs biotines, ce qui permet d'amplifier l'intensité du signal. L'utilisation d'une streptavidine couplée à un fluorochrome permet alors la détection de l'antigène.

Anticorps secondaires et système d'amplification	Dilution	Hôte	Fournisseur
Anti-IgG de souris couplée à la biotine	1/400	Chèvre	Vector
Anti-IgG de lapin couplée à la biotine	1/1500	Chèvre	Vector
Streptavidine couplée au Cy3	1/1000	-	Vector
Streptavidine couplée à l' Alexa₄₈₈	1/2000	-	Vector

Tableau 10. Tableau récapitulatif des anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunocytochimie sur fibres fœtales en survie et cultures primaires.

Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS contenant 1% de sérum normal de chèvre (NGS).

1.4.3. Protocole d'immunomarquage

La technique utilisée est celle de l'immunofluorescence, visualisée par microscopie optique conventionnelle ou confocale. Le principe de cette technique, reposant sur les interactions antigène-anticorps, est schématisé sur la figure 24.

Les marquages ont été réalisés directement dans la boîte de culture. Brièvement, les cellules ont été rincées au PBS puis fixées par un mélange paraformaldéhyde 1%-glutaraldéhyde 0,01% et traitées au Triton X-100 0,01%.

Un premier blocage des sites aspécifiques a ensuite été réalisé par incubation des préparations en PBS + NGS 3%. Dans le but de minimiser d'avantage les marquages aspécifiques, deux techniques de blocage supplémentaires ont été utilisées. La première concernait toutes les préparations, elle consistait à bloquer les biotines endogènes par incubation des préparations dans une solution d'avidine (Vector Lab), puis à saturer les sites libres de l'avidine par une solution de biotine (Vector Lab).

La seconde technique de blocage consistait à saturer les sites non spécifiques par incubation des préparations avec une solution de PBS contenant 0,1% de BSA (albumine bovine sérique: *Bovin Serum Albumin* en anglo-saxon) et 3% de NGS (Sérum normal de chèvre : *Normal Goat Serum* en anglo-saxon).

Enfin, dans le cas des immunomarquages par des anticorps monoclonaux, une étape supplémentaire de blocage a été réalisée. Dans ce cas, les préparations ont été incubées dans une solution concentrée de protéines d'un kit Mouse-On-Mouse (MOM, Vector Lab) puis en présence d'une solution de MOM Diluent. L'utilisation de ce kit MOM permet en effet de limiter le marquage non spécifique dû à l'utilisation d'anticorps monoclonaux de souris sur des préparations de tissu de souris.

Toutes les préparations ont par la suite été incubées en présence de l'anticorps primaire pendant au moins 1 heure, puis 20 minutes avec les anticorps secondaires correspondants, conjugués à la Cyanine 3 (Cy3) ou à l'Alexa₄₈₈ pour les systèmes directs et conjugués à la biotine pour les systèmes amplifiés. Dans ce dernier cas, les préparations ont subi une incubation supplémentaire avec de la streptavidine conjuguée à la Cy 3 ou à l'Alexa₄₈₈.

En dernière étape, les préparations ont subi un marquage des noyaux au colorant nucléaire de Hoechst.

Enfin, les préparations ont été préparées pour l'observation en déposant une lamelle de verre sur les cellules préalablement recouvertes d'un milieu de montage « antifading » (Vectashield, VECTOR ou Dakocytomation, DAKO).

L'acquisition a été effectuée sur microscope confocal à balayage laser (Laser Scan Microscope LSM 10, ZEISS). L'excitation a été effectuée avec un laser argon et hélium-néon à 488 et 533 nm. Les prises de vues ont été collectées par utilisation de l'objectif 63x à immersion à huile.

2. Fibres adultes de muscle squelettique de souris

2.1. Animaux utilisés

Deux souches ont été utilisées en fonction des expériences effectuées. Soit des souris Swiss OF1 mâles, âgées de 8 à 10 semaines, élevées à l'animalerie du laboratoire (Université Claude Bernard). Soit, concernant les manipulations d'électroporation des muscles des pattes postérieures, des souris C57BL10 (Charles River Laboratories), âgées de 8 semaines et élevées à l'animalerie du laboratoire (Université Claude Bernard) ont été utilisées.

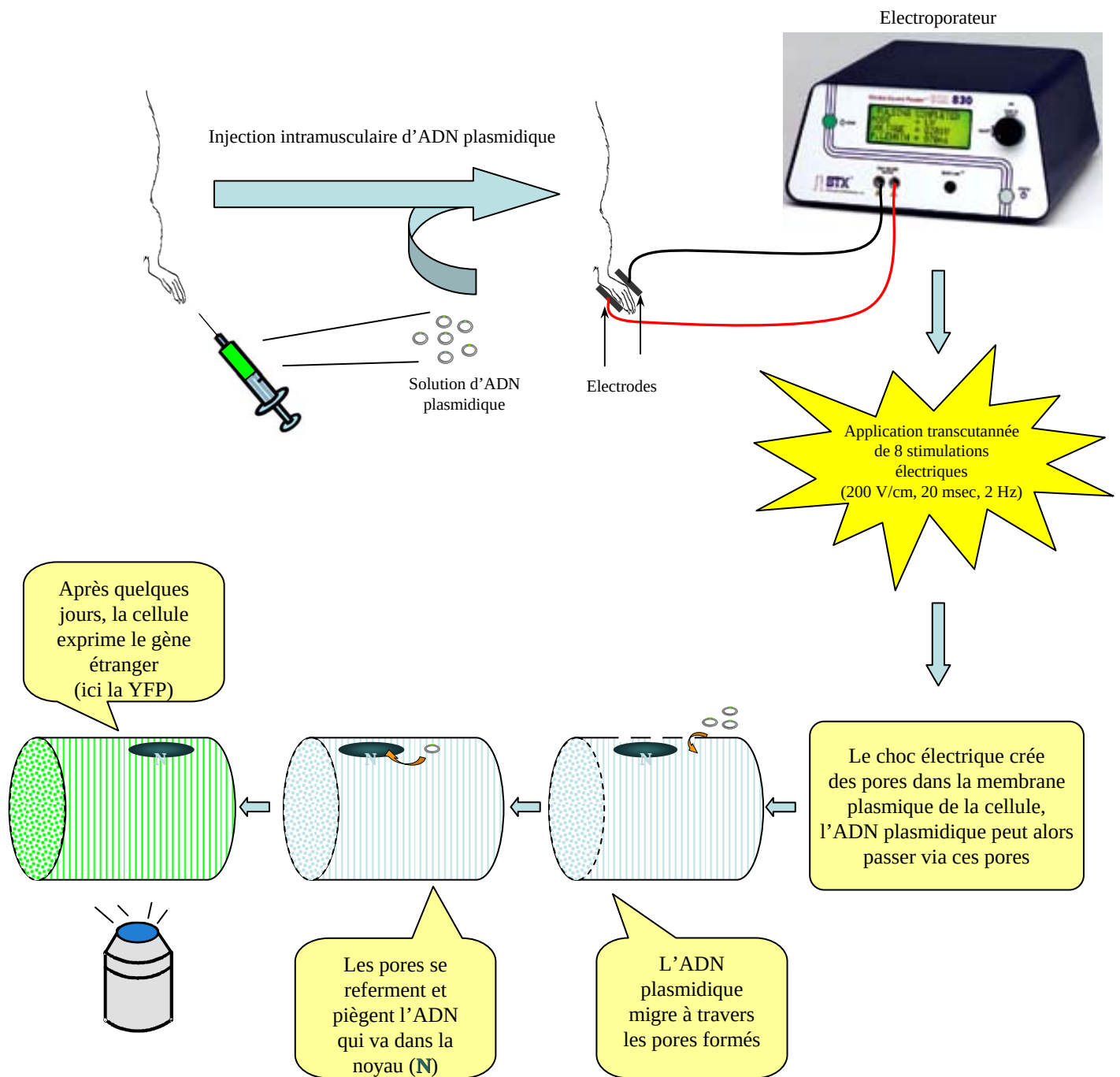


Figure 25. Principe du transfert de gène *in situ* par la technique de l'électroporation

Après injection d'ADN plasmidique dans la patte postérieure de la souris anesthésiée, deux électrodes reliées à l'électroporateur sont placées de part et d'autre de la patte. Un choc électrique constitué de 8 impulsions (200 V/cm, 20 msec, 2 Hz) est ensuite appliqué créant des pores dans la membrane plasmique par lesquels entre l'ADN, avant de pénétrer dans le noyau et permettant d'obtenir en quelques jours l'expression d'une protéine exogène.

2.2. Transfert de gène *in situ* dans les muscles des pattes postérieures par la technique d'électroporation

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de 16% d'Imalgène 500 (kétamine 5%, Merial, France) et de 8% de Rompun (xylazine 2%, Bayer, Allemagne) dilué dans du NaCl 0.9% stérile. Une dose de 10 µl/g d'animal a été injectée 5 minutes avant les injections de plasmides. Les mêmes plasmides d'expression que ceux utilisés pour les expériences de transfection des fibres embryonnaires et des cultures primaires ont été utilisés (*cf.* § 1. 2. 1).

La patte de la souris a ensuite été placée entre deux électrodes de platine reliées à l'électroporateur. Une goutte de solution saline a été déposée entre la patte et les électrodes afin d'augmenter la conductivité. Huit stimulations (90 V, 20 msec) ont alors été appliquées à une fréquence de 2 Hz, soit une stimulation toutes les 500 msec. Le principe de cette technique est résumé dans la figure 25.

2.3. Prélèvement des muscles des pattes postérieures

Les muscles ont été prélevés 15 jours après électroporation. Après sacrifice de la souris par dislocation cervicale, le Flexor Digitorum Brevis (*fdb*), puis le muscle Interosseux (IO) ont été prélevés. La localisation des muscles est schématisée sur la figure 26. Les muscles ont été conservés dans du Tyrode 2,5 mM Ca, à 4°C, avant de procéder à la dissociation enzymatique. Sinon, ils ont été immédiatement congelés selon la procédure décrite ultérieurement.

Le *FDB* est un muscle à contraction rapide, essentiellement composé de fibres rapides de type II (Henriksen et coll., 1990). Le muscle IO est un muscle apparaissant plus rouge que le *FDB*. Il est dit mixte, car il est constitué de fibres de types I et II dans un pourcentage non défini, que ce soit chez le rat ou chez la souris.

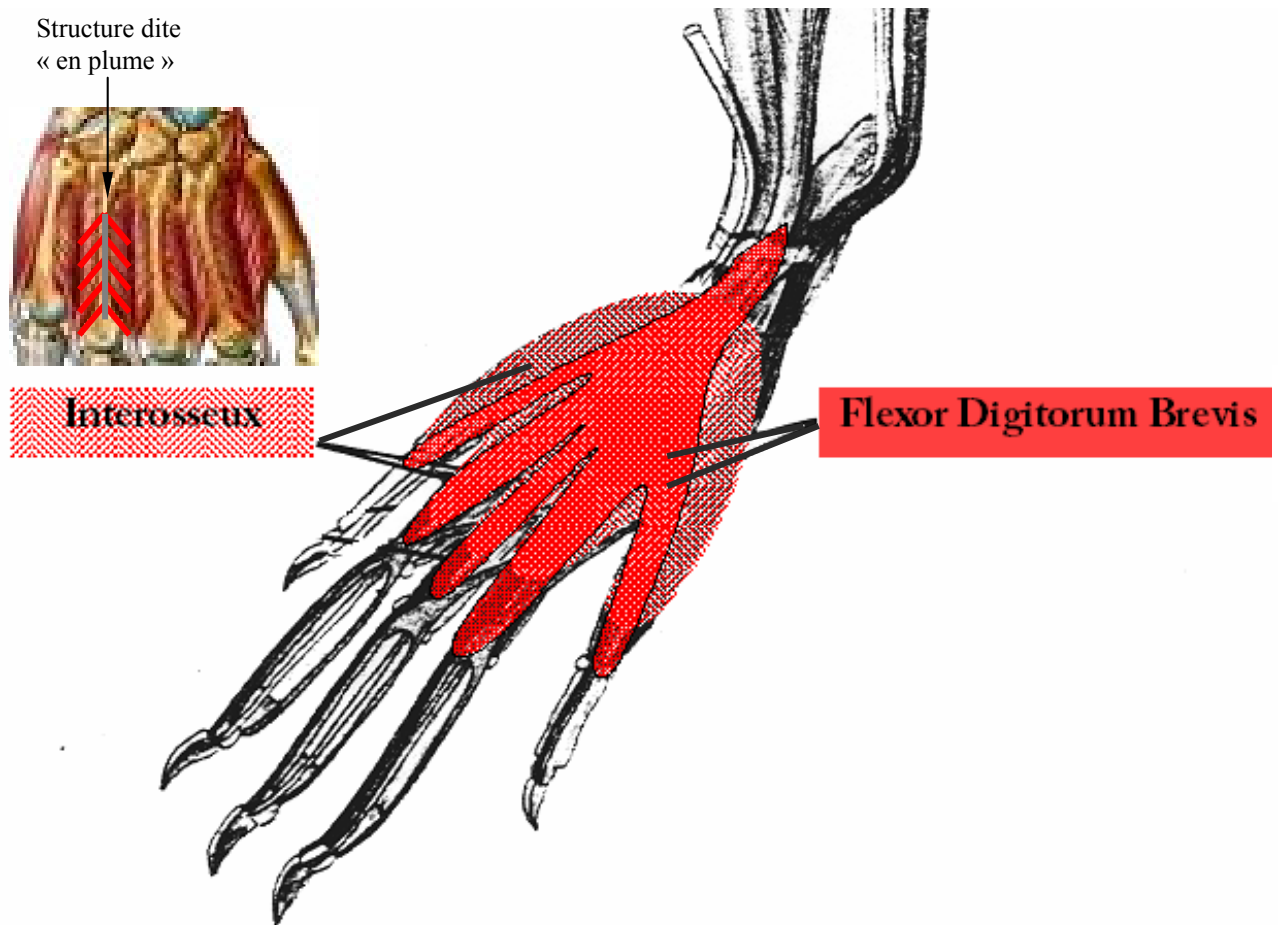


Figure 26. Localisation des muscles Interosseus et *Flexor Digitorum Brevis* dans la patte postérieure de souris

Le muscle Interosseus est un muscle palmaire, il a une structure très caractéristique dite « en plume » selon laquelle les fibres sont réparties obliquement de part et d'autre de fins tendons accolés aux os de la paume.

Le muscle *Flexor Digitorum Brevis* (ou muscle court fléchisseur du doigt) est quant à lui situé sous la peau de la paume, il comporte un tendon principal qui se ramifie dans chaque doigt de la patte.

2.4. Dissociation enzymatique des fibres musculaires adultes

2 IO + 2 *fdb* ont été dissociés dans 3 ml de collagénase type I (Sigma ou ICN) à 2 mg/ml pendant 60 minutes à 37°C.

La collagénase est une enzyme protéolytique qui catalyse la rupture des liaisons peptidiques du collagène et permet ainsi de détruire une partie de la matrice extracellulaire qui assure la cohésion des fibres au sein du muscle. Ce traitement enzymatique permet d'obtenir un grand nombre de fibres isolées (Bekoff & Betz, 1977). Cependant, il préserve la lame basale ainsi que l'intégrité des protéines membranaires et permet le maintien des propriétés électrophysiologiques des cellules.

La dissociation a été stoppée en transférant les muscles dans du Tyrode 2.5 mM Ca. Les muscles ont ensuite été mis à reposer au moins 1 heure à 4°C avant d'être dissociés mécaniquement.

2.5. Congélation et cryosections des muscles adultes

Après prélèvement, les muscles ont été enrobés d'un milieu cryoprotecteur (Tissue-Tek, Sakura Finetek), et congelés à l'isopentane refroidi à l'azote liquide pour ensuite être conservés à -80°C dans des cryotubes.

Des cryosections transversales de TA et tangentiels d'IO ou de *fdb*, de 5-7 µm d'épaisseur, ont été effectuées puis déposées sur des lames silanées et conservées à -20°C jusqu'à la réalisation du marquage immunohistochimique.

2.6. Immunomarquage des fibres squelettiques adultes

2.6.1. Anticorps primaires, secondaires et autres

Les anticorps utilisés pour ces expériences étaient en tous points identiques à ceux des cultures primaires ou des survies. Seules les dilutions des anticorps, récapitulés dans le tableau 11, différaient.

Anticorps secondaires et système d'amplification	Dilution	Hôte	Fournisseur
Anti-IgG de souris couplée à la biotine	1/250	Chèvre	Vector
Anti-IgG de lapin couplée à la biotine	1/500	Chèvre	Vector
Streptavidine couplée au Cy3	1/1000	-	Vector
Streptavidine couplée à l' Alexa₄₈₈	1/1000	-	Vector

Tableau 11. Anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunohistochimie sur fibres musculaires adultes.

2.6.2. Protocole d'immunomarquage

Le protocole d'immunomarquage sur cryosection est quasiment identique à celui décrit pour les cultures et les survies, si ce n'est que les coupes ont été réchauffées pendant 10 minutes, perméabilisées au méthanol à -20°C pendant 5 minutes, puis réhydratées au PBS pendant 10 minutes, avant d'effectuer le protocole d'immunomarquage proprement dit.

Un protocole d'immunomarquage sur fibres musculaires adultes isolées a également été utilisé. Pour cela, les muscles dissociés ont été triturés en tyrode, puis une goutte de suspension cellulaire a été déposée sur une lame préalablement traitée à la poly lysine et déposées sur une plaque chauffante à 37°C jusqu'à évaporation complète du liquide. Les lames ont enfin été stockées à -80°C en attendant tout traitement.

Au début de l'expérience d'immunomarquage, les cellules ont été réhydratées 5 minutes en PBS, puis fixées au PFA 1% ou au méthanol à -20°C pendant 5 minutes. Le méthanol agit sur les lipides et les protéines, il agit donc à la fois en tant que fixateur et perméabilisateur. Dans ce dernier cas, les cellules ont été réhydratées 10 minutes en PBS avant la suite de l'expérience, en tout point identique au protocole d'immunomarquage sur coupes.

L'observation des échantillons a été effectuée soit grâce à un microscope inversé à épifluorescence (ZEISS) couplé à un appareil photo numérique (Nikon), soit avec un microscope confocal à balayage laser (Laser Scan Microscope LSM 10, ZEISS).

3. Analyse de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR

3.1. La technique du pull-down

L'analyse "pull-down" est une méthode de chromatographie d'affinité qui implique l'utilisation de protéines cibles étiquetées ou marquées (appât) par un « tag » 6His, GST (Glutathion S-Transférase) pour créer une matrice d'affinité spécifique qui permettra la liaison et la purification des protéines en interaction (proies) dans un échantillon de lyse ou d'un autre mélange contenant des protéines.

3.1.1. Production de Cav-3

L'expression de cavéoline-3 recombinante entière par induction à l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside ; Sigma) s'étant révélée toxique pour les bactéries, nous avons dû trouver une méthode alternative pour produire la protéine. Cette autre méthode de production passe par un système acellulaire : les extraits de réticulocytes de lapin (Kit TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System; Promega). Ce système est couramment utilisé pour synthétiser des protéines marquées spécifiquement sur un acide aminé. En effet, le mélange d'acides aminés utilisés pour la traduction *in vitro* est privé d'un unique acide aminé. Si l'acide aminé manquant est radiomarké et rajouté extemporanément, il conduira à la synthèse d'une protéine radiomarkée.

Ainsi, il est possible d'obtenir une protéine non radiomarkée en mélangeant deux milieux d'acides aminés (l'un sans Met et l'autre sans Cys) pour la traduction *in vitro*, les deux milieux se complètent alors.

Pour la traduction *in vitro* de Cav-3, la réaction, dont le milieu réactionnel est donné dans le tableau ci-dessous, a duré 1h30 à 30°C.

	Traduction de Cav-3 « froide »	Traduction de Cav-3 « chaude »
Rabbit Reticuocyte Lysate	25 µL	25 µL
TNT® RNA polymerase	1 µL	1 µL
Mélange d'acides aminés sans Met, 1mM	1 µL	-
Mélange d'acides aminés sans Cys, 1mM	1 µL	1 µL
[³⁵S]cystein (>1,000Ci/mmol) 10mCi/ml	-	2 µL
TNT® Reaction Buffer	2 µL	2 µL
DNA template : pET-24a+cav-3 (0,5 µg/µL)	2 µL	2 µL
H₂O Nuclease free	18 µL	17 µL
Volume réactionnel final	50 µL	50 µL

Tableau 12. Composition du milieu réactionnel de traduction *in vitro* en extrait de réticulocytes de la Cav-3 en présence (traduction « chaude ») ou non (traduction « froide ») de radioactivité.

Sauf si cela est précisé autrement, pour les expériences de pull-down utilisant de la Cav-3 « froide », 10 µL de la traduction ont directement été ajoutés aux protéines immobilisées sur billes de glutathion-agarose..

Pour les expériences d'affinité, la traduction a tout d'abord été passée sur colonne NAPTM-10 (Amersham Biosciences). Cette colonne utilise le principe de chromatographie à retardement et permet d'éliminer les petites molécules, principalement la cystéine ³⁵S libre, qui sont éluées plus rapidement. La présence de cystéine ³⁵S libre apporterait en effet trop de signal de fond.

3.1.2. Purification des protéines de fusion

3.1.2.1. Purification des protéines de fusion GST

Les expériences de pull-down ont principalement été réalisées avec des préparations de boucles du DHPR taggées en GST, les billes Agarose-GSH présentant moins d'interaction

non spécifique que les billes Agarose-Ni²⁺ utilisées pour les protéines taggées 6His. Pour cela, toutes les boucles utilisées ont été sous clonées dans le vecteur pGEX-6P 1 (Amersham) permettant de synthétiser des protéines de fusion avec un tag GST en N-terminal.

Jour 1 : Les bactéries BL21(DE3) transformées ont été mises en culture dans 40 mL de LB medium + Ampicilline (0.1 mg/ml final), sous agitation sur la nuit à 37°C.

Jour 2 : Les 40 mL ont été transférés dans 400 mL de LB medium + Ampicilline (dilution 1:10) puis mis à pousser jusqu'à ce que la DO₆₆₀ atteigne 0.6-1.0, ce qui correspond approximativement au milieu de la phase exponentielle de croissance. L'expression des protéines recombinantes a ensuite été induite par ajout d'IPTG 1mM final pendant 3 heures à 37°C.

Les bactéries ont enfin été culottées par centrifugation pendant 10min à 4000 *g*. Les culots ont soit directement été utilisés pour la purification, soit stockés à -80°C.

Pour la purification, les culots congelés ont été décongelés sur la glace. Toutes les manipulations ultérieures ont été réalisées à 4°C

Un culot bactérien a été resuspendu et lysé dans 10 mL de tampon de lyse de composition suivante :

PBS	1x
MgCl₂	1 mM
DTT	0,01 %
DNAseI	20 µg/ml
Complete (Roche) inhibiteur d'antiprotéases	1 comprimé

Tableau 13. Composition du tampon de lyse des bactéries.

L'ensemble a ensuite été ajusté à 0.5% Triton X-100 avant sonication. La fraction insoluble, les débris cellulaires et les bactéries non-lysées ont été éliminés par ultracentrifugation 15 min à 60.000 *g* (4°C). Le surnageant, contenant les protéines solubilisées a finalement été aliquoté et conservé à -80°C.

Les protéines taggées GST ont ensuite été purifiées soit « en batch », soit par chromatographie Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) sur Äkta Purifier (Amersham).

- **Purification « en batch » :** le surnageant de l'ultracentrifugation a été mis à incuber 1h à 4°C en présence de 2 mL de billes Agarose-GSH préalablement équilibrées dans du PBS (suspension à 50% ; Sigma). Après 2 lavages avec 10 mL de PBS, les protéines de fusion ont soit été conservées sous forme accrochée aux billes ou ont été éluées par compétition avec du glutathion réduit (10 mM en solution dans 50 mM Tris-HCl, pH 9.5)
- **Purification par chromatographie FPLC :** dans ce cas, le surnageant de l'étape d'ultracentrifugation a été injecté dans l'Äkta. Cet appareillage a permis de générer un flux continu de solution de protéines recombinantes pour leur fixation sur une colonne de billes agarose-GSH (Amersham Biosciences) et d'éluer par paliers les protéines fixées tout en contrôlant leur élution par couplage avec un spectrophotomètre. Cette technique nous a permis donc d'une part d'éliminer un maximum de fixation non spécifique sur les billes d'agarose, et d'autre part d'éluer les protéines recombinantes dans un petit volume afin de les concentrer.

3.1.2.2. Purification des protéines de fusion GST-Cav-3^{wt}

Les constructions des protéines de fusion GST-cav correspondant à différents domaines de la cav-3^{wt} ont été effectuées comme suit : les domaines N-terminaux de la cav-3^{wt} (résidus 1-55 et 1-84) ont été séparément amplifiés par PCR et sous-clonés entre les sites de restriction EcoRI et XhoI dans le vecteur pGEX 6P-1 (Amersham). Ces vecteurs nous ont ainsi permis d'obtenir l'expression de protéines recombinantes cav-3 (1-55 ou 1-84) taggées en N-terminal par la GST. Ces fragments ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité sur billes de Glutathion-Agarose (GSH-Agarose, Sigma).

Le protocole de purification des fragments de la cavéoline est sensiblement différent de celui des boucles du DHPR, en raison de la mauvaise solubilité de la cavéoline. Le protocole de purification et d'extraction a été décrit par l'équipe de Lisanti (Li et coll., 1995). Brièvement, 500 mL de bactéries BL21(DE3) ont été inoculés par 50 mL d'une préculture d'une nuit ($1/10^{\text{ème}}$) et mis en cultures à 37°C, sous agitation. Quand la DO₆₀₀ a atteint environ

0.6, l'expression protéique a été induite par ajout d'IPTG à 0.25 mM final, et les cultures ont été remises à 20°C pour 16 heures supplémentaires. La faible concentration en IPTG (0,25 mM contre de 0,5 à 1 mM usuellement) ainsi que la basse température de croissance bactérienne (20°C au lieu de 37°C usuellement) permet d'augmenter la solubilité des protéines et ainsi de limiter la mortalité des bactéries. Après centrifugation 15 minutes à 4500 g, les culots de bactéries ont été rincés 2 fois dans un tampon Sodium-Tris-EDTA (STE) contenant 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 et 2 mM EDTA, puis congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à la purification.

Toutes les étapes d'extraction et de purification ultérieures ont été effectuées à 4°C, en présence d'antiprotéases dans toutes les solutions (Complete antiproteases cocktail, Sigma). Les bactéries ont d'abord été décongelées sur de la glace, resuspendues dans 15 mL de tampon STE, puis lysées par ajout de lysozyme (Sigma) à 500 µg/µL final, pendant 30 minutes sur la glace. Juste avant homogénéisation, le lysat a été ajusté à 1.5% de N-Lauroylsarcosine (Sigma), puis passés au Polytron (2 impulsions de 30 sec). L'ensemble a ensuite été clarifié par centrifugation 30 minutes à 20 000 g. Cette étape consiste à culotter la fraction insoluble contenant principalement les débris cellulaires (membranes qui n'ont pas été solubilisées par les détergents) mais aussi toutes les protéines insolubles, alors que les membranes solubilisées se retrouvent dans le surnageant. Celui-ci a alors été ajusté à 2% de Triton X-100, complété à 20 mL avec du tampon STE et mis en contact avec 2 mL de billes de GSH-Agarose à 50% dans du STE pendant 1h à 4°C, sous agitation dans une roue tournante. Au terme de l'incubation, les billes ont été rincées 3 fois avec du tampon STE, puis les fragments de cavéoline ont été élués par incubation des billes 5 minutes à 4°C, dans 2 mL de STE contenant 5 mM de Glutathion réduit (GSH) et 60 mM d'OctylGlucopyranoside, (Sigma), un détergent connu pour solubiliser les rafts lipidiques.

Pour certaines expériences cette dernière étape d'élution a été omise et les fragments de cavéoline ont été utilisés couplés aux billes de GSH-agarose. Les différentes étapes de la purification ont été évaluées par prélèvement de 50 µL de chaque fraction et analyse par SDS PAGE. Les échantillons ont été conservés à -20°C.

3.1.3. Pull-Down de la Cav-3 par Ca_v 1.1.

Toutes les solutions utilisées pour le pull-down ont été refroidies à 4°C et contenaient des antiprotéases.

La première étape a consisté à immobiliser les différentes parties de Cav 1.1 taguées GST sur des billes d'agarose-GSH (1h à 4°C). En fonction des expériences, 10 µL du produit de traduction *in vitro* de Cav-3 radiomarquée (estimation d'affinité) ou froide (pull-downs classiques) ont été rajoutés aux préparations immobilisées et l'ensemble a été complété à 500 µL final avec du tampon de saturation (PBS contenant de la BSA 10mg/mL + antiprotéases).

L'incubation entre les protéines a duré 2 h à 4°C, puis, après une étape de centrifugation (500g, 30 secondes), le surnageant, contenant les protéines non-fixées sur les billes, a été prélevé (fraction « flow through »).

Les billes ont ensuite été lavées 2 fois avec 1 mL de PBS+Triton 0,05% et ont été culottées. Le surnageant a été retiré puis 10 µL de tampon de dénaturation 6x ont été ajoutés au culot de billes afin d'éluer les protéines fixées. Les protéines ont finalement été analysées par western-blot après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les échantillons n'ont pas été dénaturés au bain-Marie bouillant comme il est commun de le faire avant la migration sur gel. En effet, la chaleur a pour effet de coaguler les extraits de réticulocyte ce qui d'une part empêche la dénaturation de la protéine traduite et d'autre part crée un culot insoluble. Les échantillons ont donc directement été chargés sur le gel de polyacrylamide.

3.2. La technique de co-immunoprécipitation

3.2.1. Préparation des vésicules de HSR

Toutes les étapes ont été effectuées à 4°C et toutes les solutions contenaient des inhibiteurs de protéases (Protease inhibitor cocktail, Roche).

Les vésicules de HSR (Heavy Sarcoplasmic Reticulum) sont des microsomes enrichies en réticulum sarcoplasmique. Ces microsomes ont été préparés à partir de muscle squelettique de lapin, selon un protocole décrit précédemment (Marty et coll., 2000). De manière synthétique, environ 1g de muscle est broyé dans 30 mL de tampon sucrose (sucrose 200 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 0.4 mM, pH 7.4), au Potter, puis l'ensemble est centrifugé 10 minutes à 1500 g pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est alors ultracentrifugé (50 minutes à 41000 g, 4°C) pour récolter les microsomes. Le culot d'ultracentrifugation, enrichi en microsomes, est alors resuspendu dans un tampon imidazole (sucrose 8%, imidazole

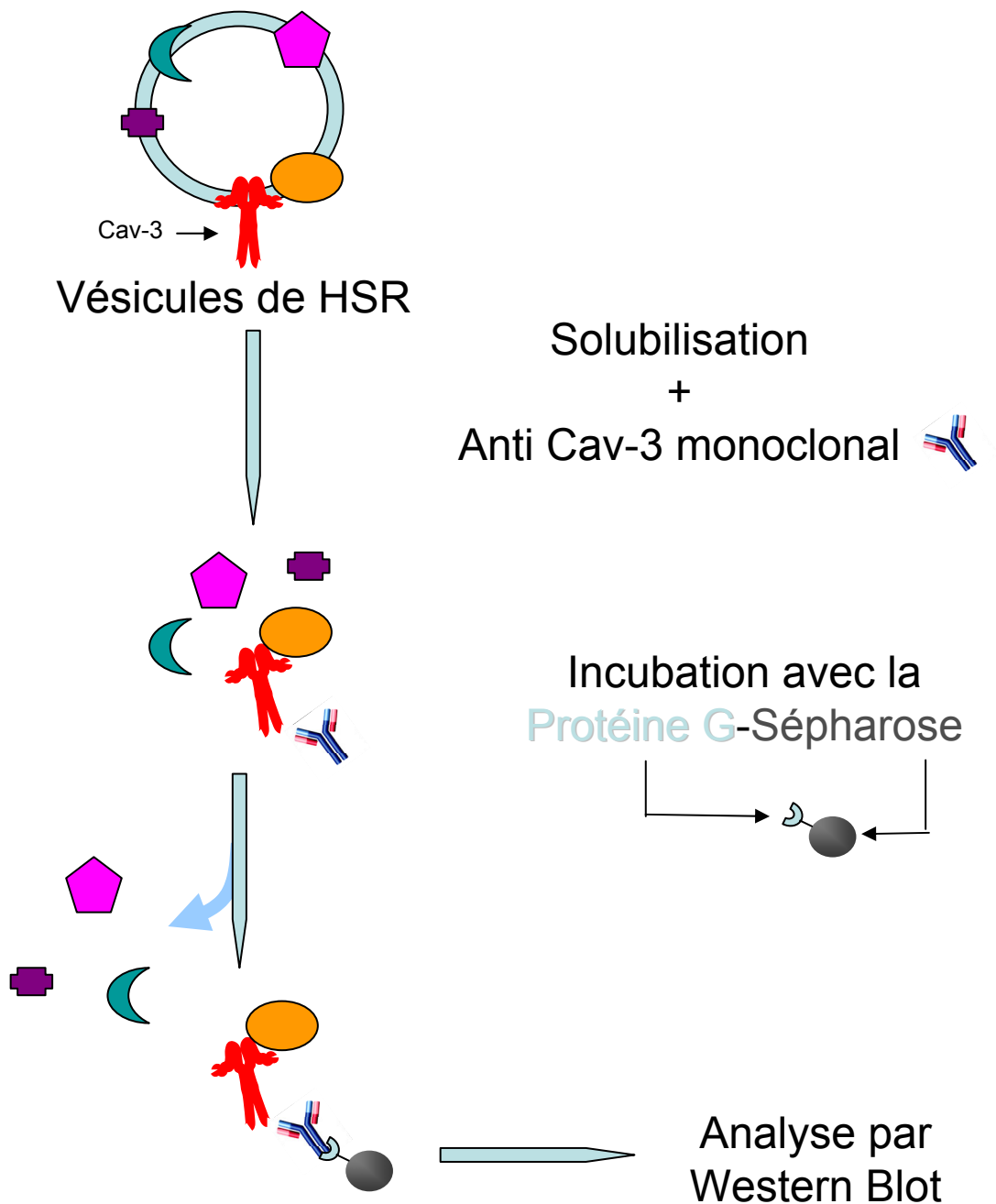


Figure 27. Schéma général du protocole de co-immunoprécipitation

Le principe de la technique repose sur la spécificité de l'interaction antigène/anticorps et protéine G/IgG. Grâce au couplage de la protéine G à des billes de sépharose, il est possible de précipiter un complexe comprenant l'anticorps, la protéine portant l'antigène et d'éventuels partenaires protéiques d'interaction. Dans notre cas, nous avons cherché à co-immunoprécipiter le DHPR et la Cav-3 à l'aide d'un anticorps anti-Cav-3 et la protéine G-sépharose.

30mM, 100 mM NaCl, pH 6.8), ajusté à ~10mg/mL dans ce même tampon et les aliquotes sont stockés dans de l'azote liquide.

3.2.2. La technique d'immunoprécipitation

Le principe de cette technique est résumé sur la figure 27. Cette technique repose sur la spécificité d'interaction entre un anticorps et l'antigène contre lequel il est dirigé. Par précipitation de cet anticorps, et donc de la protéine portant le site antigénique, il est alors possible de co-précipiter d'éventuel partenaires de la protéine cible. Ainsi, par la technique du western blot, il est alors possible de détecter si une protéine dont on cherche à déterminer si elle interagit avec la protéine portant le site antigénique est présente dans l'immunoprécipité.

3.2.2.1. Solubilisation des vésicules de HSR

Les microsomes sont des vésicules de bicouche phospholipidiques. La première étape consistait donc à solubiliser les protéines membranaires contenues dans les vésicules de HSR. Pour cela, les solutions de HSR ont été ramenées à 2 mg/mL dans un tampon de solubilisation.

Composés	Concentration finale
CHAPS	1,6 %
Lipides (Avanti polar lipids)	1 mg/mL
PIPES(Na)	20 mM
NaCl	900 mM
CaCl ₂	100 µM
EGTA	50 µM
Ajusté à pH 7,1 avec NaOH	
Remarque : $EGTA/CaCl_2 = 50,2 \mu M$ Ca libre	

Tableau 14. Tampon de solubilisation des vésicules de HSR.

Les protéines solubilisées ont ensuite été diluées dans 1 volume de PBS et 1 volume d'eau (concentrations finales : CHAPS 0,53% ; sels 0,4%).

3.2.2.2. Préparation des billes de protéine G-Sépharose (Sigma)

La protéine G est à l'origine une protéine de surface des streptocoques du groupe G, récepteur de type III des fragments Fc des anticorps de type IgG. Dans notre cas, elle a été couplée à des billes insolubles de résine de sépharose, ce qui a permis par simple centrifugation, de piéger un complexe antigène-anticorps par liaison non covalente.

Afin de diminuer au maximum les phénomènes d'interaction non-spécifique entre les protéines solubilisées et la protéine G-sépharose, les billes ont préalablement été saturées 1 heure à 4°C en présence de 10mg/ml de BSA (BSA IgG-free, Jackson Immunoresearch).

100 µL d'une suspension à 50% de protéine G-sépharose saturée ont été utilisés pour chaque immunoprécipitation.

Une étape de « pré-clearing » a ensuite été effectuée par incubation des HSR solubilisées avec 100 µL de protéine G-Sépharose (50% slurry, 1h à 4°C), afin de se débarrasser des protéines interagissant de manière non spécifique avec la protéine G et/ou la sépharose.

Après une étape de centrifugation (500g, 1 min) permettant de culotter les billes de protéine G –sépharose (fraction de pré-clearing), le surnageant a été incubé en présence de 5 µg d'anticorps anti-Cav-3 monoclonal, sur la nuit à 4°C. Un contrôle positif a été réalisé en remplaçant l'anti-Cav-3 monoclonal par un sérum non-immun (Non-immune mouse IgG, Interchim).

Au terme de l'incubation, le complexe anticorps-antigène formé a été piégé pendant 4h à 2°C par addition de 100 µL de protéine G-sépharose. Les billes ont ensuite été lavées 2 fois avec 1 mL de PBS. Après le dernier lavage, un maximum de liquide a été retiré, puis le complexe immunitaire a été dénaturé par ajout de 10 µL de tampon de dénaturation 6x (soit environ 1x final) : glycérol 10 %, β-mercaptoéthanol 5 %, SDS 2 %, Tris base 325 mM pH 11, DTT 160 mM, bleu de bromophénol).

