



HAL
open science

Fonctions des triadines dans le muscle squelettique. Caractérisation de l'isoforme Trisk 32.

Sarah Oddoux

► **To cite this version:**

Sarah Oddoux. Fonctions des triadines dans le muscle squelettique. Caractérisation de l'isoforme Trisk 32.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00443078

HAL Id: tel-00443078

<https://theses.hal.science/tel-00443078>

Submitted on 28 Dec 2009

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I
ECOLE DOCTORALE CHIMIE SCIENCES DU VIVANT

Thèse

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Discipline : Neurosciences et Neurobiologie

Présentée par

Sarah ODDOUX

Fonctions des triadines dans le muscle squelettique.
Caractérisation de l'isoforme Trisk 32.

Thèse dirigée par Isabelle MARTY

Soutenue le 23 octobre 2009 devant le jury composé de :

Président : Pr. Joël Lunardi
Rapporteurs : Pr. Bruno Allard
Dr. Alain Lacampagne
Examineurs : Dr. Léonard Féasson
Pr. Claude Feuerstein
Dr. Isabelle Marty

Thèse réalisée au sein de l'équipe Muscle et Pathologies dirigée par
Isabelle Marty

INSERM U836 - Grenoble Institut des Neurosciences



Tout d'abord, merci beaucoup à Isabelle Marty pour ces cinq années de manips, de science, de congrès, de formations. Je n'aurais pas pu imaginer de meilleures conditions de travail et meilleur encadrement. Merci pour ta rigueur scientifique, ta disponibilité à toute épreuve et ta bienveillance, le tout dans une bonne humeur agrémentée d'une pointe de chocolat et d'une touche de rhum.

Ensuite, il est incontestable que ce travail n'aurait pas été ce qu'il est sans la participation de toute l'équipe. Merci mille fois, donc, à Joël Lunardi et à Julien Fauré pour leur rigueur scientifique et la perspicacité de leurs questions. Merci à Anne Fourest-Lieuvin pour ses conseils avisés, pour son aide et son écoute. J'ai adoré nos longues discussions. Merci à Julie Brocard, indispensable (ou essentielle, peut-être les deux), dont le travail sous-tend ma thèse. Merci à Stéphane Vassilopoulos qui m'a beaucoup appris et à Didier Grunwald pour m'avoir fait découvrir la voie artistique tapie derrière nos belles images.

Marine Cacheux, ma super coloc de bureau, merci pour tes marinades et nos VDMs. Bien sûr, ce fût un plaisir de travailler avec toi, trop facile, trop souriante, trop de bonne humeur! Merci également à Claude Feuerstein qui dirige notre institut tout beau tout neuf. Merci beaucoup à Norbert Weiss pour ses explications calciques et à Florence Appaix pour son sauvetage mitochondrial.

Je remercie Karine Pernet-Gallay qui m'a formé attentivement et scrupuleusement à la microscopie électronique, j'y ai pris plaisir. Merci à Mélina Pétrel pour son acharnement à faire des marquages compliqués. Merci à Annie Schweitzer et son aide considérable pour notre souris amputée de ses triadines, et merci à Jacques Brocard pour en avoir dessiné la construction.

Ce travail a été enrichi par nos collaborateurs, qui m'ont accueilli au sein de leur équipe, pour un jour ou pour un mois.

Merci donc à Laszlo Csernoch, qui m'a accueilli dans son laboratoire, à Peter Szentesi avec qui ce fût un plaisir de travailler. Merci à Rosa, discrète, essentielle, passionnée, à qui je dois beaucoup. Et merci aux quatre Janos qui ont été là pour moi.

Merci aussi à David Bendahan et à Benoît Giancesini pour les démonstrations de RMN et pour les longues explications qui vont avec!

Merci à Sandrine Pouvreau qui m'a enseignée l'art et la manière de dissocier les fibres.

Un grand merci à Agnès Belly et Gaëlle Lachenal pour leurs pattounettes du lundi, mais aussi pour tous les moments passés à faire des pauses au chocolat.

Merci à Yasmina de m'avoir prise sous son aile à Mifobio, merci à Toff pour nos discussions inter-couloirs, intra-escaliers, et pour tes divers conseils accompagnés de ta motivation contagieuse.

Je remercie tous mes amis non scientifiques parce qu'ils sont précieux et que leurs présences sont essentielles. Je pense qu'ils en savent beaucoup plus sur la triadine qu'ils ne l'auraient voulu.... Merci pour votre patience face à la science!

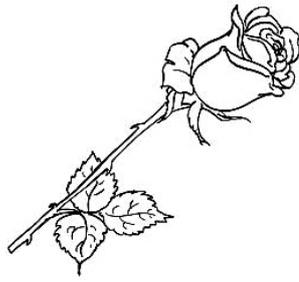
Je remercie ma famille, pour qui la triade n'est pas une structure musculaire de relâchement de calcium, mais restera toujours une structure chinoise de relâchement de drogue... Je vous promets, je passe ma thèse d'abord et après j'essaie d'arrêter les choix cornélio-psycho-prise de tête (j'ai bien dit j'essaie....).

Merci Kinou, pour notre binôme jnm, tu es aussi géniale à la paillasse, en DEEEEEEB, que dans la vie. Une ligne ce n'est pas assez, mais je ne voudrais pas lasser mes lecteurs dès la première page.

Brice, ce que tu es et ce que tu m'apportes ne peut pas être contenu dans un merci. Mais, universitairement et « vitalement » parlant, je peux te dire mille fois merci pour m'avoir écoutée, supportée, soutenue, logée, nourrie, blanchie, pendant ces 2 mois de rédaction, et le tout sans râler.

Merci beaucoup à Bruno et Laurence pour votre accueil d'une gentillesse et d'une générosité rares et un grand merci pour les conditions de travail idéales que vous m'avez offertes.

Et bien sûr, merci à l'AFM, sans qui rien n'aurait été possible.



Résumé:

La triadine est une famille de protéines du muscle squelettique. Quatre isoformes de la triadine ont été clonées: Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32. Ce sont des protéines transmembranaires du reticulum sarcoplasmique (RS). Trisk 95 et Trisk 51 sont localisées dans la triade où elles sont associées au récepteur de la ryanodine (RyR), un canal calcique. Trisk 49 et Trisk 32 sont localisées dans le RS longitudinal. Il a été montré que Trisk 95 régule les relâchements de Ca^{2+} du RyR. L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les fonctions des triadines dans le muscle squelettique grâce à différentes approches et techniques complémentaires. Dans un premier temps, Trisk 95 et de Trisk 51 ont été étudiées par surexpression *in vivo* dans les muscles de souris. La caractérisation de ces muscles a permis de mettre en évidence l'association du RyR avec la cavéoline, une protéine de la membrane plasmique. Dans un second temps, la fonction de Trisk 32 a été étudiée dans le muscle squelettique. L'étude précise de sa localisation a permis de montrer qu'elle est localisée dans la triade, dans le RS longitudinal, et à proximité des mitochondries. Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé qu'elle est associée avec le RyR et avec le récepteur de l' IP_3 . De par ses partenaires, Trisk 32 semble jouer un rôle dans la régulation de nombreux mécanismes impliquant le Ca^{2+} . Enfin, le gène de la triadine a été invalidé chez la souris. Cette souris KO triadine présente une faiblesse musculaire et des défauts dans l'ultrastructure de la triade. Ces résultats indiquent qu'en plus de sa fonction de régulation des relâchements de Ca^{2+} la triadine pourrait avoir un rôle structural.

Mots clefs: calséquestrine, cavéoline, complexe de relâchement du calcium, couplage excitation-contraction, muscle cardiaque, muscle squelettique, récepteur de l' IP_3 , récepteur de la ryanodine, reticulum sarcoplasmique, souris KO, triade, triadine, tubule-transverse.

Abstract:

Triadin is a protein of the skeletal muscle. Four isoforms have been cloned: Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49, and Trisk 32. They are transmembrane proteins of the sarcoplasmic reticulum (SR). Trisk 95 and Trisk 51 are in the triad junction where they are associated with a calcium release channel, the ryanodine receptor (RyR). Trisk 49 and Trisk 32 are localised in the longitudinal SR. It has been shown that Trisk 95 is able to regulate RyR Ca^{2+} releases. The aim of this work was to study triadins functions in the skeletal muscle with different and complementary approaches. In the first part of this work, Trisk 95 and Trisk 51 were over-expressed *in vivo* in mouse muscles. These muscles were then characterised and the results showed an association between RyR and caveolin-3, a protein of the plasma membrane. The second part of this work is related to the study of Trisk 32. I studied more precisely the localisation of Trisk 32 and showed that it is localised in the triad, in the longitudinal SR, and close to mitochondria. Co-immunoprecipitation experiments highlighted new partners for Trisk 32 such as RyR and the IP_3 receptor, another calcium channel of the SR. Thanks to its partners, it can be assumed that Trisk 32 is involved in the regulation of many Ca^{2+} dependent processes. At least, triadin gene has been knocked out in mouse. This mouse model clearly presents an obvious muscle weakness. The muscle presented ultrastructural disorders. These results suggest that in addition to its function as a Ca^{2+} release channel regulator, triadin could have a scaffolding function.

Key words: calcium release complex, calsequestrin, cardiac muscle, caveolin, excitation-contraction coupling, IP_3 receptor, KO mouse, ryanodine receptor, sarcoplasmic reticulum, skeletal muscle, transverse tubule, triad, triadin.