Après 10 minutes, les échantillons ont déposés sur un gel d'acrylamide pour une analyse en western blot.

3.2.2.3. Analyse des produits de Co-IP par la technique de western blot

La technique du western-blot utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE = **SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**) pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.

Lors de nos expériences, les protéines ont été séparées sur un gel gradient 5-15%, particulièrement approprié pour la séparation de protéines ayant de PM très éloignés. En effet, nos protéines d'intérêt ont des PM très différents (~170 kDa pour Cav 1.1 et ~20 kDa pour la Cav-3). La migration a été réalisée environ 1 h à 40 mA jusqu'à ce que le front de migration contenant le bleu de bromophénol sorte du gel.

Les protéines séparées en SDS-PAGE ont ensuite été transférées sur des membranes d'Immobilon P (membrane PVDF, Millipore). Le transfert a été réalisé après avoir coupé le gel en deux au niveau du marqueur de PM de 75 kDa. Chaque partie de gel a ensuite été équilibré environ 5 minutes dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.025 %, méthanol 20 % (pour la Cav-3) ou 10% éthanol (pour le DHPR)). La membrane d'Immobilon P a été préalablement activée 1 minute dans du méthanol puis équilibrée dans le tampon de transfert, avant de réaliser un sandwich comprenant de la cathode à l'anode : papier Whatmann/ gel / Immobilon / papier Whatmann. Le transfert a duré 1h (400mA) pour le transfert concernant la moitié de gel contenant la Cav-3 ou 2h à 500 mA pour le transfert concernant la moitié de gel contenant DHPR. Dans ce dernier cas, le transfert a été effectué dans une cuve constamment refroidie par circulation d'eau.

Les membranes de PVDF ont ensuite été saturées la nuit à 4°C dans une solution de PBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait (Non Fat Dry Milk, Biorad).

Au terme de la saturation, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps spécifiquement dirigé contre la protéine à détecter (2h à température ambiante). Les anticorps ont tous été dilués dans la solution de saturation (anti Cav-3 polyclonal : 1/1000 ; anti DHPR N_{term} poly : 1/2500). Après 5 lavages de 10 min dans du PBS-Tween 0,1%, les membranes ont été incubées 1h en présence d'un anticorps secondaire, dilué dans du tampon de saturation, couplé à la peroxydase. Enfin, après 5 lavages de 10 min dans du PBS-T 0.1 %, les membranes ont été essorées sur du papier puis incubées 1 minute au noir dans le substrat de la

peroxydase (kit renaissance NEN, Perkin Elmer). Les membranes ont été emballées dans du film plastique puis exposées contre des films autoradiographiques.

3.3. Estimation de l'affinité entre la Cav-3 et la boucle I-II de Cav 1.1

Le protocole de pull-down décrit précédemment a été utilisé pour cette étude (voir § 1.5.3). Au terme du pull-down, au lieu d'analyser les protéines par western blot, 10 mL de cocktail à scintillation ont été ajoutés aux culots de billes, puis l'ensemble a été compté sur un compteur à scintillation.

Il est possible de détecter et de dénombrer des molécules radioactives en mesurant la quantité de leur produit de décomposition (particules α , β ou rayonnement γ).

Le compteur à scintillation est un spectromètre qui permet le dosage de radio-isotopes à émission bêta dans des échantillons.

Les radio-isotopes, en se désintégrant, émettent des particules d'un niveau d'énergie moyen qui leur permet d'obtenir une stabilité, ce qui entraîne par le fait même l'émission de radiation. Les différentes formes de radiations sont: électromagnétique (rayon gamma) et particulaire (désintégration alpha et bêta).

Le seul type de radiation que nous pouvons mesurer au laboratoire est la radiation particulaire bêta. Les échantillons doivent alors être mélangés avec un "cocktail de scintillation". Ce cocktail contient un solvant, un émulsifiant et du fluor qui transforme l'énergie émise par l'échantillon marqué, d'un isotope à émission bêta en énergie lumineuse qui est détectée par le compteur à scintillation. La quantité d'énergie émise est proportionnelle au nombre de photons produits.

La relation $(\text{cpm})=f([\text{GST/I-II}])$ a été tracée. L'équation utilisée pour obtenir le B_{max} et le K_d est la suivante :

$$y = (B_{\text{max}} * (L)) / (K_d + (L))$$

Où L est la concentration du ligand.

4. Electrophysiologie

4.1. Cellules musculaires squelettiques fœtales et myotubes primaires : la technique de *patch clamp*

Patch-clamp est un terme anglais désignant la technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Cette technique, mise au point par Erwin Neher et Bert Sakmann à Goettingue en 1976 (ce qui leur valut le prix Nobel de physiologie et médecine en 1991) consiste à isoler électriquement une surface réduite de membrane (patch) sous la pointe d'une micro-pipette en verre (diamètre de contact de l'ordre du μm) remplie d'une solution ionique de composition définie et contenant une électrode reliée à un amplificateur. Cette même électrode permet à la fois de contrôler le potentiel de membrane et d'enregistrer des courants ioniques. Cette technique permet d'étudier les mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques d'une cellule prise individuellement en permettant le suivi en direct des phénomènes d'ouverture des canaux. Cette technique permet d'atteindre un niveau de résolution tel que des courants de très faible amplitude (de l'ordre du pA) peuvent être enregistrés.

L'apport principal de cette technique, comparée à l'électrophysiologie intracellulaire, est l'obtention d'un *seal*, c'est-à-dire un scellement verre/membrane plasmique, en appliquant une légère succion dans la pipette, créant ainsi une résistance de l'ordre du giga Ω , on parle alors de « *gigaseal* ». Ce *seal* de forte résistance permet de réduire le bruit de fond provoqué par des fuites de courant non spécifiques entre la micropipette de verre et la membrane plasmique. Dans cette situation, la configuration est dite en cellule-attachée (*cell-attached* dans la littérature anglo-saxonne). Elle permet l'enregistrement de courants unitaires, c'est-à-dire l'étude des canaux ioniques au niveau unitaire tout en gardant l'intégrité de la cellule et les voies de signalisations intracellulaires.

Une autre possibilité à partir de la configuration cellule-attachée est de rompre le morceau de membrane sous la pipette, sans compromettre le scellement de la pipette sur la membrane, par application d'une nouvelle aspiration : c'est la configuration cellule-entière (*whole cell*). L'intérieur de la cellule est alors dialysé avec la solution contenue dans la pipette qui correspond à un milieu intracellulaire classique. Cette configuration permet l'enregistrement de courants macroscopiques, c'est-à-dire de l'activité électrique générée par l'ensemble des

canaux ioniques de la cellule. Toutefois, il est à noter que l'équilibre entre le milieu intracellulaire et le milieu intrapipette n'est pas atteint instantanément.

4.2. Cellules musculaires squelettiques adultes : la technique du silicone-clamp

Une fibre musculaire squelettique d'IO ou de *fdb* de souris adulte mesure de 0,3 à 1 mm de longueur pour 20 à 50 μm de diamètre. En ajoutant à cette taille importante la surface occupée par le système tubulaire transverse ($\sim 4,5 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ de sarcolemme ; Jacquemond, 1997), la surface de membrane est trop importante pour qu'une simple électrode de patch puisse imposer un potentiel uniforme sur toute la cellule. Par conséquent, la technique de silicone clamp permet de réduire la surface de membrane enregistrée par isolation électrique de la majeure partie de la cellule.

Une fois la cellule partiellement recouverte de graisse silicone, la pointe d'une micropipette (assemblage B-Si), contenant l'électrode connectée à l'amplificateur, est insérée à travers la graisse, directement dans le cytoplasme de la cellule, à une distance inférieure à 150 μm de la portion libre de la fibre. La graisse silicone permet d'éviter les fuites de courant entre la pointe de la pipette et le milieu extracellulaire et représente ainsi l'équivalent du *seal* obtenu selon la technique de *patch-clamp* entre la membrane plasmique et la pipette. Au moment où la pipette passe la membrane plasmique et se retrouve dans le cytoplasme, on observe un courant capacitif caractéristique, cette configuration s'apparente donc à la configuration d'enregistrement en « cellule-entière » de la technique de *patch-clamp*.

Les mesures électrophysiologiques selon la technique de silicone clamp que j'ai réalisées ont été effectuées sous la tutelle de Vincent Jacquemond, chercheur au laboratoire et spécialiste de cette méthode.

4.3. Dispositif expérimental et appareillage

Les postes d'enregistrement utilisés comprenaient :

- ◊ Un microscope à optique inversée (Nikon) ;
- ◊ Un micromanipulateur (Leitz) attenant au microscope et permettant de diriger la micropipette ;

- ◇ Un amplificateur Visual Patch (BioLogic, Claix, France), piloté par un ordinateur PC.

Les pipettes d'enregistrement ont été obtenues en étirant en 2 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 (Nirishige, modèle PP-83). Une fois remplies de milieu intrapipette, la résistance électrique de ces micropipettes variait entre 2 et 5 MΩ.

4.4. Solutions et milieux électrophysiologiques

Les compositions des solutions utilisées pour l'ensemble des enregistrements sont récapitulées ci-dessous.

Toutes les solutions ont été réalisées avec de l'eau déminéralisée, les milieux intrapipette ont été filtrés (seuil de filtration 0,22 µm²).

Les fibres musculaires squelettiques adultes ont été incubées en présence d'EGTA-AcétoxyMéthyl (ou EGTA-AM) pour les enregistrements de mouvements de charges. L'AcétoxyMéthyl est un groupement permettant aux molécules de diffuser à travers la membrane plasmique jusque dans le cytoplasme. Une fois dans la cellule, le groupement AM est clivé par diverses estérases, chargeant ainsi le cytoplasme en EGTA sans passer par une étape de microinjection. L'EGTA, agent chélateurs des ions divalents (Ca²⁺ ...) prévient de la contraction musculaire et de la déphosphorylation du DHPR provoquée par le Ca²⁺.

	Type d'enregistrement	Cultures primaires et survie	Fibres musculaires squelettiques adultes
Milieux intrapipettes (mM)	Courants calciques	110 Cs-Asp, 20 TEACl, 2 MgCl ₂ , 5 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7,2 ajusté avec CsOH	120 K-Glu, 5 Na ₂ -ATP, 5 Na ₂ -phosphocréatine, 5 Glucose, 5,5 MgCl ₂ , 5 HEPES, pH 7,2 ajusté avec KOH
	Mouvements de charges	-	
Milieux extracellulaires (mM)	Courants calciques	140 TEAMESO ₃ , 10 CaCl ₂ , 2 MgCl ₂ , 0,001 TTX, 10 HEPES, pH 7,4 ajusté avec TEA-OH	140 TEAMESO ₃ , 2,5 CaCl ₂ , 2 MgCl ₂ , 0,002 TTX, 1 4-AP, 10 HEPES, pH 7,2 ajusté avec TEA-OH
	Mouvements de charges	-	140 TEAMESO ₃ , 0,5 CaCl ₂ , 4 MgCl ₂ , 0,002 TTX, 0,3 LaCl ₂ , 1 CdCl ₂ , 10 HEPES, pH 7,2 ajusté avec TEA-OH
Tyrode		140 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl ₂ , 1 MgCl ₂ , 10 HEPES pH 7,4, ajusté avec NaOH	140 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl ₂ , 2 MgCl ₂ , 10 HEPES pH 7,4, ajusté avec NaOH

Tableau 15. Composition des différents milieux d'enregistrement

4.5. Mise en œuvre des manipulations et traitement des données

Tous les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués à température ambiante (20-23°C).

- **Préparation des cultures/survies** : avant tout enregistrement, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées deux fois avec du milieu d'enregistrement (milieu externe).

- **Préparation des cellules musculaires squelettiques adultes** : rappelons qu'à la fin de l'étape de dissociation enzymatique, les muscles dissociés ont été conservés dans du tyrode à 4°C. Les fibres ont ensuite été isolées par trituration douce, à l'aide d'une pipette de large diamètre, directement dans la cuve expérimentale contenant du milieu de culture MI199 (Eurobio) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal. La cuve expérimentale a préalablement été couverte d'une fine couche de graisse silicone (graisse silicone 70428 ;

Rhône-Poulenc). Le milieu de culture MI199 + 10% SVF est indispensable en raison de la contracture irréversible des cellules si elles entrent en contact avec la graisse silicone en milieu tyrode (Jacquemond, 1997). Les fibres sont ensuite individuellement recouvertes de graisses silicone soit manuellement par une seringue, soit à l'aide d'une micropipette de verre dont l'extrémité cassée permet l'écoulement de la graisse, provoqué par une pression générée par un système de microinjection (Picospritzer II ; General Valve Corporation). Au terme de cette opération ne doit rester en contact avec la solution extracellulaire qu'une portion restreinte d'une extrémité de la fibre, comprise entre 50 et 100 μm .

- **Acquisition et traitement des données :**

Pour les cultures primaires et les survies, les courants calciques voltage-dépendants de type L et T ont été enregistrés en configuration « cellule-entière » grâce aux protocoles de stimulation suivant :

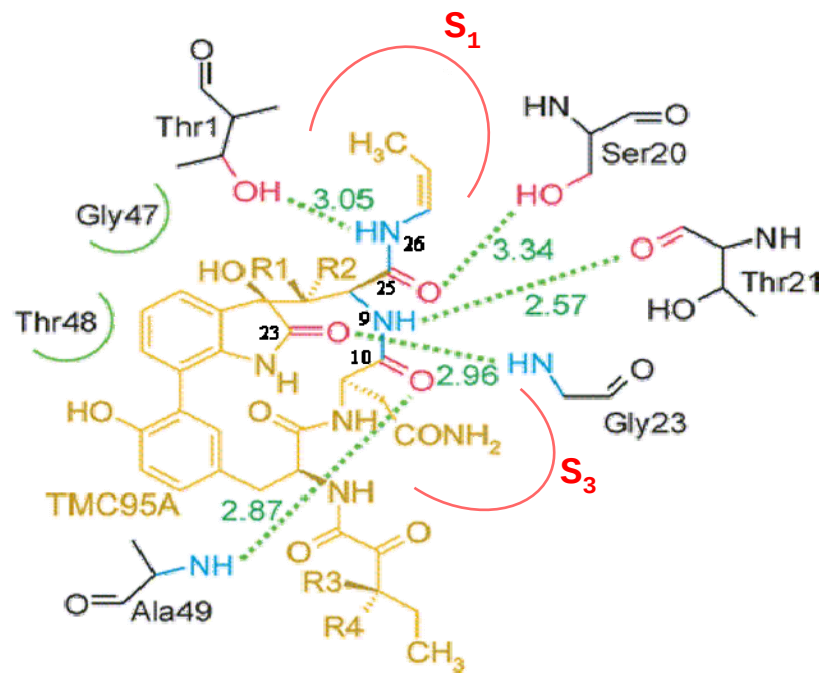
	$I_{\text{Ca, T}}$ et $I_{\text{Ca, L}}$	$I_{\text{Ca, L}}$
Potentiel de maintien (HP)	- 80 mV	- 40 mV
Nombre de pulses	13	9
ΔV pulse	10 mV	10 mV

Tableau 16. Résumé des protocoles utilisés pour l'enregistrement de $I_{\text{Ca, T}}$ et $I_{\text{Ca, L}}$ dans les cultures primaires de myotubes squelettiques et les fibres fœtales en survie.

Les données ont été analysées par le logiciel Microcal Origin version 7 (OriginLab).

Les valeurs de courant ont été exprimées en fonction de la capacité membranaire de chaque cellule, ce qui nous a ainsi permis de déterminer la densité de courant (en pA/pF), seul paramètre comparable entre les cellules car il permet de s'affranchir de la taille des cellules en ramenant le courant à une unité de surface. Toutes les cellules animales ont une capacitance spécifique de 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ de membrane. Cette capacitance a été déterminée par intégration d'une trace de courant contrôle obtenue suite à une dépolarisation de 10 mV à partir du potentiel de maintien.

A)



TMC-95A

B)

	K _i (nM)		
	CT-L	PA	T-L
TMC-95A	5.4	60	200

Figure 28. Structure du TMC-95A (A) et tableau récapitulatif de ses activités inhibitrices du protéasome (B)

A) Structure du TMC-95A estimée par co-cristallisation et interaction avec le site actif T-L du protéasome (d'après Groll et al., 2001). Le TMC-95A est un métabolite tripeptidique cyclique isolé à partir d'*Apiospora montagnei*. Il agit de manière non-covalente en inhibant l'activité Trypsine-like (T-L) du protéasome.

B) Paramètres mesurés pour les différentes activités inhibitrices du TMC-95A.

CT-L: chymotrypsine-like

PA : post acidic

T-L : trypsine-like

Par ailleurs, un pulse dépolarisant de 10 mV a été appliqué à partir du potentiel de maintien, permettant de déterminer le courant de fuite. Ce courant a ensuite été soustrait à toutes les traces de courants enregistrées en supposant une évolution linéaire du courant de fuite en fonction des dépolarisations.

L'amplitude des courants a été mesurée au pic et chaque courbe de voltage-dépendance du courant calcique de type L a été ajustée par l'équation :

$$I(V) = G_{\max}(V - V_{\text{rev}}) / \{1 + \exp[(V_{0.5} - V)/k]\}$$

équation 1

Où $I(V)$ représente la densité de courant mesuré en réponse à une dépolarisation au potentiel V ; $G_{\max}$ représente la conductance maximale ; V_{rev} représente le potentiel d'inversion apparent, $V_{0.5}$ représente le potentiel de demi-activation ; et k représente un facteur de pente.

La courbe de voltage-dépendance de la conductance calcique a été calculée par l'équation 2 :

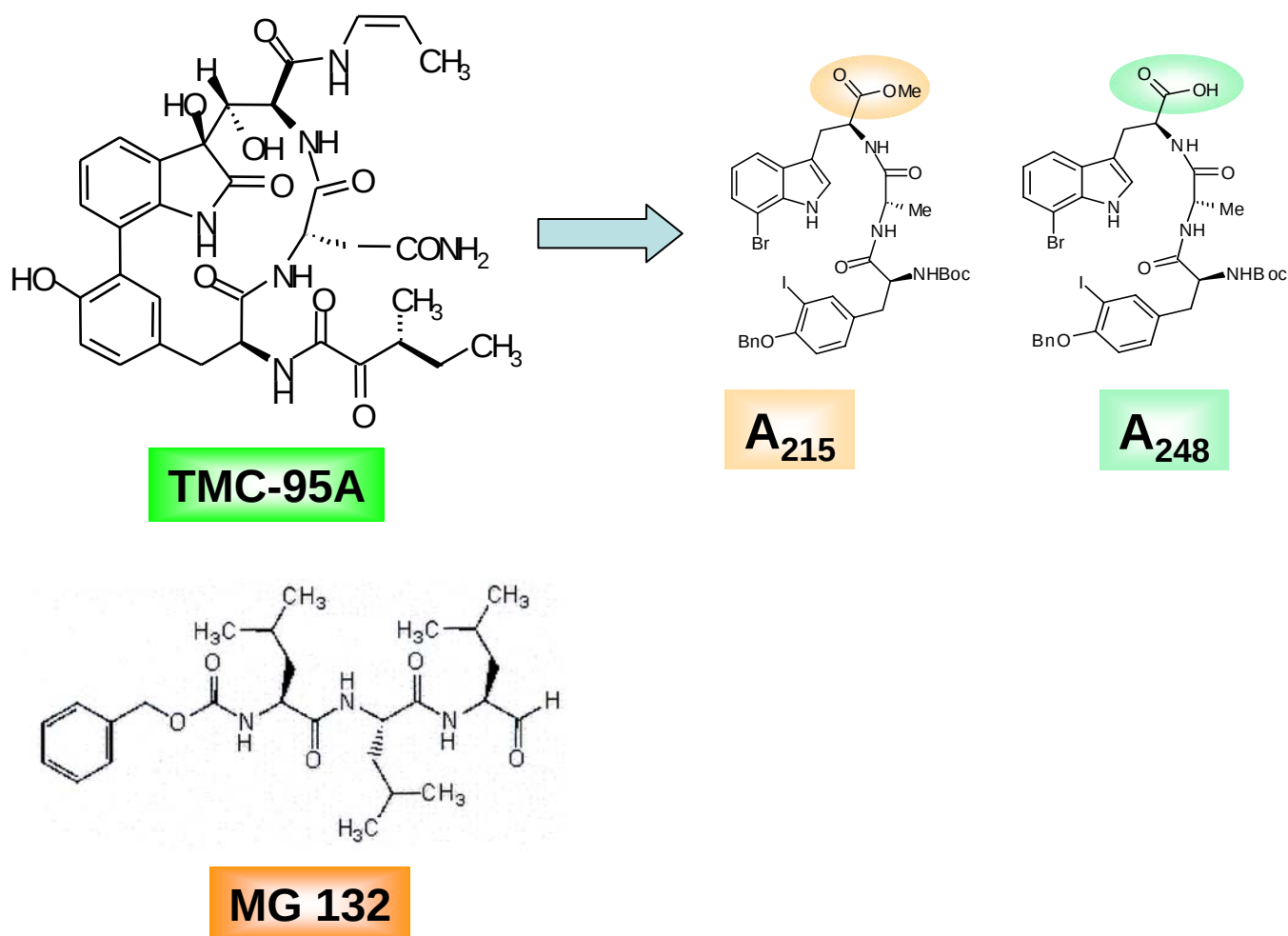
$$G(V) = I(V) / G_{\max}(E - E_{\text{rev}})$$

équation 2

5. Etudes de nouveaux inhibiteurs du protéasome

L'objectif général de cette étude était ici de caractériser de nouveaux inhibiteurs du protéasome, agissant de manière réversible en n'établissant pas de liaison covalente avec le protéasome

Un inhibiteur naturel, le TMC-95A avait déjà été caractérisé (Groll et coll., 2001 ; figure 28). Cet inhibiteur, bien que non covalent et agissant spécifiquement sur les trois activités protéolytiques du protéasome présente l'inconvénient d'être difficile et par conséquent long à synthétiser. Deux molécules, A215 et A248, ont alors été synthétisées par simplification de la structure du TMC-95A et ont démontré une activité inhibitrice spécifique sur les activités enzymatiques protéasomales. Ces manipulations ont été réalisées par des chimistes et biochimistes parisiens avec lesquels nous avons collaboré. La structure de ces molécules et leurs caractéristiques sont résumées figure 29.



Composés	M (g/mol)	IC ₅₀ activité CT-L (μM)	IC ₅₀ activité PA (μM)	IC ₅₀ activité T-L (μM)
A215	883.5	6.8	11.3	14.4
A248	847.5	ni	32% à 100 μM	ni
MG132	475.2	0.024	2.2	9.2

Figure 29. Structures du MG132, du TMC-95A, de ses deux composés dérivés A₂₁₅ et A₂₄₈, et leurs caractéristiques

Le TMC-95A est un composé tripeptidique, cyclique. Plusieurs molécules dérivées du TMC-95A ont été synthétisées. Parmi celles-ci, deux composés (A215 et A248) obtenus par simplification (linéarisation) du squelette du TMC-95A présentaient de bonnes activités inhibitrices des activités protéolytiques du protéasome.

Le MG132 est un inhibiteur covalent commercial.

L'activité cellulaire de ces inhibiteurs non-covalents a par la suite été étudiée au laboratoire. Ces molécules ont été utilisées pour traiter des myotubes C₂C₁₂ en culture transfectés par le mutant dominant négatif Cav-3^{P104L}-YFP, afin d'analyser si ces molécules étaient capables d'inhiber l'effet dominant négatif, c'est-à-dire la dégradation de la Cav-3 sauvage endogène par le protéasome.

La molécule dont nous nous sommes servis en tant que référence est le MG132 (Calbiochem). Cet inhibiteur est dit covalent puisqu'il inhibe l'activité du protéasome en créant des liaisons covalentes avec les sites actifs des protéases.

5.1. Culture, transfection et traitement de cultures de C2C12

Des cellules C₂C₁₂ au stade myoblaste ont étéensemencées dans des boîtes de culture de diamètre 35 mm (Corning) à raison de 50 000 cellules par boîte. Après quelques jours en milieu de prolifération (tableau 8B), les cellules atteignent 70% de confluence. Elles ont alors été passées en milieu de différenciation (tableau 8B) et simultanément transfectées selon la même méthode que celle utilisée pour les cultures primaires (*cf.* § 1.2).

Après 5 jours de différenciation, les cultures ont été traitées avec 5 ou 10 µM d'inhibiteurs de protéasome. Les inhibiteurs n'étant solubles qu'en DMSO, un contrôle a été effectué en ajoutant dans le milieu de culture le volume de DMSO correspondant à celui utilisé pour les inhibiteurs

Quel que soit le stade de différenciation, les cellules ont été placées en incubateur à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau, à 5 % de CO₂. Les milieux ont été changés quotidiennement.

5.2. Immunomarquage de la Cav-3 sur cultures de C2C12.

Nous avons scrupuleusement suivi le même protocole d'immunomarquage que celui utilisé pour les cultures primaires de myotubes squelettiques (*cf.* § 1.3). Les anticorps, leur concentration, leur source étaient également identiques.

Les préparations ont enfin été observées sur microscope à épifluorescence (Zeiss).

L'estimation des effets des inhibiteurs de protéasome a été évaluée en comptant sur x myotubes transfectés par la Cav-3^{P104L}-YFP le nombre de myotubes présentant un marquage de la Cav-3 à la membrane, puis en ramenant ce chiffre à 100 myotubes afin d'obtenir un pourcentage d'effet.

6. Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ SEM (écart à la moyenne). Les courbes ont été ajustées selon la méthode des moindres carrés, grâce à un algorithme classique Marquardt-Levenberg inclus dans le logiciel Microcal Origin. Les données ont été analysées à l'aide d'un test t non-apparié de Student. Les valeurs ont été considérées comme significativement différentes pour $P < 0,05$.

1^{ère} partie, Chapitre I

Rappel de la problématique spécifique : Quels sont les effets d'une déficience en Cav-3 sur l'homéostasie calcique de myotubes primaires squelettiques ?

Ce premier chapitre a pour but d'étudier les propriétés des canaux calciques voltage-dépendants dans des myotubes primaires squelettiques exprimant le mutant dystrophique de la cavéoline-3, la Cav-3^{P104L}. Grâce à une approche immunocytochimique, ce chapitre vise également à caractériser les effets de l'expression de Cav-3^{P104L} sur l'expression fonctionnelle des canaux calciques voltage-dépendants.

- I -

RÔLE DE LA CAVÉOLINE-3 SUR LA FONCTION DES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DÉPENDANTS DANS DES CULTURES PRIMAIRES DE MUSCLE SQUELETTIQUE.

1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 et du DHPR dans les myotubes de cultures primaires de muscle squelettique et les fibres musculaires squelettiques fœtales en survie.

Cette partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus par immunolocalisation de nos deux protéines d'intérêt, à savoir la Cav-3 et le DHPR. Cette étude a porté sur des myotubes de cultures primaires de muscle squelettique. Pour cela, des cellules satellites ont été isolées à partir de muscle intercostale de fœtus de souris à E₁₈, puis mises à proliférer en culture (cf. Matériel et Méthodes § 1.1.2). Quand les cellules arrivaient à 70-80% de confluence, elles ont été passées en milieu de différenciation. Après 5 jours de différenciation, nous avons procédé aux enregistrements électrophysiologiques ou aux analyses immunochimiques. Les myotubes possèdent alors environ une dizaine de noyaux (figure 30), certains présentent même des contractions spontanées.

Les myotubes primaires présentent l'avantage de bien se prêter aux expériences d'électrophysiologie, car le *seal* entre la pipette et la membrane cellulaire est de bonne qualité ($> 1 \text{ G}\Omega$).

De plus, les cultures primaires ont l'avantage de présenter un taux de transfection de l'ordre de 10%, ce qui est suffisant pour effectuer cette étude. L'inconvénient principal de ce système est d'être en cours de différenciation, si bien qu'un éventuel « effet différenciation » doit être considéré au moment de l'analyse des résultats.

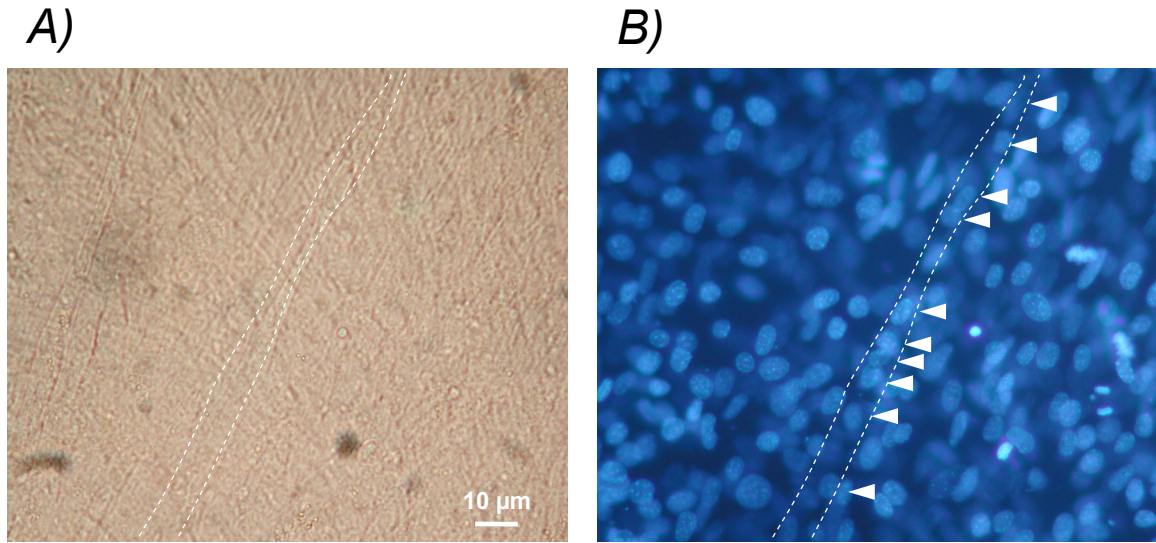


Figure 30. Clichés représentatifs de culture primaire de myotubes squelettiques à +5 jours de différenciation A) en lumière visible et B) après coloration nucléaire au Hoechst.

A +5 jours de différenciation, le support de culture est couvert d'un tapis de myotubes. Un myotube a été surligné afin de faciliter son repérage. A ce stade, les myotubes possèdent en général une dizaine de noyau (B, têtes de flèches).

1.1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 dans des myotubes squelettiques primaires.

La figure 31 illustre la distribution de la Cav-3 dans des myotubes de cultures primaires de muscle squelettique à +5 jours de différenciation. Ce cliché, réalisé dans un plan d'observation intracellulaire, a été obtenu en microscopie confocale.

L'immunomarquage de la Cav-3 (en rouge) apparaît sous la forme d'un liseré membranaire très dense en périphérie de la fibre, indiquant une localisation principalement au niveau du sarcolemme de surface. A fort grossissement (encart, grossissement 2x d'une zone du myotube), il est également possible d'observer un marquage intracellulaire d'allure ponctiforme. Ces points sont juxtaposés au sarcolemme de surface et tendent à s'organiser en s'alignant longitudinalement par rapport au myotube.

1.2. Immunolocalisation de la sous-unité Ca_v1.1 du DHPR et colocalisation avec la Cav-3 dans les myotubes squelettiques primaires.

La sous-unité Ca_v1.1 (ex α_{1s}) est la sous-unité principale du DHPR, car elle constitue la sous-unité pore du canal de type L.

Sa distribution et sa colocalisation avec la Cav-3 ont été étudiées par immunomarquage de myotubes squelettiques primaires. Les cellules ont été marquées en séquentiel par un anticorps anti-Cav-3 puis anti-Ca_v1.1, et enfin observées en microscopie confocale. L'utilisation de la microscopie confocale est ici impérative pour superposer les images des deux marquages d'un même plan confocal, afin de pouvoir conclure quant à la colocalisation des deux protéines.

A +5 jours de différenciation, la sous-unité Ca_v1.1 est localisée essentiellement au niveau du sarcolemme de surface (figure 32, en vert, cliché du centre), qui apparaît sous forme d'un liseré intense. Il est également possible d'observer un marquage intracellulaire discret, ponctiforme, juxtaposé à la membrane plasmique. Suite à la superposition de ce marquage avec celui de la Cav-3 (cliché du haut, en rouge), nous pouvons remarquer que les deux protéines sont colocalisées à la membrane de surface et au niveau des points intracellulaires. Notons tout de même que la localisation de la sous-unité Ca_v1.1 est en grande majorité à la membrane de surface et que le marquage intracellulaire est minoritaire et de plus faible intensité.

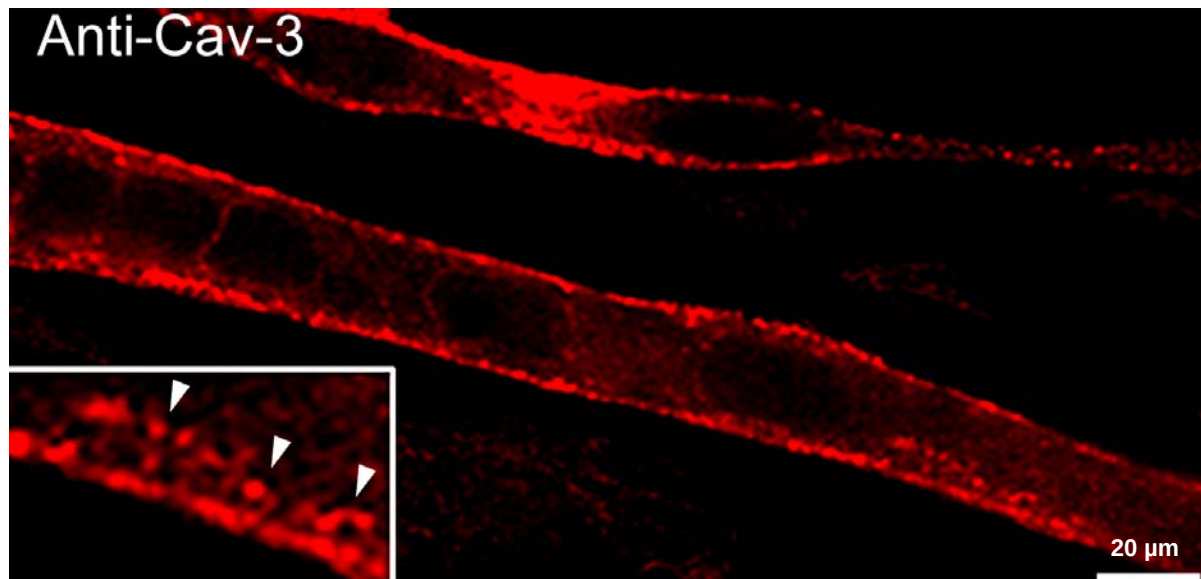


Figure 31. Immunolocalisation de la cavéoline-3 sur des myotubes squelettiques primaires à +6 jours de différenciation.

Sur les myotubes primaires, l'immunolocalisation de la Cav-3 par un anticorps anti-Cav-3 polyclonal indique une localisation principalement au niveau du sarcolemme de surface, le marquage apparaissant majoritairement sous la forme d'un liseré très dense. A fort grossissement (grossissement partiel 2x), l'immunomarquage révèle également une localisation de la Cav-3 dans le compartiment intracellulaire. Le marquage apparaît alors ponctiforme. Ces points sont généralement juxtaposés au sarcolemme de surface et tendent à s'organiser en s'alignant longitudinalement par rapport au myotube (têtes de flèche).

2. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les myotubes primaires squelettiques exprimant le mutant Cav-3^{P104L}.

Nous avons procédé à la transfection des cultures primaires par le plasmide codant pour la Cav-3^{P104L}-YFP au moment du passage en milieu de différenciation. Le plasmide code pour une protéine de fusion Cav-3^{P104L}-YFP qui sera donc détectée en vert. Le marquage anti-Cav-3 a été amplifié et révélé par de la cyanine 3 (visible en rouge). Les cellules ont été analysées par des techniques électrophysiologiques ou immunocytologiques après 5 jours de différenciation/expression.

Comme le montre la figure 33, les myotubes surexprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP présentent un profil de marquage très différent de celui des cellules contrôles. En effet, alors que le mutant de la cavéoline est localisé dans de petites vésicules périnucléaires (correspondant vraisemblablement à l'appareil de Golgi), la Cav-3 endogène n'atteint plus le sarcolemme. Dans la plupart des myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L} (~95% des myotubes transfectés observés), la Cav-3 est à peine détectable. Notons également que l'anticorps utilisé (PA1066) ne détecte pas la cavéoline mutante ou endogène localisée dans Golgi, probablement en raison d'un masquage de l'épitope N-terminal, comme il l'a préalablement été démontré (Luetterforst et coll., 1999).

3. Immunolocalisation et de la sous-unité Ca_v1.1 dans les myotubes primaires squelettiques exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, l'immunomarquage de la sous-unité Ca_v1.1 est clairement réduit (figure 34). Par ailleurs, une partie du marquage de la sous-unité Ca_v1.1 est colocalisée avec le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, dans des vésicules périnucléaires (flèche, la superposition du marquage vert correspondant au mutant et rouge correspondant à Ca_v1.1 apparaît en jaune), suggérant une rétention intracellulaire de Ca_v1.1, probablement au niveau de l'appareil de Golgi.

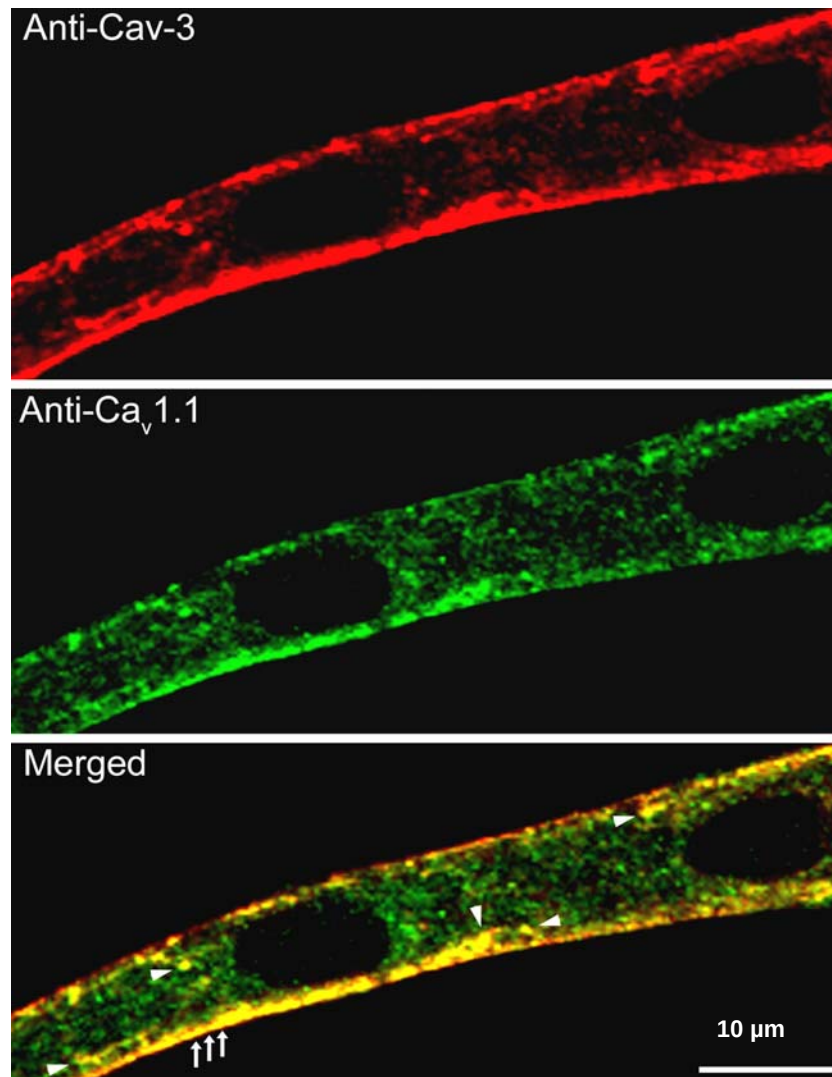


Figure 32. Double immunomarkage de la cavéoline-3 (en rouge) et de la sous-unité Cav1.1 (en vert) sur des myotubes squelettiques primaires à +6 jours de différenciation.

La Cav-3 et la sous-unité Cav1.1 sont fortement colocalisées (merged) comme le montre clairement le cliché confocal où les deux marquages sont superposés. Cette colocalisation est particulièrement forte au niveau de la membrane plasmique de surface, où les deux protéines se concentrent (flèches).

De plus, le marquage de la sous-unité Cav1.1 est concentré de manière caractéristique au sein de structure intracellulaires ponctiformes distribuées assez uniformément dans la cellule. Le marquage de la Cav-3 apparaît par ailleurs plus faible dans ces structure internes sauf au niveau de zones spécifiques où elle colocalise avec la sous-unité Cav1.1 (têtes de flèche).

4. Etude des courants calciques voltage-dépendants de type T et L dans des cultures primaires de myotubes squelettiques transfectés par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Notre avons précédemment montré que les myotubes squelettiques primaires exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP étaient déficients en Cav-3 endogène, ce qui valide notre modèle de déficience en Cav-3^{wt}. Nous avons donc procédé aux enregistrements des courants calciques voltage-dépendants sur ces cellules.

Dans les cultures primaires de myotubes squelettiques, deux types de courants calciques voltage-dépendants sont détectables : d'une part un courant calcique de type T ($I_{Ca, T}$), à bas seuil, présentant des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides et s'activant à des dépolarisations comprises entre -40 et 0 mV ; et d'autre part un courant calcique de type L ($I_{Ca, L}$) à haut seuil, présentant des cinétiques d'activation et d'inactivation lentes et s'activant à des dépolarisations supérieures à -20 mV (figure 35A). Afin de s'affranchir de l'influence de la taille des myotubes, les valeurs des amplitudes des courants ont été ramenées à la capacitance des cellules enregistrées donnant une densité de courant.

Les courbes I/V moyennes des courants calciques obtenues en faisant la moyenne des courbes « fittées » pour chaque courbe I/V individuelles sont représentées sur la figure 35B et 35C. Les paramètres du courant de type L obtenus suite aux enregistrements sont récapitulés dans le tableau ci-dessous et la figure 36. Les valeurs concernant le courant calcique de type T n'étant pas significativement différentes entre les deux lots de cellules, elles ne sont pas représentées.

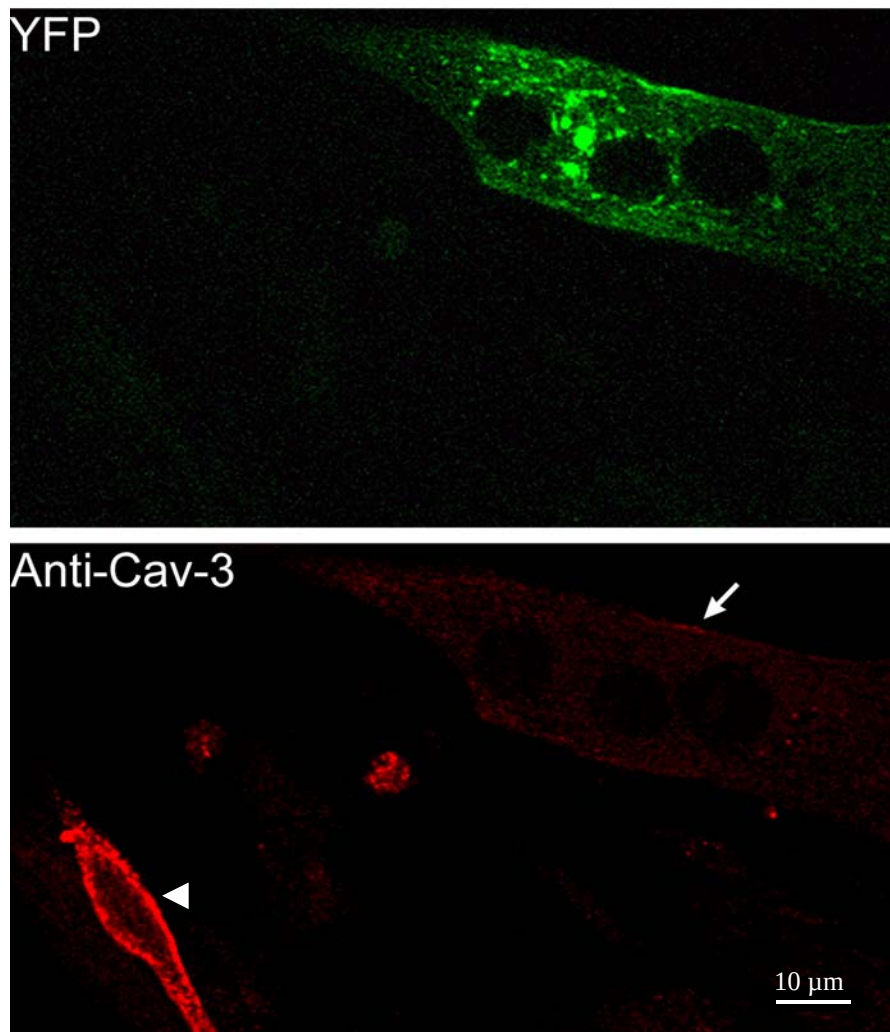


Figure 33. Immunomarquage de la Cav-3 dans des myotubes squelettiques primaires exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Sur les myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, nous pouvons clairement voir sur ces clichés de microscopie confocale que le mutant adopte préférentiellement une localisation périnucléaire. Sur ces myotubes, la Cav-3 endogène (flèche) est quasiment indétectable comparée à un myotube avoisinant non transfecté (tête de flèche).

Paramètres mesurés (moyennes $\pm$ se)	Myotubes contrôles (n=40)	Myotubes exprimant Cav-3 ^{P104L} -YFP (n=21)	Myotubes exprimant YFP (n=6)
$G_{\max}$ (S/F)	197 $\pm$ 12	88 $\pm$ 13	191 $\pm$ 10
$V_{0.5}$ (mV)	9 $\pm$ 0.8	11 $\pm$ 1.9	-
V_{rev} (mV)	65 $\pm$ 1.6	55 $\pm$ 2	-
k (mV)	5 $\pm$ 0.4	5 $\pm$ 0.5	-
C (pF)	218 $\pm$ 20	229 $\pm$ 27	-

Tableau 17. Principaux paramètres du courant calcique voltage-dépendant de type L ($I_{\text{Ca,L}}$) dans les myotubes squelettiques primaires contrôles ou transfectés par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (Significativité selon un test *t* de Student: *** $p < 0,0001$ et ** $p < 0,001$). Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de cellules enregistrées.

Dans le lot de cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, nous avons observé une diminution significative de 55% de la moyenne de la conductance maximale $G_{\max}$ par rapport au lot de cellules contrôles, ainsi qu'un déplacement d'environ 10 mV du potentiel d'inversion V_{rev} vers des potentiels plus négatifs.

Afin de s'assurer que l'effet observé ne soit pas du au tag YFP de la protéine recombinante, nous avons également transfecté des cellules avec un plasmide codant pour la YFP seule. Comme nous pouvons le voir dans le tableau, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules transfectées par la YFP seule, confirmant la spécificité de l'effet du mutant Cav-3^{P104L} sur $I_{\text{Ca,L}}$.

Nous avons également évalué la capacitance moyenne des deux lots de cellules, afin d'évaluer si l'expression du mutant Cav-3^{P104L}-YFP influençait la quantité de membrane électriquement active.

Comme indiqué dans le tableau 17, nous n'avons pas observé de différence significative de la capacitance membranaire moyenne (C) entre les cellules transfectées et les cellules contrôles. Ainsi, l'expression exogène du mutant Cav-3^{P104L}-YFP ne semble pas influencer la quantité de membrane électriquement active.

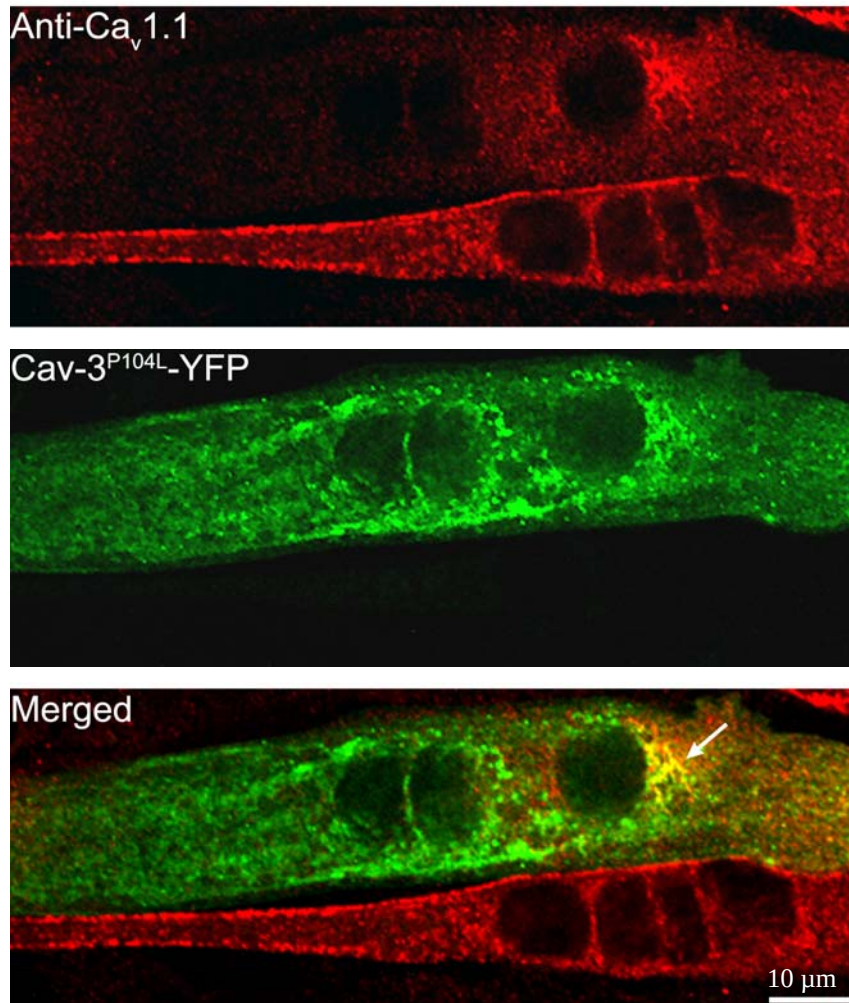


Figure 34. Immunolocalisation de la sous-unité $\text{Ca}_v1.1$ dans des myotubes primaires contrôles ou transfectés par la Cav-3^{P104L}-YFP.

Sur ces clichés représentatifs des myotubes exprimant la Cav-3^{P104L}-YFP, obtenus en microscopie confocale, nous pouvons remarquer d'une part que le marquage de Cav1.1 est plus faible que sur un myotube non transfectés (myotube du bas), et d'autre part, une partie de ce marquage est distribué dans une zone périnucléaire où il colocalise avec le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (merged).

5. Quantification de l'immunoréactivité de la sous-unité Ca_v1.1 dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

La diminution de la conductance maximale moyenne des canaux de type L pouvant être due soit à une diminution de leur conductance unitaire, soit à une diminution de la densité de canaux membranaires, nous avons comparé l'immunoréactivité de la sous-unité Ca_v1.1 dans des myotubes exprimant ou non le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Pour cela, des séries Z ont été effectuées en microscopie confocale et l'immunoréactivité de Ca_v1.1 a été quantifiée sur chaque cliché de la série Z (figure 37). Ainsi, les myotubes surexprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (23 ± 2.4 , $n = 56$) présentent une diminution de 66% de l'intensité de marquage de Ca_v1.1 par rapport aux cellules contrôles (68.2 ± 3.3 , $n = 34$) ($P < 0.0001$).

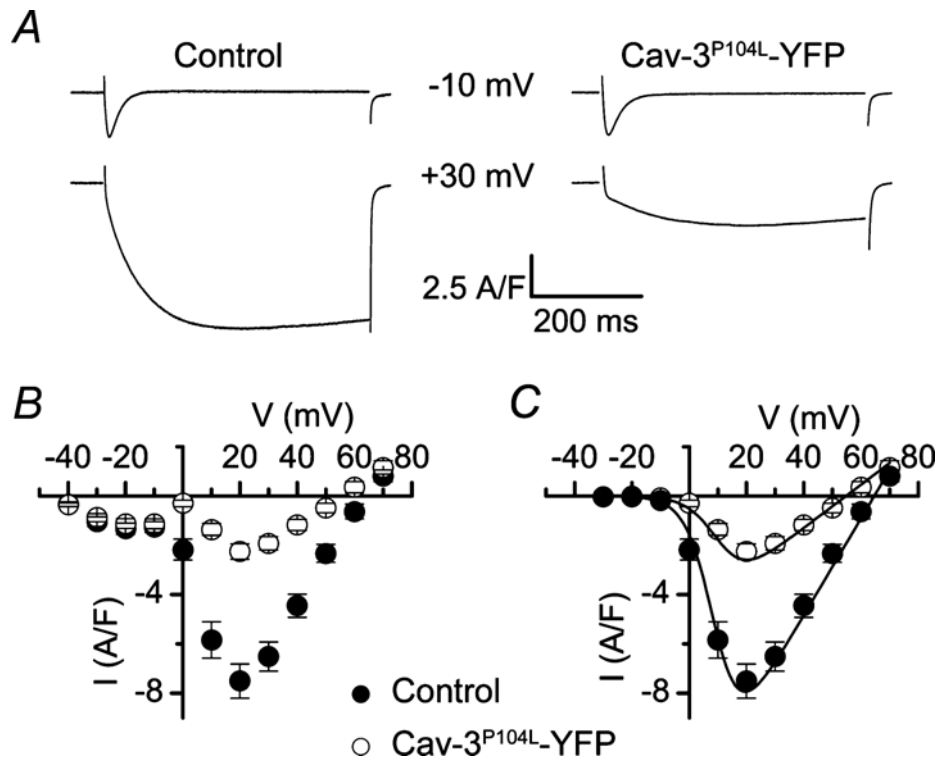


Figure 35. (A) Traces représentatives des courants calciques de type T et L enregistrés aux potentiels indiqués. (B et C) Courbes I/V des courants calciques voltage-dépendants de type T (ICa, T) et de type L (ICa, L) pour 40 myotubes contrôles et 21 myotubes exprimant la Cav-3^{P104L}-YFP.

(A) Courants représentatifs obtenus à -10 et +30 mV après des pulses dépolarisants de 500 msec à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV pour des cellules contrôles (gauche) et transfectées (droite).

(B) Courbes I/V (densité/potentiel) moyennes des courants calciques voltage-dépendants de type T (ICa, T) et de type L (ICa, L) pour 40 myotubes contrôles et 21 myotubes exprimant la Cav-3^{P104L}.

(C) Courbes I/V moyennes du courant calcique de type L sur des myotubes contrôles et transfectés.

Les courbes I/V ont été calculées en utilisant les paramètres moyens obtenus en fittant les paramètres de voltage-dépendance de chaque fibre.

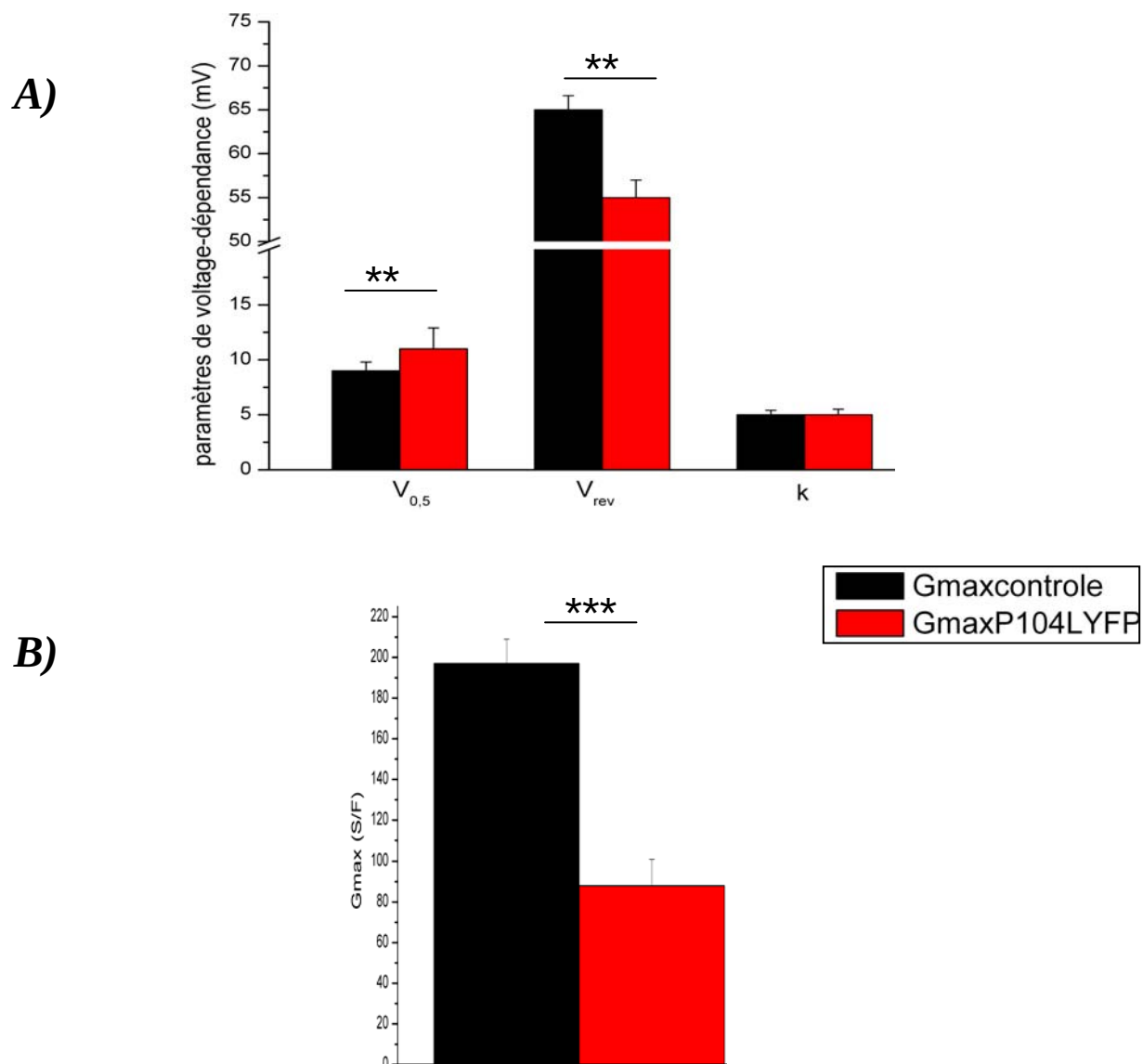


Figure 36. (A) Paramètres de voltage-dépendance et (B) conductance maximale des canaux calciques de type L de myotubes squelettiques primaires contrôles et exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

A) Comparaison des paramètres de voltage-dépendance de myotubes primaires contrôles ou exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Les valeurs moyennes pour $V_{0.5}$, V_{rev} et k étaient de 9 ± 0.8 mV, 65 ± 1.6 mV et 5 ± 0.4 mV pour les myotubes contrôles (n = 40) et 11 ± 1.9 mV, 55 ± 2 mV and 5 ± 0.5 mV pour les myotubes exprimant la Cav-3P104L (n = 21). Les seules valeurs significativement différentes étaient un déplacement de 14 mV de V_{rev} vers des potentiels plus négatifs et de 6 mV de $V_{0.5}$ vers des potentiels plus positifs.

B) Comparaison de la conductance maximale des canaux de type L de cellules contrôles ou exprimant le mutant Cav-3P104L-YFP. La conductance était diminuée de 58% dans les cellules transfectées (Gmax contrôle = 197 ± 12 S/F; Gmax P104L= 88 ± 13 S/F).

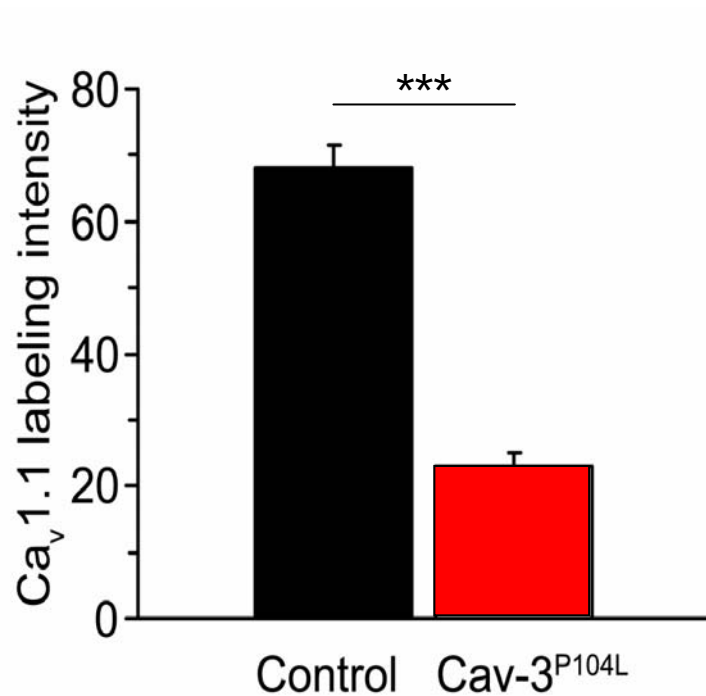


Figure 37. Quantification de l'intensité de marquage de la sous-unité Ca_v1.1 dans des myotubes primaires contrôles ou transfectés par la Cav-3^{P104L}-YFP.

Nous avons procédé à une analyse d'image numérique sur une série Z confocale en mesurant l'immunoréactivité de Cav1.1 sur des myotubes contrôles et exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, présents sur une même image.

L'intensité de marquage moyenne apparaît alors réduite d'environ 66% dans les myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L} ($P < 0,0001$) par rapport aux myotubes contrôles.

1^{ère} partie, Chapitre II

Rappel de la problématique spécifique : Quels sont les effets d'une déficience en Cav-3 sur l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique plus différencié que les myotubes primaires ?

Ce deuxième chapitre a pour but d'étudier les propriétés des canaux calciques voltage-dépendants dans des fibres musculaires squelettiques fœtales en survie exprimant le mutant dystrophique de la cavéoline-3, la Cav-3^{P104L}. Par rapport aux myotubes squelettiques primaires, les fibres fœtales en survie présentent l'avantage d'être à un stade de maturation auquel les structures membranaires telles que les tubules T sont déjà présents et bien formés.

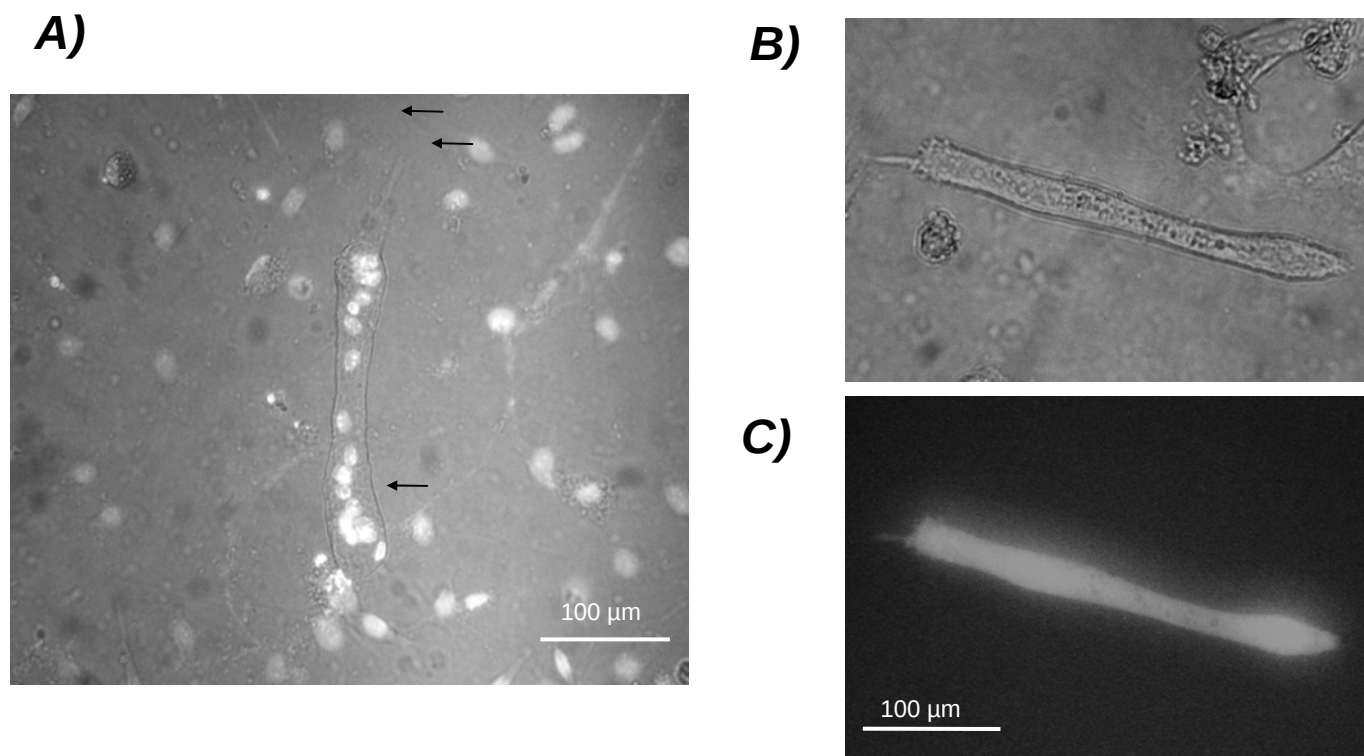


Figure 38. (A) Fibres musculaires fœtales à +2 jours et (B et C) à +7 jours de survie

Les clichés ont été réalisés (A) sur cellules fixées et traitées au colorant de Hoechst ou (B et C) vivantes. Le cliché A correspond à la superposition de l'image du marquage des noyaux observé en fluorescence et de l'image de la fibre observée en lumière transmise.

- (A) A J+2, le jour de la transfection, les fibres présentent des extrémités étalées, signe de leur plus grande adhérence au support (flèches). Les noyaux, révélés par le colorant de Hoechst, sont répartis sur la longueur des fibres.
- (B) A J+5, le jour auquel les cellules sont analysées, les cellules sont dans le même état de différenciation qu'à J+2. 5 jours après transfection, les cellules expriment la protéine d'intérêt (ici de la GFP).

- II -

RÔLE DE LA CAVÉOLINE-3 SUR LA FONCTION DES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DÉPENDANTS DANS DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES FŒTALES EN SURVIE.

Le chapitre précédent présentait les résultats obtenus sur les cultures primaires de muscle squelettique. Cependant, la Cav-3 serait impliquée dans les processus développementaux du muscle squelettique. Par conséquent, une hypothèse possible pour expliquer les altérations de la fonction du canal calcique de type L observées dans les myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L} serait une différenciation anormale des myotubes. Nous nous sommes ainsi intéressés à la fonction de ce canal dans des fibres musculaires squelettiques fœtales maintenues en condition de survie et transfectées ou non par la Cav-3^{P104L}-YFP. Les fibres fœtales de fœtus à E₁₈, bien qu'elles ne soient pas totalement différenciées, ont déjà la plupart des caractéristiques morphologiques d'une fibre adulte.

Les fibres fœtales ont été isolées à partir de muscles intercostaux de fœtus de souris au stade embryonnaire E₁₈. Elles ont ensuite été mises en condition de survie, c'est-à-dire dans des conditions telles que l'état de différenciation des fibres au moment de l'analyse soit le plus proche possible de celui du jour du prélèvement.

Après 2 jours de survie, les fibres musculaires fœtales ont été transfectées par le plasmide codant pour la Cav-3^{P104L}-YFP. Les analyses électrophysiologiques ou immunocytochimiques ont été effectuées 5 jours après transfection, soit à J+7 de survie. Au cours de la survie, les fibres s'étalent et adhèrent au support de culture, en particulier au niveau de leurs extrémités. Il est possible de conserver les fibres dans un état de différenciation stable pendant environ 10 jours. Passé ce délai, la formation de myotubes par fusion de cellules satellites détachées des fibres au moment de la trituration perturbe la stabilité de différenciation de la survie (figure 38).

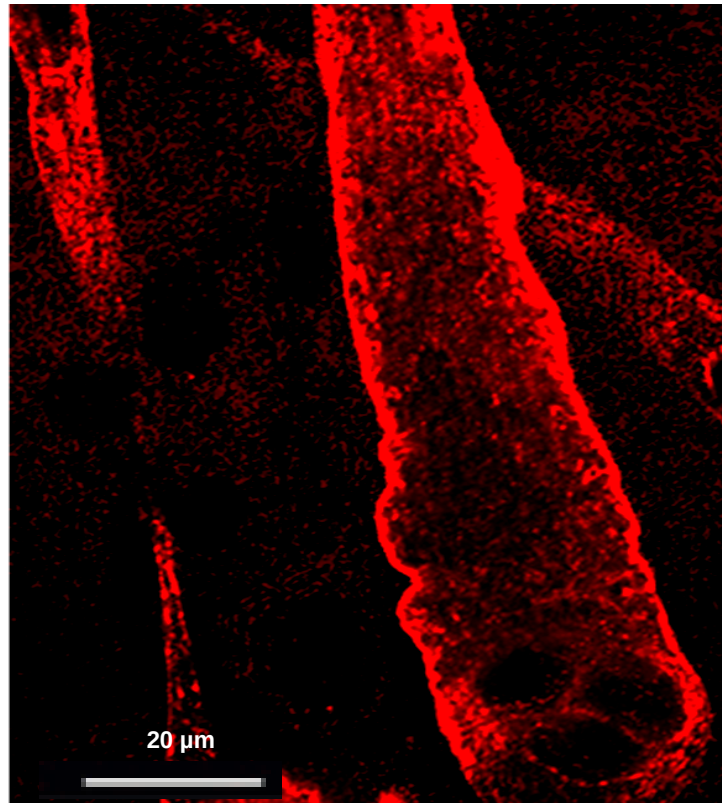


Figure 39. Immunolocalisation de la cavéoline-3 sur des fibres squelettiques fœtales à +5 jours de survie.

Sur les fibres fœtales en survie, après 5 jours de survie, la Cav-3 adopte une répartition essentiellement à la membrane de surface, comme l'illustre ce cliché pris dans un plan confocal intracellulaire. Comme pour les myotubes primaires, il est possible d'observer un marquage intracellulaire ponctiforme. L'intensité de ce marquage intracellulaire est cependant plus important que dans les myotubes.

1. Immunolocalisation de la cavéoline-3 et du DHPR dans les fibres musculaires squelettiques fœtales en survie.

Tous les marquages présentés dans cette étude ont été observés en microscopie confocale. Le plan d'observation confocal est précisé dans la description de la figure.

1.1. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires fœtales en survie.

Comme illustré sur la figure 39, représentant l'immunomarquage de la Cav-3 observé dans un plan intracellulaire, la Cav-3 a une répartition essentiellement à la membrane de surface sur les fibres musculaires squelettiques fœtales. Tout comme pour les myotubes primaires, il est possible d'observer un marquage intracellulaire ponctiforme ayant tendance à s'aligner selon l'axe longitudinal de la fibre. L'importance et l'organisation de ce marquage intracellulaire semblent être plus importantes dans les fibres fœtales que dans les myotubes primaires.

1.2. Immunolocalisation de la sous-unité $Ca_v1.1$ du DHPR dans fibres musculaires squelettiques fœtales en survie.

Comme pour les myotubes squelettiques primaires, la localisation de la sous-unité $Ca_v1.1$ a été analysée par immunomarquage de fibres fœtales en survie. Les cellules ont été marquées 5 jours après transfection.

De plus, la sous-unité $Ca_v1.1$ étant considérée comme un marqueur des tubules l'immunolocalisation de cette sous-unité nous a permis d'analyser l'organisation du système T dans notre système d'étude.

La figure 40 illustre l'immunomarquage visualisé en microscopie confocale de la sous-unité $Ca_v1.1$ dans une fibre musculaire squelettique fœtale à +7 jours de survie. Sur ce cliché, le plan confocal est intracellulaire. L'immunomarquage de $Ca_v1.1$ est principalement périphérique, il apparaît sous forme d'un liseré correspondant à la membrane de surface. Comme pour les myotubes primaires, la sous-unité $Ca_v1.1$ est également distribuée au niveau intracellulaire, sous forme de structures longitudinales par rapport à l'axe de la fibre musculaire (têtes de flèches, encart, grossissement x2 de la zone encadrée).

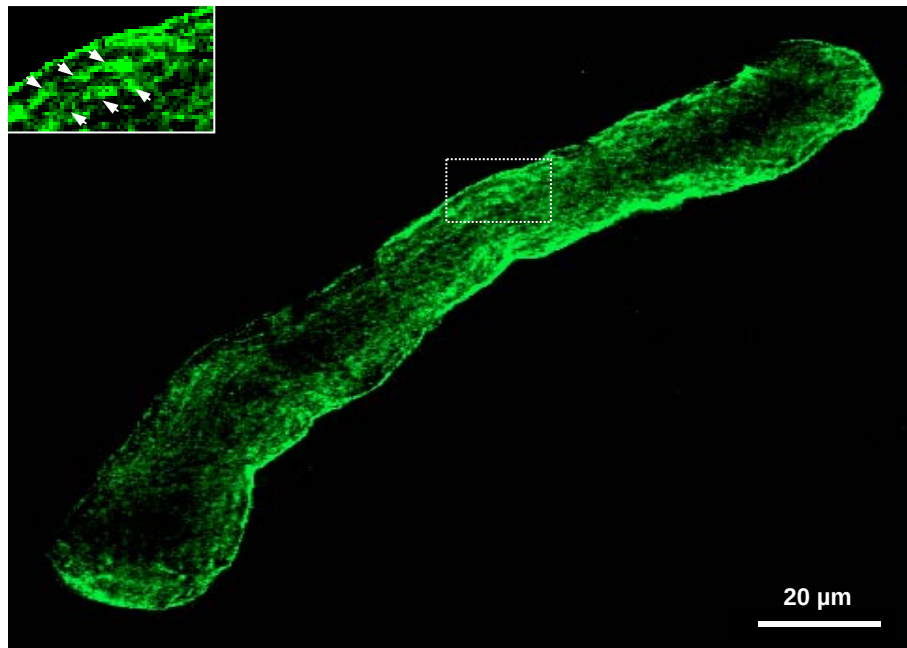


Figure 40. Immunolocalisation de $\text{Ca}_v 1.1$ dans des fibres musculaires squelettiques fœtales à +7 jours de survie

Ce cliché de microscopie confocale représente l'immunomarquage de la sou-unité pore du canal calcique de type L, $\text{Ca}_v 1.1$, dans une fibre fœtale intercostale 7 jours après mise en survie.

$\text{Ca}_v 1.1$ est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique de surface, ainsi qu'au niveau intracellulaire, dans des structures juxtaposées au sarcolemme s'orientant de manière longitudinale par rapport à l'axe de la fibre musculaire (encart, têtes de flèches, grossissement x2 de la zone encadrée).

2. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}.

La localisation de la Cav-3 a été analysée par immunomarquage après 5 jours d'expression du mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Les expériences d'immunocytochimie ont ensuite été analysées en microscopie confocale. La Cav-3 a été détectée par un anticorps polyclonal et le système a été amplifié et révélé par la cyanine 3. La Cav-3 apparaît donc en rouge, le mutant, marqué à la YFP, apparaît lui en vert.

Comme l'illustre la figure 41, les fibres fœtales en survie surexprimant le mutant ne présentent pas de marquage de la Cav-3 endogène au niveau du sarcolemme de surface. Le mutant, quant à lui, est localisé dans de petites vésicules périnucléaires, précédemment décrites comme appartenant à l'appareil de Golgi (Carozzi et coll., 2002). La quasi-totalité des fibres fœtales exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP ne présentait d'ailleurs pas de marquage de la Cav-3 endogène.

3. Etude des courants calciques voltage-dépendants de type T et L.

3.1. Courants calciques voltage-dépendants de fibres fœtales en survie transfectées par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués à +7 jours de survie en utilisant la configuration cellule entière de la technique de patch-clamp.

Sur les fibres fœtales en survie, seul un courant calcique de type L ($I_{Ca, L}$) a pu être enregistré. Ce courant était typique des fibres fœtales (Pouvreau et coll., 2004), avec une cinétique d'activation lente, un seuil à -10 mV, un pic d'amplitude à + 20 mV et un potentiel d'inversion proche de + 80 mV (figure 42A, tracé de droite). Le courant calcique de type T, très labile, disparaît rapidement au moment de la mise en survie des cellules.

Les courbes I/V moyennes obtenues pour les cellules transfectées et les cellules contrôles sont représentées dans la figure 42B, la diminution de la densité de courant calcique de type L est clairement visible.