Intitulé du laboratoire:
Grenoble Institut des Neurosciences
INSERM U836 / Equipe 4 Muscle et Pathologies
UJF Site Santé
BP170
38042 Grenoble Cedex 9
France

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
I. Structure du muscle squelettique	19
A. Organisation de l'appareil contractile	19
1. Du muscle au sarcomère	19
2. Organisation et fonctionnement du sarcomère	20
B. Organisation des membranes: le reticulum sarcoplasmique et la triade	23
II. Le couplage excitation-contraction et l'homéostasie calcique	25
A. Notion de couplage excitation-contraction et complexe de relâchement du Ca^{2+}	25
B. Le complexe de relâchement du Ca^{2+}	26
1. Le DHPR	27
2. Le RyR	30
a. Les isoformes et la topographie	30
b. Activation de la libération de Ca^{2+}	32
c. Les pathologies génétiques associées au RyR	33
3. La triadine	34
a. Le gène de la triadine	34
b. Les isoformes cardiaques et squelettiques	35
c. Localisations et partenaires	36
d. Fonctions	37
4. La junctine	39
5. La calséquestrine	41
6. FKBP12	44
C. Autres mécanismes de l'homéostasie calcique	45
1. Le récepteur de l' IP_3	45
2. Le dialogue calcique entre le RS et les mitochondries	47
3. L'entrée capacitive	49
D. Le métabolisme du muscle au cours de la contraction	50
III. La formation des triades	53
A. La cavéoline-3	53
B. La formation des triades et l'association des mitochondries	54
IV. Objectifs de ce travail	57
MATERIEL & METHODES	59
I. Matériel	61
A. Anticorps	61
B. Virus	62
C. Cellules	62
1. Culture primaire de cellules satellites	62
2. Culture de lignées cellulaires: la lignée L6	62
II. Méthodes	63
A. Surexpression de protéines par infection virale	63
1. Infections de cellules en cultures	63
2. Infection de muscle <i>in vivo</i>	64
B. Coloration histologique à l'hématoxyline-éosine	64
C. Marquage immunofluorescent	65
1. Prélèvement et inclusion des muscles	65
2. Préparation de fibres dissociées	65
3. Marquage immunofluorescent	66
D. Microscopie électronique à transmission	66
1. Microscopie classique	67
a. Préparation de grilles pour l'ultramicrotomie	67
b. Coloration des compartiments en communication avec le milieu extracellulaire	67

c.	Immunomarquage à l'or en préinclusion	68
d.	Inclusion des tissus en résine	68
e.	Coupe et coloration	69
2.	Cryométhode	69
a.	Congélation des tissus	69
b.	Coupe des tissus congelés à l'ultramicrotome	69
c.	Immunomarquage à l'or	70
E.	Préparation d'échantillons pour la biochimie	70
1.	Lyse de cellule	70
2.	Homogénat total de tissu musculaire	71
3.	Préparation de microsomes	71
4.	Dosage de protéines par la méthode de Folin Lowry	71
F.	Co-immunoprécipitation	72
1.	Co-immunoprécipitation sur billes de sépharose-4B	72
2.	Co-immunoprécipitation sur billes magnétiques pour la spectrométrie de masse	73
G.	Western Blot	74
H.	Souris invalidée pour le gène de la triadine	75
1.	Construction de la souris KO triadine	75
2.	Génotypage par PCR	75
I.	Mesure de force musculaire	76
1.	Mesure de force <i>in vivo</i>	76
a.	Test d'agrippement	76
b.	Spéctrométrie-RMN	76
i.	Préparation des animaux	76
ii.	Protocole de stimulation de la patte et mesure de force	77
iii.	Acquisition des images RMN et traitement	77
2.	Mesure de force sur muscle isolé	78

RESULTATS **79**

Partie I : Etude de la surexpression <i>in vivo</i> de Trisk 95 et de Trisk 51	83	
A.	Infection de muscles de souris	85
B.	Surexpression de la triadine et niveau d'expression des protéines du RS	85
C.	Localisation des protéines du complexe de relâchement du Ca ²⁺ dans les fibres infectées	86
D.	Etude histologique des fibres surexprimant la triadine	88
E.	Morphologie cellulaire	89
F.	Interaction des protéines du complexe de relâchement du Ca ²⁺ avec la cavéoline-3	91
G.	Discussion	96
Partie II : Caractérisation de Trisk 32	99	
A.	Expression de Trisk 32 au cours du développement	101
B.	Localisation de Trisk 32 dans les muscles striés	103
1.	Localisation de Trisk 32 par rapport aux canaux calciques du RS	103
2.	Localisation de Trisk 32 par rapport aux mitochondries	105
C.	Les partenaires de Trisk 32	108
1.	Association de Trisk 32 avec les canaux calciques du RS	108
2.	Recherche de partenaires de Trisk 32 par spectrométrie de masse	110
D.	Etude de la régulation des canaux calciques du RS par Trisk 32	112
1.	Surexpression de Trisk 32 dans des cultures primaires de myoblastes en vue de l'étude de la régulation du RyR par Trisk 32	112
2.	Etude de la régulation de l'IP ₃ R par Trisk 32	113
E.	Discussion	115
1.	Les partenaires de Trisk 32	115
2.	Deux complexes de relâchement du Ca ²⁺	116
3.	Trisk 32 et l'IP ₃ R-III : une implication de Trisk 32 dans le développement musculaire?	118
4.	Trisk 32 et les mitochondries	119
Partie III : Etude fonctionnelle des triadines	123	
A.	Validations moléculaires et biochimiques de la souris KO triadine	125
B.	Expression des protéines du complexe de relâchement du Ca ²⁺	126
C.	Localisation des protéines du complexe de relâchement du Ca ²⁺	127
D.	Etude ultrastructurale	129

E.	Etudes physiologiques _____	131
1.	Mesure de force globale _____	132
2.	Mesure de force du gastrocnémien _____	132
3.	Distinction entre muscle lent et muscle rapide _____	133
4.	Etude anatomique et métabolique par IRM _____	135
F.	Discussion _____	138
1.	Expression du complexe de relâchement du Ca ²⁺ à la triade et organisation du muscle KO triadine : un rôle structural de la triadine _____	138
2.	Le paradoxe des muscles KO triadine: faiblesse musculaire et résistance à la fatigue _____	141
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES _____		143
ANNEXES _____		149
Manuscrit I : Caveolin-3 is associated with the calcium release complex and is modified under <i>in vivo</i> triadin modification _____		151
Manuscrit II : Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function _____		153
LITTERATURE _____		156

LISTE DES ABBREVIATIONS

4-CmC : 4-chloro-méta-crésol	KO : knock-out
aa : acide aminé	MAPK : mitogen activated protein kinase
Ach : acétylcholine	MG23 : mitsugumine 23
actine F : actine filamenteuse	MmD : multi minicore disease
actine G : actine globulaire	Mn²⁺ : manganèse
ADN : acide désoxyribonucléique	MOI : multiplicity of infection
ADNc : ADN complémentaire	MTOC : microtubule organization center
ADP : adénosine diphosphate	N-ter : N-terminal
AID : α interaction domain	OMM : membrane mitochondriale externe
AMP : adénosine monophosphate	pb : paires de bases
ARN/RNA : adéno-ribonucléique	PBS : phosphate buffer saline
ARNm : ARN messenger	PCr : phosphocréatine
Asph : aspartate β -hydroxylase	PCR : réaction de polymérisation en chaîne
ATP : adénosine triphosphate	PI : pré-immun
BID : β interaction domain	Pi : phosphate inorganique
Ca²⁺ : calcium	PIP₂ : phosphatidyl inositol bisphosphate
cADP-ribose : ADP ribose cyclique	PFA : paraformaldéhyde
cAMP/AMPC : AMP cyclique	pH : potentiel Hydrométrique
CaUP : calcium uniporteur	pHi : potentiel Hydrométrique intracellulaire
cav-3 : cavéoline-3	PLC : phospholipase C
CCD : central core disease	PMSF : fluorure de phenylméthanesulfonyle
CICR : calcium induced calcium release	PS : pénicilline – streptomycine
CK : créatine kinase	RE : reticulum endoplasmique
CMV : cytomégalovirus	RMN : résonance magnétique nucléaire
co-IP : co-immunoprécipitation	RNAi : ARN interférent
couplage-EC : couplage excitation-contraction	ROS : reactive oxygen species
CRC : complexe de relâchement du calcium	rpm : rotations par minute
CREB : cAMP response element binding	RS : reticulum sarcoplasmique
CSQ : calséquestrine	RyR : récepteur de la ryanodine
CT : cardiac triadin	SDS : sodium dodécyl sulfate
C-ter : C-terminal	SERCA : sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase
CRU : calcium release unit	shRNA : small hairpin RNA
DAG : diacylglycérol	siRNA : small interfering RNA
DFP : diisopropylfluorophosphate	SRp38 : serine rich protein 38
DHPR : récepteur des dihydropyridines	TnC : troponine C
DO : densité optique	TnI : troponine I
EDL : extensor digitorum longus	TnT : troponine T
FDB : flexor digitorum brevis	tubule-T : tubule transverse
GFP : green fluorescent protein	Trisk : triadin skeletal
HM : hyperthermie maligne	VICR : voltage induced calcium release
IF : immunofluorescence	TRPC : transient receptor potential cation channel
IMM : membrane mitochondriale interne	TVPC : tachycardie ventriculaire polymorphique catécholaminergique
IP : immunoprécipitation	WB : Western blot
IP₃ : inositol 1,4,5 trisphosphate	WT : wild type
IP₃R-III : récepteur de l'IP ₃ type III	
jnm : jonction neuro-musculaire	
JP1 : junctophiline 1	
K₃FeCN₆ : ferrocyanure de potassium	
KCl : chlorure de potassium	
kDa : kilo Dalton	

INTRODUCTION



I. Structure du muscle squelettique

A. Organisation de l'appareil contractile

1. Du muscle au sarcomère

Les muscles squelettiques sont fixés sur le squelette osseux par leurs deux extrémités myotendineuses (Figure 1). Chaque muscle est composé de faisceaux de fibres musculaires, les cellules musculaires, qui s'étendent d'une extrémité à l'autre du muscle. Les cellules musculaires sont entourées d'une gaine conjonctive, l'endomysium. Elles sont rassemblées en plusieurs faisceaux enrobés d'une enveloppe commune à toutes les fibres: le périmysium. Il y a plusieurs faisceaux par muscle, compactés à l'intérieur d'une enveloppe aponévrotique: l'épimysium. Le muscle est également entouré de fascias. Aux deux extrémités du muscle, le fascia fusionne avec l'endomysium qui entoure chaque cellule et forme les fibres tendineuses qui se rassemblent ensuite en tendons.