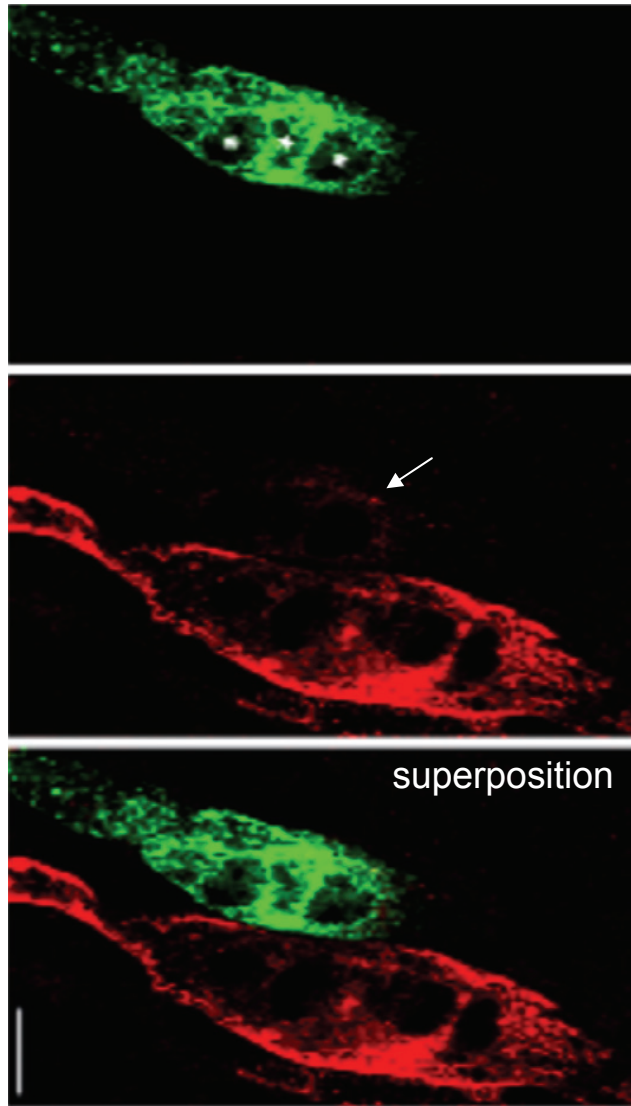


Figure 41. Immunomarquage de la Cav-3 dans des fibres fœtales en survie exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Dans les fibres fœtales en survie, le mutant Cav-3^{P104L}-YFP adopte une localisation autour des noyaux (*), vraisemblablement l'appareil de Golgi, comme l'illustrent ces clichés de microscopie confocale. Dans ces cellules exprimant le mutant, la Cav-3 endogène est quasiment indétectable comparativement à une fibre contrôle (flèche).

Les principaux paramètres du canal calcique de type L, récapitulés dans le tableau 18 et la figure 43, montrent une diminution de 55% de la conductance maximale $G_{\max}$ de $I_{Ca, L}$ dans le lot de cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, par rapport au lot de cellules contrôles, ce qui est clairement visible sur les traces de courants représentatives. Par ailleurs, nous avons également observé un déplacement significatif de -14 mV et + 6 mV du potentiel d'inversion V_{rev} et du potentiel de demi-activation $V_{0,5}$ respectivement.

Paramètres mesurés (moyennes $\pm$ se)	Fibres fœtales contrôles (n=31)	Fibres fœtales exprimant Cav-3 ^{P104L} - YFP (n=6)
$G_{\max}$ (S/F)	203 $\pm$ 11	85 $\pm$ 18
$V_{0,5}$ (mV)	10 $\pm$ 0.9	16 $\pm$ 3.5
V_{rev} (mV)	77 $\pm$ 1.1	63 $\pm$ 5
k (mV)	4 $\pm$ 0.2	4 $\pm$ 0.7
C (pF)	175 $\pm$ 21	182 $\pm$ 13

Tableau 18. Paramètres de voltage-dépendance du courant de type L ($I_{Ca, L}$) de fibres squelettiques fœtales en survie contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (significativité selon un test t de Student : *** $p < 0,0001$ et ** $p < 0,001$). Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de cellules enregistrées.

Comme pour les cultures primaires de myotubes, les valeurs des capacitances ne diffèrent pas entre les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP et les cellules contrôles. L'expression du mutant ne perturberait donc pas de manière significative la quantité de membrane électriquement active.

4. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les cellules surexprimant la Cav-3^{wt}.

Nous avons également testé les effets d'une surexpression de Cav-3 de type sauvage par transfection de fibres squelettiques fœtales en survie par un plasmide codant pour la Cav-3^{wt} taguée avec la YFP. Cette étude ne présente pas de résultats en ce qui concerne le taux de surexpression de la Cav-3, mais s'intéresse plus à la localisation de la Cav-3 surexprimée afin

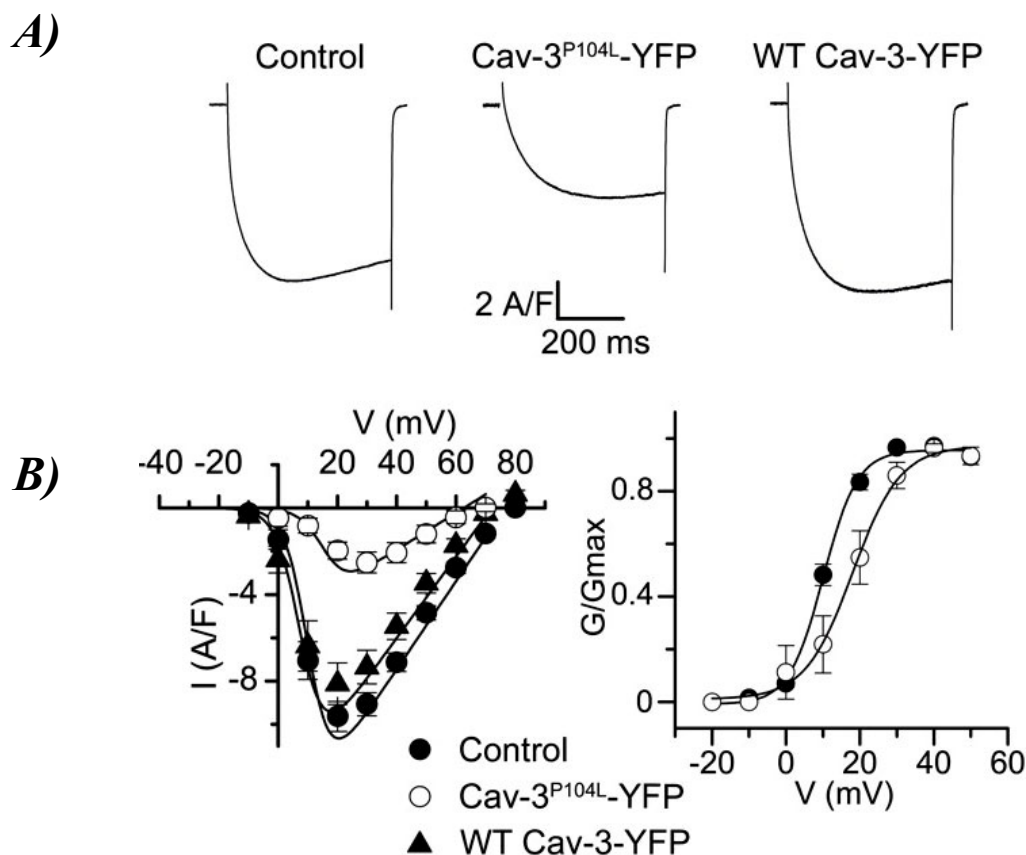


Figure 42. (A) Traces représentatives du courant calcique de type L enregistré aux potentiels indiqués sur des fibres fœtales en survie contrôles et transfectées par la Cav-3^{wt}-YFP ou par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Courbes I/V du courant calcique de L (B gauche) et courbes des conductances maximales normalisées (B droite) établies à partir de ces mêmes cellules.

(A) Courants représentatifs obtenus à +30 mV après des pulses dépolarisants de 500 msec à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV pour des cellules contrôles (gauche), exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (centre) et surexprimant la Cav-3^{wt} (droite).

(B) (gauche) Courbes I/V (densité/potentiel) moyennes du courant calcique de type L (I_{Ca}, I_L) obtenues sur les mêmes lots de cellules que la figure A.

(droite) Courbes des conductances maximales normalisées des canaux calciques de type L sur des myotubes contrôles et transfectés par la Cav-3^{P104L}-YFP.

Les courbes I/V ont été calculées en utilisant les paramètres moyens obtenus en fittant les paramètres de voltage-dépendance de chaque fibre.

de vérifier que la protéine exogène est d'une part exprimée et d'autre part que la protéine taguée YFP possède bien la même localisation que la Cav-3 endogène, nous permettant ainsi de penser qu'elle sera, elle aussi, fonctionnelle.

Comme l'illustre la figure 44, la Cav-3 exogène de type sauvage, marquée à la YFP (en vert) adopte une localisation membranaire, où elle est parfaitement colocalisée avec la Cav-3 endogène (en rouge).

4.1. Courants calciques voltage-dépendants dans des fibres fœtales surexprimant la Cav-3^{wt}.

Nos expériences d'immunolocalisation de la Cav-3^{wt} dans des fibres fœtales surexprimant la Cav-3^{wt} indiquent que la protéine exogène adopte une localisation similaire à la Cav-3 endogène. Ce résultat valide notre système de surexpression de Cav-3, nous avons ainsi testé les effets d'une surexpression de Cav-3 de type sauvage sur l'expression fonctionnelle des canaux calciques voltage-dépendants.

Les mesures effectuées sur les cellules surexprimant la Cav-3^{wt}-YFP n'ont pas montré de différence majeure entre ce lot de cellules et le lot de cellules contrôles, comme peuvent le montrer les traces de courants représentatives de la figure 42A. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres mesurés sont récapitulées dans le tableau 19, ci-dessous.

Paramètres mesurés (moyennes $\pm$ se)	fibres contrôles (n=31)	fibres transfectées par Cav-3 ^{wt} -YFP (n=13)
$G_{\max}$ (S/F)	203 $\pm$ 11	188 $\pm$ 16
$V_{0.5}$ (mV)	10 $\pm$ 0.9	8 $\pm$ 1.6
V_{rev} (mV)	77 $\pm$ 1.1	72 $\pm$ 1.4
k (mV)	4 $\pm$ 0.2	4 $\pm$ 0.3

Tableau 19. Paramètres de voltage-dépendance du courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$) de fibres squelettiques fœtales en survie contrôles ou transfectées par la Cav-3^{wt}-YFP (significativité selon un test t de Student: * $p < 0,01$). Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de cellules enregistrées.

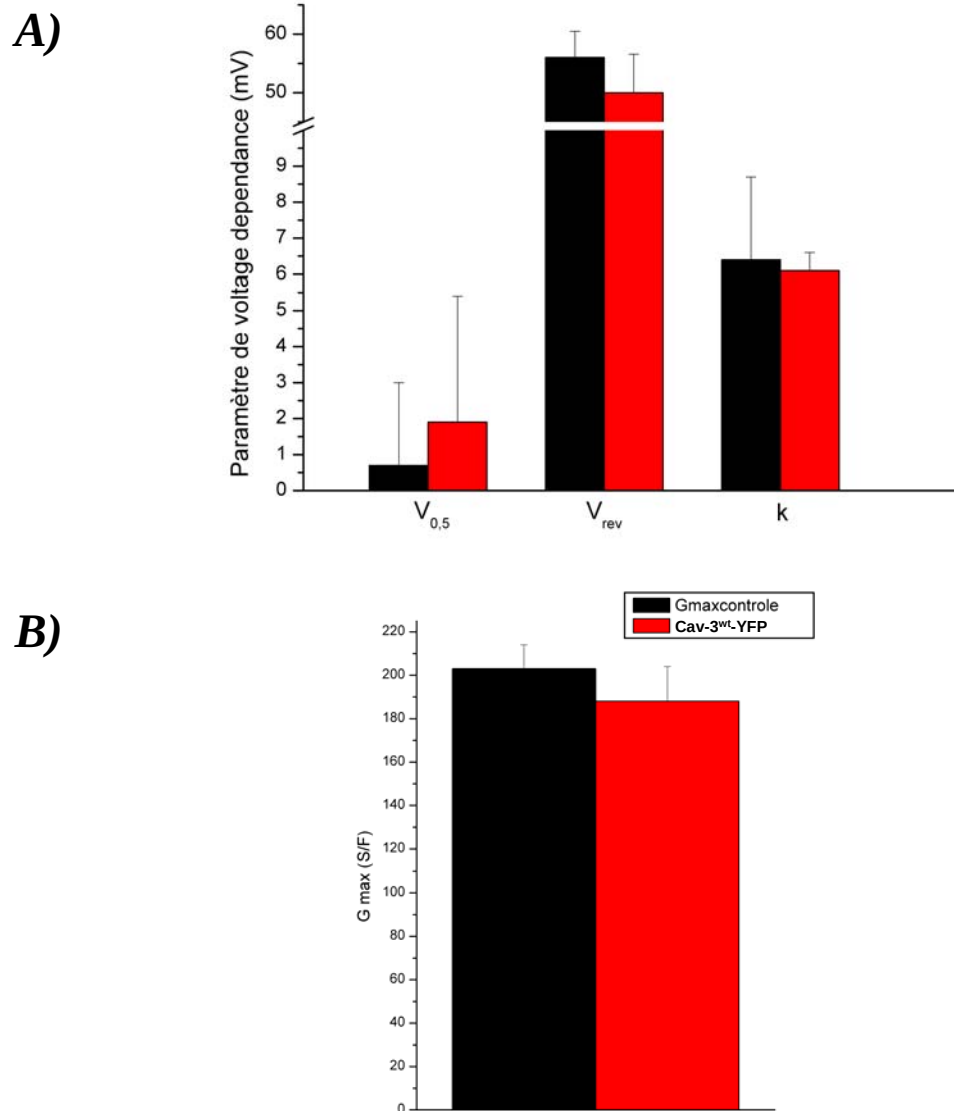


Figure 43. (A) Paramètres de voltage-dépendance et (B) conductance maximale des canaux calciques de type L de fibres fœtales en survie contrôles ou surexprimant la Cav-3.

A) comparaison des paramètres de voltage-dépendance de fibres fœtales à +5 jours de survie contrôles ou exprimant la Cav-3^{wt}-YFP. Les valeurs moyennes pour $V_{0.5}$, V_{rev} et k étaient de 9 ± 0.8 mV, 65 ± 1.6 mV et 5 ± 0.4 mV pour les myotubes contrôles ($n = 40$) et 8 ± 1.6 mV, 72 ± 1.4 mV and 4 ± 0.3 mV pour les myotubes exprimant la Cav-3^{wt}-YFP ($n = 21$). La seule valeur significativement différente était un déplacement de 5 mV de V_{rev} vers des potentiels plus négatifs dans le lot de cellules transfectées.

B) comparaison de la conductance maximale des canaux de type L de cellules contrôles ou surexprimant la Cav-3^{wt}-YFP. La conductance maximale n'était pas significativement changée pour les cellules contrôles comparativement aux cellules transfectées ($G_{max} = 197 \pm 12$ S/F contre 188 ± 16 S/F respectivement).

La seule différence significative entre les deux lots de cellules est un léger déplacement de la valeur du potentiel d'inversion V_{rev} de 5 mV vers des potentiels plus négatifs pour le lot de cellules surexprimant la Cav-3.

La figure 42 B présente la courbe I/V obtenue pour le courant calcique de type L pour les cellules transfectées par Cav-3^{wt}-YFP et les cellules contrôles et confirme l'absence de différence significative concernant la densité de courant entre les deux lots de cellules enregistrés.

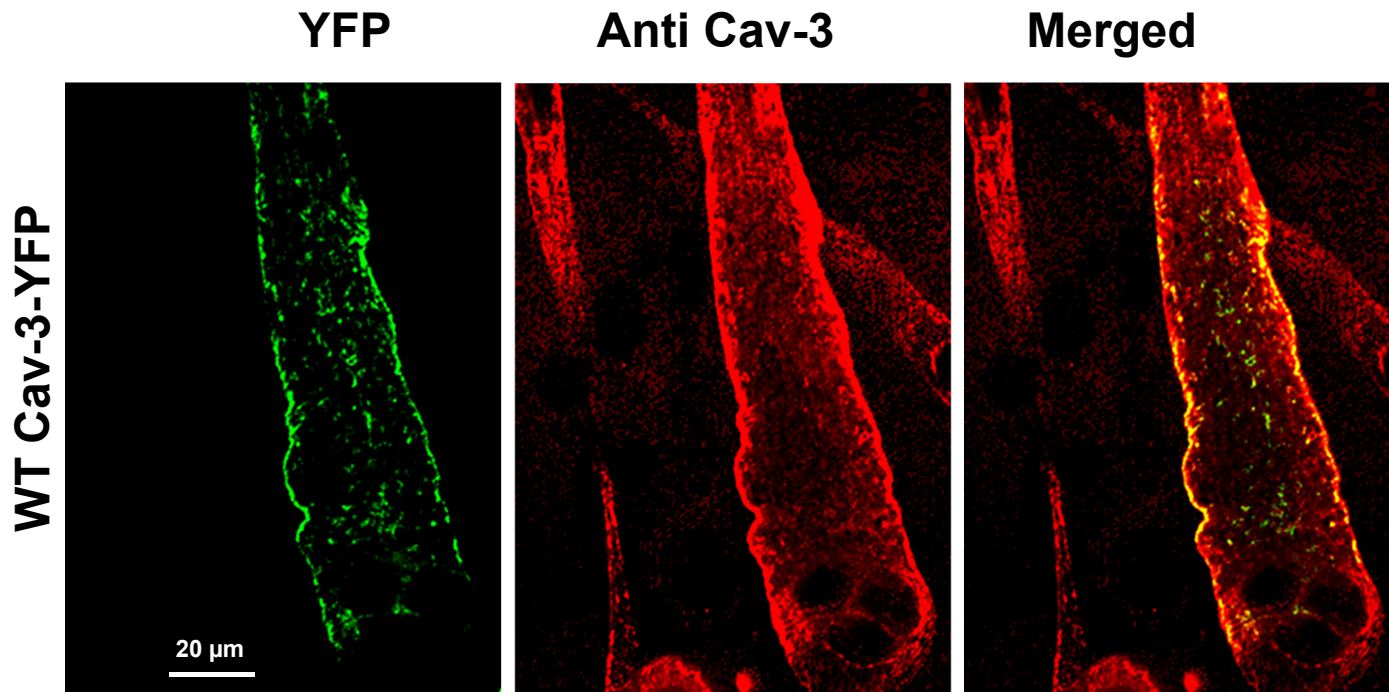


Figure 44. Surexpression de Cav-3^{wt} par transfection de myotubes primaires par Cav-3^{wt}-YFP et immunomarquage de la Cav-3.

Immunolocalisation de la Cav-3 dans des fibres fœtales exprimant la Cav-3 de type sauvage (WT Cav-3-YFP). Comme l'illustrent ces clichés de microscopie confocale, la Cav-3-YFP apparaît concentrée au niveau de la membrane plasmique de surface, ainsi qu'au niveau de petits amas intracellulaires, également détectés par immunomarquage.

1^{ère} partie, Chapitre III

Rappel de la problématique spécifique : Quels sont les effets d'une déficience en Cav-3 sur l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique adulte, totalement différencié ?

Ce troisième chapitre consiste à analyser les propriétés des canaux calciques voltage-dépendants dans des fibres musculaires squelettiques adulte exprimant de manière transitoire le mutant dystrophique Cav-3^{P104L} suite au transfert de gène *in situ* par la technique d'électroporation. La distribution de la Cav-3 dans le muscle squelettique adulte étant sujet à controverse, ce chapitre vise également à étudier sa localisation.

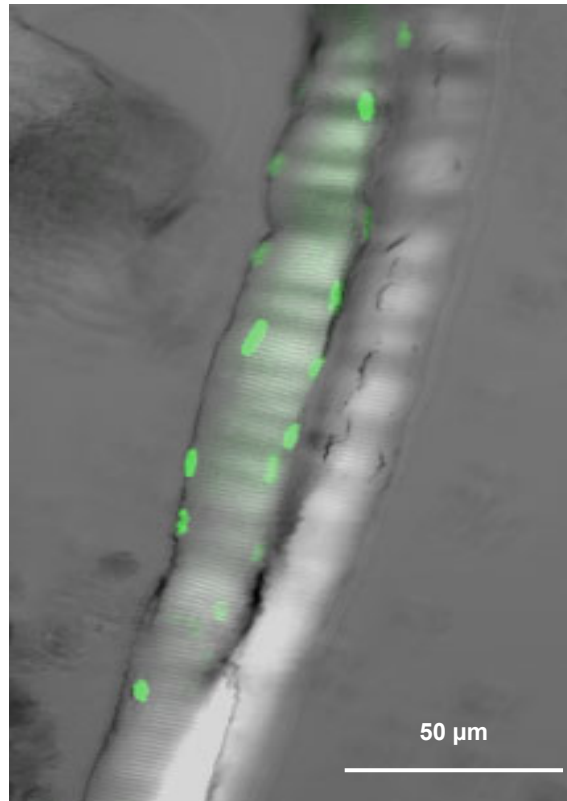


Figure 45. Fibres musculaires adulte fraîchement dissociée exprimant la NLS-GFP 14 jours après électroporation

Les clichés ont été réalisés sur cellules vivantes fraîchement dissociées et observées en microscopie confocale. L'image correspond à l'image du marquage YFP des noyaux d'une fibre musculaire obtenue en lumière fluorescente superposée à l'image des fibres observées en lumière transmise.

14 jours après transfert de gène *in situ* par la technique d'électroporation, les muscles de la patte de souris (IO et *fdb*) ont été prélevés, dissociés à la collagénase et triturés afin d'isoler les fibres musculaires. Comme l'illustrent ces clichés de microscopie confocale de fibres isolées, les fibres transfectées expriment la protéine exogène (ici la GFP nucléaire, NLS-GFP).

- III -

RÔLE DE LA CAVÉOLINE-3 SUR LA FONCTION DES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DÉPENDANTS DANS DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ADULTES.

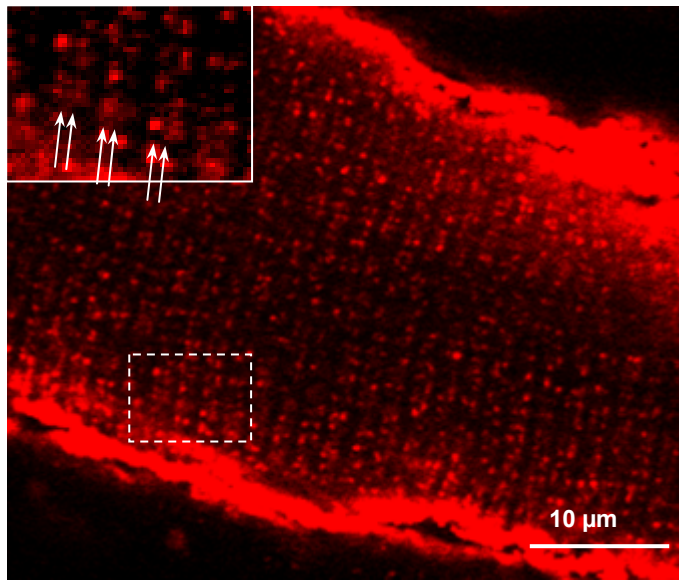
1. Etude par immunofluorescence de la distribution de la cavéoline-3 et du DHPR dans les fibres musculaires squelettiques adultes.

Afin d'obtenir l'expression exogène de nos protéines d'intérêt, nous avons procédé au transfert de gène *in situ* par la technique de l'électroporation. Cette technique couramment utilisée pour le transfert de gène dans les bactéries est assez récente et innovante en ce qui concerne des systèmes eucaryotes. Nous avons mis au point les conditions de temps d'expression, de technique d'injection et de concentration en plasmide afin d'optimiser le rendement de transfection par cette technique.

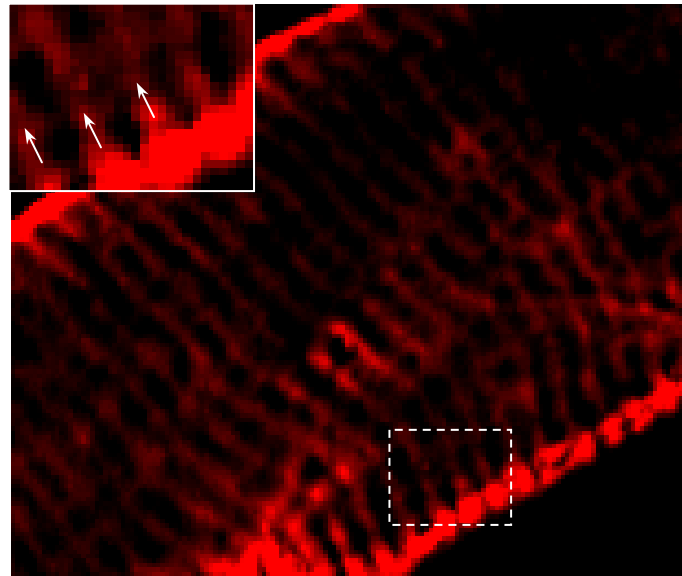
Nos études préliminaires indiquent que le rendement de transfection est optimal dans les conditions suivantes :

- 1) les plasmides d'expression sont utilisés très concentrés, à 10 µg/µL.
- 2) la solution plasmidique est directement injectée en intramusculaire dans la patte de souris. Cette technique d'injection présente un meilleur rendement de transfection par comparaison avec des injections sous-cutanées.

Dans ces conditions, le pic d'expression, c'est-à-dire le temps au bout duquel nous obtenons un maximum de fibres exprimant la protéine d'intérêt est situé à 14 jours après électroporation (figure 45). Nous obtenons en général un rendement de transfection de l'ordre de 10% et 20% pour le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Typiquement, pour un muscle tel que l'interosseux, qui possèdent entre 500 et 700 fibres musculaires, une dizaine de fibres exprimant le mutant sont en générale repérées.



PFA



Méthanol

Figure 46. Immunolocalisation de la Cav-3 sur des fibres musculaires adultes.

Cette expérience a été réalisée sur fibres musculaires adultes de *fdl* ou d'interosseux fraîchement dissociées, triturées dans du tyrode, et fixées au PFA ou au méthanol à -20°C.

En fixation PFA, la Cav-3 est essentiellement localisée au niveau du sarcolemme de surface qui apparaît sous forme d'un liseré. A plus fort grossissement (encart, zoom x2 de la zone encadrée), il est également possible d'observer une répartition en double stries (encart, flèches) qui sont en fait constituées d'un ensemble de petits points.

En fixation méthanol, La Cav-3 est également distribuée au niveau du sarcolemme de surface ainsi qu'au niveau de striations, qui ne présentent toutefois pas de double-stries (encart flèches, zoom x2 de la zone encadrée) comme c'est le cas en fixation PFA.

Dans cette étude, toutes les expériences d'immunomarquage et tous les enregistrements électrophysiologiques ont par conséquent été réalisés 14 jours après électroporation d'un des plasmides d'intérêt.

1.1. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires squelettiques adultes

Les cavéoles et les tubules transverses sont des structures membranaires sensibles aux traitements chimiques. De plus, la méthode de fixation peut elle-même conditionner l'efficacité du marquage. Nous avons alors testé deux techniques de fixation. La première, au paraformaldéhyde (PFA), est couramment utilisée. Le PFA étant un fixateur doux et réversible, il altère peu les épitopes et les structures cellulaires. La seconde, au méthanol, est plus drastique car elle dénature les protéines de manière irréversible et agit également sur les lipides membranaires. Toutefois, le choix d'une technique dépend des structures à analyser et de l'anticorps. Nous avons par conséquent testé le PFA que nous utilisons en routine au laboratoire, en parallèle avec le méthanol, des études précédentes utilisant le même anticorps anti-DHPR ayant été réalisées sur des préparations fixées au méthanol (Flücher et coll., 1993).

Par ailleurs, l'utilisation de fibres isolées présente l'avantage d'une part de conserver la membrane plasmique intacte, et d'autre part de garder la fibre dans son intégralité, ce qui est utile en microscopie confocale car il est alors possible, sur une même cellule, d'observer le marquage dans un plan en surface et en intracellulaire.

Comme l'illustre la figure 46 représentant des clichés de microscopie confocale, deux types de marquages ont été obtenus en fonction de la méthode de fixation.

La fixation des fibres isolées au PFA a permis d'obtenir un marquage de la Cav-3 au niveau sarcolemmal, sous forme d'un fin mais intense liseré soulignant le pourtour des fibres. Il est également possible d'observer une distribution intracellulaire de la Cav-3 sous formes de striations transversales, perpendiculaires au grand axe de la fibre, et régulièrement espacées. A plus fort grossissement (x 2) on peut voir que ces striations sont elles-mêmes le résultat d'un doublet de stries (encart), une strie étant le fruit de l'alignement de points (flèches).

La fixation des fibres isolées au méthanol à -20°C nous a également permis d'obtenir un marquage membranaire de la Cav-3 sur les fibres isolées. Des striations perpendiculaires au

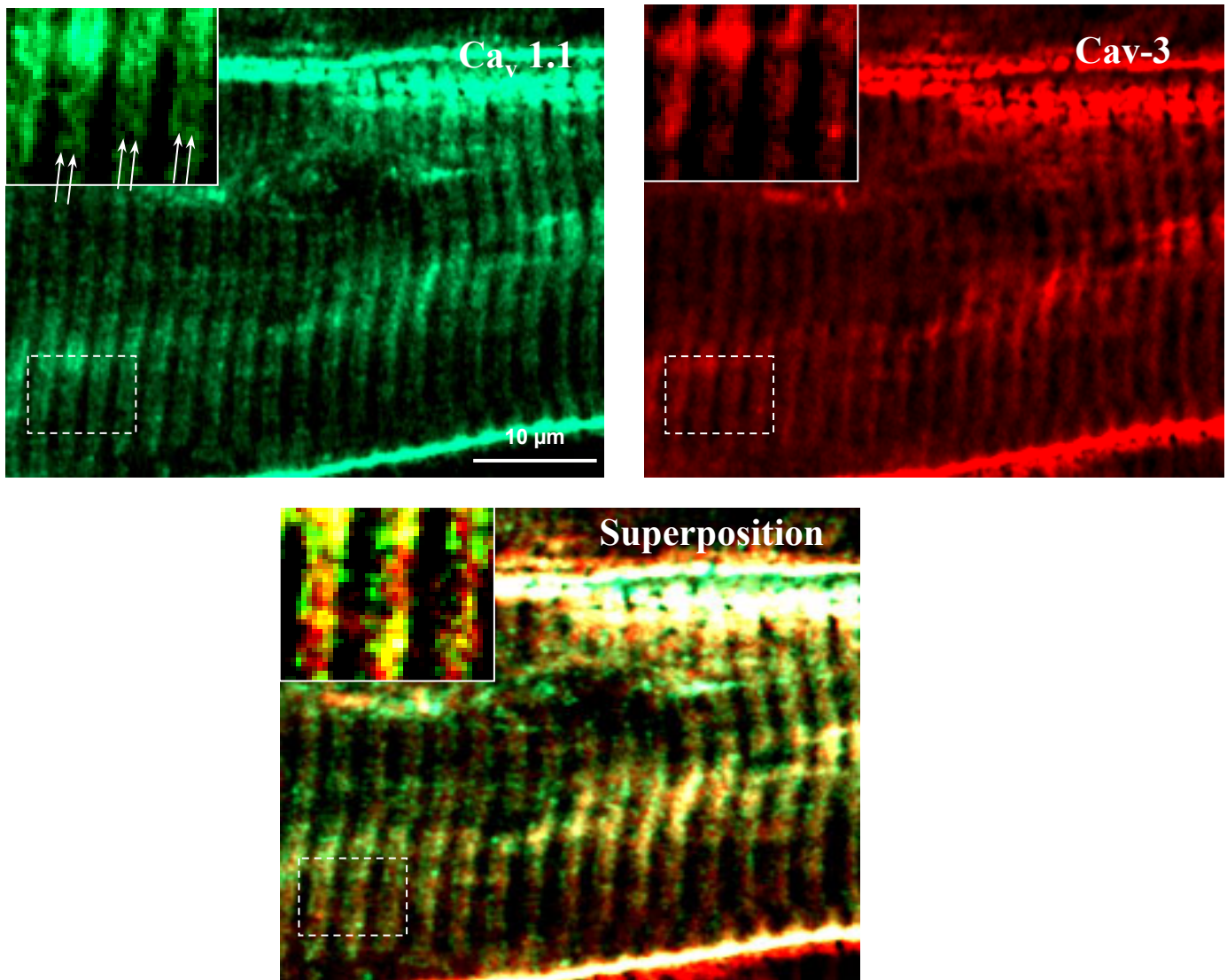


Figure 47. Immunolocalisation de la $Ca_v 1.1$ et colocalisation avec la Cav-3 sur des fibres musculaires squelettiques adultes.

Cette expérience a été réalisée sur fibres musculaires adultes fraîchement dissociées, triturées dans du tyrode, et fixées au méthanol à -20°C .

La sous-unité $Ca_v 1.1$ a une distribution à la fois sarcolemmale et intracellulaire sous forme de striations qui apparaissent à plus fort grossissement sous forme d'un doublet de stries (encart, grossissement x2 de la zone encadrée).

La superposition des immunomarquages de $Ca_v 1.1$ (en vert) et de la Cav-3 (en rouge) indique que les deux protéines sont au moins partiellement colocalisées au niveau des stries et quasi totalement colocalisées au niveau du sarcolemme de surface (encart, grossissement x2 de la zone encadrée).

grand axe des fibres sont également visibles. Toutefois, elles sont plus intenses qu'avec la fixation au PFA et chaque strie ne semble pas être le résultat de l'alignement de petits points (encart, grossissement x2 de la zone encadrée).

1.2. Immunolocalisation de la sous-unité Ca_v 1.1 du DHPR dans le muscle adulte et colocalisation avec la Cav-3.

Les fibres isolées ont dans cette expérience été fixées au méthanol. Nous avons ensuite procédé à marquage en séquentiel des fibres isolées. La Cav-3 a été révélée par de la cyanine 3 (en rouge) et Ca_v 1.1 par de l'alexa₄₈₈ (en vert). Les fibres ont enfin été observées en microscopie confocale. Comme pour les cultures, l'utilisation de la microscopie confocale est impérative pour superposer les images des deux marquages d'un même plan confocal afin de pouvoir conclure quant à la colocalisation de deux protéines.

La sous-unité Ca_v 1.1 du DHPR est considérée comme un marqueur des tubules transverses. En effet, bien qu'elle ne soit pas exclusivement localisée dans le système T, elle est préférentiellement distribuée dans ce vaste système d'invaginations membranaires pénétrant en profondeur dans la fibre.

Comme le montre la figure 47 (immunomarquage de Ca_v 1.1, en vert), la sous-unité Ca_v 1.1 est localisée à la fois au niveau du sarcolemme de surface, ainsi qu'en intracellulaire, sous forme de striations transversales au grand axe de la fibre. Ces striations sont en fait formées d'un doublet de stries comme nous pouvons le voir à plus fort grossissement (encart, grossissement x2 de la zone encadrée).

Rappelons que les tubules T sont localisés au niveau des jonctions bande A-Bande I, soit 2 tubules par sarcomère. Le marquage obtenu pour la Cav-3, sous forme de double-stries régulièrement réparties, nous faisait penser à un marquage tubulaire, c'est pourquoi nous avons effectué des expériences de colocalisation de la Cav-3 et de Ca_v 1.1.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 47, la Cav-3 et Ca_v 1.1. semblent être fortement colocalisées au niveau de la membrane plasmique de surface, comme le révèle la superposition des deux marquages. A plus fort grossissement, les deux protéines sont

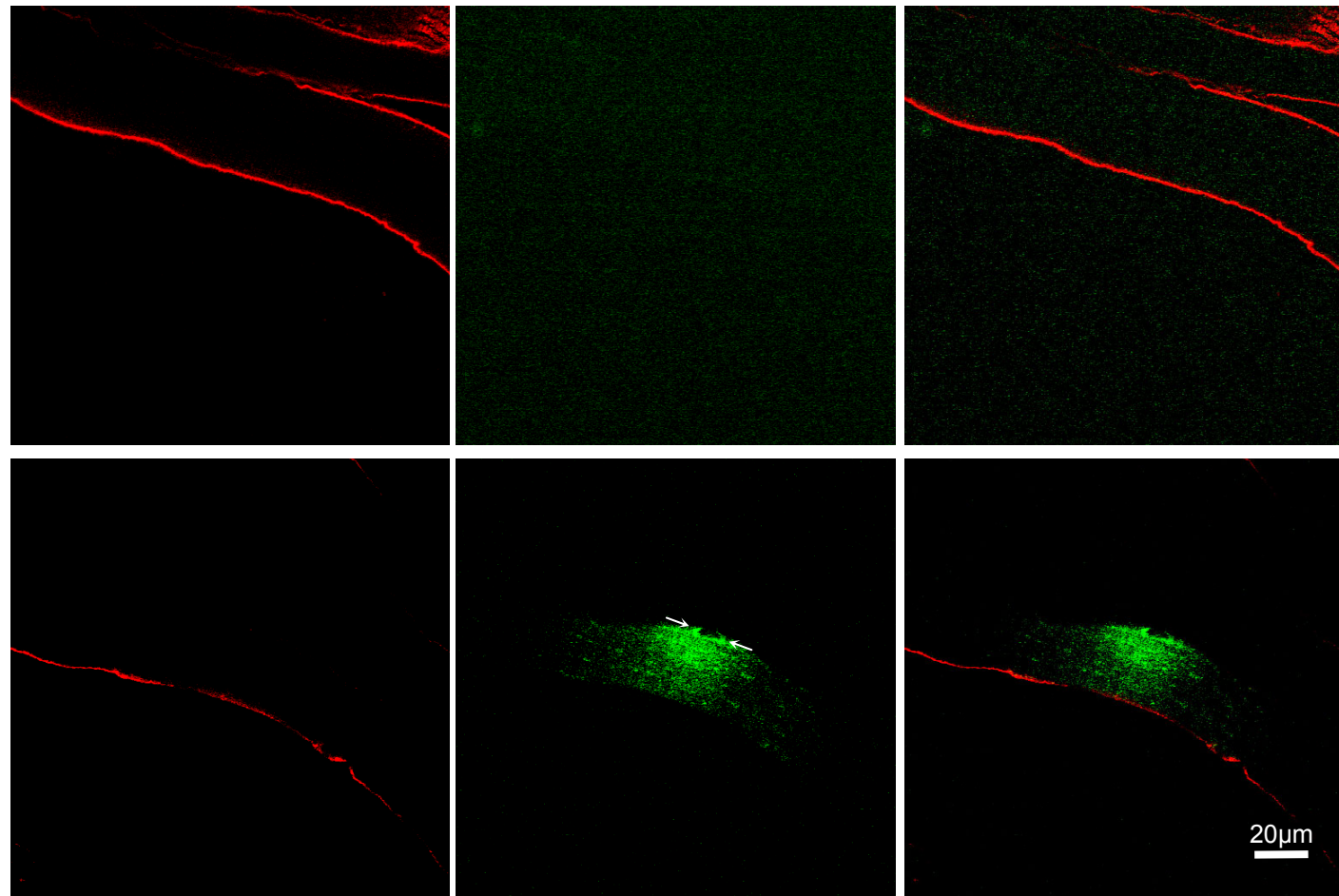
Anti-Cav-3**Cav-3^{P104L}-YFP****Superposition**

Figure 48. Immunolocalisation de la Cav-3 sur des fibres musculaires adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Cette expérience a été réalisée sur fibres musculaires adultes de *fdb* ou d'interosseux fraîchement dissociées, triturées dans du tyrode et fixées au PFA, 14 jours après transfert de gène par la technique de l'électroporation. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps anti-Cav-3 révélé en rouge, puis observées en microscopie confocale. Les clichés représentent une fibre contrôle (clichés du haut) et une fibre exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (en vert) présentes dans une même zone. Afin de comparer les intensités de marquage entre les deux cellules, les paramètres ont été déterminés sur la cellule contrôle et conservés pour la prise de cliché de la cellule transfectée.