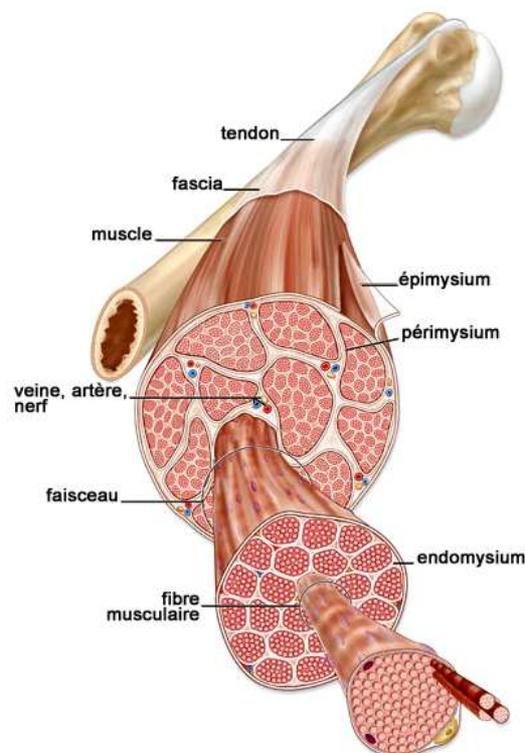


Figure 1: Organisation du muscle squelettique. Schéma adapté du site <http://academic.kellogg.cc.mi.us/>

2. Organisation et fonctionnement du sarcomère

Le cytoplasme des cellules musculaires (ou sarcoplasme) est occupé à 85%-90% par les myofibrilles, composées de sarcomères, les sous-unités contractiles du muscle (Figure 2 A). Les sarcomères sont des assemblages de filaments d'actomyosine. En microscopie électronique, ces filaments apparaissent sous forme d'une alternance de bandes claires (bandes I: isotropes) et de bandes sombres (bandes A: anisotropes) (Figure 2 B). Un sarcomère est composé d'une bande A et de deux demies bandes I, séparées en leur centre par la ligne Z. Les bandes A sont composées de filaments épais de myosine qui chevauchent les filaments fins d'actine. Les bandes I sont dépourvues de myosine et sont composées des filaments fins d'actine.

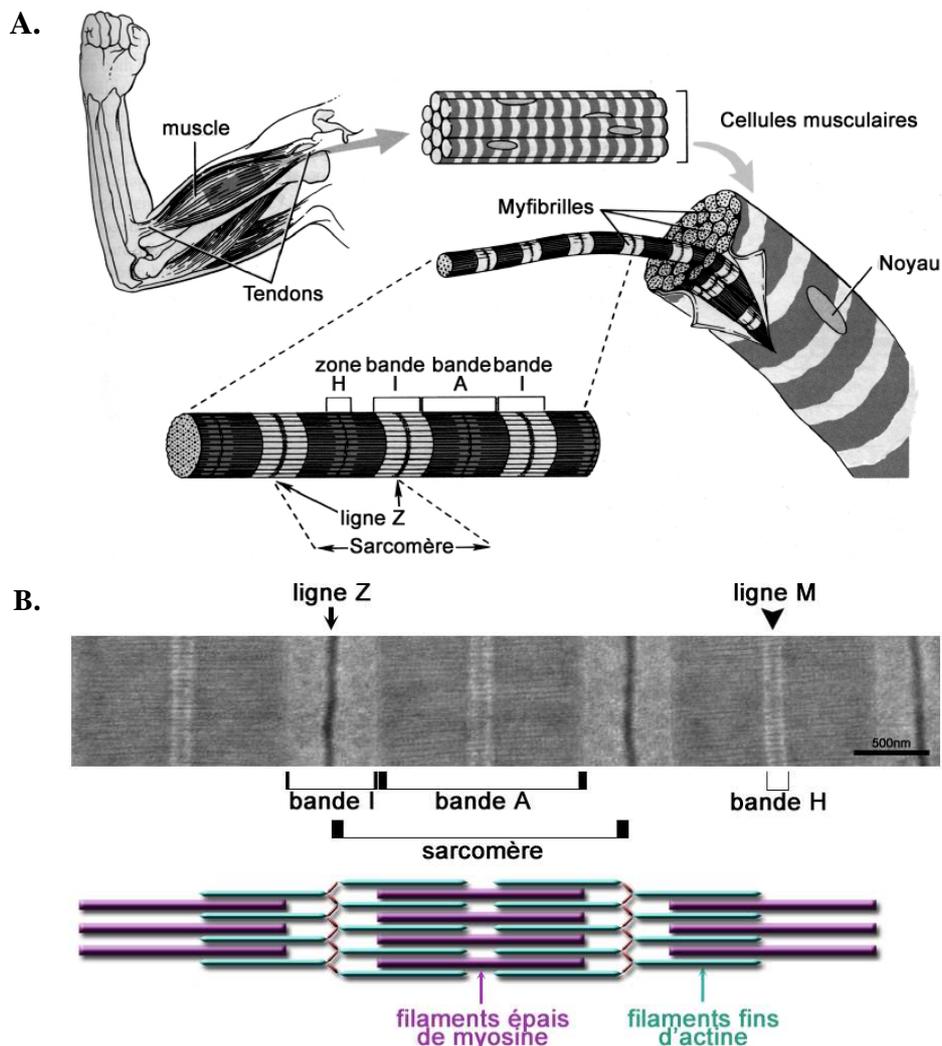


Figure 2: La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile. A. La fonction de contraction du muscle est réalisée par les myofibrilles, l'appareil contractile des cellules musculaires, composées d'une succession de sarcomères. *Adaptation de Goll et al., 2008*. B. Trois sarcomères d'une myofibrille de muscle squelettique de souris en coupe longitudinale observés au microscope électronique. Les filaments épais de la bande A sont constitués de myosine, les filaments fins de la bande I, d'actine.

La myosine de la bande A est composée d'une chaîne légère en forme de bâtonnet flexible et de la queue de la chaîne lourde de myosine qui porte les têtes de myosine (Figure 3, en violet). La bande H correspond à la région où les filaments épais de myosine ne chevauchent pas les filaments fins d'actine.

Au milieu de la bande H se trouve la ligne M, qui apparaît sous forme de trois à cinq lignes en fonction du type de fibre. La bande M est composée, entre autres, de myoméline (Figure 3, en jaune) et de protéine M (Figure 3, en vert), qui stabilisent la myosine en connectant les filaments entre eux.

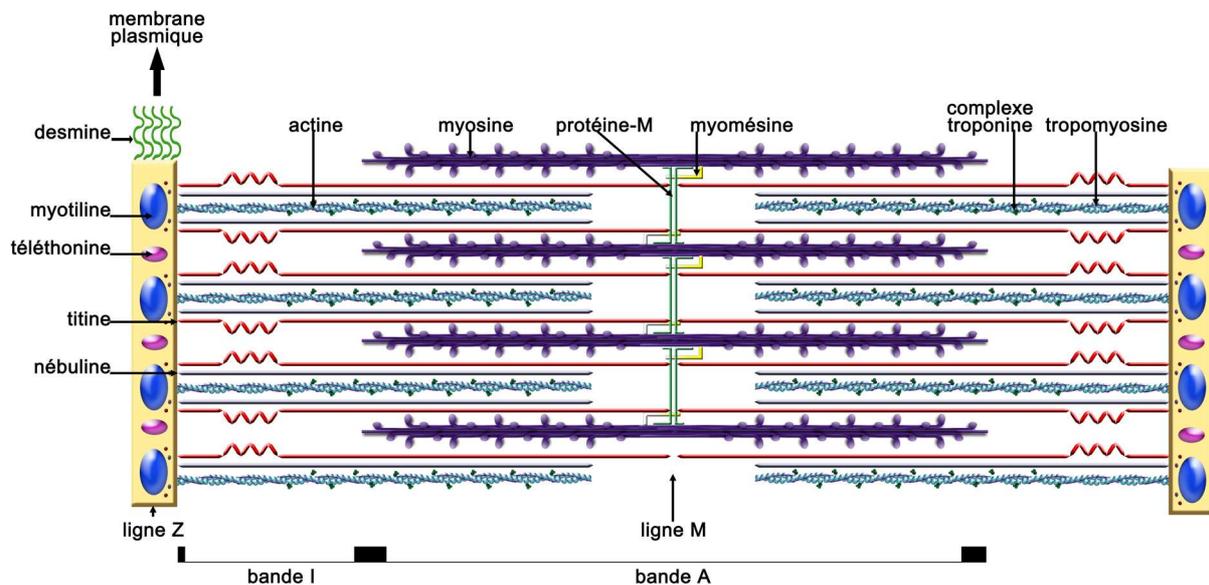


Figure 3: Structure du sarcomère. Représentation schématique de l'organisation des protéines principales du sarcomère. Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z. L'extrémité N-terminal de la titine est dans la ligne Z et la protéine s'étend jusqu'à la ligne M. Le complexe troponine/tropomyosine est associé à l'hélice d'actine. Schéma adapté d'après « *Muscle Biops* » 3^e édition, Dubowitz et Sewry ed. Saunders Elvier, (2007), Maruyama, 1997 et Obermann et al. 1997.

Chaque filament de myosine est entouré de six filaments d'actine (Figure 3, en turquoise). Ces filaments d'actine (actine F) sont des polymères d'actine globulaire (actine G), ils sont arrangés en double hélice et centrés sur un axe de tropomyosine à laquelle ils sont rattachés. Les filaments d'actine sont reliés à la ligne Z, elle-même composée d'un assemblage macromoléculaire où se trouvent entre autres les protéines α -actinine, téléthonine, γ -filamine, myotiline, obscurine, titine (en rouge) et nébuline (en gris clair). La titine, avec ses 3000 kDa, est la plus grande protéine connue. Elle s'étend sur la longueur d'un demi sarcomère (soit sur 1,2 à 1,5 μm !), son domaine N-terminal est dans la ligne Z et son C-terminal dans la ligne M. La titine est une protéine qui confère des propriétés élastiques aux sarcomères.

Le complexe des troponines est ancré à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Ce complexe est formé de la troponine C (TnC) qui lie le calcium (Ca^{2+}), de la troponine I (TnI, Inhibitrice) qui, au repos, masque les sites de fixation de la myosine sur l'actine, et de la troponine T (TnT) responsable de la liaison du complexe avec la tropomyosine.

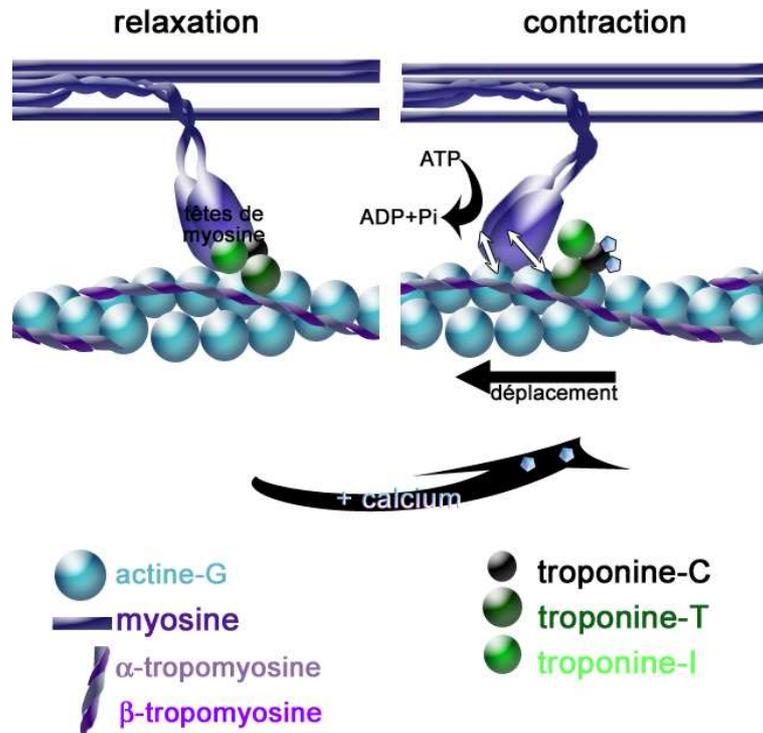


Figure 4: La contraction musculaire nécessite de l'ATP et du Ca^{2+} . La TnI ne démasque les sites de fixation de la myosine sur l'actine que lorsque la TnC a lié du Ca^{2+} et change de conformation. Une fois la tropomyosine déplacée avec le complexe troponine, la myosine accède à son site de fixation sur l'actine. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le relâchement de la tête de myosine qui vient s'associer avec l'actine. La libération de l'ADP provoque le mouvement de la tête de myosine vers l'extérieur du sarcomère, ce qui raccourcit la myofibrille et réalise la contraction musculaire. Au repos, la myosine est liée à une molécule d'ATP.

Au repos, la tropomyosine et la TnI (Figure 4, en vert clair) masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. La contraction se produit lorsque la TnC (en noir sur la Figure 4), après avoir fixé du Ca^{2+} , change de conformation et déplace la TnI et la tropomyosine. Les têtes de myosine (en violet) ont alors accès à leurs sites de fixation sur l'actine (en turquoise). Elles hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie. Le relargage de l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères. Le décrochage des têtes de myosine est induit par la fixation d'un nouvel ATP et par la libération du Ca^{2+} de la TnC. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.

B. Organisation des membranes: le reticulum sarcoplasmique et la triade

Les myofibrilles sont entourées d'un réseau de reticulum sarcoplasmique (RS). Le RS est un reticulum endoplasmique lisse qui constitue le stock calcique principal de la cellule musculaire. Ce reticulum est organisé en deux compartiments: le RS longitudinal le long des myofibrilles, et le RS jonctionnel au niveau des triades (Figure 5).

La triade est une structure spécifique du muscle qui est composée de l'apposition de trois membranes: deux membranes du RS jonctionnel centrées sur le tubule transverse (tubule-T) qui est une invagination de la membrane plasmique. Chez les mammifères, il y a deux triades par sarcomère, chaque triade étant située à l'interface des bandes A et I. Le RS longitudinal se trouve entre deux triades.

Le muscle est un tissu extrêmement consommateur d'énergie. Pour répondre à la demande d'énergie le plus efficacement possible, des mitochondries sont localisées en des points très précis, à proximité des zones de contractions: ainsi il y a en général deux mitochondries entre deux triades. Cependant toutes ne sont pas disposées près des triades, un grand nombre de mitochondries est également présent sous la membrane plasmique et en amas autour des noyaux.

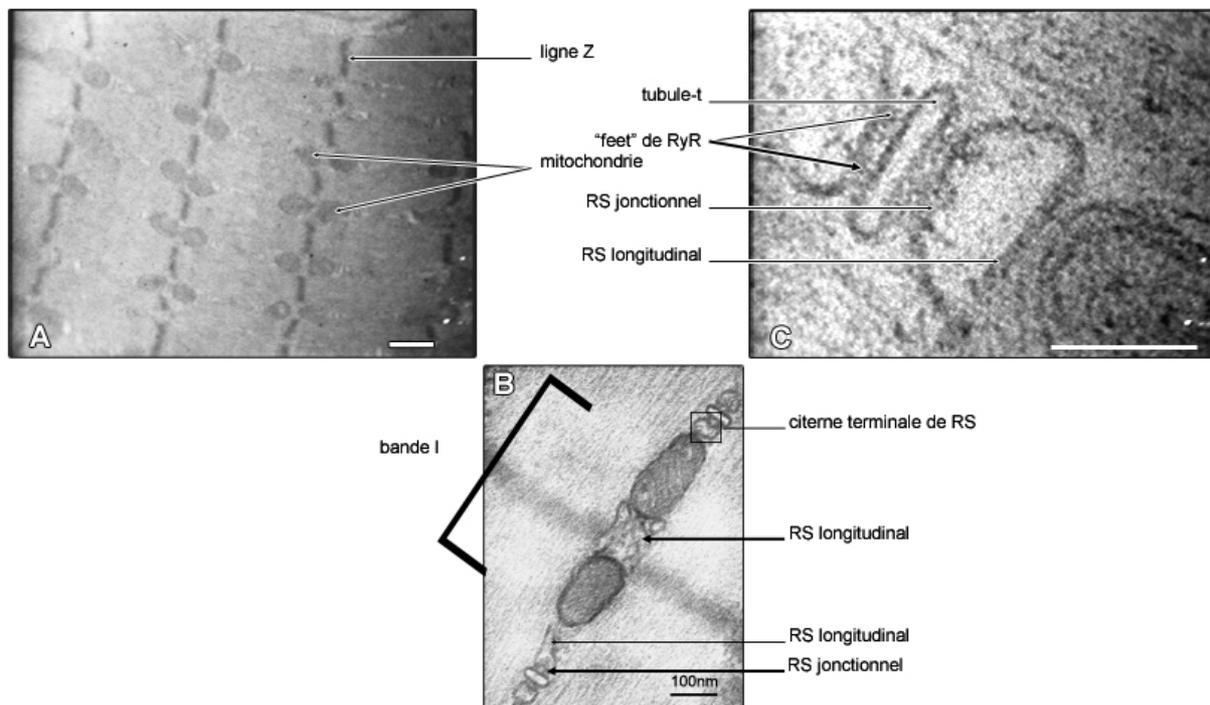


Figure 5: Du sarcomère à la citerne terminale. Coupe longitudinale d'un muscle squelettique de rat. **A.** Les mitochondries sont localisées au niveau de la bande I entre les myofibrilles. **B.** Deux triades sont réparties de chaque côté des mitochondries. **C.** Deux citernes terminales d'une triade centrées sur un tubule-T à côté d'une mitochondrie. Les zones denses aux électrons entre le RS jonctionnel et le tubule-T sont les « feet » de RyR. Barres d'échelle: A: 500 nm, B et C: 100 nm.

La distance entre le RS longitudinal et la mitochondrie est de 10 nm en moyenne (Csordas *et al.*, 2006; Franzini-Armstrong, 2007). Cette distance est maintenue grâce à différentes protéines qui relient les deux membranes, ainsi que par des structures, de nature inconnue, visibles en microscopie électronique (Boncompagni *et al.*, 2009).

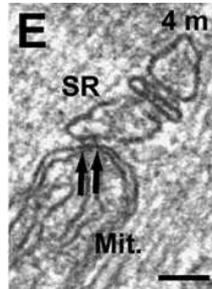


Figure 6: Liens entre le RS et les mitochondries. Des liens visibles en microscopie électronique (flèches) rattachent les mitochondries au reticulum sarcoplasmique. SR: reticulum sarcoplasmique, Mit.: mitochondrie, 4m: muscle prélevé sur une souris de 4 mois. Barre d'échelle: 0,05 μm . (Boncompagni *et al.*, 2009)

Dans le muscle cardiaque, les triades sont remplacées par des diades qui n'ont donc que deux membranes: la membrane du tubule et une seule citerne terminale de RS qui s'étend le long du tubule. Ces diades ne sont pas organisées en doubles rangées mais en simples rangées.

II. Le couplage excitation-contraction et l'homéostasie calcique

A. Notion de couplage excitation-contraction et complexe de relâchement du Ca^{2+}

Le couplage excitation-contraction (couplage-EC) qui prend place à la triade, est la transformation d'un signal électrique en travail mécanique via une libération massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Il est réalisé par un assemblage macromoléculaire: le complexe de relâchement du calcium (CRC). Le CRC est composé, entre autre, de deux canaux calciques couplés physiquement: le Récepteur des Dihydropyridines (DHPR), un canal calcique voltage dépendant de la membrane plasmique du tubule-transverse (Figure 7, en vert) et le Récepteur de la Ryanodine (RyR) dans la membrane du RS qui lui fait face (Figure 7, en orange).