Le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (en vert) adopte préférentiellement une localisation périnucléaire (flèches) correspondant vraisemblablement à l'appareil de Golgi, bien qu'une partie du signal soit localisée au niveau intracellulaire. Par comparaison du marquage de la Cav-3 entre la cellule contrôle et la cellule exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, nous observons une réduction à la fois de l'intensité et de la quantité de marquage sur la fibre exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

également partiellement colocalisées au niveau de striations transversales à l'axe de la fibre, correspondant vraisemblablement au réseau tubulaire transverse. Ce résultat, bien qu'encourageant, reste cependant un résultat préliminaire. En effet, il semblerait qu'en fonction du type de fixation, le profil de marquage diffère, notamment au niveau de la fréquence et de la structure des stries transversales.

1.3. Immunolocalisation de la Cav-3 dans les fibres musculaires squelettiques adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP

Cette étude a été réalisée sur des fibres musculaires de muscles *fdb* ou IO électroporés par le plasmide codant pour la Cav-3^{P104L}-YFP. Les cellules ont été isolées, fixées au méthanol et marquées par un anticorps anti-Cav-3 polyclonal, révélé par la Cyanine 3 (en rouge). L'immunomarquage a enfin été observé au microscope confocal. En raison du faible rendement de transfection, nous ne disposons actuellement que de résultats préliminaires concernant les effets de l'expression transitoire du mutant sur la localisation de la Cav-3 endogène.

La figure 48 représente l'immunolocalisation de la Cav-3 dans des fibres contrôles et exprimant le mutant Cav-3^{P104L}. Afin de pouvoir comparer deux cellules entre elles, les paramètres de prise de vue, tels que le gain, l'amplifier offset... ont été déterminés de manière optimale sur une fibre contrôle et conservés pour la prise de vue d'une fibre exprimant le mutant. Cette figure indique que l'expression du mutant semble altérer la quantité de Cav-3 endogène membranaire. Ainsi, la fibre exprimant le mutant présente un marquage de la Cav-3 endogène moins intense que la fibre contrôle. De plus, une grande portion de la fibre ne possède pas de Cav-3 endogène.

Par ailleurs, nous pouvons observer que le mutant marqué à la YFP (en vert), est préférentiellement localisé sous formes de points de part et d'autre d'un ou de plusieurs noyaux (flèches). Cette localisation correspondrait vraisemblablement à l'appareil de Golgi, comme il l'a précédemment été décrit (Ralston et coll., 2001).

2. Etude du Courant calcique voltage-dépendant de type L de fibres musculaires squelettiques adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

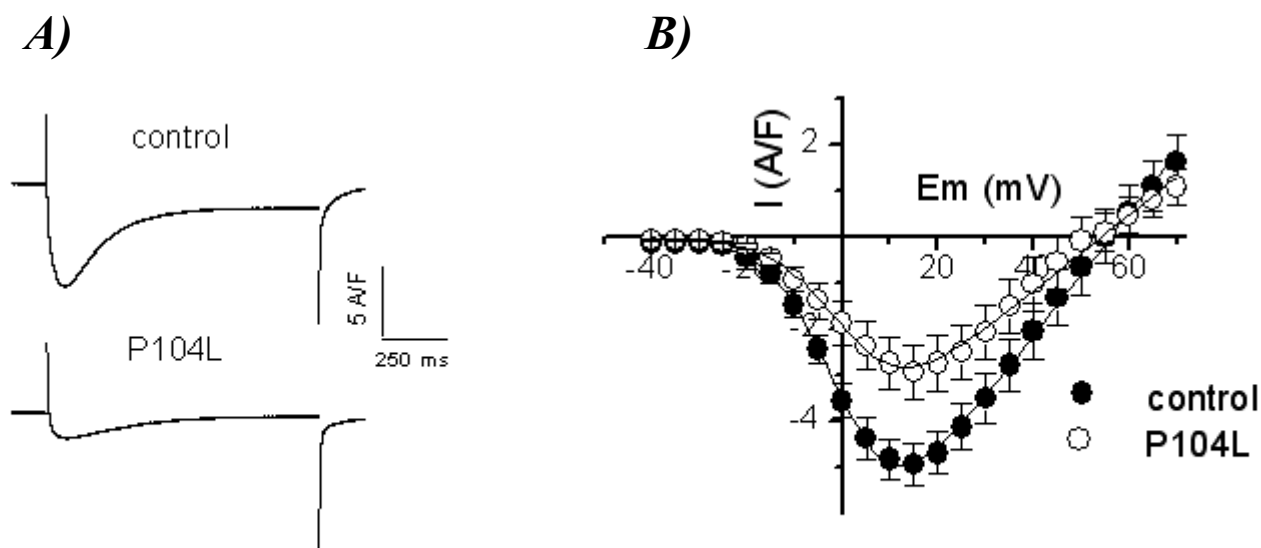


Figure 49. (A) Traces représentatives du courant calcique de type L enregistré au potentiel indiqué, sur des fibres squelettiques adultes contrôles et transfectées. (B) Courbes I/V du courant calcique de type L obtenues sur les mêmes cellules.

(A) Traces représentatives de courant obtenus à +30 mV après un pulse dépolarisant de 1500 msec à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV pour des cellules contrôles et transfectées.

(B) Courbes I/V (densité/potentiel) moyennes du courant calcique voltage-dépendants de type de type L ($I_{Ca,L}$) obtenus sur des fibres musculaires adultes contrôles et exprimant la Cav-3^{P104L}-YFP.

La figure 49A représente des tracés typiques de courants calciques de type L évoqués suite à une dépolarisation à un potentiel de +15 mV. Nous pouvons alors remarquer que la densité maximale du courant de type L est fortement diminuée dans le lot de cellules exprimant de mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

Cette différence est également clairement visible sur les courbes densité/potentiel moyennes (figure 49B). Les valeurs de la conductance maximale $G_{\max}$, du facteur de pente k , du potentiel de demi-activation $V_{0,5}$ et du potentiel d'inversion V_{rev} sont récapitulées dans le tableau ci-dessous ainsi que dans la figure 50.

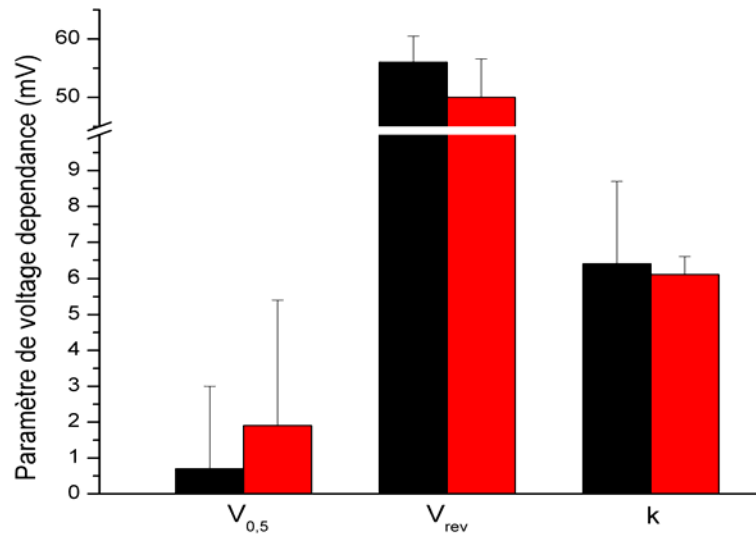
Paramètres mesurés (moyennes $\pm$ se)	fibres contrôles (n=10)	fibres transfectées par Cav-3 ^{P104L} -YFP (n=12)
$G_{\max}$ (S/F)	152 $\pm$ 15	99 $\pm$ 10
$V_{0,5}$ (mV)	0,7 $\pm$ 2,3	1,9 $\pm$ 3,2
V_{rev} (mV)	56 $\pm$ 4,5	50 $\pm$ 6,6
k (mV)	6,4 $\pm$ 2,3	6,1 $\pm$ 0,5

Tableau 20. Paramètres de voltage-dépendance du courant calcique de type L ($I_{\text{Ca, L}}$) de fibres squelettiques adultes contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. (Significativité selon un test t de student : *** $p < 0,0001$). Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de cellules enregistrées

Le seul paramètre significativement différent est la conductance maximale $G_{\max}$ passant de 152 $\pm$ 15 S/F pour les fibres contrôles à 99 $\pm$ 10 S/F pour les fibres exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Cette réduction de la conductance maximale des canaux est comparable à la réduction de la densité de $I_{\text{Ca, L}}$. Les paramètres de voltage-dépendance restent quant à eux significativement inchangés.

En conclusion aux chapitres I, II et III, portant sur le rôle de la cavéoline-3 sur la fonction des canaux calciques voltage-dépendants de type L dans les cellules musculaires squelettiques, le tableau suivant récapitule les principaux résultats obtenus dans pour les lots de cellules contrôles et exprimant le mutant Cav-3^{P104L}.

A)



B)

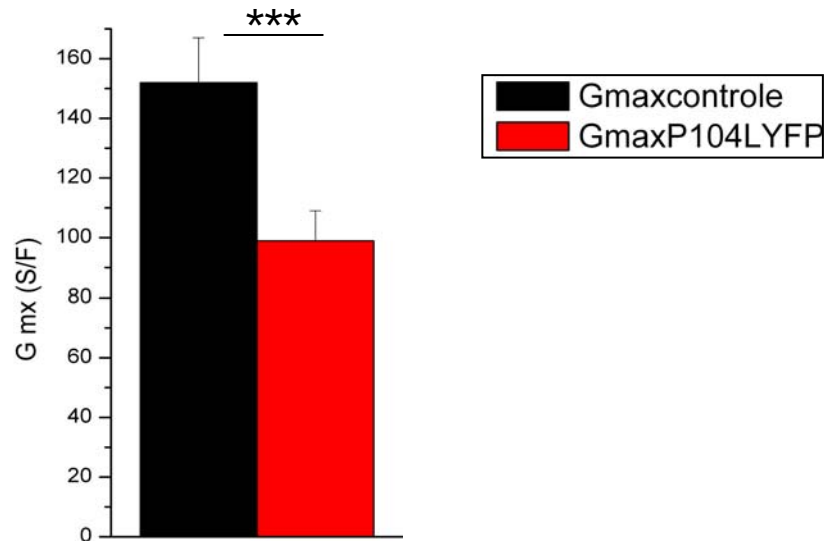


Figure 50. (A) Paramètres de voltage-dépendance et (B) conductance maximale des canaux calciques de type L de fibres adultes contrôles ou exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP.

A) comparaison des paramètres de voltage-dépendance de fibres adultes contrôles ou électroporées par la Cav-3^{P104L}-YFP. Les valeurs moyennes pour $V_{0.5}$, V_{rev} et k étaient de $0,7 \pm 2,3$ mV, $56 \pm 4,5$ mV et $6,4 \pm 2,3$ mV pour les fibres contrôles ($n = 10$) et $1,9 \pm 3,2$ mV, $50 \pm 6,6$ mV and $6,1 \pm 0,5$ mV pour les fibres exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP ($n = 12$). Aucun des paramètres de voltage-dépendance n'est significativement différent entre les deux lots de cellules analysés.

B) comparaison de la conductance maximale des canaux de type L de fibres adultes contrôles ou transfectées par le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. La conductance maximale des canaux était alors diminuée de 35% dans les cellules transfectées comparativement aux les cellules contrôles ($G_{max} = 99 \pm 10$ S/F contre 152 ± 15 S/F respectivement).

Paramètres étudiés sur les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L} (comparativement à des cellules contrôles)	Chapitre I	Chapitre II	Chapitre III
	Myotubes Squelettiques Primaires	Fibres Musculaires Fœtales	Fibres Musculaires Adultes
Localisation du mutant Cav-3^{P104L}	Périnucléaire	Périnucléaire	Périnucléaire
Marquage de la Cav-3 endogène	Indétectable	Indétectable	Détectable mais fortement diminué
Densité du Courant Calcique de type T	Inchangée	-	-
Conductance maximale des canaux calciques de type L (Gmax)	Diminution de 55%	Diminution de 55%	Diminution de 35%
Capacitance membranaire (Cm)	Inchangée	Inchangée	Non déterminée
Intensité de marquage de Ca_v 1.1	Diminution de 60%	Non déterminée	Non déterminée

Tableau 21 : Tableau récapitulatif des différents paramètres étudiés dans les lots de cellules contrôles et exprimant le mutant Cav-3^{P104L}. Les valeurs ou observations indiquées ont été établies en comparaison aux résultats obtenus pour le lot de cellules contrôles.

2^{ème} partie

Rappel de la problématique : existe-t-il une interaction entre la Cav-3 et le DHPR dans le muscle squelettique ?

Cette partie vise à analyser par des techniques de co-fractionnement, de pull-down et de co-immunoprécipitation si la Cav-3 et la sous-unité Ca_v 1.1 interagissent et de caractériser cette interaction. Grâce à une collaboration avec l'équipe de Michel Ronjat (Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, CEA Grenoble) nous disposons des plasmides codant pour les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité pore du canal calcique de type L, ainsi que la sous-unité annexe β_{1a} , sous forme de protéines recombinantes.

- 2^{ème} partie -

**ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE
LA CAVÉOLINE-3 ET LA SOUS-UNITÉ Ca_v 1.1 DU DHPR**

L'étude des courants calciques de cellules déficientes en Cav-3 a montré que :

- 1) Que ce soit des myotubes primaires, des fibres squelettiques fœtales ou des fibres adultes, les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}, induisant une déficience en Cav-3 endogène, présentent une réduction drastique de l'intensité du courant calcique de type L ;
- 2) cet effet est une conséquence de la déficience en Cav-3 et non de l'état de différenciation des cellules;
- 3) cette réduction du courant calcique de type L serait due à une réduction du nombre de canaux calciques de type L à la membrane.

Nous avons alors émis l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre la Cav-3 et la sous-unité Ca_v 1.1 du DHPR. Cette interaction pouvant être fonctionnelle ou de type adressage/stabilisation du canal à la membrane.

Afin de réaliser cette étude, nous nous sommes basés sur deux approches complémentaires d'étude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR. D'une part, des expériences de co-immunoprécipitation qui permettent de conclure quand à une interaction en deux partenaires protéiques. D'autre part, nous avons effectué des expériences de pull-down décrire ce que c'est entre les Cav-3 et différentes boucles intracellulaires de Ca_v 1.1 ainsi que la sous-unité β_{1a} , ce qui permet de déterminer un domaine d'interaction de la Cav-3 sur le DHPR.

Le canal calcique de type L étant une protéine transmembranaire, les domaines cytoplasmiques représentent donc des sites potentiels d'interaction avec des partenaires protéiques. Les parties cytoplasmiques de la sous-unité pore du canal calcique de type L sont représentées par ses extrémités N- et C-terminales, par les boucles reliant les différents domaines membranaires du canal, ainsi que par les « linkers », c'est-à-dire les petites boucles entre chaque segment intramembranaire d'un domaine (voir Historique chapitre II § 1.1.2).

Peu de domaines fonctionnels à l'égard de l'activité du canal ont été décrits sur ces « linkers ». En revanche, de nombreuses études montrent un ou plusieurs rôles des boucles interdomaines dans la régulation de l'activité du canal calcique de type L. Par ailleurs, les sous-unités annexes (β , $\alpha_2\delta$, γ) ont également un rôle dans la régulation de l'activité du canal et/ou dans son adressage à la membrane plasmique. Ainsi, nous avons plus particulièrement cherché l'existence d'une interaction entre la Cav-3 et les différentes boucles interdomaines, ainsi qu'avec une sous-unité annexe en particulier : la sous-unité β_{1a} .

1. Etude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR par co-immunoprécipitation.

Dans cette étude, la Cav-3 a été immunoprécipitée par un anticorps monoclonal anti-Cav-3. Les protéines co-immunoprécipitées, et notamment la présence de $Ca_v 1.1$, ont ensuite été analysées par SDS PAGE et western blot.. Ainsi, nous avons incubé une préparation de vésicules de HSR (Heavy Sarcoplasmic Reticulum).

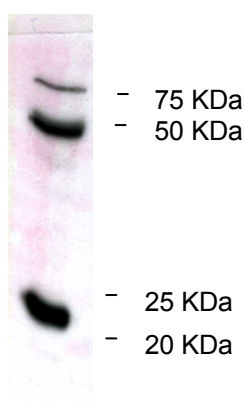
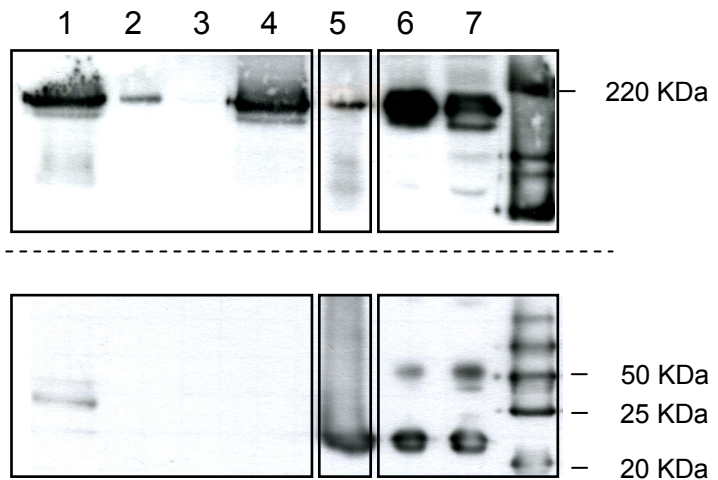
La co-immunoprécipitation a été réalisée à partir d'une préparation obtenue après fractionnement de muscle squelettique et correspondant à la fraction de réticulum sarcoplasmique la plus dense (Heavy Sarcoplasmic Reticulum ou HSR). Cette fraction correspond donc à une fraction vésiculaire contenant non seulement du réticulum sarcoplasmique mais aussi des portions de tubule T. Elle est donc particulièrement riche en DHPR et RyR (Marty et coll., 1993).

1.1. Co-fractionnement de la Cav-3 et du DHPR dans les vésicules de HSR

Dans l'éventualité d'une interaction directe ou indirecte entre la Cav-3 et le DHPR, ces deux protéines devraient se trouver dans la même fraction membranaire. Le but de cette

A)

anti Cav-3

**B)**anti-N_{term} Ca_v 1.1

anti Cav-3

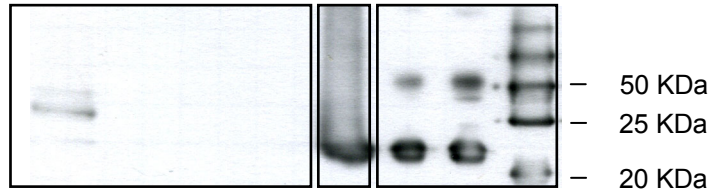


Figure 51. (A) Co-fractionnement de la Cav-3 et du DHPR dans des vésicules de HSR et (B) co-immunoprécipitation de la Cav-3 et de Ca_v 1.1

(A) 30 µg de vésicules de HSR solubilisées ont été analysées en western-blot révélé par un anticorps anti-Cav-3 polyclonal. Une bande majoritaire est alors détectée, avec un poids moléculaire compris entre 20 et 25 KDa. Deux autres bandes à environ 50 et 75 KDa sont également visibles et pourraient correspondre à la Cav-3 sous forme de dimères ou d'oligomères.

(B) L'immunoprécipitation de la Cav-3 a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie C-terminale de la Cav-3, à partir de vésicules de HSR solubilisées. L'analyse par western blot des différentes fractions obtenues lors de l'immunoprécipitation a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la partie N-term de Ca_v 1.1 et d'un anticorps polyclonal anti-Cav-3.

La fraction de co-immunoprécipitation a été chargée dans le puits 5. 30 et 15 µg respectivement de vésicules de HSR ont servi de contrôle positif de l'anticorps anti-DHPR (puits 6 et 7).

Les fractions de lavage des billes d'agarose ont été déposées dans les puits 2 et 3 et le flow through de co-immunoprécipitation a été chargé dans le puits 4.

La présence à la fois de Cav-3 et de Ca_v 1.1 dans le produit de co-immunoprécipitation (puits 5) indique d'une part que la Cav-3 a bien été immunoprécipitée et d'autre part que le DHPR fait partie des protéines co-immunoprécipitées. En d'autres termes que Ca_v 1.1 et la Cav-3 interagissent.

étude était de déterminer si les fractions membranaires enrichies en DHPR, telles que les vésicules de HSR contenaient également de la Cav-3.

De plus, si la présence de Cav-3 se confirme dans les vésicules de HSR, celles-ci peuvent alors servir de matériel biologique pour les expériences de co-immunoprécipitation.

La figure 51A représente un western blot, obtenu après SDS-PAGE de 30 µg de vésicules de HSR, révélé par un anticorps anti-Cav-3 polyclonal. Cet anticorps reconnaît deux bandes. La première, la plus intense, a un poids moléculaire compris entre 20 et 25 KDa, correspondant précisément au PM de la Cav-3 (~21 KDa). La deuxième bande se situe autour de 50 KDa et correspondrait vraisemblablement à des dimères de Cav-3, qui rappelons-le, est la structure native qu'adopte la Cav-3 dans la membrane plasmique. L'échantillon n'ayant pas été dénaturé au bain Marie bouillant avant dépôt, les différentes conformations de la Cav-3 sont détectables.

1.2. Co-immunoprécipitation de la Cav-3 et du DHPR

La présence de Cav-3 au sein de la fraction de HSR ayant été montrée, nous avons utilisé cette préparation pour les expériences de co-immunoprécipitation. La Cav-3 a été immunoprécipitée avec un anticorps monoclonal et des billes de protéine G couplées à la sépharose. La figure 51B présente des Western blots représentatifs obtenus à partir des différentes fractions de co-immunoprécipitation en révélant la Cav-3 à l'aide d'un anticorps polyclonal et le DHPR à l'aide un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine N-terminal de Ca_v 1.1 (anti- Ca_v 1.1 N_{term}).

La fraction de « pré-clearing » (puits 1) a été obtenue après incubation des billes de protéine G-sépharose avec la solution de vésicules de HSR, sans ajout d'anticorps. Cette fraction contient donc les protéines fixées de manière non spécifique sur les billes de protéine G-sépharose. En d'autres termes, il s'agit du bruit de fond apporté par la protéine G et/ou les billes de sépharose. Comme le montre les résultats de western blots, les billes de protéine G-sépharose se lient de manière non spécifique à une petite quantité de sous-unité Ca_v 1.1 ainsi que de Cav-3.

Les fractions de lavage des billes ont été déposées dans les puits 2 et 3.

Le Flow Through de Co-IP a été déposé dans le puits 4. Le flow through correspond à toutes les protéines qui n'ont pas interagit avec la Cav-3. Une bande correspondant au DHPR est visible dans ce puits. Une partie du DHPR n'a donc pas interagit avec la Cav-3. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela : soit les conditions de liaison n'étaient pas optimales ; soit parce toutes les molécules de DHPR n'interagissent pas avec la Cav-3 ; soit l'interaction est de faible affinité.

30 et 15 µg de protéines totales de HSR ont été déposées (puits 6 et 7 respectivement) et constituent les contrôles positifs de l'anticorps anti-DHPR. L'anticorps anti-N_{term} de Ca_v 1.1 a révélé une bande d'environ 170 KDa dans ces puits, ce qui correspond approximativement à ce qui a pu être décrit précédemment pour la sous-unité Ca_v 1.1 (Marty et coll., 1993). L'anticorps anti-Cav-3 a révélé quant à lui deux bandes: l'une comprise entre 20 et 25 KDa, et l'autre à ~50 KDa, comme nous l'avons précédemment observé sur cette même préparation (voir Résultats III, §1.1).

La fraction de co-immunoprécipitation (puits 5) correspond à la fraction de protéines de HSR retenues par l'anticorps anti-Cav-3. L'anticorps anti Cav-3 détecte dans cette fraction une bande de 20-25 KDa, de même poids moléculaire que celle observée dans les puits 6 et 7. L'hybridation avec l'anticorps anti-N_{term} de Ca_v 1.1 (46B) révèle également une bande à ~170 KDa. Par comparaison avec les contrôles positifs (puits 5 et 6), nous pouvons en conclure que cette bande correspond à Ca_v 1.1.

La présence de DHPR parmi les protéines co-immunoprécipitées avec la Cav-3 suggère fortement une interaction entre ces deux protéines.

2. Etude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR par pull-down de la Cav-3 par différents domaines de Cav 1.1

2.1 Pull down de la cav-3 entière par les boucles I-II, II-III, III-IV, les domaines N- et C-Terminaux de Ca_v 1.1, ainsi que par la sous-unité β_{1a}.

Afin de préciser, les sous-unités et domaines avec lesquels le DHPR seraient susceptible d'interagir avec la Cav-3, nous avons effectué un pull-down de la Cav-3 par les différents domaines de Ca_v 1.1.

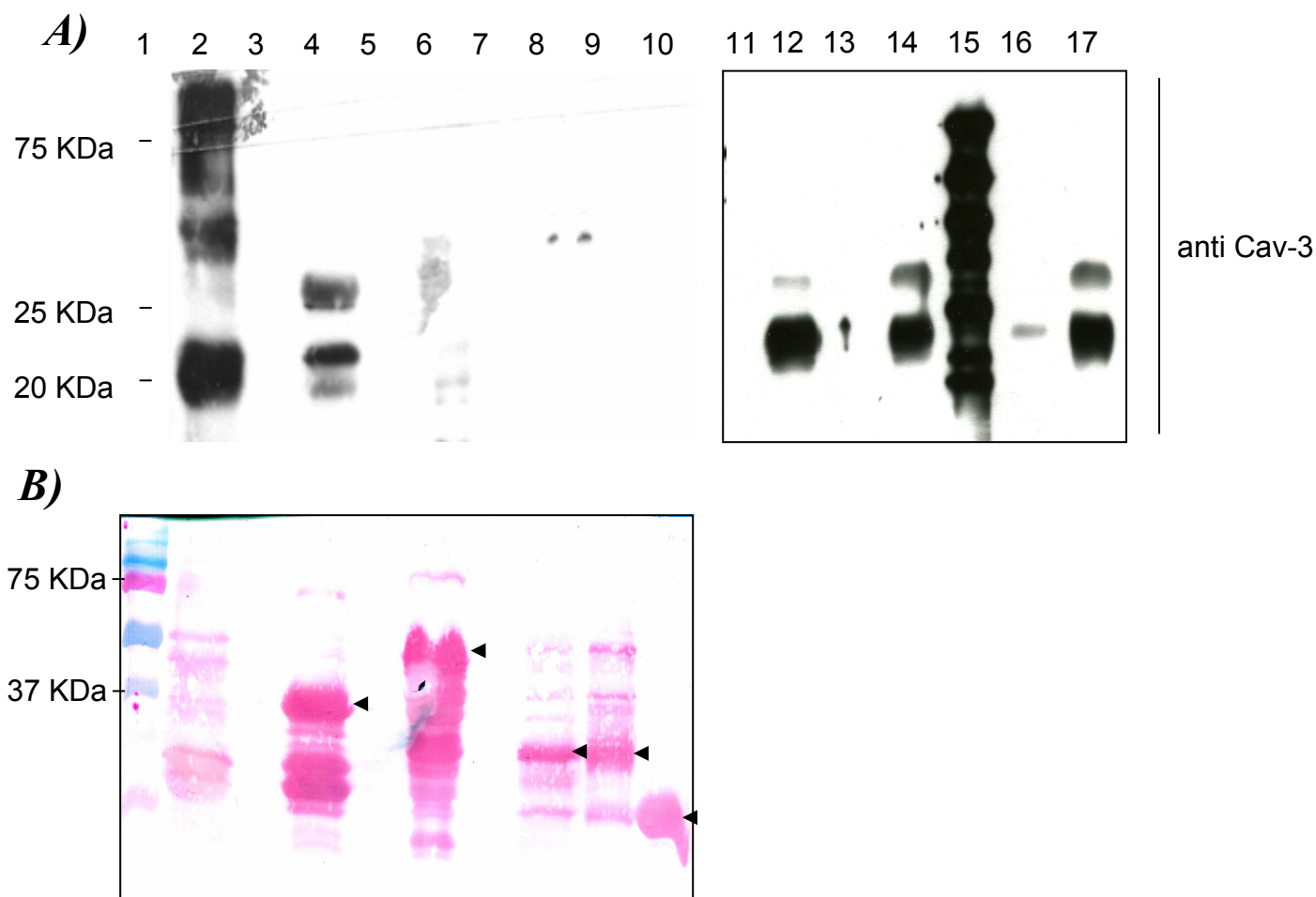


Figure 52. (A) et (B) Pull-downs de la Cav-3 par les boucles interdomaines de $\text{Ca}_v 1.1$ et par la sous-unité β_{1a} , et (C) vérification de l'intégrité des préparations par coloration au rouge Ponceau

(A) et (B) Les boucles interdomaines de $\text{Ca}_v 1.1$ ainsi que la sous-unité β_{1a} ont été immobilisés via leur tag GST sur des billes glutathion-Agarose, puis incubées avec la Cav-3 traduite en extrait de réticulocytes. Le western blot a été révélé par un anticorps anti-Cav-3. Le puits 1 contient le marqueur de PM; le puits 2 contient la charge de Cav-3; les puits 4 et 6 contiennent respectivement le produit du pull-down de la Cav-3 par les boucles I-II et II-III, les puits 8 et 11 présentent le résultat du pull-down de la Cav-3 par la boucle III-IV; les puits 9 et 13 par la β_{1a} et les puits 10 et 16 par la GST. La présence d'une bande correspondant à la Cav-3 dans le puits 4 indique que les deux protéines interagissent. L'absence de signal dans tous les autres puits contenant le produit des différents pull-downs indique que la Cav-3 n'interagit pas ni avec les autres boucles de Cav 1.1, ni avec la β_{1a} . L'interaction avec la I-II est par ailleurs spécifique comme le montre l'absence de signal dans les puits 10 et 16.

(C) Membrane correspondant à la figure 48A colorée au rouge Ponceau des différentes purification des protéines de fusion, permettant d'évaluer l'intégrité des protéines purifiées. Malgré la présence de protéines contaminantes, les purifications contiennent majoritairement les protéines de fusion (têtes de flèches).

Dans ces expériences, la sous-unité β_{1a} ainsi que les différentes portions de Ca_v 1.1 marqués par la Glutathion-S-Transférase (GST) ont été exprimées dans un système bactérien, purifiées et immobilisées sur des billes d'Agarose-Glutathion réduit (agarose-GSH), le substrat naturel de la GST. Cav-3, produite par traduction *in vitro* en extraits de réticulocytes, a ensuite été incubée en présence des billes et un western blot de la fraction fixée, révélé avec un anticorps anti-Cav-3, permet de révéler d'éventuelles interactions avec la Cav-3.

D'une manière générale, afin d'avoir une référence de la quantité de protéine utilisée et une estimation de la quantité de protéine qui peut avoir interagit, la même quantité de Cav-3 que celle utilisée pour les pull-downs est chargée dans un puits. Cette référence est communément appelée « la charge ».

La figure 52A montre un western blot obtenu après SDS PAGE des billes d'agarose après incubation des différentes boucles de Ca_v 1.1 avec la Cav-3 traduite, puis par hybridation de la membrane par un anticorps anti-Cav-3.

La charge de Cav-3 (puits 2) correspond à la charge de 10 μ L de traduction *in vitro* de Cav-3. Une bande comprise entre 20 et 25 KDa correspondant à la Cav-3 peut alors être observée.

Le pull-down entre la boucle I-II et la Cav-3 (puits 4) a permis de révéler une bande de même poids moléculaire que la Cav-3 (puits 2), suggérant l'existence d'une interaction directe entre ces deux protéines.

En revanche, les boucles II-III, III-IV et la sous-unité β_{1a} ne semblent pas interagir avec la Cav-3 (puits 6, 8, 9, 11 et 13), puisque aucune bande correspondant à Cav-3 n'a pu être révélée.

Le contrôle négatif (puits 10 et 16) correspond au pull-down entre la GST et la Cav-3. Cette réaction permet de déterminer le « bruit de fond », c'est-à-dire la part d'interaction non-spécifique due aux billes d'agarose et/ou à la GST. Aucune bande n'a pu être révélée, preuve de l'absence de bruit de fond.

Sur figure 52B correspond à la membrane de la figure 52A après coloration au Rouge Ponceau, ce dernier révélant les composés peptidiques et permettant ainsi d'évaluer la pureté des préparations et d'estimer les quantités relatives des diverses protéines.

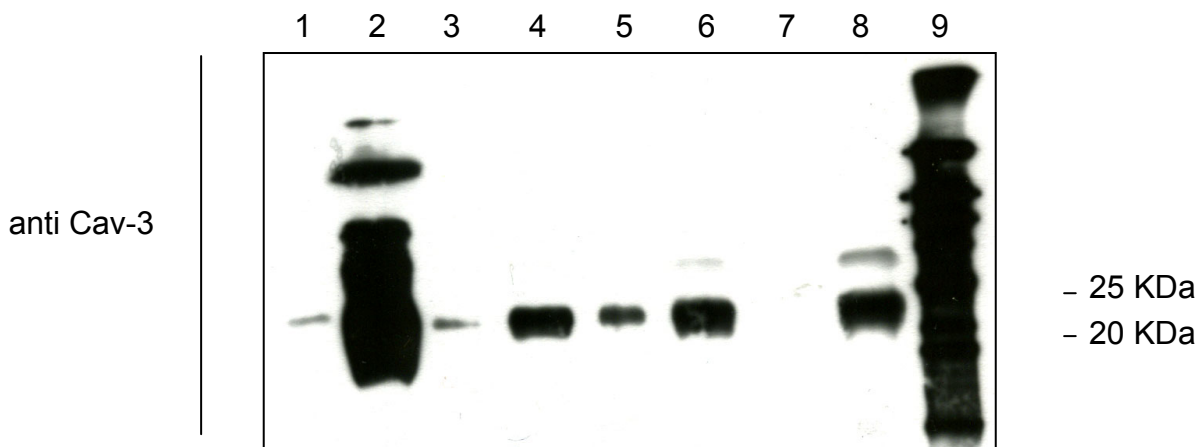


Figure 53. Pull-down de la Cav-3 par les boucles I-II, II-III, la sous-unité β_{1a} et le peptide AIDsk.

Les boucles interdomaines de Ca_v 1.1 ainsi que la sous-unité β_{1a} ont été immobilisées via leur tag GST sur des billes glutathion-Agarose, le peptide AID, biotinylé, à quant à lui été immobilisé sur des billes streptavidine. Chaque domaine a été incubé avec de la Cav-3 traduite *in vitro* en extrait de réticulocytes. Le puits 2 contient la charge de Cav-3, les puits 3, 5 et 7 correspondent au produit du pull-down de la Cav-3 par la boucle I-II, le pAIDsk et la boucle II-III respectivement. L'analyse par western blot, révélé par un anticorps anti-Cav-3, indique que la Cav-3 interagirait avec la boucle I-II (puits 3) au niveau de son domaine AID (puits 5). Le pull-down de la Cav-3 par la boucle II-III (puits 7) a servi de contrôle négatif. Les puits 4, 6 et 8 contiennent respectivement les flow-through des pull-downs de la Cav-3 par la I-II, le pAIDsk et la II-III.

Les bandes correspondant aux protéines de fusion sont indiquées par une flèche. Bien que la purification de protéines recombinantes en extrait bactérien ne soit pas pure, des bandes caractéristiques des différentes protéines de fusion sont majoritaires (têtes de flèches).

En outre, la comparaison de l'intensité des bandes des protéines recombinantes entre les différents puits indique que les différentes préparations étaient à peu près dans des gammes de concentrations équivalentes, à l'exception de la GST (PM ~ 25 KDa, puits 9) qui est présente en excès.

2.2 Pull down de la Cav-3 par le peptide AID squelettique (pAID_{sk})

Nos résultats préliminaires suggérant qu'il existerait une interaction entre la Cav-3 et la boucle I-II, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce domaine. De plus, au niveau de la boucle I-II, la sous unité β interagit avec Ca_v 1.1 via un motif de 18 résidus appelé AID (De Waard et coll., 1994). Ce domaine fonctionnel peut ainsi constituer un domaine d'interaction préférentiel avec la Cav-3

Le peptide AID squelettique (pAID_{sk}), synthétisé avec des lysines biotinylées a pu être immobilisé sur des billes de streptavidine qui ont alors été mis en contact avec Cav-3. La figure 53 illustre le western blot, révélé par un anticorps anti-Cav-3, obtenu à la suite de cette expérience.

La « charge » se situe dans le puits 2. Un pull-down entre la Cav-3 et la boucle I-II. A été réalisé (puits 3) en tant que contrôle positif de l'interaction. Nous retrouvons d'ailleurs cette interaction entre ces deux protéines, bien qu'elle apparaisse plus faible que précédemment.