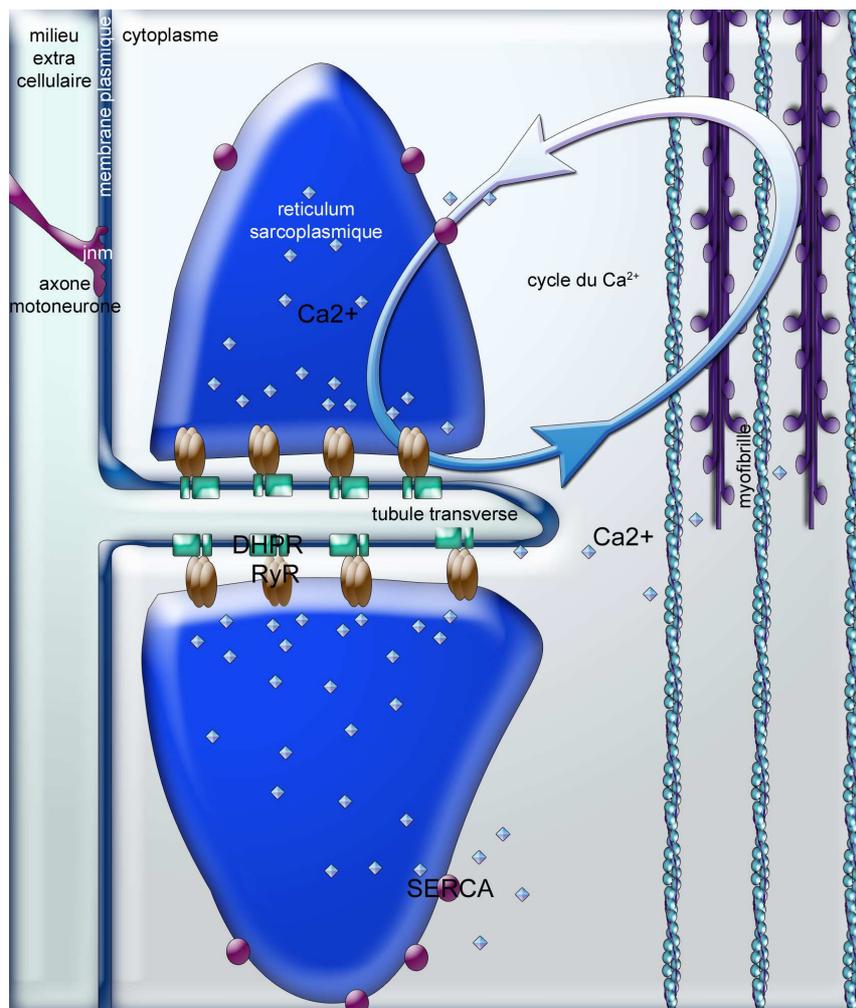


Figure 7: Le couplage excitation contraction au niveau de la triade. Le DHPR est dans la membrane plasmique du tubule-T, le RyR lui fait face dans la membrane du RS jonctionnel. La dépolarisation qui part de la jonction neuro musculaire (jnm) modifie la conformation du DHPR qui active alors l'ouverture du RyR. Le Ca^{2+} qui sort du RS va se fixer sur les myofibrilles, le muscle se contracte puis se relaxe lorsque le Ca^{2+} est repompé dans le RS par la pompe Ca^{2+} ATPase (Sarco-Endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA).

La synapse entre le neurone moteur et la cellule musculaire est la jonction neuromusculaire (jnm). L'acétylcholine (ACh) libérée par le neurone moteur à la jnm se fixe sur son récepteur au niveau de la membrane plasmique de la cellule musculaire ce qui provoque une entrée de Na^+ , dépolarisant ainsi la membrane. Cette dépolarisation se propage sur toute la surface de la cellule et jusqu'à l'intérieur de celle-ci grâce aux tubules-T, les invaginations de la membrane plasmique. La dépolarisation produit un changement de conformation du DHPR qui induit l'ouverture du RyR par couplage physique direct. L'ouverture du RyR permet au Ca^{2+} de sortir du RS selon son gradient électrochimique (gradient de concentration du Ca^{2+} : 100 μM dans le RS contre 100 nM dans le cytoplasme). Le calcium libéré va se fixer sur la TnC dans le complexe des troponines et ainsi déclencher la contraction musculaire.

Le muscle se relâche lorsque le Ca^{2+} est repompé dans la citerne terminale du RS par la pompe calcium ATPase (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) localisée dans toute la membrane de la citerne terminale du RS sauf dans la partie jonctionnelle, face au tubule-T.

Le couplage-EC du muscle squelettique fonctionne donc sur le mode « VICR »: (Voltage Induced Calcium Release), par opposition au « CICR » (Calcium Induced Calcium Release) dans le muscle cardiaque. Dans le cas du VICR, suite à la dépolarisation de la membrane plasmique, c'est le changement de conformation du DHPR qui provoque l'ouverture de RyR et le relâchement de Ca^{2+} . Dans le coeur, les isoformes cardiaques du RyR (RyR2) et du DHPR (DHPR α_{1c}) ne sont pas couplées physiquement. La dépolarisation de la membrane plasmique ouvre le DHPR et c'est l'entrée de Ca^{2+} par le DHPR qui ouvre RyR2.

B. Le complexe de relâchement du Ca^{2+}

Pour former le CRC, un certain nombre de protéines régulatrices sont associées au RyR et au DHPR (Figure 8): la calmoduline et FKBP12 sont associées au RyR (Figure 8, en orange) du côté cytoplasmique, et la calséquestrine, dans la lumière du RS, est reliée au RyR par la junctine (en jaune) et la triadine (en rose).

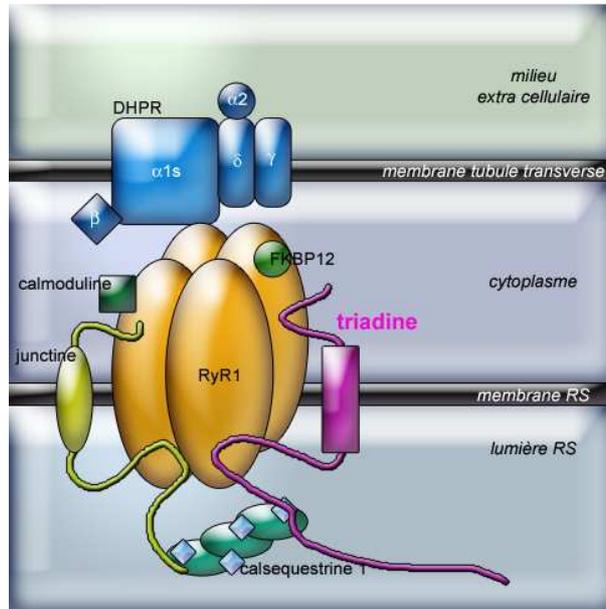


Figure 8: Le complexe de relâchement du calcium dans le muscle squelettique. RyR1 est associé à la calséquestrine 1 via la junctine et la triadine. Il est également associé à la sous-unité α_{1s} du DHPR.

1. Le DHPR

Le DHPR est un canal calcique de type L (« Long lasting ») exprimé dans différents tissus et très concentré dans les tubules transverses des muscle striés (Foskett *et al.*, 2008), à partir desquels il a été purifié (Curtis & Catterall, 1984). Des expériences de cryofracture ont montré que les DHPR sont organisés en tétrade dans la membrane plasmique, quatre DHPR formant les quatre angles d'un carré. Une tétrade sur deux est localisée en face d'un RyR (Block *et al.*, 1988) avec lequel elle forme une CRU (Calcium Release Units). En microscopie à fluorescence, le DHPR apparaît donc colocalisé avec le RyR et la triadine dans les triades (Flucher *et al.*, 1993).

Le DHPR est un hétéropentamère composé de cinq sous-unités: α_1 , β , $\alpha_2\delta$ et γ (Leung *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1987). Les sous-unités α_2/δ , β et γ sont liées de façon non-covalente à α_1 , qui forme le pore du canal. Elles modulent ses propriétés biophysiques et son adressage à la membrane plasmique. Plusieurs sous-unités du DHPR permettent son association avec le RyR.

La sous-unité α_1 (170 kDa) forme le pore du canal (Ellis *et al.*, 1988; Dolphin, 1999) ainsi que le filtre de sélectivité (Takahashi *et al.*, 1987) (Figure 9, têtes de flèches). et comporte le site de fixation des dihydropyridines (Galizzi *et al.*, 1986; Carafoli *et al.*, 2001) (Figure 9, en n°3). Les isoformes squelettiques α_{1s} , et cardiaques α_{1c} , sont codées par des gènes différents (Perez-Reyes *et al.*, 1990). La sous-unité α_1 est composée de quatre motifs homologues (I à IV), eux-mêmes composés de

six hélices transmembranaires (S1 à S6), reliées par des boucles cytoplasmiques (boucles I-II, II-III, III-IV) (Catterall, 1995). Les extrémités amino- et carboxy-terminales ainsi que les boucles reliant chaque domaine sont cytoplasmiques.

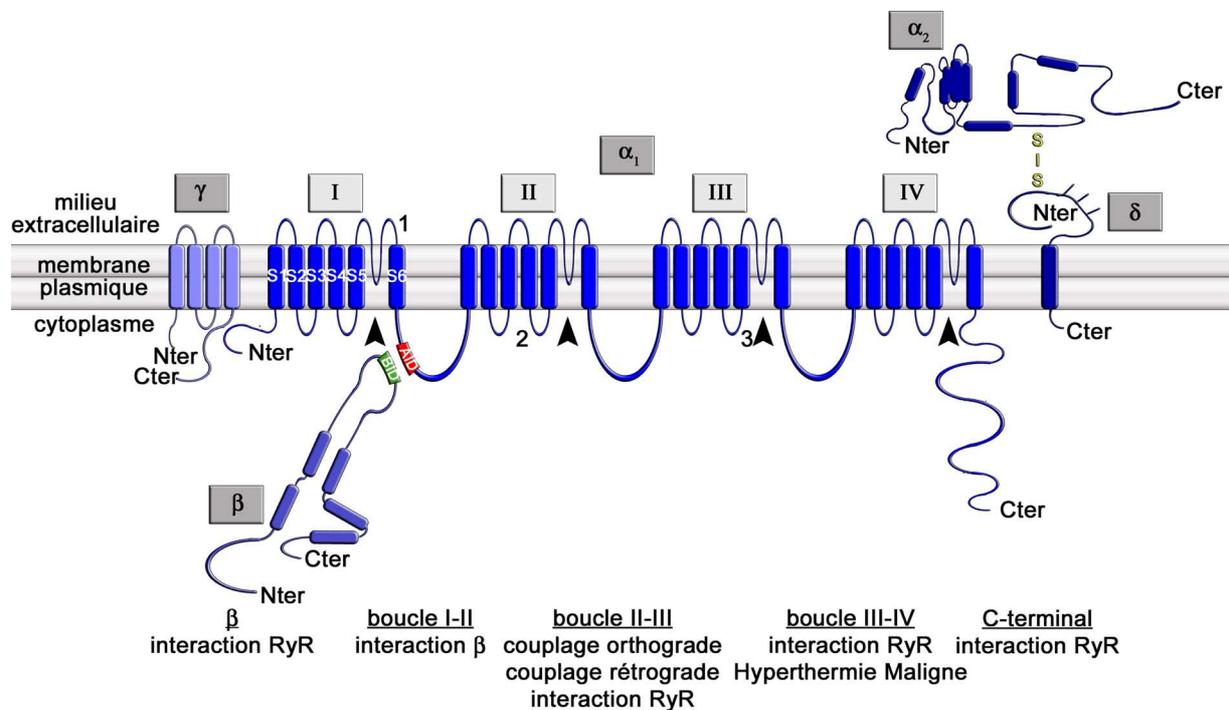


Figure 9: Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du DHPR. Têtes de flèches: pore de sélectivité au Ca^{2+} (boucle S5-S6 sur les quatre domaines). Rectangle rouge: AID (α interaction domain), rectangle vert : BID (β interaction domain). 1: inactivation dépendante du voltage; 2: senseur du voltage (IS4, IIS4, IIS4, IVS4), 3: Site de liaison aux dihydropyridines (IIIS5, IIIS6). Schéma adapté d'après Bodi et al. 2005 et Bannister, 2007.