L'interaction entre la Cav-3 et le peptide AID a été analysée par dépôt des billes de streptavidine après incubation avec la Cav-3 (puits 5). Une bande correspondant au PM de la Cav-3 est alors visible, indiquant que le Cav-3 interagirait avec la boucle I-II au niveau du domaine AID.

Les « flow through », c'est-à-dire la fraction de Cav-3 qui n'a pas interagi par la fraction immobile (ici, la boucle I-II ou le pAID_{sk}) ont également été déposés (puits 4 et 6) afin d'estimer la quantité de Cav-3 restée libre. Il est alors possible de comparer la quantité de cav-3 qui a interagit et celle qui est restée libre. Nous pouvons alors remarqué qu'une grande

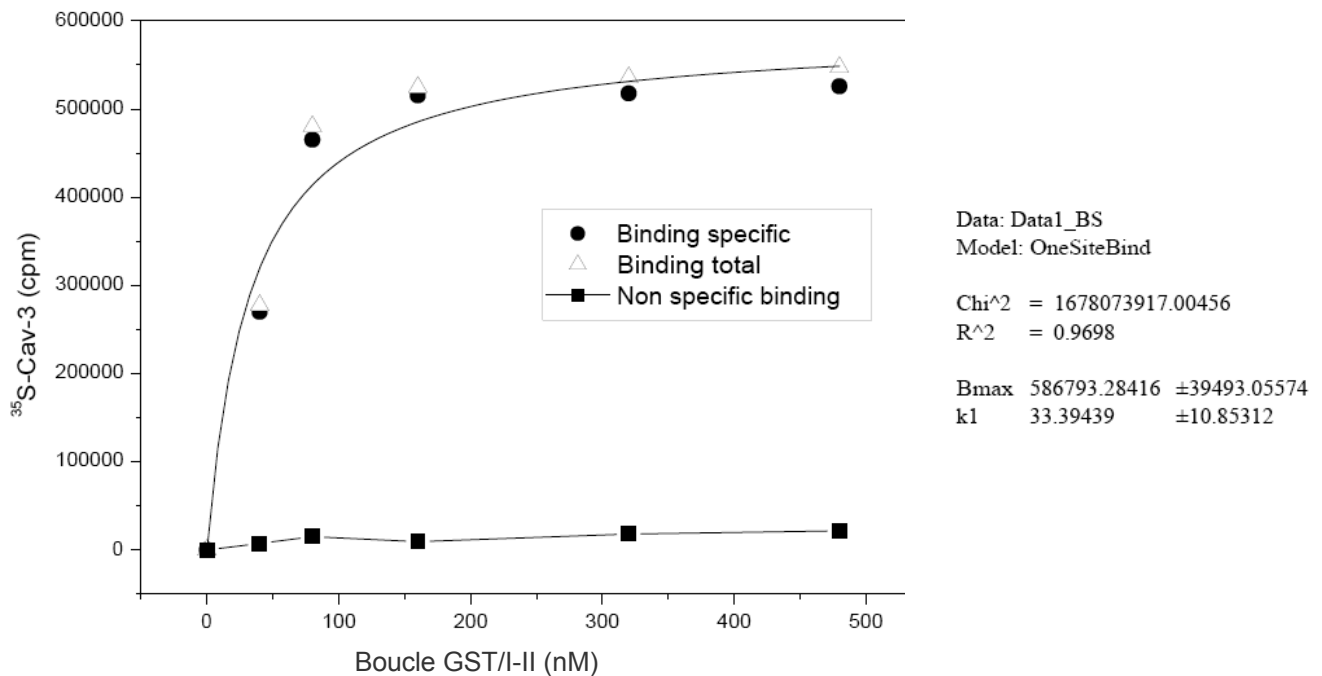


Figure 54. Estimation de l’affinité entre la boucle GST/I-II et la Cav-3 entière

75 μ L de milieu réactionnel d’une traduction *in vitro* de Cav-3 radiomarquée au ^{35}S ont été incubés en présence de concentrations croissantes de boucle GST/I-II (40-480 nM), la nuit à 4°C. La quantité de Cav-3 liée à la boucle GST/I-II (binding total, triangles), ainsi que le binding non-spécifique (binding des billes d’agarose; carrés noirs) ont été déterminés par comptage des cpm sur compteur à scintillation. Le binding spécifique (ronds noirs) a été déterminé par différence entre le binding total et le binding non-spécifique. La concentration obtenue à la demi-saturation (B_{max}) du binding de la Cav-3 donne une estimation de l’affinité (k_1) de la Cav-3 pour la GST/I-II de l’ordre de 33 ± 11 nM.

partie de Cav-3 n'est pas retenue par pAID_{sk}, probablement car la Cav-3 est en large excès par rapport à la quantité de peptide AID immobilisé.

Le pull-down de la Cav-3 par la boucle II-III (puits 7) a servi de contrôle négatif, cette boucle n'interagissant pas avec la Cav-3.

2.3 Détermination de l'affinité entre la Cav-3 et la boucle I-II de Cav 1.1

L'ensemble des valeurs et des résultats obtenus dans cette partie constituent des résultats préliminaires qui nécessitent d'être confirmés en répétant les expériences de pull-down. Cependant, les résultats déjà obtenus suggèrent une interaction entre la Cav-3 et la boucle I-II au niveau de son domaine AID.

L'affinité, c'est-à-dire la « force » de l'interaction, est un paramètre important dans la caractérisation des interactions entre deux protéines. Au vu de nos résultats, nous avons tenté d'obtenir une estimation de la valeur de la constante d'affinité entre la Cav-3 et la boucle I-II.

Pour les besoins de ce type de manipulation, la Cav-3 utilisée a été radiomarquée par de la cystéine ³⁵S lors de la traduction *in vitro*. Grâce à un comptage des coups par minutes (cpm), valeur proportionnelle à la quantité de Cav-3 retenue, la quantité de Cav-3 qui a interagi avec la boucle I-II a pu être estimée. En effet, il est possible de déterminer une constante d'affinité en faisant varier la concentration en boucle I-II et en estimant à chaque fois la quantité de Cav-3 qui s'est fixée (*cf.* Matériel et Méthodes § 1.7).

La figure 54 représente la courbe d'affinité obtenue suite au pull-down de la Cav-3 par la boucle GST/I-II. Cette courbe possède deux parties. La première, exponentielle, indique que plus [GST/I-II] est importante, plus la quantité de Cav-3 retenue augmente. Il s'ensuit une phase linéaire, en plateau, qui correspond vraisemblablement à une phase de saturation des sites de liaison de la boucle GST/I-II.

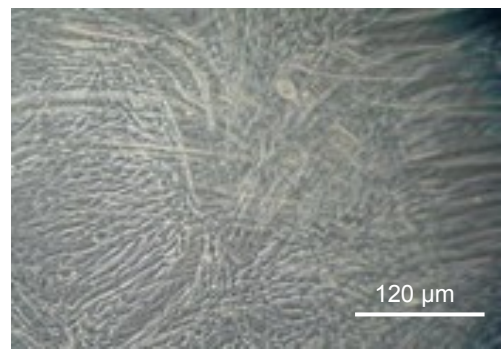
La concentration en GST/I-II à la demi-saturation donne alors la valeur de la constante d'affinité en la Cav-3 et la boucle GST/I-II. Cette valeur correspond à un K_d , c'est-à-dire à un constant de dissociation. Le K_d entre la Cav-3 et la boucle I-II a été déterminé en fittant la courbe de binding. Les paramètres du fit donne un K_d d'environ de 33 ± 11 nM.

3^{ème} partie

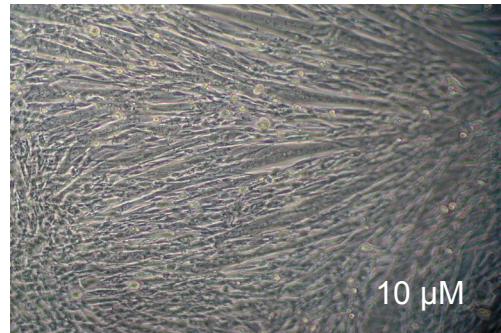
Rappel de la problématique : quels sont les effets cellulaires de nouveaux inhibiteurs du protéasome sur la restauration de Cav-3 endogène membranaire ?

Le groupe de M. Reboud-Ravaux a conçu et caractérisé biochimiquement de nouveaux inhibiteurs du protéasome qui sont des analogues cycliques et linéaires de l'inhibiteur naturel non-covalent TMC-95A (Basse *et coll.*, 2006). Notre but est de tester si le traitement de cellules différenciées de muscle squelettique exprimant Cav-3^{P104L} par ces inhibiteurs pourrait restaurer activement l'expression sarcolemmale de la Cav-3 endogène sauvage et la fonction du DHPR

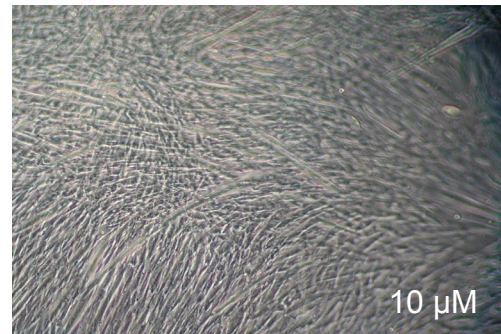
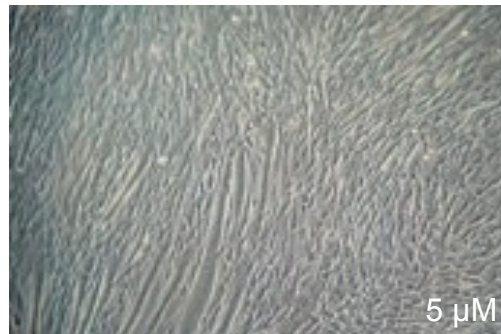
Contrôle DMSO



Composé A₂₁₅



Composé A₂₄₈



MG-132

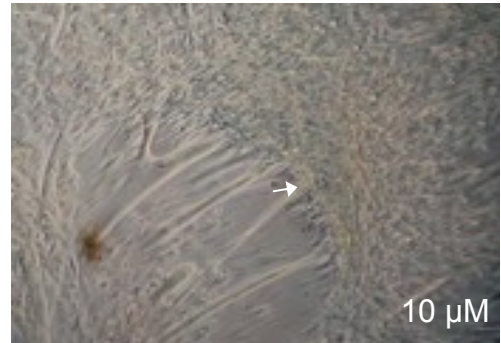
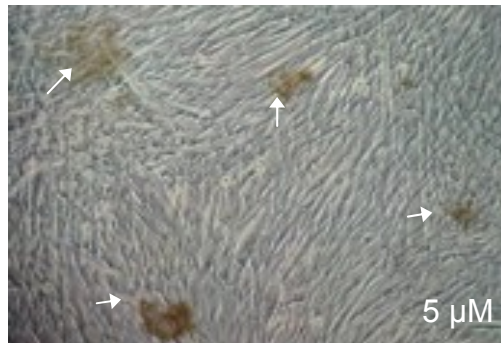


Figure 55. Evaluation de la cytotoxicité d'inhibiteurs du protéasome sur culture de myotubes de C₂C₁₂

Des cultures de C₂C₁₂ au stade myotube (+5 jours de différenciation) ont été incubées pendant 30h en présence des diverses molécules inhibitrices du protéasome à des concentrations finales de 5 et 10 μM ou en présence de DMSO (volume équivalent à 5 et 10 μM d'inhibiteur).

Le DMSO à une dose équivalente à 5 ou 10 μM d'inhibiteur n'affecte pas de manière significative l'aspect général des cultures.

De même, les composés A₂₁₅ et A₂₄₈, que ce soit à 5 ou 10 μM, ne semblent pas perturber les cultures de C₂C₁₂.

En revanche, le MG132, à 5 ou 10 μM, affecte les cultures et provoque la mort de cellules, qui à terme entraîne des décollement de la culture (flèches).

- 3^{ème} partie -

EFFETS D'INHIBITEURS DU PROTÉASOME SUR UNE LIGNÉE DE CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES EXPRIMANT CAV-3^{P104L}

Les propriétés de deux inhibiteurs non-covalents du protéasome, A₂₁₅ et A₂₄₈, ont été évaluées. Leur toxicité cellulaire a tout d'abord été estimée et comparée à celle du MG 132. Leur capacité à restaurer la présence membranaire de la Cav-3 dans les myotubes C2C12 exprimant Cav-3^{P104L}-YFP a par la suite été déterminée.

Les manipulations ont été réalisées sur des cellules musculaires de la lignée C2C12 exprimant de façon transitoire Cav-3^{P104L}-YFP après leur différenciation en myotubes. Le choix du matériel cellulaire s'est porté sur la lignée C2C12 car i/ la culture de ces cellules est plus aisée que celle des cultures primaires ii/ ces cellules sont généralement plus robustes que les cultures primaires et iii/ le taux de transfection des cellules C2C12 est de façon reproductible plus important que celui des cultures primaires.

Les résultats présentés restent préliminaires mais sont néanmoins encourageants.

1. Evaluation de la cytotoxicité de diverses molécules.

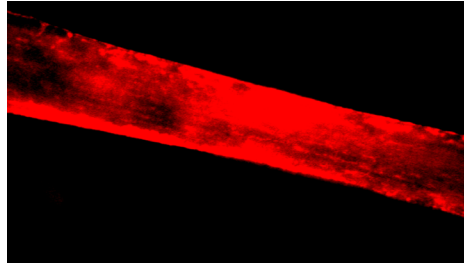
La figure 55, illustre l'aspect général des cultures de C₂C₁₂ après 30 heures de contact avec les différents inhibiteurs de protéasome.

Plusieurs critères peuvent témoigner de la souffrance des myotubes et donc du pouvoir cytotoxique d'une substance : des myotubes hypercontractés qui ont tendance à se décoller du support de culture, la présence de cellules mortes, reflétant des mécanismes d'apoptose ou de nécrose, et un retard de différenciation cellulaire indiquant que le composé inhibe le développement cellulaire.

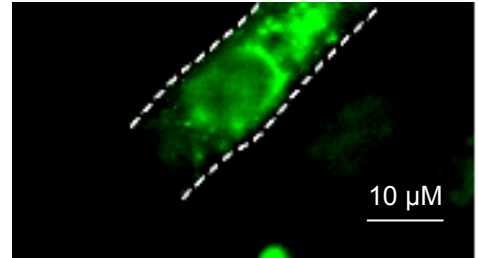
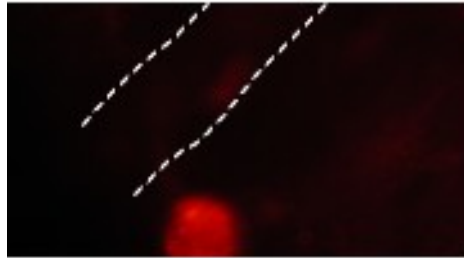
Toutes les molécules testées sont solubles dans le DiMéthylsulfoxyde (DMSO). Par conséquent, les contrôles des expériences ont donc été réalisés en utilisant uniquement ce solvant ou « véhicule ».

cav-3^{WT}Cav-3^{P104L}-YFP

A)

Myotubes
contrôle

B)

Myotube
transfecté
Cav-3^{P104L}-YFP

C)

DMSO

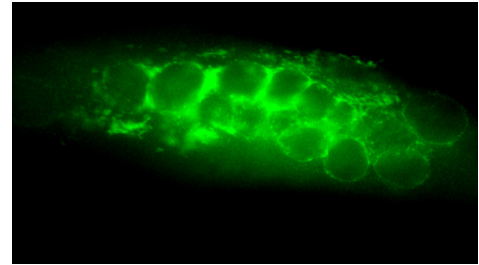
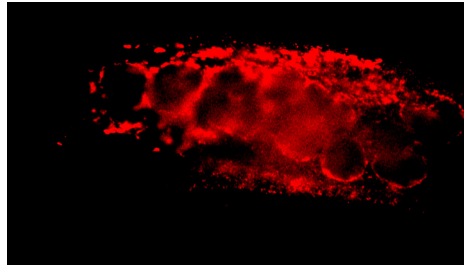
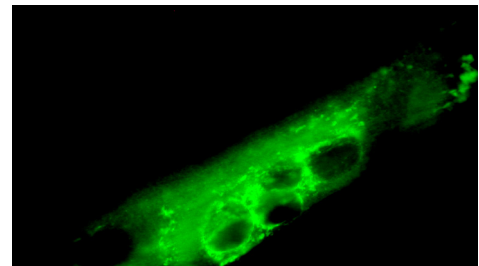
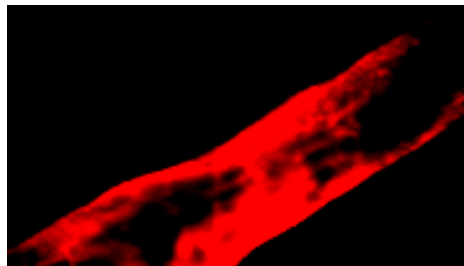
Composé A₂₁₅

Figure 56. Effet des inhibiteurs du protéasome sur la récupération de Cav-3 de type sauvage endogène sur des cultures de C2C12

Des cultures de C2C12 au stade myotubes (+5 jours de différenciation) ont été traitées avec l'un des 3 inhibiteurs de protéasome ou uniquement avec le véhicule des molécules, le DMSO, en volume équivalent.

Alors que la Cav-3 adopte une localisation membranaire en condition contrôle (A), elle est quasiment indétectable sur des myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP (B) qui, lui, a une localisation périnucléaire.

Le traitement par des inhibiteurs du protéasome (ici le A₂₁₅) permet de récupérer de la Cav-3 à la membrane plasmique (C, clichés du bas) contrairement au DMSO (C, clichés du haut).

Comme nous pouvons le noter, le DMSO n'affecte pas réellement les cellules en culture (figure 55). Il est possible d'observer de nombreux myotubes, d'aspect tout à fait similaire à ceux obtenus dans des conditions normales.

Que ce soit à 5 ou 10 μM (figure 55), les composés A_{215} et A_{248} ne semblent pas non plus avoir d'effet majeur, l'aspect général des cellules est en tout point comparable à celui des cellules cultivées en présence de DMSO.

En revanche, que ce soit à 5 ou 10 μM , le MG132 induit une mort cellulaire se caractérisant par des cellules mortes qui se sont décollées (55, flèches). A terme, il peut arriver que des zones entières de la boîte de culture se vident, soit suite au décollement d'un trop grand nombre de cellules, soit car le composé induit une contractilité anormale des myotubes qui vont s'hypercontracter.

Ainsi, les composés A_{215} et A_{248} semblent d'une part ne pas présenter de cytotoxicité cellulaire par rapport au DMSO, et d'autre part sont moins toxiques que l'inhibiteur de référence MG132.

2. Effet des inhibiteurs du protéasome sur la distribution de la Cav-3

Les effets des divers inhibiteurs du protéasome ont été évalués par immunomarquage de la Cav-3 après 30 heures d'incubation en présence des molécules. Le critère principal a été d'étudier si la Cav-3 retrouvait une localisation membranaire et n'était plus séquestrée au niveau de l'appareil de Golgi.

La figure 56 illustre le profil obtenu après immunomarquage de la Cav-3 sur un myotube contrôle (haut) et sur un myotube transfecté par la Cav-3^{P104L}-YFP (bas).

En condition contrôle, la Cav-3 est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique. Toutefois, le marquage étant intense et ces images n'étant pas des clichés de microscopie confocale, la cellule semble intégralement marquée, même dans le cytoplasme. Cela vient du fait qu'en microscopie à épifluorescence, le signal est observé sur toute l'épaisseur de la préparation.

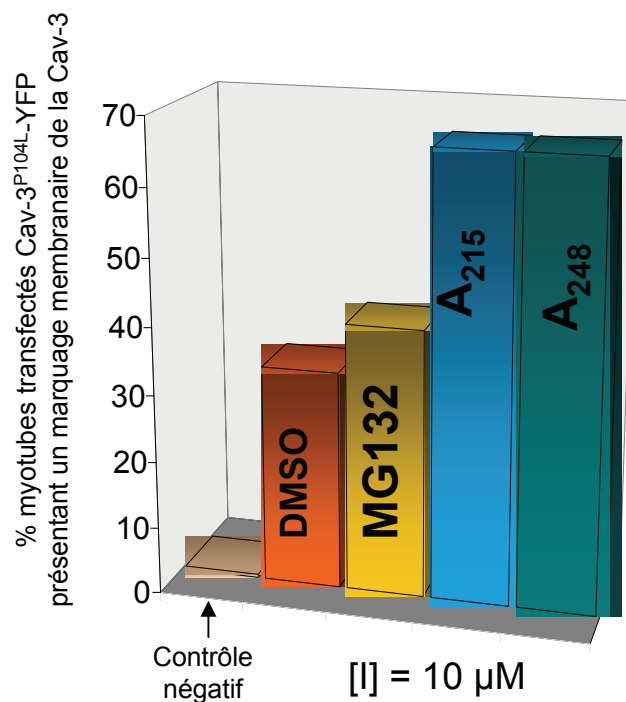


Figure 57. Quantification des effets des molécules inhibitrices de l'activité du protéasome

L'effet « in vivo » des molécules d'inhibiteurs a été testé sur cultures de C2C12 (voir Matériel et Méthodes) et a été estimé par immunomarquage en établissant le rapport du nombre de myotubes transfectés par le mutant P104L-YFP sur le nombre de ces myotubes qui ont récupérés un marquage de la Cav-3 membranaire.

Sur les trois inhibiteurs testés (MG132, A₂₁₅ et A₂₄₈, tous à 10 μM), les deux inhibiteurs non covalents A₂₁₅ et A₂₄₈ présentent un taux de récupération de Cav-3 membranaire bien supérieur (~70%) à celui de l'inhibiteur de référence MG132 (~45%). Notons un « effet DMSO » qui permet de récupérer de la Cav-3 membranaire dans ~35% des myotubestransfectés.

Ces résultats ayant été obtenus à un stade préliminaire, aucune analyse statistique n'a été réalisée.

Sur les myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, comme nous l'avons déjà vu pour les cultures primaires (Résultats Chapitre I, § 3), le mutant adopte une localisation périnucléaire, correspondant vraisemblablement à l'appareil de Golgi. La Cav-3 endogène (en rouge) est quant à elle indétectable.

La figure 56 présente également les profils de marquage obtenus après incubation des cultures cellulaires en présence des différents inhibiteurs du protéasome. Pour des soucis de clarté ne sont représentés que les clichés obtenus avec le composé A₂₁₅, les autres composés présentant strictement le même profil.

Sur la figure 56 (clichés du haut), nous pouvons observer le profil de marquage typique de la Cav-3 (mutante, taguée YFP en vert, et endogène, immunomarquée en rouge) obtenu suite à l'incubation des cultures avec le véhicule seul (DMSO). Dans ce cas, le mutant Cav-3^{P104L}-YFP, adopte toujours une localisation périnucléaire au sein des myotubes transfectés. En revanche, il est désormais possible d'observer un marquage intense de la cav-3 endogène. Ce marquage se situe également au niveau de vésicules périnucléaires et semble se colocaliser avec le mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Cependant, la Cav-3 endogène n'atteint pas la membrane plasmique, aucun marquage en liseré, semblable à celui observé en condition contrôle, n'étant visible.

Sur la figure 56 (clichés du bas), nous pouvons observer que l'incubation en présence d'inhibiteur du protéasome n'affecte pas significativement la localisation du mutant Cav-3^{P104L}-YFP. Le mutant adopte toujours une localisation périnucléaire, peut être moins stricte qu'en condition contrôle. Si nous nous intéressons à la Cav-3 endogène, nous pouvons remarquer qu'il est possible d'observer de la Cav-3 à la membrane plasmique, ce profil étant tout à fait comparable à celui observé en condition contrôle.

Nous avons alors estimé le pourcentage de myotubes transfectés récupérant de la Cav-3 au niveau de la membrane plasmique pour chaque molécule, ainsi que pour le DMSO (figure 57). Ainsi, alors qu'environ 35% des myotubes transfectés par le mutant dominant négatif Cav-3^{P104L}-YFP et traités au DMSO récupèrent de la Cav-3 à la membrane, 41% des myotubes traités à l'inhibiteur de référence, le MG132, sont marqués à la Cav-3 au niveau du sarcolemme. En ce qui concerne les composés A₂₁₅ et A₂₄₈, ce taux augmente à 67%.

Les molécules A_{215} et A_{248} permettent donc d'inhiber l'effet dominant négatif du mutant, c'est-à-dire la dégradation de la Cav-3 par le système du protéasome. Leur efficacité semble même accrue par rapport au MG132 dont les effets sont à peine meilleurs que ceux du DMSO. Ce dernier semble par ailleurs avoir une action sur l'activité protéasomale puisqu'il permet d'inhiber la dégradation de la Cav-3 dans environ un tiers des myotubes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, nous ne disposions pas encore d'estimation de données concernant les effets du composé A_{248} .

1^{ère} PARTIE. ÉTUDE DU RÔLE DE LA CAVÉOLINE-3 SUR LA FONCTION DES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DÉPENDANTS DANS LES CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES.

Cette étude démontre que l'expression du mutant Cav-3^{P104L} induit une réduction très significative de l'amplitude du courant calcique de type L dans le muscle squelettique en cours de différenciation et totalement différencié. L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement qu'une altération de la fonction du canal calcique voltage-dépendant de type L résulte d'une déficience en Cav-3 dans le muscle squelettique.

Une telle déficience en Cav-3 a en effet été observée par immunomarquages de cette protéine dans des myotubes squelettiques primaires, ainsi que dans des fibres musculaires fœtales et adultes. Tout d'abord dans les myotubes squelettiques primaires et les fibres fœtales en survie, nos résultats indiquent que l'expression exogène de Cav-3^{P104L} reproduit la perte pathologique de Cav-3 observée chez les patients atteints de LGMD-1C. Cette déficience en Cav-3 suite à l'expression du mutant dominant négatif Cav-3^{P104L} avait déjà été décrite sur des fibroblastes NIH3T3 en culture (Galbiati et coll., 2000), mais également dans les souris transgéniques Cav-3^{P104L} et chez les patients LGMD-1C chez qui cette mutation a été décrite (Minetti et coll., 1998; Sunada et coll., 2001). Dans nos expériences, le mutant de la Cav-3 était directement visible puisque tagué YFP. Que ce soit dans les cultures primaires de myotubes squelettiques ou dans les fibres fœtales en survie, le mutant Cav-3^{P104L} adopte une localisation au niveau de vésicules périnucléaires correspondant vraisemblablement à l'appareil de Golgi, en accord avec ce qui avait précédemment été décrit dans des fibroblastes, des C2C12 et des biopsies de patients atteints de LGMD-1C (Minetti et coll., 1998 ; Galbiati et coll., 1999b ; Carozzi et coll., 2002). En effet, la dimérisation de Cav-3 endogène et mutante forme un complexe reconnu comme étant mal conformé. La Cav-3 endogène et mutante seraient donc toutes deux retenues au niveau de l'appareil de Golgi et seraient incapables d'atteindre la membrane plasmique. Dans les fibres musculaires squelettiques adultes, l'appareil de Golgi est principalement périnucléaire. Il est organisé sous forme de petites vésicules qui s'accumulent de part et d'autre des noyaux de la fibre (Rahkila et coll., 1997 ; Ralston et coll., 1999). Sur les fibres exprimant le mutant Cav-3^{P104L}, nous observons également cette localisation périnucléaire du mutant, il est donc probable qu'il s'agisse d'une localisation golgienne de la Cav-3^{P104L}. Il serait intéressant de clairement définir la localisation du mutant en effectuant des marquages de l'appareil de Golgi. Nous procédons

actuellement à des marquages de Golgi sur fibres musculaires squelettiques adultes contrôles et transfectées grâce à un marqueur de l'appareil de Golgi, le BODIPY C6-céramide.

Par ailleurs, l'anticorps utilisé pour l'immunomarquage de la Cav-3 ne nous a pas permis de détecter de Cav-3 endogène ou mutante localisée dans Golgi. Ceci provient probablement d'un masquage de l'épitope (situé en N-terminal) lorsque la Cav-3 est localisée dans le compartiment golgien. Ce phénomène avait déjà été décrit sur culture de cellules BHK (Luetterforst et coll., 1999) où il avait été démontré que différents épitopes de la cavéoline sont exposés en fonction de sa localisation golgienne ou membranaire. Ainsi, un anticorps dirigé contre la partie C-terminale reconnaît plutôt la cavéoline golgienne alors qu'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale reconnaît majoritairement la Cav membranaire. Notre anticorps (PA1-066) est dirigé contre la partie N-terminale de la Cav, et est donc plus spécifique de la Cav membranaire.

Dans des fibres musculaires squelettiques adultes exprimant le mutant Cav-3^{P104L}, nos premiers marquages de la Cav-3 indiquent que les cellules transfectées possèdent moins de Cav-3 que les cellules contrôles. Alors que la Cav-3 était quasiment indétectable dans la majorité des myotubes squelettiques primaires et des fibres fœtales exprimant le mutant, les fibres musculaires adultes exprimant la Cav-3^{P104L} présentent encore systématiquement un marquage membranaire de la Cav-3. Cette différence d'effet du mutant dominant négatif sur le contenu en Cav-3 endogène peut s'expliquer par le fait que l'expression exogène du mutant a été réalisée à un stade auquel la Cav-3 est présente en grande quantité, mais également par le fait que son *turn over* est probablement plus long dans le muscle adulte.

Concernant l'étude des courants calciques voltage-dépendants, notre étude a montré qu'une déficience en Cav-3, induite par l'expression du mutant Cav-3^{P104L}, induisait une forte altération de la fonction du canal calcique de type L, mais pas de type T. Ainsi, dans les cultures primaires de myotubes squelettiques et les fibres fœtales en survie, la diminution de l'amplitude de $I_{Ca, L}$ était d'environ 55 %, et d'environ 30% dans les fibres musculaires squelettiques adultes. Ces résultats sont en accord avec la perte de courant observée sur des fibres fœtales fraîchement isolées suite à une déplétion en cholestérol (Pouvreau et coll., 2004). Une telle déplétion, induite par la méthyl- β -cyclodextrine, était à l'origine d'une déstructuration des cavéoles et une délocalisation de la Cav-3. D'un point de vue électrophysiologique, l'amplitude de $I_{Ca, L}$ mais pas de $I_{Ca, T}$ était réduite de 50% dans les cellules traitées.

Grâce à une étude quantitative de l'immunomarquage de la sous-unité $Ca_v1.1$ dans des myotubes primaires exprimant ou non le mutant Cav-3^{P104L}, nous avons observé que cette

altération de $I_{Ca,L}$ était accompagnée d'une réduction de 66% de l'intensité de marquage de $Ca_v1.1$ par rapport à des myotubes contrôles. Ce résultat est tout à fait comparable à la diminution de la conductance maximale des canaux de type L.

Il est ainsi probable que la diminution de l'amplitude de $I_{Ca,L}$ résulte d'une diminution de la quantité de canaux plutôt que d'altérations de leurs propriétés fonctionnelles.

Par ailleurs, il a récemment été suggéré que la Cav-3 pourrait avoir un rôle dans le transport de protéines, notamment de la dysferline. Il a en effet été montré qu'une déficience en Cav-3 entraînait une accumulation de la dysferline au niveau de l'appareil de Golgi (Hernandez-Deviez et coll., 2006). De plus, la cavéoline serait nécessaire au transport et/ou à l'ancrage membranaire de canaux SOC (Store Operated Channels) tels que les TRP (Brazier et coll., 2003). Sur myotubes squelettiques en culture, nos expériences montrent une forte réduction de canaux à la membrane avec un marquage résiduel de $Ca_v1.1$ au niveau de Golgi, comme la colocalisation avec le mutant Cav-3^{P104L} le laisse supposer. Nous pouvons par conséquent émettre l'hypothèse que la Cav-3 agirait en tant que partenaire post-golgi pour le transport de la sous-unité $Ca_v1.1$ du DHP.

La Cav-3 pourrait ainsi jouer un rôle dès les stades précoces de la différenciation musculaire puisque la sous-unité $Ca_v1.1$ et la Cav-3 présentent des profils d'expression similaires au cours du développement musculaire. En effet, plusieurs études montrent que le transcrit primaire de $Ca_v1.1$ et le canal calcique de type L correspondant sont détectés au moment de la fusion des myoblastes en myotubes (Romey et coll., 1989; Varadi et coll., 1989; Cognard et coll., 1993; Kyselovic et coll., 1994). De la même manière, l'expression de Cav-3 est fortement induite au cours de la différenciation de cellules musculaires squelettiques de souris (Way & Parton, 1995; Song et coll., 1996; Tang et coll., 1996; Parton et coll., 1997).

La Cav-3 pourrait par conséquent agir en tant que transporteur de la sous-unité Cav1.1 dans les étapes précoces de la différenciation musculaire ou bien servir à l'ancrage et la stabilisation de $Ca_v1.1$ à la membrane plasmique.

La Cav-3 participerait également au développement musculaire et en particulier à la biogenèse du système tubulaire transverse dans le muscle squelettique. Tout d'abord, la découverte d'une isoforme spécifique du muscle strié laisse penser à un rôle spécifique de la Cav-3 dans ce système. La contraction musculaire est la fonction principale du muscle strié, et le système tubulaire transverse est le site du couplage excitation-contraction. De récentes études indiquent qu'une déficience en Cav-3 induite par des morpholinos ou par expression du mutant dystrophique Cav-3^{P104L} dans des embryons de poissons Zebrafish serait à l'origine

d'une désorganisation de systèmes membranaires et d'un défaut de la fusion des myoblastes (Nixon et coll., 2005). De plus, dans le muscle squelettique, l'expression de la Cav-3 serait régulée au cours du développement musculaire (Biederer et coll., 2000).

Le premier indice d'une implication de la Cav-3 dans la biogenèse du système T trouve son origine dans le fait que tubules T et cavéoles partagent de nombreuses similarités au niveau de leur composition. Ils sont en effet tout deux enrichis en cholestérol et sphingolipides (Razani et coll., 2001). Très tôt, des études ultrastructurales ont montré une localisation particulière des cavéoles de part et d'autre des entrées des tubules T (Ishikawa 1968 ; Franzini-Armstrong et coll., 1991). Ces études ont abouti à l'hypothèse que les tubules T dériveraient de la fusion de cavéoles. Suite au bourgeonnement répété de cavéoles, il y aurait formation de structures tubulaires en collier de perles d'abord orientées longitudinalement, puis, au cours du développement musculaire, ces structures se développeraient et s'organiseraient en réseaux tridimensionnels étendus : le futur réseau tubulaire transverse (Ishikawa, 1968). Plus récemment, des analyses ultrastructurales menées sur cultures d'une lignée musculaire, les C2C12, ont montré qu'en début de différenciation (fusion des myoblastes en myotubes), des éléments marqués à la Cav-3 élaborent un réseau de cavéoles interconnectées, pénétrant en profondeur dans les cellules musculaires. Ces éléments sont hautement organisés, connectés à la surface des cellules et positifs au marquage par un anticorps anti-DHPR. Sur le muscle embryonnaire en développement, la Cav-3 est détectable à la périphérie des fibres musculaire, ainsi que dans des structures ponctiformes réparties dans toute la cellule. La caractéristique principale de ce marquage était l'organisation longitudinale de ces points régulièrement espacés, proches de la membrane plasmique. Cette étude suggérait donc une association de la Cav-3 avec les tubules T au cours du développement musculaire (Parton et coll. 1997).

Nos expériences d'immunomarquage de la sous-unité Ca_v 1.1 montrent en effet que la Cav-3 et le DHPR seraient associés, comme le suggère la colocalisation des deux protéines à la membrane de surface et dans les tubules T, en accord avec de précédentes études (Jorgensen et al. 1989; Parton et al. 1997; Ralston and Ploug, 1999).

Dans les myotubes primaires squelettiques, la distribution de la Cav-3 est principalement membranaire, bien qu'une partie du marquage, d'aspect ponctiforme, soit localisé au niveau intracellulaire. Par ailleurs, ce marquage se colocalise avec celui de la sous-unité Ca_v 1.1, aussi bien au niveau du sarcolemme de surface qu'au niveau de ces points intracellulaires. Ce résultat est en accord avec ceux précédemment décrits sur myotubes de C2C12 (Flucher et coll., 1991 ; Parton et coll., 1997). Dans ces myotubes, la Cav-3 apparaît comme étant

associée à des éléments tubulaires qui pénètrent dans le cytoplasme des myotubes. Ces éléments, décrits comme les tubules T en cours de formation, ont de manière prédominante une orientation longitudinale selon l'axe des myotubes.

Dans le muscle squelettique adulte, dans lequel les processus de maturation sont achevés, la Cav-3 et Ca_v 1.1 présentent tous deux une distribution très organisée. En effet, nos expériences d'immunomarquage sur fibres musculaires adultes indiquent que la Cav-3 et Ca_v 1.1 sont colocalisées au niveau du sarcolemme de surface et au niveau intracellulaire dans le système tubulaire transverse. Ces résultats sont en accord avec ce qui a précédemment été décrit pour la distribution de la Cav-3 dans les fibres musculaires squelettiques adultes (Ralston & Ploug ; Rahkila et coll., 2001). En revanche, nous avons observé une colocalisation partielle entre la Cav-3 et le DHPR au niveau des tubules T. La présence de Cav-3 au sein du réseau tubulaire transverse des fibres musculaires squelettiques reste controversée, bien que dans le muscle cardiaque cette association soit clairement démontrée (Balijipalli et coll., 2005). En effet, certaines études suggèrent que la Cav-3 s'associerait de manière transitoire avec les tubules T en développement mais serait quasiment absente du système T de fibres adultes (Parton et coll., 1997). D'autres études ont montré que la Cav-3 est présente dans le système T du muscle squelettique adulte (Ralston & Ploug., 1999) ou elle arbore une distribution essentiellement au niveau de la membrane de surface, mais également dans un vaste réseau intracellulaire, correspondant au système T, qui apparaît sous forme de doubles stries transversales à l'axe de la fibre.

La détection, ou l'absence de détection, de la Cav-3 au sein du système T pourrait provenir de différences dans la méthode de préparation et de fixation qui conditionneraient l'efficacité du marquage et l'intégrité de la structure des cellules. Nos résultats indiquent que sur les cellules d'un même muscle, les profils de distribution de la Cav-3 peuvent être différents en fonction de la technique de fixation. Ainsi, nous observons une distribution tubulaire sous forme de doubles stries avec une fixation au PFA (technique de fixation identique à celle de Ralston & Ploug), alors qu'une fixation au méthanol ne nous a pas permis d'observer ces doubles stries caractéristiques du réseau tubulaire transverse. Par ailleurs, pour leurs immunomarcages, Ralston et Ploug ont travaillé sur des fibres détachées d'un muscle préalablement fixés, alors que Parton a travaillé sur des cryosections. L'utilisation de fibres isolées intègres, comme nous avons pu en utiliser, est peut être un critère déterminant pour la détection de la Cav-3 au sein de structures telles que les tubules T.

Concernant la localisation membranaire du DHPR et sa colocalisation avec la Cav-3, telle que nous pouvons l'observer dans nos expériences, il s'agirait d'une distribution

cavéolaire du DHPR (Jorgensen et coll., 1989). Une population de DHPR serait en effet localisée hors des triades, au niveau de la membrane de surface, dans les cavéoles.

L'étude de muscles déficients en Cav-3 a par ailleurs étayé cette l'hypothèse d'un rôle de la Cav-3 dans la formation et le maintien des tubules T. Les muscles de souris Cav-3^{-/-} et de patients LGMD-1C présentent toujours un système TT, mais il existe tout de même des anomalies dans la structure des tubules T, bien qu'elles ne soient pas tout à fait identiques entre les deux modèles. Les tubules T des muscles de patients LGMD-1C (Minetti et coll., 2002) présentent des ouvertures sous forme de vacuoles sous sarcolemmales et prolifération anormale des tubules T, formant des structures en « nids d'abeilles » caractéristique de ce phénomène (Galbiati et coll., 2001; Minetti et coll., 2002). Chez les souris CAV3 *ko*, les tubules ont une orientation longitudinale et sont dilatés. Ainsi, bien que la Cav-3 n'apparaisse pas indispensable à la formation des tubules T, son absence est à l'origine d'importantes anomalies du réseau tubulaire transverse. Ces données suggèrent alors fortement que la Cav-3 pourrait jouer un rôle dans l'organisation correcte du réseau tubulaire transverse.

Ainsi, l'ensemble de ces observations nous a amené à penser qu'une explication possible pour expliquer l'altération de la fonction du canal calcique de type L serait une perturbation de la biogenèse des tubules T suite à la déficience en Cav-3, induite par l'expression du mutant Cav3^{P104L}. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons mesuré la capacitance électrique moyenne des myotubes et des fibres fœtales analysées. La capacitance est un paramètre fiable de la surface membranaire électriquement active. L'absence de différence significative entre les cellules contrôle et les cellules exprimant le mutant Cav3^{P104L} infirment donc l'hypothèse que l'expression de Cav3^{P104L} aie altéré la quantité de membrane tubulaire, mais ciblerait plutôt spécifiquement le DHPR. Ceci fut par la suite confirmé par notre étude sur des fibres musculaires squelettiques fœtales en survie, dans lesquelles nous avons observé une réduction comparable de la conductance maximale des canaux de type L. Dans ces conditions, et à la différence des cultures de myotubes primaires, nous avons transfecté les fibres et donc obtenu l'expression du mutant Cav-3^{P104L} à un stade de maturation auquel les tubules T sont déjà bien formés et déjà présents (Takekura et coll., 2001), si bien qu'un effet relatif à une désorganisation des tubules T ne peut être soulevé. De plus, les capacitances membranaires n'étaient pas significativement différentes dans les fibres exprimant le mutant Cav3^{P104L} et les fibres contrôles, ce qui confirme l'absence d'effet sur l'organisation du système T. Cependant, l'estimation des capacitances membranaires

n'apportent pas d'éléments concernant la morphologie du système T. Il serait par conséquent intéressant de réaliser une analyse exhaustive de l'organisation des tubules T dans notre système d'expression. En effet, jusqu'à présent, les études portant sur l'organisation du système T dans des conditions de déficience en Cav-3 ont été réalisées sur des souris $CAV3^{-/-}$, Tg $CAV3^{P104L}$ ou sur des biopsies de patients LGMD-1C. Grâce à notre système de transfert de gène *in situ* par la technique d'électroporation dans le muscle adulte, nous pourrions observer les conséquences fonctionnelles d'une expression aigüe de $Cav-3^{P104L}$, en s'affranchissant des effets qu'une déficience en Cav-3 pourrait avoir dans les processus développementaux. Nous projetons ainsi d'effectuer des analyses morphologiques des cavéoles et du système T en combinant des techniques de microscopie électronique et confocale. Des marquages membranaires au Di-8-ANNEPS de fibres musculaires adultes exprimant le mutant $Cav-3^{P104L}$ sont en effet prévus dans la suite de l'étude du rôle de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique.

Par ailleurs, nous avons analysé la fonction du canal calcique voltage-dépendant de type T, afin d'analyser si l'altération de la fonction du DHPR suite à la déplétion en Cav-3 était un effet spécifique ou si cela affectait l'ensemble des protéines membranaires des cellules musculaires. Ainsi, l'absence d'effet de la déficience en Cav-3 sur la fonction du canal calcique voltage-dépendant de type T nous permet de conclure que l'expression du mutant $Cav3^{P104L}$ cible spécifiquement le DHPR.

Ainsi, bien que l'ensemble de ces résultats suggèrent fortement une interaction entre la Cav-3 et $Ca_v 1.1$, nous ne pouvons à ce stade conclure clairement sur l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR. Cette interaction peut être physique directe ou bien servir indirectement à clusteriser des molécules régulant l'activité du canal, voire à créer un environnement favorable à l'insertion du canal dans la membrane plasmique. A ce propos, de nombreux autres canaux ont été montrés comme étant spécifiquement localisés dans les cavéoles (Martens et coll., 2004). Ainsi, dans le muscle cardiaque, la Cav-3 co-immunoprécipite avec l'isoforme cardiaque de la sous-unité pore du canal calcique de type L et jouerait un rôle dans la réponse β_2 -adrénergique (Balijepalli et coll., 2006). Dans les cellules endothéliales, les canaux potassiques calcium-activés (K_{Ca}) interagissent directement avec la Cav-1 (Wang et coll., 2005). La Cav-1 serait également essentielle à la formation de canaux TRPC1 avec lesquels elle s'associe (Brazer et coll., 2003). Le plus souvent cette interaction est inhibitrice, bien que quelques molécules interagissent avec la Cav-3 sans que cela modifie leur activité.

Une déficience en Cav-3 pourrait être à l'origine d'une régulation négative de l'expression fonctionnelle de $Ca_v1.1$, ou d'un défaut d'adressage et/ou de stabilisation du canal à la membrane. Cependant, aucune étude quantitative du marquage de $Ca_v1.1$ n'a pu être effectuée sur les fibres fœtales en survie et les fibres musculaires adultes, en raison du trop faible rendement de transfection de ces systèmes pour effectuer une analyse quantitative fiable. Toutefois, nous procédons actuellement à des enregistrements des mouvements de charges intra-membranaires sur fibres musculaires adultes, afin d'évaluer les effets de l'expression du mutant sur l'expression fonctionnelle du DHPR. L'intensité des courants de charge, c'est-à-dire la quantité de charges déplacées en réponse à une stimulation électrique d'une fibre musculaire, reflète la quantité de DHPR électriquement actifs. Par comparaison de ces mouvements de charges dans des cellules contrôles ou exprimant le mutant Cav-3^{P104L} nous pourrions déterminer si une déficience en Cav-3 affecte la quantité de DHPR fonctionnels. Ce paramètre rendra compte également de l'efficacité du couplage E-C. Outre la fonction canal calcique voltage-dépendant, le DHPR agit en tant que détecteur de potentiel (Schneider et Chandler, 1973), par couplage électro-mécanique avec les récepteurs à la ryanodine situés sur les citernes de réticulum sarcoplasmique, dont l'ouverture aboutit à la libération de calcium dans le cytosol et à la contraction musculaire. L'analyse de ces mouvements de charges intra-membranaires nous permettra également d'évaluer cette fonction de détecteur de potentiel et donc l'efficacité du couplage E-C dans les fibres exprimant le mutant.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats ne nous permettent pour le moment pas d'exclure totalement l'hypothèse que, dans les fibres musculaires fœtales et adultes, la réduction de la conductance des canaux calciques de type L ne résulte pas d'un mécanisme autre qu'une régulation négative de l'expression fonctionnelle du canal, ou d'un défaut de son adressage/stabilisation.

A ce sujet, une étude précédente par analyse en Western-Blot de la quantité de $Ca_v1.1$ dans le muscle de souris Cav-3^{-/-} n'a pas montré de différence significative avec celle de souris contrôles (Galbiati et coll., 2001). Autrement dit, dans un système en cours de différenciation, tel que les myotubes squelettiques primaires, la Cav-3 pourrait avoir un rôle dans l'adressage et/ou la stabilisation du canal à la membrane. En revanche, dans les fibres musculaires fœtales en survie et adultes, la réduction de la conductance des canaux calciques de type L serait majoritairement due à une altération de la fonction des canaux, plutôt qu'à

une diminution de leur densité. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la voltage-dépendance du courant calcique de type L était significativement déplacée vers des potentiels plus positifs dans les fibres fœtales exprimant le mutant, mais pas les myotubes primaires. De plus, la Cav-3 peut être à l'origine de la régulation de l'activité de nombreuses protéines, y compris des canaux ioniques. La cavéoline interagirait notamment avec des canaux potassiques, sodiques, calciques (pour revue voir Maguy et coll., 2006).

Enfin, des études précédentes ont montré par microscopie électronique et cryofracture que les muscles de patients atteints de myopathie présentent un nombre accru de cavéoles (North et coll., 1993). En accord avec cette augmentation de la surface cavéolaire, les muscles de patient DMD et de souris mdx, le modèle murin de la DMD, ont des niveaux d'expression de Cav-3 supérieurs de 2 à 3 fois à celui de muscles contrôles (Vaghy et coll., 1998). De plus, la surexpression de Cav-3 chez la souris transgénique CAV3 suffit à provoquer l'apparition d'un phénotype myopathique (Galbiati et coll., 2000). Selon notre hypothèse que la Cav-3 est un élément crucial dans l'expression fonctionnelle du canal calcique de type L, nous avons testé les effets d'une surexpression de Cav-3 sur la fonction du DHPR. Notre étude indique qu'une surexpression de Cav-3 dans des fibres fœtales en survie n'a pas d'effet significatif sur la fonction des canaux calciques de type L. Ainsi, en conditions physiologiques, la Cav-3 endogène serait déjà disponible en quantité suffisante pour permettre un fonctionnement optimal du canal calcique de type L. L'apparition du phénotype myopathique chez les souris mdx et les patient DMD serait donc la conséquence d'un mécanisme autre qu'une perturbation de la fonction du DHPR. Une étude récente a montré que la Cav-3 et le β -dystroglycane entraînent en compétition pour un même site sur la dystrophine. L'apparition du phénotype myopathique serait alors due au fait que la surexpression de Cav-3 inhibe l'interaction dystrophine/ β -dystroglycane, entraînant une dégradation du complexe dystrophine/ glycoprotéines associées, phénomène moléculaire primaire de la dystrophie musculaire de Duchennes (Sotgia et coll., 2000).

Cette étude avait également pour but de définir des éléments clés des mécanismes physiopathologiques des cavéolinopathies. En cela, nos résultats fournissent des éléments importants permettant d'expliquer certaines conséquences physio-pathologiques d'une déficience en Cav-3 dans le muscle squelettique. En effet, une réduction de la fonction du DHPR peut être associée à une faiblesse musculaire, puisque le DHPR est un élément essentiel du couplage excitation-contraction (Rios & Pizarro, 1991). C'est effectivement l'une

des caractéristiques des patients atteints de LGMD-1C (Woodman et al. 2004). Une autre caractéristique de la LGMD-1C est une amyotrophie dégénérative musculaire progressive, et, comme pour un grand nombre de dystrophies musculaires, une surcharge calcique chronique pourrait être le processus primaire de la nécrose à l'origine de l'amyotrophie (Rizzuto & Pozzan, 2003). D'ailleurs, les souris transgéniques *knock in* Cav-3^{P104L} présente une activité accrue de la synthase de l'oxyde nitrique (NOS), qui serait due à une absence d'inhibition de son activité par la Cav-3 endogène de type sauvage (Sunada et coll., 2001). Cette surproduction d'oxyde nitrique (NO) pourrait causer une fuite de calcium continue du réticulum sarcoplasmique, due à une modification de l'état rédox du récepteur à la ryanodine (Pouvreau et coll., 2004). La surcharge de calcium intracellulaire en résultant mènerait à terme à l'activation de protéases calcium-dépendantes (calpaïnes...) et à une nécrose musculaire. Nous avons d'ailleurs pour projet d'évaluer la signalisation NOergique dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L}.

2^{ème} PARTIE. ÉTUDE DU RÔLE DE LA CAVÉOLINE-3 SUR LA FONCTION DES CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DEPENDANTS DANS DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ADULTES

La diminution de l'amplitude du courant de type L et la colocalisation de la Cav-3 et du DHPR laissait penser à une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines. Nous avons par conséquent analysé par différentes approches expérimentales si la Cav-3 et la sous-unité Ca_v 1.1 interagissaient.

Nos expériences de co-fractionnement indiquent que la Cav-3 et Ca_v 1.1 sont tous deux présents dans des vésicules de HSR. Les vésicules de HSR sont des microsomes de triades, enrichis en DHPR et RyR (Saito et coll., 1984). Ces résultats indiquent qu'au sein de la membrane plasmique, la Cav-3 et le DHPR sont colocalisés dans les mêmes microdomaines membranaires ce qui confirme la colocalisation au niveau des tubules T observée par immunomarquage. De plus, la présence de Cav-3 dans les HSR a permis d'utiliser ces microsomes comme matériel biologique pour l'étude de l'interaction entre la Cav-3 et le DHPR dans des conditions où les protéines sont dans un environnement membranaire physiologique. Nous avons donc procédé à l'immunoprécipitation de la Cav-3 dans ces préparations de triades. Nos résultats montrent la présence de Ca_v 1.1 parmi les protéines co-immunoprécipitées avec la Cav-3, ce qui indique que ces deux protéines interagiraient au sein des triades. Cependant, la présence de Ca_v 1.1 parmi les protéines retenues de manière non-spécifique par les billes d'agarose et/ou par la protéine G (fraction de « pré-clearing ») ne nous permettent pas d'affirmer catégoriquement que ces deux protéines interagissent. Il est possible que l'interaction observée soit non-spécifique. Nous projetons de répondre à cette question, notamment en améliorant la saturation des billes d'agarose. Par ailleurs, nous n'avons pas réalisé de contrôle négatif dans cette expérience. Ainsi, afin de vérifier que la co-immunoprécipitation de Ca_v 1.1 est spécifique de l'anticorps anti-Cav-3, nous procéderons à la même expérience en substituant l'IgG d'immunoprécipitation de la Cav-3 par des IgG non immunes, c'est-à-dire qui ne sont pas dirigées contre un antigène.

Par ailleurs, bien que ces résultats soient préliminaires, nous avons cherché à caractériser cette interaction, notamment en analysant plus précisément le site de l'interaction entre la Cav-3 et Ca_v 1.1. Cette dernière est une protéine à 4 domaines transmembranaires. Les seuls domaines protéiques disponibles à une interaction sont donc les domaines extramembranaires de Ca_v 1.1. La Cav-3 étant elle-même localisée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, nous avons émis l'hypothèse que le site d'interaction

devrait se situer sur l'une des extrémités N- et C-terminales ou sur une des boucles cytoplasmiques de Ca_v 1.1, en d'autres termes sur les boucles interdomaines de la sous-unité pore du canal.

Nos résultats, obtenus suite à des expériences de pull-down de la Cav-3 par les différents domaines intracellulaires de Ca_v 1.1, nous confortent dans l'hypothèse d'une interaction directe entre la Cav-3 et Ca_v 1.1, puisqu'il semblerait que la Cav-3 interagisse avec la sous-unité pore du canal uniquement au niveau de sa boucle interdomaines I-II. Les autres boucles intracellulaires ainsi que les domaines N- et C-terminaux de Ca_v 1.1 n'ont pas permis d'observer d'interaction avec la Cav-3.

Nous avons également analysé si une éventuelle interaction avec la sous-unité β existait. Parmi les 3 isoformes de β_1 , seule l'isoforme β_{1a} est présente dans le muscle squelettique (Powers et coll., 1992). Plusieurs rôles lui sont attribués, notamment celui d'augmenter l'expression membranaire des canaux calciques, par transport de Ca_v 1.1 de compartiments périnucléaires vers la membrane plasmique (Chien et coll., 1995; Neuhuber et coll., 1998; Bichet et coll., 2000; Schredelseker et coll., 2005). Il est alors possible que la Cav-3 interagisse avec β_{1a} . Ainsi, quand la Cav-3 est absente ou bloquée dans Golgi en raison de l'expression du mutant Cav-3^{P104L}, elle empêcherait la sous-unité β_{1a} de remplir sa fonction de transport de Ca_v 1.1 hors de vésicules périnucléaires, ce qui expliquerait d'une part la diminution de courant de type L et d'autre part la rétention golgienne de Ca_v 1.1 que nous avons observé dans les myotubes primaires. Toutefois, nos expériences de pull-down de la Cav-3 par la sous-unité β_{1a} affirment qu'elles n'interagissent pas. Ceci n'exclut pas pour autant un rôle coopératif des deux protéines, selon lequel β_{1a} adresserait Ca_v 1.1 à la membrane et Cav-3 participerait à son ancrage et à sa stabilisation. Il serait ici particulièrement judicieux de procéder à des immunomarquages de la sous-unité β_{1a} dans les cellules exprimant le mutant Cav-3^{P104L} afin d'étudier sa localisation. En effet, il est possible d'imaginer que l'absence de Cav-3 altère indirectement le rôle de transporteur et d'adressage de la sous-unité β_{1a} . L'immunomarcage de cette sous-unité permettrait alors de déterminer si son expression fonctionnelle est altérée en absence de Cav-3.

L'ensemble de nos résultats indiquent que donc que Ca_v 1.1 posséderait un unique site d'interaction avec la Cav-3 localisé sur la boucle I-II. Or, la boucle I-II possède en particulier un site fonctionnel correspondant au domaine d'interaction avec la sous-unité β_{1a} . Ce domaine porte le nom de AID (*Alpha Interaction Domain*; Pragnell et coll., 1994). Nous avons alors testé l'interaction entre la Cav-3 et ce peptide (nommé pAIDsk) par pull-down de Cav-3 traduite par le peptide AIDsk biotinylé et immobilisé sur billes recouvertes de streptavidine.

Les résultats de ce pull-down indiquent qu'*in vitro*, une interaction existe entre la Cav-3 et le pAIDsk. Cependant, nous ne pouvons catégoriquement conclure quant à l'existence de cette interaction *in vivo*. En effet, il est possible que, dans les conditions expérimentales du pull-down, la concentration de peptide immobilisé utilisées favorisent une interaction non spécifique. Nous observons en effet qu'une grande partie de la Cav-3 est restée libre et se retrouve dans le « flow through ». Ce résultat pourrait en partie s'expliquer par le fait que l'interaction entre la Cav-3 et pAIDsk est une interaction de faible affinité ou que le pAIDsk seul ne constitue pas un site complet pour l'interaction optimale de la Cav-3. L'affinité entre les deux protéines pourrait également dépendre d'un troisième ligand de la boucle I-II qui potentialiserait l'interaction avec la Cav-3 en modifiant la conformation du pAIDsk, le rendant « apte » à une interaction. Enfin, la Cav-3 possède de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations, palmitoylations et myristoylations (Williams & Lisanti, 2001). Or, la Cav-3 utilisée pour les pull-downs a été synthétisée en extraits de réticulocytes. Ce système eucaryote acellulaire de traduction *in vitro* permet d'obtenir certaines modifications post-traductionnelles, mais souvent à un taux inférieur à celui obtenu en système cellulaire. Une alternative serait alors de procéder à l'expression de la Cav-3 dans un système cellulaire eucaryote tel que les cellules d'insecte *sf9*. En effet, il est possible que la Cav-3 traduite n'adopte par sa conformation physiologique et/ou ne possède pas de modifications post-traductionnelles lui permettant d'interagir de manière optimale. Nous pourrions également travailler directement sur des vésicules de HSR solubilisées, dont on sait désormais qu'elles sont enrichies en Cav-3. Ainsi, nous pourrions tester si le peptide AID immobilisé est capable d'interagir avec de la Cav-3 native, directement isolée à partir d'extraits musculaires.

Nous comptons également effectuer parallèlement des expériences complémentaires de pull-down de la Cav-3 traduite en extrait de réticulocytes par le pAIDsk à des concentrations croissantes, afin de déterminer la spécificité et l'affinité de l'interaction entre la Cav-3 et la boucle I-II au niveau du domaine AID. De plus, nous comptons procéder à ces expériences en utilisant de la Cav-3 radiomarquée. La détection de la Cav-3 fixée sera ainsi plus sensible que par western blot. Or, l'affinité entre deux protéines dépend de la concentration en sites à partir de laquelle le ligand interagit. Il paraît alors évident que la sensibilité de la détection conditionne la valeur apparente de l'affinité déterminée.

En parallèle, nos résultats suggérant fortement une interaction entre la boucle I-II de Ca_v 1.1 et la Cav-3, nous avons cherché à déterminer avec quelle affinité les deux protéines interagissent l'une avec l'autre. La constante de dissociation K_d ainsi obtenue constitue un

paramètre essentiel dans la caractérisation des interactions protéiques. La courbe d'affinité obtenue suite au pull-down de la Cav-3 par la boucle I-II à des concentrations croissantes est représentative d'une courbe d'interaction spécifique entre deux protéines et confirme les résultats du pull-down. En effet, nous pouvons observer que cette courbe comporte une phase de saturation où, quelle que soit la concentration en boucle I-II, la Cav-3 ne se fixe plus.

Nous avons alors obtenu un K_d Cav-3/boucle I-II de l'ordre de 35 nM. Pour comparaison, le K_d entre la sous-unité β_1 et la boucle I-II est comprise entre 5 et 60 nM en fonction du type de sous-unité (Canti et coll., 2001; De Waard et coll., 1994). Cav-3 et β_{1a} ayant une affinité comparable pour la boucle I-II, une hypothèse serait qu'en conditions physiologiques, les deux protéines pourraient entrer en compétition pour le même site. Dans ce cas, la Cav-3 pourrait moduler indirectement l'activité de β_{1a} sur la fonction du canal de type L. En effet, la sous-unité β module l'activité du canal et les cinétiques de courant calcique de type L (Gregg et coll., 1996 ; Strube et coll., 1996 ; Beurg et coll., 1997). Si l'interaction entre la Cav-3 et $\text{Ca}_v 1.1$ au niveau de son domaine AID se confirme, il serait alors intéressant de mener des expériences de compétition entre la Cav-3 et β_{1a} . Dans cette optique, il serait en effet intéressant de tester directement l'effet du peptide AID sur les propriétés du canal calcique de type L. Si la Cav-3 interagit avec la boucle I-II au niveau du domaine AID, l'ajout de peptide AID dans la pipette de patch au moment des enregistrements électrophysiologiques en configuration cellule-entière devrait créer une compétition avec la Cav-3 sur la boucle I-II et en quelque sorte « détourner » son action. L'analyse des propriétés des courants calciques en absence et en présence du peptide apporterait probablement des éléments de réponse à quant à l'interaction de la Cav-3 sur la boucle I-II *via* le domaine AID.

Il est toutefois difficile de concevoir que la Cav-3 et la sous-unité β_{1a} partage un même site, avec la même fonction. Il paraît ainsi plus probable qu'elles agissent selon un mode coopératif. Dans ce modèle, β_{1a} participerait à l'adressage de $\text{Ca}_v 1.1$ à la membrane et la Cav-3 participerait à l'ancrage et/ou la stabilisation du canal dans la membrane plasmique. La Cav-3 possède d'ailleurs des groupements myristoyl et palmitoyl qui participent à son adressage et à son ancrage à la membrane plasmique (Williams & Lisanti, 2001). Ces caractéristiques en font un bon partenaire d'interaction pour la stabilisation de protéines membranaires, en l'occurrence de $\text{Ca}_v 1.1$.

Il n'est cependant pas exclu qu'outre un rôle dans la stabilisation et/ou l'ancrage de $\text{Ca}_v 1.1$ à la membrane plasmique, la Cav-3 participe à la régulation de l'activité du canal. En effet, dans le muscle complètement différencié de souris Cav-3^{-/-}, la quantité de DHPR n'est

pas différente par rapport à des souris contrôles. Or, nos expériences et d'autres (Pouvreau et coll., 2004) montrent qu'une déficience ou une délocalisation de la Cav-3 altère la fonction du DHPR.

Ainsi, il semblerait que la Cav-3 interagisse avec la boucle I-II de Ca_v 1.1, peut être au niveau de son domaine AID. Nous comptons également identifier le domaine de Cav-3 impliqué dans l'interaction avec la boucle I-II. Pour cela, j'ai précédemment sous-cloné différentes parties du gène de la CAV3 afin d'obtenir différents domaines sous forme de protéines recombinantes. Parmi les domaines fonctionnels de la Cav-3, le domaine scaffolding ou CSD est particulièrement important dans les interactions protéiques. De nombreux partenaires de la Cav-3, tels que la nNOS (Venema et coll., 1997), les KCa (Wang et coll., 2005), TRPC1 (Lin et coll., 2006), interagissent au niveau de son CSD. Cependant, une récente étude vient de démontrer l'association de la Cav-1 avec l'échangeur $(Na^+, K^+)/H^+$ nommé NHE7 via son domaine C-terminal (Lin et coll., 2006). Nous disposons actuellement du domaine C-terminal et du domaine N-terminal entier et délété du CSD. Chacun de ces domaines sera donc testé par la technique de pull-down afin de compléter cette étude et d'identifier sur chaque partenaire le site responsables de l'interaction.

En conclusion, la Cav-3 pourrait constituer un nouveau partenaire du DHPR. Le DHPR est un élément central de l'excitabilité musculaire et la découverte de nouveaux partenaires protéiques capables de réguler son activité ou son expression membranaire permet d'apporter des éléments clés dans la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques impliqués dans l'homéostasie calcique. L'interaction avec la Cav-3 pourrait servir à ancrer, à stabiliser le canal, voir à faciliter son interaction avec d'autres modulateurs de son activité, tels que la sous-unité β_{1a} .

3^{ème} PARTIE. EFFETS D'INHIBITEURS DU PROTÉASOME SUR UNE LIGNÉE DE CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES EXPRIMANT LE MUTANT PATHOLOGIQUE CAV-3^{P104L}.

Cette étude avait pour but de tester et de caractériser les effets cellulaires de nouveaux inhibiteurs de protéasome sur la restauration de la Cav-3 endogène sauvage dans des conditions où le mutant dominant négatif Cav-3^{P104L} est exprimé. Nous avons travaillé sur culture de C2C12, une lignée musculaire squelettique. Contrairement à des études précédentes sur ce mutant effectuées sur des cultures de fibroblastes (Galbiati et coll., 2000). Les C2C12 sont une lignée de cellules musculaires squelettique qui exprime donc la Cav-3 de manière endogène, notamment au moment de la fusion des myoblastes en myotubes, les cellules expriment la Cav-3 (Parton et coll., 1997).

L'effet dominant négatif du mutant Cav-3^{P104L} exprimé de manière exogène a précédemment été caractérisé sur culture de fibroblastes NIH 3T3 (Galbiati et coll., 2000). Cette étude a montré que le mutant agissait en se dimérisant avec la Cav-3 endogène. Il se formerait alors des agrégats de cavéoline mutante et endogène, de haut poids moléculaire instables, retenus au niveau de l'appareil de Golgi. Ces agrégats auraient une demi-vie raccourcie par rapport à la demi-vie des oligomères de Cav-3 endogène, car ils seraient rapidement dégradés par la voie protéasomale, ce qui expliquerait la déficience en Cav-3 observée chez les patients LGMD-1C.

Le projet consistait à évaluer l'efficacité de nouveaux inhibiteurs du protéasome qui inhibent l'enzyme de manière réversible, sans création de liaisons covalentes comme le font d'autres inhibiteurs connus tels que le MG 132 et la lactacystine. Le TMC-95A est un composé tripeptidique complexe, mais dont l'efficacité sur l'inhibition des activités protéolytiques des enzymes du protéasome sont avérées. Cependant, la complexité de sa structure fait de ce composé une molécule difficile à synthétisée et par conséquent coûteuse en terme de temps et d'argent. Ainsi, deux molécules ont été synthétisées par simplification la structure du TMC-95A. Ces molécules, les composés A215 et A248, sont capables d'inhiber les différentes activités du protéasome de manière réversible *in vitro*. Nous avons ici comparé les effets cellulaires de ces molécules à ceux du MG132, un inhibiteur reconnu de l'activité protéasomale qui a servi de référence dans cette étude.

Nous avons tout d'abord commencé cette étude en évaluant de manière qualitative la cytotoxicité relative des différentes molécules à tester. Nous avons observé que

l'incubation des cellules en présence de MG132, à des concentrations de 5 et 10 μ M, pouvait se montrer toxique. Au bout de quelques heures, nous pouvions observer des signes de mort cellulaire, se traduisant par un grand nombre de cellules se décollant du support et des phénomènes d'hypercontractibilité des myotubes qui, à terme, entraînaient un décollement des cultures du support. Nous n'avons pas observé de tels phénomènes en ce qui concerne les composés A215 et A248. Ces molécules étant toutes solubles en DMSO, nous avons également testé l'effet du « véhicule » seul. Le DMSO ne semble pas d'avoir d'effet drastique sur le développement des cultures, aucun phénomène significatif de mort cellulaire n'a été observé. Il en est de même pour les composés A215 et A248 qui ne présentent pas plus de toxicité que le DMSO seul, et surtout bien moins que le composé MG132. Il serait intéressant ici d'évaluer plus précisément les phénomènes de cytotoxicité. Des tests de cytotoxicité de ces inhibiteurs sur les cellules musculaires en culture ainsi que sur des cellules non-musculaires (lignée épithéliale CHO) à l'aide d'un test colorimétrique non-radiocatif (Cytotox 96, Promega) sont actuellement en cours. Ce test est basé sur une mesure quantitative de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules traitées, si celles-ci meurent. En effet, la LDH est une enzyme cytosolique qui est libérée lors de la lyse cellulaire et dont l'activité est facilement mesurable par réaction colorimétrique.

Nous avons ensuite évalué par immunomarquage la capacité des inhibiteurs à préserver de la dégradation protéasomale de la Cav-3 quand le mutant Cav-3^{P104L} est exprimé de manière exogène. Dans les myotubes C2C12, Cav-3^{P104L} adopte une répartition périnucléaire, correspondant vraisemblablement à l'appareil de golgi, comme nous l'avons préalablement décrit sur myotubes squelettiques primaires et fibres fœtales (Couchoux et coll., 2007). L'absence de marquage de la Cav-3 sur ces cellules indique qu'elles sont déficientes en Cav-3 endogène membranaire reflétant l'effet dominant-négatif du mutant Cav-3^{P104L}. Nos résultats montrent également que le traitement des cultures par le MG132 permet de récupérer un marquage membranaire de la Cav-3. Par conséquent, le MG132 bloquerait bien l'effet dominant négatif du mutant en inhibant sa dégradation et celle de la Cav-3 endogène par le protéasome. Les molécules nous ont fourni des résultats similaires, avec restauration de Cav-3 membranaire. Ces molécules semblent donc être aussi efficaces que le MG132 en ce qui concerne l'inhibition de la dégradation de la Cav-3 par le protéasome.

Nous avons ainsi quantifié les effets des différentes molécules en analysant par immunocytochimie le nombre de myotubes transfectés par le mutant restaurait de la Cav-3

membranaire. Nos résultats indiquent que les composés A215 et A248 permettent de récupérer de la Cav-3 membranaire dans près de 70% des myotubes transfectés. L'efficacité de ces molécules semble même supérieure à celle du MG 132 qui permet de récupérer de la Cav-3 membranaire dans moins de 50% des myotubes exprimant le mutant. Il est intéressant de noter que le DMSO seul semble lui-même avoir un effet sur l'activité protéasomale, puisqu'il permet de récupérer de la Cav-3 membranaire dans plus de 30% des myotubes transfectés. Cet effet du DMSO pourrait provenir de son action sur l'activité protéolytique du protéasome. Le DMSO est un composé chimique capable de déstabiliser la structure de protéines. Il est possible qu'il puisse déstabiliser la structure du complexe du protéasome et inhiber son activité protéolytique. Le DMSO est également capable d'agir sur la conformation et la stabilité des protéines. Plusieurs de ces effets, notamment sur la déstabilisation et les propriétés de liaison de plusieurs protéines, ont déjà été caractérisés (Tjernberg et coll., 2006). Ainsi, une hypothèse pour expliquer l'inhibition de l'effet dominant-négatif du mutant et la restauration de Cav-3 membranaire en présence de DMSO serait qu'il déstabiliserait la dimérisation de Cav-3 mutante et endogène. Il n'y aurait plus de formations des complexes de haut poids moléculaires et par conséquent plus de rétention au niveau de Golgi et de dégradation protéasomale de ces agrégats.

L'ensemble de ces résultats constitue une étude préliminaire aux effets cellulaires d'inhibiteurs de protéasome sur la restauration de Cav-3 quand le mutant dystrophique Cav-3^{P104L} est exprimé.

Si ces résultats préliminaires se confirment, cette étude pourrait à terme mener au développement de molécules pour le traitement pharmacologique des patients atteint de LGMD-1C, et d'une manière plus générale, aux pathologies associées à la dégradation anormale de protéines par le protéasome. En effet, les patients présentant des mutations de CAV3 telles que la mutation P104L ou la délétion Δ TFT, à l'origine de la LGMD-1C, conservent un allèle codant pour la Cav-3 de type sauvage. En bloquant l'effet dominant négatif de l'allèle muté, il serait possible de préserver la dégradation de la Cav-3 sauvage. D'autres pathologies mettant en jeu une dégradation anormale ou accrue de protéines par le protéasome peuvent également constituer une cible thérapeutique des inhibiteurs de protéasome. Le bortezomib (Velcade®), inhibiteur covalent, est déjà utilisé dans le traitement du Myélome Multiple (Cusack et coll., 2001). Dans un contexte de pathologie musculaire, la myopathie de Duchenne se caractérise par une déficience en dystrophine responsable d'une déstabilisation du complexe des glycoprotéines associées à la

dystrophine, qui sont en conséquence absentes ou très peu représentées dans le muscle dystrophique. Des injections intramusculaires de MG 132 chez la souris mdx (modèle murin de la myopathie de Duchenne) permettent de conserver le niveau d'expression fonctionnelle de ces glycoprotéines, de diminuer les dommages cellulaires et l'ampleur du phénotype myopathique (Bonuccelli et coll., 2003). Cependant, un traitement par des inhibiteurs de protéasome peut présenter des inconvénients majeurs, notamment lorsque la dégradation d'un produit protéique anormal est nécessaire à la viabilité cellulaire.

Ainsi, outre leur activité intrinsèque, un des intérêts potentiels de ces inhibiteurs non-covalents du protéasome est qu'ils seraient susceptibles d'engendrer des effets délétères beaucoup plus restreints que les inhibiteurs covalents tels que le MG-132. Le développement de molécules capables d'inhiber spécifiquement les diverses activités du protéasome tout en restant à effet réversible semble constituer une piste thérapeutique pharmacologique intéressante.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble de mes travaux de thèse démontre l'importance de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique. Une déficience en Cav-3 est en effet à l'origine d'une réduction drastique de l'amplitude du courant calcique de type L dans le muscle en développement et différencié. Outre leur intérêt fondamental, mes résultats permettent d'apporter de nouveaux éléments concernant les mécanismes physiopathologiques des cavéolinopathies. De plus, mes résultats suggèrent fortement une interaction entre la Cav-3 et le DHPR ce qui apporte des données supplémentaires dans la compréhension de la relation entre les différents microdomaines sarcolemmaux du muscle squelettique.

Depuis la découverte d'une isoforme spécifique de la Cav-3 dans le muscle strié (Way & Parton, 1996), de nombreux rôles ont été attribués à la Cav-3 et aux cavéoles. Bien que l'hypothèse d'un lien entre les cavéoles et l'homéostasie calcique ait été émise il y a plusieurs années (Popescu et coll., 1974), très peu d'études sur la relation entre la Cav-3 et les voies d'entrée du calcium ont été menées dans le muscle squelettique. Nous démontrons dans cette étude l'importance de la Cav-3 sur l'expression fonctionnelle du DHPR dans le muscle squelettique. Nous émettons notamment l'hypothèse d'une interaction entre la Cav-3 et la sous-unité pore du DHPR, $Ca_v 1.1$.

Notre hypothèse concernant une interaction fonctionnelle entre la Cav-3 et le DHPR est étayée par les observations faites chez les souris Cav-3^{-/-}. Ces souris ne présentent pas de changement de la quantité de $Ca_v 1.1$ dans le muscle de souris adultes (Galbiati et coll., 2001). Dans ce cas, la diminution de courant de type L serait la conséquence d'une altération de la fonction du canal due à la perte de son association avec la Cav-3. De même, il n'est pas exclu que la Cav-3 serve à organiser un environnement membranaire ou protéique favorable au bon fonctionnement du canal. De nombreuses molécules interagissant avec la Cav-3 sont susceptibles de réguler l'activité du DHPR. La Cav-3 aurait pour rôle de former des complexes de signalisation macromoléculaires contenant tous les acteurs de voies de signalisation, permettant ainsi la régulation rapide et spécifique de canaux ioniques, en l'occurrence celle du DHPR. Dans ce contexte, des expériences d'immunoprécipitation ont révélé que la Cav-3, $Ca_v 1.2$, le récepteur β_2 -adrénergique, la protéine G_{as} , l'adénylyl cyclase

et la PKA formaient un complexe de signalisation dans les cardiomyocytes (Balijpalli et coll., 2006). De même, les canaux TRP1 formeraient un complexe de signalisation, localisé dans les cavéoles, comprenant la Cav-1, la sous unité $G_{\alpha q/11}$ et le récepteur à l' IP_3 de type 3 (IP_3R) (Lockwich et coll., 2000). Il est alors possible d'imaginer que la Cav-3 serve à organiser des protéines impliquées dans un complexe de mobilisation du calcium. Rappelons que la Cav-3 interagit avec de nombreuses molécules de régulation de la $[Ca]_i$, telles que la calmoduline, la parvalbumine (Darby et coll., 1999), mais également la PMCA (Tortelote et coll., 2004). Il est possible de déterminer l'ensemble des protéines interagissant avec la Cav-3 par immunoprécipitation de la Cav-3 suivie de l'analyse des protéines co-précipitées par spectrométrie de masse.