Dans le muscle squelettique, le DHPR sert principalement de senseur de la dépolarisation membranaire pour initier le couplage-EC, et donc activer le RyR (Rios & Brum, 1987; Tanabe et al., 1988). Cette fonction est assurée par l'hélice S4 de la sous-unité α_1 (Figure 9, en n°2). Cette hélice comporte des arginines (trois à cinq selon les domaines). Ces arginines étant chargées positivement, l'inversion du potentiel de membrane attire l'hélice qui les porte vers l'extérieur de la cellule, ce qui modifie la conformation du DHPR et initie donc le couplage-EC. Le déplacement de ces acides aminés chargés constitue le mouvement de charge décrit par Schneider et Chandler (Schneider & Chandler, 1973).

Le RyR et le DHPR sont associés (Marty et al., 1994) et se régulent mutuellement via la sous-unité α_1 . Plusieurs domaines d'interaction et de régulation ont été décrits sur ces deux protéines. Les couplages orthograde (activation du RyR par le DHPR) et rétrograde (potentialisation du DHPR par le RyR) sont réalisés par les acides aminés 720 à 765 de la boucle II-III (Nakai et al., 1998). Dans cette région, les Lysines 677 et 682 sont impliqués dans

l'interaction avec la région 922-1112 du RyR (Leong & MacLennan, 1998a). Il a aussi été montré par pull-down que la boucle III-IV du DHPR est associée avec les acides aminés 1066-1118 du RyR, c'est-à-dire avec la même région du RyR qui interagit avec la boucle II-III. (Leong & MacLennan, 1998b). Le domaine C-terminal de la sous-unité α_1 est également associé avec le RyR. La sous-unité α_1 est indispensable au couplage: son absence chez la souris est létale. En effet, la souris KO α_{1s} (souris dysgénique) meurt à la naissance par déficience des muscles respiratoires (Knudson *et al.*, 1989). Des mutations de cette sous-unité entraînent des pathologies chez l'homme. Ainsi la mutation R1086H/C génère une hyperthermie maligne (HM) (Monnier *et al.*, 1997). L'étude de cette mutation a été réalisée par expression de la sous-unité α_{1s} R1086H dans des myotubes de souris dysgénique. L'expression de cette protéine mutée augmente la sensibilité du complexe à la dépolarisation membranaire et à la caféine (Weiss *et al.*, 2004). Il est donc probable que ce soit ce phénomène qui, chez l'homme, soit responsable des crises d'HM.

La sous unité α_2 (143 kDa) est extracellulaire et rattachée à la membrane plasmique par la sous unité δ (27 kDa) qui comporte un domaine transmembranaire. Ces deux sous-unités sont codées par le même gène: la sous-unité δ provient de l'extrémité 3' du gène codant pour α_2 . La protéine issue de ce gène subit un clivage protéolytique post-traductionnel séparant donc α_2 de δ , les deux peptides étant ensuite réassociés par pont disulfure (Jay *et al.*, 1991; Gurnett *et al.*, 1996). La sous-unité α_2/δ serait impliquée dans la régulation du niveau d'expression de α_{1s} , dans son adressage à la membrane, et dans la régulation de sa fonction (Obermair *et al.*, 2005).

La sous-unité β est complètement cytoplasmique. Elle possède des hélices α mais pas de segment transmembranaire (Ruth *et al.*, 1989). Elle est associée à la boucle I-II par le domaine AID (α interaction domain) (De Waard *et al.*, 1994; Pragnell *et al.*, 1994) et avec les acides aminés 3495-3502 du RyR. La sous-unité β a un rôle de chaperonne dans l'adressage de α_1 et dans son insertion à la membrane plasmique (Neuhuber *et al.*, 1998; Schredelseker *et al.*, 2005). Elle est également essentielle pour l'assemblage correct de α_1 (Tareilus *et al.*, 1997). L'absence d'assemblage α_1/β_1 dans les souris KO β_1 amène α_1 à la dégradation. Il n'y a plus de couplage-EC et les souris meurent à la naissance par déficience des muscles respiratoires (Gregg *et al.*, 1996).

Enfin, la sous-unité γ (30 kDa) est une glycoprotéine à quatre hélices transmembranaires (Jay *et al.*, 1990). Son ablation chez la souris n'a pas d'effet sur le couplage-EC mais elle pourrait moduler les propriétés biophysiques du canal (Ursu *et al.*, 2001).

2. Le RyR

a. Les isoformes et la topographie

Le RyR est le canal calcique principal du RS. C'est un homotétramère d'environ 2000 kDa, dont le domaine N-terminal cytoplasmique forme des structures « en pieds » (les « feet » de RyR). Ces « feet » sont denses aux électrons en microscopie électronique et enjambent l'espace entre le RS jonctionnel et le tubule-T (Block *et al.*, 1988). Le RyR a également été identifié dans des zones de RS non jonctionnel (Dulhunty *et al.*, 1992) où il n'est donc pas couplé au DHPR. Il existe trois isoformes du RyR, codées par trois gènes différents (McPherson & Campbell, 1993; Meissner, 1994), isolées grâce à leur interaction avec la [³H]Ryanodine (Tableau 1). RyR1 est exprimé dans le muscle squelettique, RyR2 dans le cœur et le cerveau (Furuichi *et al.*, 1994), et RyR3 est ubiquitaire (Hakamata *et al.*, 1992).

Tableau 1: Clonage des différentes isoformes du RyR.

	Clonage	Localisation chromosomique chez l'homme
RyR1	Lapin (Takeshima <i>et al.</i> , 1989) (Zorzato <i>et al.</i> , 1990) Homme (Zorzato <i>et al.</i> , 1990)	19q12-q13 (McCarthy <i>et al.</i> , 1990)
RyR2	Lapin (Otsu <i>et al.</i> , 1990) (Nakai <i>et al.</i> , 1990) Homme (Tunwell <i>et al.</i> , 1996)	1q42.1-q43 (Otsu <i>et al.</i> , 1993)
RyR3	Lapin (Hakamata <i>et al.</i> , 1992) Homme (Nakashima <i>et al.</i> , 1997)	15q14-q13 (Sorrentino <i>et al.</i> , 1993)

Les séquences primaires de ces trois isoformes présentent 65% d'homologies et trois zones de divergence (D1, D2, D3) qui seraient responsables de leurs différences fonctionnelles (Sorrentino & Volpe, 1993; Tunwell *et al.*, 1996) (Figure 10). D1 (Figure 10, en jaune) serait impliquée dans la sensibilité à la caféine et au Ca²⁺ (Du *et al.*, 2000), D2 (en bleu) serait la zone de couplage pour le VICR (Perez *et al.*, 2003) et D3 (en vert) serait le site d'inactivation du RyR dépendante du Ca²⁺ (Hayek *et al.*, 1999).

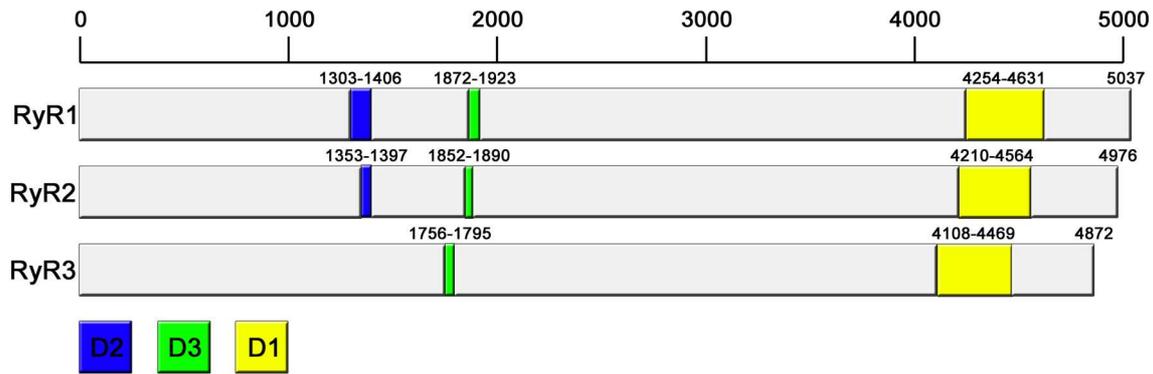


Figure 10: Localisation des zones de divergence des isoformes du RyR de lapin. Schéma adapté d'après Ogawa *et al.*, 2000 et Sorrentino et Volpe, 1993.

La topographie précise du RyR est encore imparfaitement connue. Plusieurs modèles ont été présentés suivant l'analyse de la séquence, de quatre (Takeshima *et al.*, 1989) à dix hélices transmembranaires (Zorzato *et al.*, 1990). Un modèle à huit hélices transmembranaires découlant d'une vérification expérimentale de l'insertion des fragments de RyR couplés à la GFP (Green Fluorescent Protein) a été défini par Du *et al.* (Du *et al.*, 2002). Plus récemment, des travaux réalisés par Meur *et al.* sur la rétention du RyR dans le ER par ses hélices transmembranaires ont remis en cause l'existence des deux premières hélices transmembranaires et ont finalement montré que le RyR possède six hélices transmembranaires (Figure 11, S1 à S6) (Meur *et al.*, 2007). C'est l'association de ces domaines transmembranaires qui forme le pore du canal (Bhat *et al.*, 1997). Les extrémités N-terminales et C-terminales sont toutes deux cytoplasmiques (Marty *et al.*, 1994; Grunwald & Meissner, 1995), 80% de la protéine étant localisée sur la face cytosolique.