Par ailleurs, la Cav-3 pourrait plus simplement servir non seulement à organiser des complexes protéiques, mais également des éléments lipidiques. En effet, la Cav-3 est une molécule capable d'interagir avec le cholestérol, et les cavéoles sont caractérisées par leur environnement lipidique très particulier. L'hypothèse d'une régulation de l'activité du DHPR par les lipides membranaires peut alors être émise. A ce titre, une étude précédemment menée au laboratoire a montré qu'une déplétion en cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrine diminuait l'amplitude de $I_{Ca, L}$, mis pas de $I_{Ca, T}$ (Pouvreau et coll., 2004). Ce résultat pouvait alors s'expliquer de deux façons : soit l'activité du canal était directement régulée par le cholestérol ; soit les effets observés reflétaient des changements dans les interactions du DHPR avec des molécules environnantes localisées dans les cavéoles ou les tubules T. Un rôle de la Cav-3 avait alors été soulevé. Nos études sur la fonction du DHPR en absence de Cav-3 nous a mené à des résultats tout à fait comparables, à savoir une réduction de l'amplitude du courant de type L et pas de type T. Alors que l'incubation des cellules musculaires en présence de méthyl- β -cyclodextrine entraînait un aplanissement des cavéoles (Carozzi et coll., 2000 ; Pouvreau et coll., 2004), nous n'avons pas étudié les conséquences morphologiques de l'expression du mutant $cav-3^{P104L}$. En revanche, les muscles des patients présentant la mutation P104L et donc atteints de LGMD-1C présentent une forte diminution, voire une absence de cavéoles (Galbiati et coll., 2001). Ainsi, dans notre système, nous pouvons assumer que l'expression du mutant Cav-3P104L, à l'origine d'une déficience en Cav-3 endogène, altère probablement les cavéoles des cellules transfectées. Il semblerait par conséquent que la modulation de l'activité du DHPR dépende plus de son interaction avec la Cav-3 que de l'environnement lipidique. Ainsi, sans exclure un rôle des lipides membranaires

dans la régulation de l'activité du DHPR, la Cav-3 semble être un facteur déterminant au fonctionnement correct de ce canal.

Enfin, une dernière hypothèse concernant le rôle de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique ferait intervenir les deux rôles précédemment décrits, à savoir, une organisation d'éléments protéiques mais également lipidiques. Ainsi, la Cav-3 pourrait avoir un rôle dans le transport de protéines et l'adressage de vésicules membranaires, notamment dans la formation des triades et des tubules T. Ainsi, comme le suggère la rétention partielle de Cav1.1 au niveau de Golgi quand la Cav-3 est elle-même bloquée dans ce compartiment, des vésicules contenant les principaux de la Cav-3 et les acteurs du couplage excitation-contraction pourraient bourgeonner de l'appareil de Golgi et fusionner avec les tubules T en formation au cours du développement musculaire. Plusieurs études étayaient cette hypothèse, notamment des études morphologiques sur la biogenèse du réseau tubulaire transverse. Les cavéoles sont en effet localisées de part et d'autre des entrées des tubules T (Ishikawa 1968 ; Franzini-Armstrong et coll., 1991), la Cav-3 est associée aux tubules T en cours de maturation (Parton et coll., 1997) et notre étude indique que la Cav-3 serait également localisée dans les tubules T du muscle différencié. Les tubules T et les cavéoles ont d'ailleurs une composition lipidique similaire (Carozzi et coll., 2000). De plus, l'inhibition de la formation des tubules T entraîne une accumulation de vésicules ressemblant à des cavéoles sur la face cytoplasmique de la membrane (Schiaffino et coll., 1977). L'ensemble de ces résultats a abouti à l'hypothèse que les tubules T dériveraient du bourgeonnement répété de cavéoles qui fusionneraient et formeraient des structures tubulaires en collier de perles qui se développeraient et s'organiseraient en réseaux tridimensionnels correspondants au réseau tubulaire transverse (Ishikawa, 1968). Par ailleurs, les muscles de patients LGMD-1C, déficients en Cav-3, présentent certaines déformations du système T, auxquelles s'ajoute un phénomène de prolifération anormale des tubules T, formant des structures en « nids d'abeilles » (Galbiati et coll., 2001; Minetti et coll., 2002). De même, les souris déficientes en Cav-3 présentent des anomalies de structure du système T avec certains profils de tubules T dont l'orientation est longitudinale et qui présentent des dilatations anormales (Galbiati et coll., 2001). Un modèle a même été proposé pour expliquer la relation entre cavéoles et tubule T au cours de la biogenèse du système T et des triades (Yuan et coll., 1991). Selon ce modèle, le DHPR et le RyR sont synthétisés et incorporés dans des vésicules de transfert. Ces vésicules fusionneraient avec le sarcolemme, d'abord pour former des cavéoles, puis créeraient des invaginations membranaires tubulaires. Simultanément, des

vésicules contenant le RyR sont incorporées dans le RS en formation, alors que d'autres contenant le DHPR fusionnent avec les tubules T en formation. La jonction triadique se formerait alors par association des RyR du RS et des DHPR des tubules T. Ainsi, la Cav-3 pourrait intervenir dans les étapes d'adressage des vésicules au sarcolemme et dans la stabilisation et/ou l'ancrage des protéines du couplage dans la triade. Ce schéma n'exclut cependant pas un phénomène de régulation des protéines triadiques, en particulier le DHPR, par la Cav-3. Ainsi, il est possible que les deux effets coexistent, mais que l'effet observé dépende du stade de développement musculaire. Dans le muscle en différenciation, où les processus de maturation et de développement membranaire sont accrus, l'effet observé serait alors majoritairement un effet sur l'adressage du DHPR. Dans le muscle adulte différencié, ces phénomènes étant mineurs, les effets observés seraient alors principalement ceux d'une régulation de l'activité du canal par la Cav-3. Rappelons que le muscle en développement présente une plasticité membranaire accrue, notamment au niveau des cavéoles. A ce stade, il existerait un remaniement des cavéoles pour former le futur système tubulaire transverse (Ishikawa, 1968). Au contraire, dans le muscle différencié, ces structures sont beaucoup plus stables, notamment en ce qui concerne le contenu des cavéoles (Tagawa et coll., 2005).

Parallèlement à l'étude du rôle de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique, nous avons mené une étude sur les effets de nouveaux inhibiteurs du protéasome sur la restauration de Cav-3 dans des cellules exprimant le mutant pathologique dominant-négatif Cav-3^{P104L}. Nos résultats tendent à indiquer que le traitement de cellules musculaires C2C12 exprimant la Cav-3^{P104L} par le A₂₁₅ et A₂₄₈, des inhibiteurs réversibles du protéasome, permet d'inhiber la dégradation de Cav-3 endogène et par conséquent de restaurer de la Cav-3 membranaire. De plus, d'après notre étude cellulaire préliminaire de la toxicité de ces molécules, il semblerait que les inhibiteurs non-covalents A₂₁₅ et A₂₄₈ présentent une cytotoxicité moindre que celle de l'inhibiteur covalent de référence, le MG 132. Cette étude semble par ailleurs confirmer les résultats obtenus par le groupe de Lisanti sur cellules NIH 3T3 en culture (Galbiati et coll., 2000) et indique pour la première fois que, dans le muscle, le mutant Cav-3^{P104L} agit également de manière dominante-négative sur la Cav-3 endogène en entraînant sa dégradation par le complexe du protéasome.

Ces résultats seraient particulièrement intéressants dans une perspective thérapeutique. En effet, si les effets des inhibiteurs du protéasome se confirment et qu'il apparaît que le traitement est efficace dans la restauration de l'expression de Cav-3, la localisation du DHPR sera déterminée par immunomarquage sur les myotubes exprimant Cav-3^{P104L}. Ainsi, nous

pourrons déterminer si la localisation du DHPR est elle aussi restaurée par le traitement par les inhibiteurs du protéasome.

Par ailleurs, nous procéderons à l'étude de la fonction du canal calcique de type L dans des myotubes C2C12 exprimant le mutant dystrophique Cav-3^{P104L} traités par les différents composés inhibiteurs du protéasome, afin d'observer si l'inhibition de la dégradation protéasomale de la Cav-3 endogène est capable de restaurer l'activité du canal calcique. Ce travail a permis par ailleurs de combiner des approches biochimiques avec des approches de physiologie cellulaire et moléculaire.

En cela, la compréhension des mécanismes clés de la physiopathologie des myopathies dues à une déficience en Cav-3 passera probablement par l'association de plusieurs approches, quelles soient cliniques, biochimiques, moléculaires ou cellulaires.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse apporte des éléments clé de compréhension du rôle de la Cav-3 dans l'homéostasie calcique des cellules musculaires squelettiques. Mon travail montre en effet qu'une déficience en Cav-3 est à l'origine d'importantes altérations de la fonction des canaux calciques voltage-dépendants de type L se traduisant par une forte diminution de l'amplitude du courant calcique de type L dans les myotubes squelettiques primaires et les fibres musculaires fœtales et adultes. Dans les myotubes primaires, cette diminution de $I_{Ca, L}$ s'accompagne d'une importante réduction de l'expression fonctionnelle du DHPR. Les expériences d'interactions indiquent que la Cav-3 s'associerait au DHPR via la boucle I-II. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer plus précisément le site d'interaction, en particulier s'il s'agit du domaine fonctionnel AID. Enfin, une étude complémentaire sur les effets cellulaires d'inhibiteurs de protéasome sur l'inhibition de l'effet dominant-négatif du mutant pathologique Cav-3^{P104L} a apporté un aspect de recherche appliquée à ce travail de thèse en ouvrant des perspectives quant à une utilisation thérapeutique de ces molécules chez les patients LGMD-1C.

De nombreuses perspectives s'ouvrent suite à ce travail de thèse, notamment celle d'étudier la fonction du DHPR dans les cellules musculaires humaines en culture déficientes en CAV-3.

Le laboratoire a d'ailleurs pour projet de s'associer des cliniciens afin de récupérer des échantillons musculaires squelettiques de patients atteints de LGMD1C et de développer des cultures à partir de ces biopsies pour en étudier les propriétés électrophysiologiques. Toutefois, la grande rareté de la pathologie ainsi que la difficulté à diagnostiquer cette maladie constituent une difficulté majeure dans cette étude.

A

Aggarwal SK, MacKinnon R.

Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel.

Neuron. 1996; 16:1169-77

Ahern CA, Powers PA, Biddlecome GH, Roethe L, Vallejo P, Mortenson L, Strube C, Campbell KP, Coronado R, Gregg RG.

Modulation of L-type Ca²⁺ current but not activation of Ca²⁺ release by the gamma1 subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle.

BMC Physiol. 2001; 1:8

Allbrook D.

Skeletal muscle regeneration.

Muscle Nerve 1981; 4:234-45

Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S.

Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor.

Acta Myol. 2005; 24:134-44

Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP.

Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels.

J Biol Chem. 2003; 278:1212-9

B

Beam KG, Knudson CM, Powell JA.

A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells.

Nature. 1986; 320:168-70

Beam KG, Knudson CM.

Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle.

J Gen Physiol. 1988; 91:781-98

Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, Maier A, Tarone G, Koteliensky VE, Burridge K.

Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in non muscle cells.

J Cell Biol. 1996; 132:211-26

Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M.

Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease.

Physiol Rev. 200; 80:1215-65.

Berthier C, Blaineau S.

Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers.

Biol Cell. 1997; 89:413-34

Berthier C, Monteil A, Lory P, Strube C.

Alpha(1H) mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice.

J Physiol. 2002 ; 539:681-91

Beurg M, Sukhareva M, Strube C, Powers PA, Gregg RG, Coronado R.

Recovery of Ca²⁺ current, charge movements, and Ca²⁺ transients in myotubes deficient in dihydropyridine receptor beta 1 subunit transfected with beta 1 cDNA.

Biophys J. 1997; 73:807-18

Beurg M, Sukhareva M, Ahern CA, Conklin MW, Perez-Reyes E, Powers PA, Gregg RG, Coronado R.

Differential regulation of skeletal muscle L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling by the dihydropyridine receptor beta subunit.

Biophys J. 1999 ; 76:1744-56

Bezánilla F.

The voltage sensor in voltage-dependent ion channels.

Physiol Rev. 2000; 80:555-92

Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M.

The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit.

Neuron. 2000 ; 25:177-90

Bidaud I, Monteil A, Nargeot J, Lory P.

Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation.

J Muscle Res Cell Motil. 2006; 27:75-81

Biederer CH, Ries SJ, Moser M, Florio M, Israel MA, McCormick F, Buettner R.

The basic helix-loop-helix transcription factors myogenin and Id2 mediate specific induction of caveolin-3 gene expression during embryonic development.

J Biol Chem. 2000 ; 275:26245-51

Bijlenga P, Liu JH, Espinos E, Haenggeli CA, Fischer-Lougheed J, Bader CR, Bernheim L.

T-type alpha 1H Ca²⁺ channels are involved in Ca²⁺ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97:7627-32

Bischoff R.

The satellite cell and muscle regeneration.

Engel AG, Fr-Armstrong C. Myology; 1994

Bischoff R.

Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells.

Dev Dyn. 1997; 208:505-515

Bist A, Fielding PE, Fielding CJ.

Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveoline gene

transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:10693-8

Bossuyt J, Taylor BE, James-Kracke M, Hale CC.
The cardiac sodium-calcium exchanger associates with caveolin-3.
Ann N Y Acad Sci. 2002; 976:197-204

Bossuyt J, Taylor BE, James-Kracke M, Hale CC.
Evidence for cardiac sodium-calcium exchanger association with caveolin-3.
FEBS Lett. 2002; 511:113-7

Breuzza L, Corby S, Arsanto JP, Delgrossi MH, Scheiffele P, Le Bivic A.
The scaffolding domain of caveolin 2 is responsible for its Golgi localization in Caco-2 cells.
J Cell Sci. 2002; 115:4457-67

Brickley K, Campbell V, Berrow N, Leach R, Norman RI, Wray D, Dolphin AC, Baldwin SA.
Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha 2 subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels.
FEBS Lett. 1995; 364:129-33

Brillantes AM, Bezprozvannaya S, Marks AR
Developmental and tissue-specific regulation of rabbit skeletal and cardiac muscle calcium channels involved in excitation-contraction coupling.
Circ Res. 1994; 75:503-10.

C

Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH.
Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling.
J Biol Chem. 2000; 275:22607-10

Canti C, Davies A, Berrow NS, Butcher AJ, Page KM, Dolphin AC.
Evidence for two concentration-dependent processes for beta-subunit effects on alpha1B calcium channels.
Biophys J. 2001; 81:1439-51

Carpenter S, Karpati G.
Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal-muscle fibers.
J Neuropathol Exp Neurol. 1989; 48:154-161

Chandler WK, Rakowski RF, Schneider MF.
Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle.
J Physiol. 1976; 254:285-316

Chien AJ, Zhao X, Shirokov RE, Puri TS, Chang CF, Sun D, Rios E, Hosey MM.
Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels.

J Biol Chem. 1995; 270:30036-44

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC.
Striated muscle cytoarchitecture : an intricate web of form and function.
Annu Rev Cell Dev Biol. 2002; 18:637-706

Cognard C, Lazdunski M, Romey G.
Different types of Ca²⁺ channels in mammalian skeletal muscle cells in culture.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83:517-21

Collet C, Csernoch L, Jacquemond V.
Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice.
Biophys J. 2003 ; 84:251-65

Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP.
Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain.
Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins.
J Biol Chem. 1997; 272:6525-33

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E.
Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family.
Circ Res. 1998 ; 83:103-9

Crosbie RH, Yamada H, Venzke DP, Lisanti MP, Campbell KP.
Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex.
FEBS Lett. 1998;427:279-82

D

Danowski BA, Imanaka-Yoshida K, Sanger JM, Sanger JW.
Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes.
J Cell Biol. 1992; 118:1411-20

Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE.
Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca(2+) handling.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000; 279:L1226-35

Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP.
The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo.
J Biol Chem. 1999; 274:18721-8

Decary S, Mouly V, Butler-Browne GS.
Telomere length as a toll to monitor satellite cell amplification for cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1997; 7:1347-1350

- Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Browne GS.
Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle : Implications for satellite cell-mediated gene therapy
Hum Gene Ther. 1997; 8:1429-38
- De Jongh KS, Merrick DK, Catterall WA.
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.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86:8585-9
- De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Catterall WA.
Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88:10778-82
- Delbono O, Renganathan M, Messi ML.
Excitation-Ca²⁺ release-contraction coupling in single aged human skeletal muscle fiber.
Muscle Nerve Suppl. 1997; 5:88-92
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP.
Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain.
Neuron. 1994 ; 13:495-503.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP.
Direct binding of G-protein beta gamma complex to voltage-dependent calcium channels.
Nature. 1997 ; 385:446-50
- Dirksen RT, Beam KG.
Single calcium channel behavior in native skeletal muscle.
J Gen Physiol. 1995; 105:227-47
- Dirksen RT, Nakai J, Gonzalez A, Imoto K, Beam KG.
The S5-S6 linker of repeat I is a critical determinant of L-type Ca²⁺ channel conductance.
Biophys J. 1997; 73:1402-9
- Donaldson PL, Beam KG.
Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat.
J Gen Physiol. 198; 82:449-68
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K.
Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells.
EMBO J. 1993; 12:1597-605

E

- Eisenberg RS, McCarthy RT, Milton RL.
Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium antagonist D-600.
J Physiol. 1983 ; 341:495-505

Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP.
Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth.
J Biol Chem. 1997; 272:16374-81

Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA.
Nomenclature of voltage-gated calcium channels.
Neuron. 2000; 25:533-5

F

Fabrizio E, Nudel U, Hugon G, Robert A, Pons F, Mornet D.
Characterization and localization of a 77 kDa protein related to the dystrophin gene family.
Biochem J. 1994; 299:359-65

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM.
Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus.
Nature. 1989; 338:509-11.

Feldmeyer D, Melzer W, Pohl B.
Effects of gallopamil on calcium release and intramembrane charge movements in frog skeletal muscle fibres.
J Physiol. 1990; 421:343-62

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T.
Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells.
J Biol Chem. 1996; 271:22810-4

Fielding CJ, Bist A, Fielding PE.
Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts.
Biochemistry. 1999; 38:2506-13

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG.
De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:8655-9

Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, Lisanti MP.
Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I.
Biochemistry. 2002; 41:11931-40

Franzini-Armstrong C.
Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse.
Dev Biol. 1991; 146:353-63

Franzini-Armstrong C, Jorgensen AO.
Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle.
Annu Rev Physiol. 1994; 56:509-34.

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V.

Comparative ultrastructure of Ca²⁺ release units in skeletal and cardiac muscle.

Ann N Y Acad Sci. 1998; 853:20-30

Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M, Flockerzi V.

Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties.

J Biol Chem. 2000; 275:14476-81

Fujimoto T.

Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae.

J Cell Biol. 1993; 120:1147-57

G

Galbiati F, Volonte D, Minetti C, Bregman DB, Lisanti MP.

Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutants and rescues wild-type caveolin-3.

J Biol Chem. 2000 ; 275:37702-11

Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H Jr, Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP.

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. 2001; 276:21425-33

Garcia J, Beam KG.

Measurement of calcium transients and slow calcium current in myotubes.

J Gen Physiol. 1994 ; 103:107-23

Garcia J, Beam KG.

Calcium transients associated with the T type calcium current in myotubes.

J Gen Physiol. 1994; 104:1113-28

Glenney JR Jr.

Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus.

J Biol Chem. 1989; 264:20163-6

Gonoi T, Hasegawa S.

Post-natal disappearance of transient calcium channels in mouse skeletal muscle : effects of denervation and culture.

J Physiol. 1988; 401:617-37

Gordon AM, Homsher E, Regnier M.

Regulation of contraction in striated muscle.

Physiol Rev. 2000; 80:853-924

Gray AJ, Park PW, Broekelmann TJ, Laurent GJ, Reeves JT, Stenmark KR, Mecham RP.
The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin.
J Biol Chem. 1995; 270:26602-6

Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, Sukhareva M, Haynes S, Powell JA, Coronado R, Powers PA.
Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:13961-6

H

Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK.
Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells.
J Lipid Res. 1998; 39:369-79

Ham, RG, St. Clair IA, Meyer SD.
Improved medis for rapid clonal growth of normal human skeletal muscle satellite cells.
Adv Exp Med Biol. 1990; 280:193-199

Hansen-Smith FM, Carlson BM.
Cellular responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat.
J Neurol Sci. 1979; 41:149-73

Hughes SM, Blau HM.
Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development.
Nature. 1990; 345:350-353

Hynes RO.
Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell. 1992; 69:11-25

I

Ilisley JL, Sudol M, Winder SJ.
The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton.
Cell Signal. 2002; 14:183-9

Isshiki M, Anderson RG.
Function of caveolae in Ca²⁺ entry and Ca²⁺-dependent signal transduction.
Traffic. 2003; 4:717-23

J

Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP
Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides.
J Biol Chem. 1991; 266:3287-93

Jones SW.
Overview of voltage-dependent calcium channels.
J Bioenerg Biomembr. 1998; 30:299-312

Jorgensen AO, Shen AC, Arnold W, Leung AT, Campbell KP.
Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study.
J Cell Biol. 1989 109:135-47

K

Kamp TJ, Perez-Garcia MT, Marban E.
Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line.
J Physiol. 1996; 492:89-96

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM.
The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.
Cell. 1988 ; 53:219-26

Kurzchalia TV, Parton RG.
Membrane microdomains and caveolae.
Curr Opin Cell Biol. 1999; 11:424-31

L

Lansman JB, Hess P, Tsien RW.
Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore.
J Gen Physiol. 1986; 88:321-47

Lencer WI, Hirst TR, Holmes RK.
Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin.
Biochim. Biophys. Acta. 1999;1450:177-90

Leuranguer V, Bourinet E, Lory P, Nargeot J.
Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line.
Neuropharmacology. 1998; 37:701-8

Lin PJ, Williams WP, Kobiljski J, Numata M.
Caveolins bind to (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7 by a novel binding module
Cell Signal. 2007; 19:978-88

Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP.
Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin.
J Biol Chem. 1995; 270:15693-701

Li S, Song KS, Lisanti MP.

Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes.

J Biol Chem. 1996; 271:568-73

Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, Scherer PE, Lisanti MP. Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes.

FEBS Lett. 1998 ; 434:127-34

Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG.

Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria.

J Cell Sci. 2001; 114:1397-408

Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M.

Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease.

J Cell Biol. 1994; 126:111-26

Liu JH, Bijlenga P, Occhiodoro T, Fischer-Lougheed J, Bader CR, Bernheim L.

Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca²⁺ and K⁺ currents in human fusion-competent myoblasts.

Br J Pharmacol. 1999; 126:245-50

Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS.

Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells.

J Biol Chem. 2000; 275:3403-11

Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadowiec J, Weiland S, Ambudkar IS.

Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains.

J Biol Chem. 2000; 275:11934-42

M

MacDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ.

Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells.

Physiol Rev. 1994; 74:365-507

Maguy A, Hebert TE, Nattel S.

Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function.

Cardiovasc Res. 2006 ; 69:798-807

Marchesi VT, Steers E Jr.

Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane.

Science. 1968; 159:203-4

Martin PT, Kaufman SJ, Kramer RH, Sanes JR.

Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of alpha1, alpha7A, and alpha7B integrins with the neuromuscular junction.

Dev Biol. 1996; 174:125-39

Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV.

VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro.

Mol Biol Cell. 1995; 6:911-27

Montell C, Rubin GM

Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction.

Neuron. 1989; 2:1313-23

Morgan JE, Pagel CN, Sherratt T, Partridge TA.

Long-term and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice.

J Neurol Sci. 1993; 115:191-200

Morton ME, Froehner SC.

The alpha 1 and alpha 2 polypeptides of the dihydropyridine-sensitive calcium channel differ in developmental expression and tissue distribution.

Neuron. 1989 ; 2:1499-506

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K.

VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:10339-43

N

Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L, Stefani E.

Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel.

Science. 1993 ; 262:575-8

Neuhuber B, Gerster U, Doring F, Glossmann H, Tanabe T, Flucher BE.

Association of calcium channel alpha1S and beta1a subunits is required for the targeting of beta1a but not of alpha1S into skeletal muscle triads.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:5015-20

O

Olcese R, Neely A, Qin N, Wei X, Birnbaumer L, Stefani E.

Coupling between charge movement and pore opening in vertebrate neuronal alpha 1E calcium channels.

J Physiol. 1996; 497:675-86

Ogi M, Yokomori H, Inao M, Oda M, Ishii H.

Hepatic stellate cells express Ca²⁺ pump-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in plasma

membrane of caveolae.

J Gastroenterol. 2000; 35:912-8

P

Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW.

A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma.

Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80:1008-12.

Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E.

Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation.

J Cell Biol. 1997; 136:137-54

Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E.

Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation.

J Cell Biol. 1997; 136:137-54

Partridge TA.

Myoblast transfer - a possible therapy for inherited myopathies.

Muscle Nerve. 1991; 14:197-212

Pawson T, Scott JD.

Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.

Science. 1997; 278:2075-80

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A.

Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER.

Nat. Cell Biol. 2001; 3:473-83

Perez-Reyes E, Schneider T.

Molecular biology of calcium channels.

Kidney Int. 1995; 48:1111-24

Perez-Reyes E.

Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels.

Physiol Rev. 2003 ; 83:117-61

Perry SV.

Calcium ions and the function of the contractile proteins of muscle.

Biochem Soc Symp. 1974; 39:115-32

Pette D, Staron RS.

Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers.

Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1990;116:1-76

Pietrobon D, Prod'hom B, Hess P.

Interactions of protons with single open L-type calcium channels. pH dependence of proton-induced current fluctuations with Cs⁺, K⁺, and Na⁺ as permeant ions.

J Gen Physiol. 1989; 94:1-21

Phillips GD, Hoffmann JR, Knighton DR.

Migration of myogenic cell in the rat *extensor digitorum longus* muscle studied with a split autograft model.

Cell Tissue Res. 1990; 262:81-88

Popescu LM, Diclescu I, Zelck U, Ionescu N.

Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study.

Cell Tissue Res. 1974; 154:357-78

Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ.

Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle.

J Cell Biol. 1992; 117:997-1005

Potten CS, Loeffler M.

Stem Cells : attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties.

Development. 1990; 110:1001 -1012

Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG.

Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene.

J Biol Chem. 1992; 267:22967-72

Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP.

Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit.

Nature. 1994 ; 368:67-70

R

Rahkila P, Takala TE, Parton RG, Metsikko K.

Protein targeting to the plasma membrane of adult skeletal muscle fiber: an organized mosaic of functional domains.

Exp Cell Res. 2001 ; 267:61-72

Ralston E, Ploug T.

Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers.

Exp Cell Res. 1999 ; 246:510-5

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP.

Caveolae: from cell biology to animal physiology.

Pharmacol Rev. 2002; 54:431-67

Rieger F, Pincon-Raymond M, Tassin AM, Garcia L, Romey G, Fosset M, Lazdunski M.

Excitation-contraction uncoupling in the developing skeletal muscle of the muscular dysgenesis mouse embryo.

Biochimie. 1987 ; 69:411-7

- Rios E, Pizarro G.
Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle.
Physiol Rev. 1991; 71:849-908
- Rios E, Pizarro G, Stefani E.
Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling.
Annu Rev Physiol. 1992; 54:109-33
- Rios E, Brum G.
Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle.
Nature. 1987; 325:717-20
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG.
Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.
Cell. 1992; 68:673-82
- Romey G, Garcia L, Dimitriadou V, Pincon-Raymond M, Rieger F, Lazdunski M.
Ontogenesis and localization of Ca²⁺ channels in mammalian skeletal muscle in culture and role in excitation-contraction coupling.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86:2933-7

S

- Sadeh M, Czyzewski K, Stem LZ.
Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections.
J Neurol Sci. 1985; 67: 229-38
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP.
Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells.
J Cell Biol. 1993; 122:789-807
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP.
Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:9407-11
- Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF.
Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles.
J Cell Biol. 1994; 127:1233-43
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP.
Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:131-5
- Scherer PE, Lisanti MP.
Association of phosphofructokinase-M with caveolin-3 in differentiated skeletal myotubes. Dynamic regulation by extracellular glucose and intracellular metabolites.

J Biol Chem. 1997; 272:20698-705

Schlegel A, Lisanti MP.

A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo.

J Biol Chem. 2000 ; 275:21605-17

Schneider MF, Chandler WK.

Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling.

Nature. 1973; 242:244-6

Schnitzer JE, Liu J, Oh P.

Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases.

J Biol Chem. 1995; 270:14399-404

Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM.

Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28;92(5):1759-63.

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F.

Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel.

Neuron. 1996; 16:1159-67

Sheridan DC, Carbonneau L, Ahern CA, Nataraj P, Coronado R.

Ca²⁺-dependent excitation-contraction coupling triggered by the heterologous cardiac/brain DHPR beta2a-subunit in skeletal myotubes.

Biophys J. 2003 ; 85:3739-57

Shimahara T, Bournaud R.

Barium currents in developing skeletal muscle cells of normal and mutant mice fetuses with 'muscular dysgenesis'.

Cell Calcium. 1991; 12:727-33

Simionescu M, Gafencu A, Antohe F.

Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey.

Microsc Res Tech. 2002; 57:269-88

Singer SJ, Nicolson GL.

The structure and chemistry of mammalian cell membranes.

Am J Pathol. 1971; 65:427-37

Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP.

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. 1996; 271:15160-5

Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP.

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. 2000; 275:38048-58

Strube C, Beurg M, Powers PA, Gregg RG, Coronado R.

Reduced Ca²⁺ current, charge movement, and absence of Ca²⁺ transients in skeletal muscle deficient in dihydropyridine receptor beta 1 subunit.

Biophys J. 1996 ; 71:2531-43

Strube C, Tourneur Y, Ojeda C.

Functional expression of the L-type calcium channel in mice skeletal muscle during prenatal myogenesis.

Biophys J. 2000; 78:1282-92

Sueyoshi T, McMullen BA, Marnell LL, Du Clos TW, Kisiel W.

A new procedure for the separation of protein Z, prothrombin fragment 1.2 and calreticulin from human plasma.

Thromb Res. 1991 ; 63:569-75

Sugi H, Suzuki S, Daimon T.

Intracellular calcium translocation during contraction in vertebrate and invertebrate smooth muscles as studied by the pyroantimonate method.

Can J Physiol Pharmacol. 1982; 60:576-87

Szentesi P, Collet C, Sarkozi S, Szegedi C, Jona I, Jacquemond V, Kovacs L, Csernoch L.

Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers.

J Gen Physiol. 2001; 118:355-75

T

Tachibana T, Nawa T, Mizuhira V, Yoshida Y.

Ultrastructural localization of calcium in mechanoreceptors of the oral mucosa.

J Neurocytol. 1992; 21:745-53

Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A.

Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters

J. Cell Biol. 2005;170:769-79

Takekura H, Flucher BE, Franzini-Armstrong C.

Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle.

Dev Biol. 2001; 239:204-14

Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S.

Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle

by dihydropyridine receptor complementary DNA.

Nature. 1988; 336:134-9

Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP.

Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle.

J Biol Chem. 1996; 271:2255-61

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE.

HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells.

Dev Dyn 1998; 194:114-128

Tiwari-Woodruff SK, Schulteis CT, Mock AF, Papazian DM.

Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K⁺ channel subunits.

Biophys J. 1997; 72:1489-500

Tortelote GG, Valverde RH, Lemos T, Guilherme A, Einicker-Lamas M, Vieyra A.

The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae.

FEBS Lett. 2004; 8:31-5

V

Varadi G, Orlowski J, Schwartz A.

Developmental regulation of expression of the alpha 1 and alpha 2 subunits mRNAs of the voltage-dependent calcium channel in a differentiating myogenic cell line.

FEBS Lett. 1989; 250:515-8.

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC.

Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle.

Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain.

J Biol Chem. 1997; 272:28187-90

Vracko R, Benedict EP.

Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement.

J Cell Biol. 1972; 55:406-419

W

Walker D, De Waard M.

Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function.

Trends Neurosci. 1998 ; 21:148-54

Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, Stauderman KA.

Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium

channel.

J Neurochem. 1999; 72:791-9

Y

Yamada KM, Geiger B.

Molecular interactions in cell adhesion complexes.

Curr Opin Cell Biol. 1997;9:76-85

Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW.

Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels.

Nature. 1993; 366:158-61

Yuan SH, Arnold W, Jorgensen AO.

Biogenesis of transverse tubules and triads: immunolocalization of the 1,4-dihydropyridine receptor, TS28, and the ryanodine receptor in rabbit skeletal muscle developing in situ.

J Cell Biol. 1991; 112:289-301.

Yunker AM, McEnery MW.

Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review.

J Bioenerg Biomembr. 2003 ; 35:533-75

Z

Walker D, De Waard M.

Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function.

Trends Neurosci. 1998 ; 21:148-54

Watt DJ, Karasinski J, Moss J, England MA.

Migration of muscle cells.

Nature. 1994; 368:406-407

Williams TM, Lisanti MP.

The Caveolin genes: from cell biology to medicine.

Ann Med. 2004; 36:584-95

White TK, Zhu Q, Tanzer ML.

Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading.

J Biol Chem. 1995; 270:15926-9

Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells

Harold Couchoux, Bruno Allard, Claude Legrand, Vincent Jacquemond and Christine Berthier

Abstract : Caveolins are membrane scaffolding proteins that associate with and regulate a variety of signalling proteins, including ion channels. A deficiency in caveolin-3 (Cav-3), the major striated muscle isoform, is responsible for skeletal muscle disorders, such as limb-girdle muscular dystrophy 1C (LGMD 1C). The molecular mechanisms leading to the muscle wasting that characterizes this pathology are poorly understood. Here we show that a loss of Cav-3 induced by the expression of the LGMD 1C-associated mutant P104L (Cav-3^{P104L}) provokes a reduction by half of the maximal conductance of the voltage-dependent L-type Ca²⁺ channel in mouse primary cultured myotubes and fetal skeletal muscle fibres. Confocal immunomicroscopy indicated a colocalization of Cav-3 and Ca_v1.1, the pore-forming subunit of the L-type Ca²⁺ channel, at the surface membrane and in the developing T-tubule network in control myotubes and fetal fibres. In myotubes expressing Cav-3^{P104L}, the loss of Cav-3 was accompanied by a 66% reduction in Ca_v1.1 mean labelling intensity. Our results suggest that Cav-3 is involved in L-type Ca²⁺ channel membrane function and localization in skeletal muscle cells and that an alteration of L-type Ca²⁺ channels could be involved in the physiopathological mechanisms of caveolinopathies.

DOI : <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124198>

HAL (Open Archive portal) : <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00149140/fr/>

Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and depletion fail to affect sarcolemmal ion channel activity in mouse skeletal muscle

Bruno Allard, Harold Couchoux, Sandrine Pouvreau and Vincent Jacquemond

Abstract : In skeletal muscle, sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} depletion is suspected to trigger a calcium entry across the plasma membrane and recent studies also suggest that the opening of channels spontaneously active at rest and possibly involved in Duchenne dystrophy may be regulated by SR Ca^{2+} depletion. Here we simultaneously used the cell-attached and whole-cell voltage-clamp techniques as well as intracellular Ca^{2+} measurements on single isolated mouse skeletal muscle fibres to unravel any possible change in membrane conductance that would depend upon SR Ca^{2+} release and/or SR Ca^{2+} depletion. Delayed rectifier K^{+} single channel activity was routinely detected during whole-cell depolarizing pulses. In addition the activity of channels carrying unitary inward currents of ~ 1.5 pA at -80 mV was detected in 17 out of 127 and in 21 out of 59 patches in control and *mdx* dystrophic fibres, respectively. In both populations of fibres, large whole-cell depolarizing pulses did not reproducibly increase this channel activity. This was also true when, repeated application of the whole-cell pulses led to exhaustion of the Ca^{2+} transient. SR Ca^{2+} depletion produced by the SR Ca^{2+} pump inhibitor cyclopiazonic acid (CPA) also failed to induce any increase in the resting whole-cell conductance and in the inward single channel activity. Overall results indicate that voltage-activated SR Ca^{2+} release and/or SR Ca^{2+} depletion are not sufficient to activate the opening of channels carrying inward currents at negative voltages and challenge the physiological relevance of a store-operated membrane conductance in adult skeletal muscle.

DOI : <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112367>

Interactions fonctionnelles et moléculaires de la cavéoline-3 et du canal calcique de type L dans les cellules musculaires squelettiques

Harold Couchoux

La cavéoline (Cav) est une protéine dite « de scaffolding » présente dans les cavéoles. La Cav-3, isoforme majeure du muscle strié, aurait un rôle dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique. Notre but était de caractériser les interactions entre la Cav-3 et le canal calcique voltage-dépendant de type L. Nous avons tout d'abord étudié les conséquences d'une déficience en Cav-3 suite à l'expression du mutant pathologique Cav-3^{P104L}. Nos résultats indiquent que l'expression de Cav-3^{P104L} i) réduit spécifiquement la conductance des canaux de type L dans des myotubes squelettiques primaires, des fibres fœtales en survie et adultes, ii) entraîne une réduction significative de l'expression membranaire du canal de type L. De plus, nous avons montré que la Cav-3 et le canal de type L sont colocalisés à la membrane plasmique et dans des extraits musculaires. Enfin, des expériences d'interaction *in vitro* suggèrent une interaction moléculaire directe entre ces deux protéines.

Functional and molecular interactions of caveolin-3 with the L-type voltage-gated calcium channel in skeletal muscle cells

Caveolin (Cav) is a scaffolding protein found in caveolae. It has been suggested that Cav-3, the major striated muscle isoform, is involved in skeletal muscle calcium homeostasis. Our goal was to characterize the interactions of Cav-3 with the L-type voltage-gated calcium channel. We first investigated the consequences of Cav-3 deficiency consecutive to the expression of the myopathy-associated mutant Cav-3^{P104L}. Our results indicate that Cav-3^{P104L} expression i) specifically reduces the maximal conductance of the L-type calcium channel in mouse primary cultured skeletal myotubes as well as in foetal and adult skeletal fibers, and ii) leads to a significant reduction of the L-type calcium channel membrane expression. Moreover, we showed that both Cav-3 and the L-type calcium channel colocalize at the surface membrane and in muscle extracts. Finally, *in vitro* binding experiments strongly suggested a direct molecular interaction between Cav-3 and the L-type calcium channel.

DISCIPLINE : Physiologie cellulaire

MOTS-CLES : cavéoline, muscle squelettique, myopathie, calcium, canal calcique de type L

KEYWORDS : caveolin, skeletal muscle, myopathy, calcium, L-type calcium channel

Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire
UMR 5123 CNRS
Université Claude Bernard Lyon 1
43 bd du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne cedex