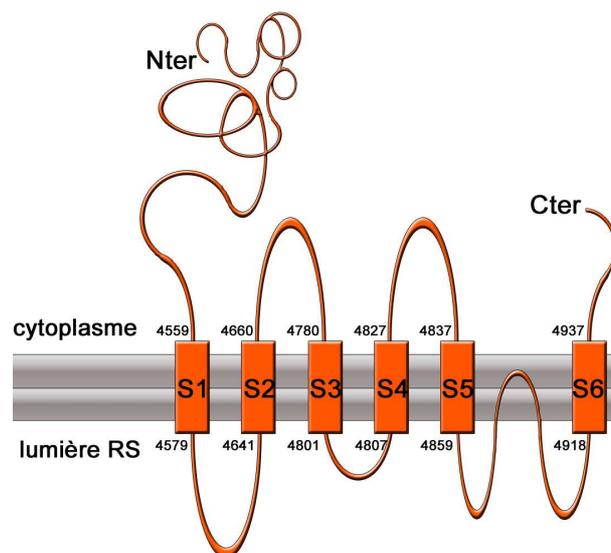


Figure 11: Topographie du RyR à six hélices transmembranaires. Schéma adapté d'après Meur *et al.*, 2007.

RyR1 est essentiel au couplage-EC: son ablation chez la souris est létale (Takeshima *et al.*, 1994; Takeshima *et al.*, 1995), les souris meurent d'asphyxie après la naissance car il n'y a plus de couplage-EC pour déclencher la contraction des muscles respiratoires. Seul RyR3 est fonctionnel dans le muscle squelettique de souris KO RyR1 (Takeshima *et al.*, 1995), mais il est cependant insuffisant pour permettre la survie de l'animal. Du fait de l'absence de « feet » de RyR dans les triades, ces souris sont dites « dyspédiques ».

RyR2 est indispensable à la contraction du muscle cardiaque chez l'adulte ce qui n'est pas le cas au stade embryonnaire: le cœur des embryons de souris KO RyR2 bâtit grâce à l'entrée de Ca^{2+} par le DHPR (Takeshima *et al.*, 1998a). Toutefois les embryons présentent des malformations cardiaques dramatiques ce qui suggère que RyR2 est essentiel au bon développement du cœur. Les souriceaux ne survivent que pendant dix jours après la naissance. La mort serait due à une surcharge calcique des cellules. Le Ca^{2+} qui entre dans le cytoplasme est stocké dans le RS. Lorsque ce dernier est saturé (il apparaît alors large et vacuolisé en microscopie électronique), le Ca^{2+} du cytoplasme entre dans les mitochondries et provoque des dégâts irréversibles. L'homéostasie calcique est complètement perturbée dans ces cellules. Au stade embryonnaire, RyR2 servirait ainsi de valve de sécurité pour libérer le Ca^{2+} du RS dans le cytoplasme.

La fonction de RyR3 est mal comprise. Jusqu'à présent le seul défaut identifié chez la souris KO RyR3 (Takeshima *et al.*, 1996) est une hyperactivité locomotrice, attribuée à la perte de ce canal dans le cerveau (Hakamata *et al.*, 1992; Takeshima *et al.*, 1994). L'expression de RyR3 n'est pas détectable dans les cellules musculaires indifférenciées et a été mise en évidence dans les cellules différenciées (Tarroni *et al.*, 1997). *In vivo*, ce canal est exprimé à partir de E13 chez la souris (Pisaniello *et al.*, 2003) et devient indétectable chez l'adulte (sauf dans le soleus et le diaphragme) (Bertocchini *et al.*, 1997), ce qui suggère qu'il est impliqué dans la différenciation du muscle squelettique. La fenêtre d'expression de RyR3 couvre donc la période périnatale, au cours de laquelle il joue un rôle dans l'amplification des signaux calciques de RyR1 par CICR (Yang *et al.*, 2001).

b. Activation de la libération de Ca^{2+}

L'étude de la fonction canal du RyR par différentes techniques comme l'imagerie calcique ou le voltage clamp requiert un arsenal pharmacologique adapté. Certains agonistes ou antagonistes sont totalement artificiels comme le 4-chloro-*m*-crésol (4-CmC) ou la ryanodine, d'autres ont une réalité biologique *in vivo* comme le Ca^{2+} . Ainsi le RyR peut être

activé par le Ca^{2+} à faible concentration, de l'ordre du μM (Schneider *et al.*, 1994). Une concentration de Ca^{2+} plus élevée, de l'ordre du mM , inhibe son ouverture (Meissner *et al.*, 1997).

Comme le Ca^{2+} , la ryanodine, un alcaloïde de plante, module la conformation du RyR en fonction de sa concentration. Elle accède à ses sites de liaison lorsque le canal est ouvert (Callaway *et al.*, 1994) et le bloque dans cet état lorsqu'elle est faiblement concentrée ($<10 \mu\text{M}$). A forte concentration ($>100 \mu\text{M}$) la ryanodine bloque le RyR en conformation fermée.

La caféine, les adénonucléotides (ATP, AMP (Endo, 1977), cADP-ribose) et le 4-CmC (Gschwend *et al.*, 1999) sont d'autres agonistes du RyR. Parmi ses antagonistes on trouve le dantrolène, le rouge de ruthénium et le Mg^{2+} .

Dans la cellule musculaire squelettique *in vivo*, le RyR est activé par le Ca^{2+} ou par activation directe par le DHPR lors de son changement de conformation suite à la dépolarisation de la membrane plasmique (VICR (Wier & Balke, 1999)).

L'activité du RyR est régulée par les protéines qui lui sont associées, mais également par des modifications de son état rédox par l'oxydation, l'alkylation ou la S-nitrosylation. La S-nitrosylation du RyR par les RNS (Reactive Nitrogen Species), produites par les mitochondries ou la NO synthase, augmente sa sensibilité à la température et diminue sa sensibilité à l'inhibition par le Ca^{2+} , ce qui augmente le relâchement de Ca^{2+} et résulte en un canal fuyant (Pouvreau *et al.*, 2004; Bellinger *et al.*, 2009) pouvant contribuer au mécanisme physiopathologique des myopathies.

c. Les pathologies génétiques associées au RyR

Plus de 200 mutations ont été identifiées sur toute la séquence du RyR (Monnier *et al.*, 2005). Ces mutations sont associées à différentes myopathies dont les myopathies structurales à core et à l'hyperthermie maligne *per* anesthésique (HM) (Monnier *et al.*, 2001).

Les cores sont des désorganisations des sarcomères visibles en microscopie électronique, avec une prolifération du réseau de tubules transverses et une absence de mitochondries caractérisée en histologie par l'absence d'activité oxydative. Dans le cas des myopathies congénitales à core centraux (CCD: Central Core Disease), ces zones de désorganisations se situent au centre des fibres de type I et peuvent s'étendre sur toute leur longueur (Romero *et al.*, 2005). Les myopathies à multiminicores (MmD: Multimincore Disease) présentent de nombreux cores de petite taille dans les fibres de type I ou II (Lunardi & Monnier, 2004).

Ces myopathies sont à transmission dominante ou récessive et sont provoquées par des mutations dans la partie C-terminale du RyR (forme dominante) ou tout au long de la séquence (forme récessive). Cependant la classification entre CCD et MmD est parfois difficile et il semble exister un continuum entre les deux pathologies. Le tableau clinique des patients atteints de CCD peut aller de la faiblesse musculaire proximale modérée à l'hypothonie néonatale majeure, voire à une akinésie fœtale. Les patients atteints de MmD présentent une faiblesse musculaire axiale également assez variable, mais plutôt plus sévère que dans le cas de CCD. Cette pathologie est souvent liée à des mutations de la sélénoprotéine N.

L'HM est une maladie pharmacogénétique dont les crises, chez les individus susceptibles, sont déclenchées par l'utilisation d'anesthésiques halogénés. Le tableau clinique de ces crises est caractérisé par une hyperthermie et un hypermétabolisme, une contraction généralisée et une hypercapnie. Si la crise d'HM n'est pas immédiatement prise en charge et traitée au dantrolène elle peut être fatale. Les mutations HM sont à transmission dominante et sont principalement retrouvées dans deux domaines, MH1 et MH2, localisés dans les parties N-terminales et centrales du RyR. Le statut clinique HM est établi par un test de contracture *in vitro* (test IVCT) sur biopsie qui évalue la sensibilité du muscle à différentes concentrations de caféine et d'halothane.

3. La triadine

a. Le gène de la triadine

Quatre isoformes de la triadine du muscle squelettique ont été clonées au laboratoire, Trisk 95, Trisk 51 (Thevenon *et al.*, 2003), Trisk 49 et Trisk 32 (Trisk pour Triadin SKEletal, le chiffre indiquant le poids moléculaire apparent de la protéine) (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Il existe également une isoforme cardiaque, CT1 (équivalente à Trisk 32). Toutes ces isoformes, cardiaques et squelettiques, sont issues de l'épissage alternatif d'un seul et même gène. Ce gène de 41 exons et de 420 kb est situé dans la région 6q22-6q23 chez l'homme (Thevenon *et al.*, 2003). Trisk 95 comporte les 41 exons (Figure 12). Trisk 51 est issu de l'épissage alternatif de l'exon 21 (en bleu sur la Figure 12) (Thevenon *et al.*, 2003), Trisk 49 de l'exon 20 (en orange) et Trisk 32 de l'exon 8 (en rose) (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Dans le cœur, l'épissage alternatif de CT1 est réalisé par une protéine du spliceosome (SRp38) qui lie spécifiquement l'exon 8 bis du pré-ARNm de CT1 et favorise son inclusion dans l'ARNm (Feng *et al.*, 2009).

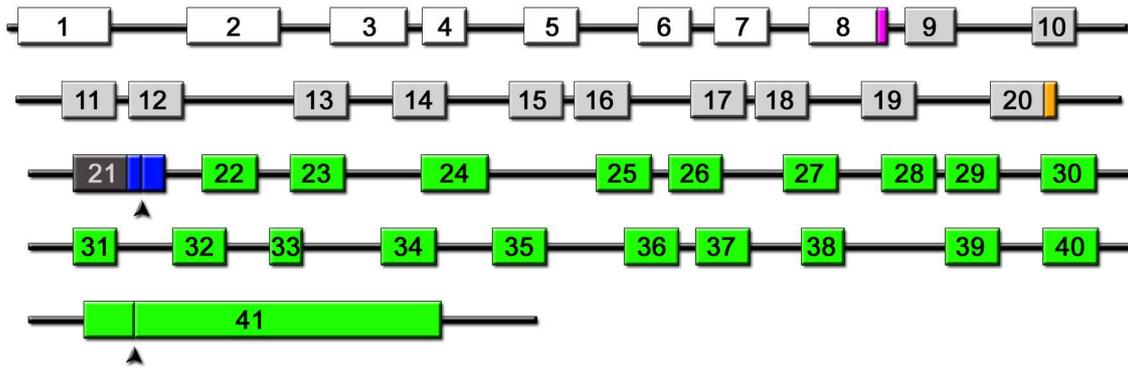


Figure 12: Organisation du gène de la triadine. Le gène de la triadine comporte 41 exons numérotés sur ce schéma. Les exons blancs codent pour les parties communes des différentes isoformes de la triadine. Les exons gris clair codent pour les parties communes à Trisk 49, Trisk 51 et Trisk 95. L'exon 21 en gris foncé n'est commun qu'à Trisk 51 et Trisk 95. Les exons colorés sont les exons spécifiques de chaque isoforme après épissage alternatif. Les têtes de flèche situent les codons stop de Trisk 51 et Trisk 95. Fushia: épissage alternatif de Trisk 32/CT1, orange: Trisk 49; bleu: Trisk 51; vert: Trisk 95. *Schéma adapté de Thevenon et al., 2003.*

b. Les isoformes cardiaques et squelettiques

La triadine est une protéine du RS dont le diagramme d'hydrophobicité et des expériences de protéolyse ménagée montrent qu'elle comporte un seul domaine transmembranaire (Knudson *et al.*, 1993), son extrémité N-terminale étant cytoplasmique et son extrémité C-terminale étant intraluminaire (Marty *et al.*, 1995). L'hélice transmembranaire est constituée des acides aminés 48 à 68 (Knudson *et al.*, 1993). Les quatre isoformes de la triadine qui ont été clonées au laboratoire (Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32) sont représentées sur la Figure 13. La partie N-terminale est commune à toutes les isoformes qui se distinguent par la longueur de leur partie C-terminale et par leurs derniers acides aminés, spécifiques à chacune d'entre elles (en couleur sur la Figure 13).



Figure 13: Les isoformes de la triadine du muscle squelettique. Isoformes de la triadine clonées chez le rat. La séquence N-terminale contient les 47 premiers acides aminés. L'hélice transmembranaire (symbolisée par un rectangle noire) est composée des acides aminés 48 à 68. Les quatre isoformes sont identiques jusqu'à l'acide aminé 264, à partir duquel Trisk 32 a un domaine spécifique. Les trois autres isoformes sont identiques jusqu'à l'acide aminé 438. Les parties colorées correspondent aux domaines spécifiques.

Trois isoformes de la triadine ont été clonées dans le cœur: CT1 (31 kDa), CT2 (33 kDa) et CT3 (Guo *et al.*, 1996b; Hong *et al.*, 2001). CT1 est parfaitement identique à Trisk 32. Il a été montré que CT2 est en réalité une isoforme glycosylée de CT1 (Kobayashi & Jones, 1999; Hong *et al.*, 2001). CT3, selon les auteurs, présente un poids moléculaire de 35 kDa (Hong *et al.*, 2001) ou de 95 kDa (Guo *et al.*, 1996b) son existence n'a pas été clairement démontrée par la suite.

Les modifications post-traductionnelles connues à ce jour sont la *N*-glycosylation sur l'asparagine en position 75 (Kobayashi & Jones, 1999) et la phosphorylation par la Calmoduline kinase sur la partie N-terminale (Damiani *et al.*, 1995). Il a été montré par l'équipe de S. Cala que la *N*-glycosylation de CT1 la protège de la dégradation par le protéasome (Milstein *et al.*, 2008). Toutes les triadines excepté Trisk 32/CT1 ont une cystéine en position 270. Trisk 95 en a une supplémentaire en 649. Ces deux cystéines sur Trisk 95 permettent la formation d'homopolymères de haut poids moléculaire jusqu'à 3000 kDa par ponts disulfures (Froemming *et al.*, 1999).

c. Localisations et partenaires

Trisk 95 et Trisk 51 sont localisées dans les triades où elles sont colocalisées et associées avec RyR1 (Vassilopoulos *et al.*, 2005) via les acides aminés cytoplasmiques N-terminaux 18 à 46 (Groh *et al.*, 1999) mais également par leur partie C-terminale intraluminale (Guo & Campbell, 1995). Elles sont également colocalisées avec la calséquestrine (Vassilopoulos *et al.*, 2005), et/ou associées (Guo & Campbell, 1995).

Trisk 49 se situe dans le RS longitudinal et colocalise avec la titine à l'interface des bandes A et I (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Aucun partenaire ne lui est connu pour le moment mais elle pourrait être associée avec la titine.

Dans le muscle squelettique, Trisk 32 se trouve aussi dans le RS longitudinal entre les triades où elle est colocalisée avec le Récepteur de l'Inositol 1,4,5 Trisphosphate type III (IP₃R-III). Son association avec ce canal calcique du RS a été montrée *in vitro* dans des cellules transfectées avec l'ADNc de Trisk 32 (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Dans le cœur, CT1 est associée avec RyR2 et la calséquestrine 2 dans les diades (Guo *et al.*, 1996a). Elle interagit avec RyR2 et avec la calséquestrine 2 par des régions chargées composées d'une alternance de lysines et de glutamates, dites « KEKE ». Son interaction avec la calséquestrine, du type « polar zipper » (Perutz *et al.*, 1993), se fait via ses acides aminés 210 à 224 chargés positivement avec la région riche en aspartates de la calséquestrine, chargée négativement (Kobayashi *et al.*, 2000;

Terentyev *et al.*, 2005). La séquence 210 à 224 de la triadine formerait un feuillet- β , n'impliquant dans cette interaction que les acides aminés pairs. (Kobayashi *et al.*, 2000) (Figure 14).

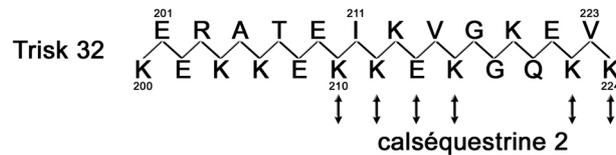


Figure 14 : Acides aminés impliqués dans l'interaction triadine-calsequestrine. Le domaine d'interaction de la calsequestrine 2 sur Trisk 32 est situé dans la zone 200 à 224 et implique les acides aminés pairs. Le domaine d'interaction de la triadine sur la calsequestrine est localisé dans la région riche en aspartate des acides aminés 354 à 367. Schéma adapté de Kobayashi *et al.* 2000.

d. Fonctions

Lors de sa découverte, il a été supposé que la triadine servait de lien entre le RyR et le DHPR (Caswell *et al.*, 1991). Cette idée fut abandonnée, son extrémité N-terminale de 47 acides aminés étant trop courte pour couvrir la distance qui sépare les deux membranes. La fonction des triadines (ou plutôt de Trisk 95 dans le muscle squelettique et de Trisk 32 dans le cœur) a ensuite été étudiée uniquement en lien avec son association avec le RyR et donc uniquement dans le cadre de la régulation des relâchements de Ca^{2+} . Cependant les résultats sont parfois contradictoires et sa fonction de régulation des relâchements de Ca^{2+} par le RyR reste mal comprise.

L'application de triadine purifiée (Ohkura *et al.*, 1998) ou du peptide contenant les acides aminés N-terminaux 18 à 46 (Groh *et al.*, 1999) sur du RyR dans une bicouche lipidique diminue puis supprime totalement les relâchements de Ca^{2+} du RyR en diminuant la probabilité d'ouverture du canal (Groh *et al.*, 1999), ce qui tend à donner à la triadine une fonction inhibitrice des relâchements de Ca^{2+} . A l'inverse, des résultats récents ont montré que l'application de triadine purifiée sur du RyR en bicouche lipidique a plutôt une action activatrice car elle augmente la durée d'ouverture du RyR et diminue sa durée de fermeture (Wei *et al.*, 2009).

Il a été montré au laboratoire que la surexpression de Trisk 95 dans des cultures primaires de myotubes de rat par infection avec le vecteur viral AdV-Trisk 95 abolit le couplage-EC en découplant le RyR du DHPR (Rezgui *et al.*, 2005), travaux auxquels j'ai contribué durant mon Master1 et auxquels j'ai été associée lors de la publication (Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. S.S. Smida-Rezgui, S. Vassilopoulos, J. Brocard, J. C. Platel, A. Bouron, C. Arnoult, S. Oddoux, L. Garcia, M. De Waard, I. Marty.) La surexpression de Trisk 95 diminue également l'entrée capacitive de Ca^{2+} (Vassilopoulos *et al.*, 2007). Des travaux menés au laboratoire de L. Csernoch sur la lignée de cellules

musculaires C2C12 et sur des cultures primaires de myotubes de souris infectées avec ce même virus AdV-Trisk 95, ont montré que la surexpression de Trisk 95 diminue la fréquence des sparks ainsi que la fréquence et l'amplitude des relâchements de Ca^{2+} par le RyR (Fodor *et al.*, 2008). A l'inverse, la baisse de l'expression de Trisk 95 par shRNA augmente la fréquence des sparks, et sa suppression par RNAi augmente la fréquence et l'amplitude des relâchements de Ca^{2+} (Fodor *et al.*, 2008). Ces résultats tendraient à montrer un rôle inhibiteur de Trisk 95 sur les relâchements de Ca^{2+} par le RyR et sur le couplage-EC.

Pourtant, la suppression de l'interaction RyR/triadine par expression d'un RyR ne possédant pas les domaines d'interaction avec la triadine dans des myotubes de souris dyspédique abolit totalement le couplage-EC (Goonasekera *et al.*, 2007). De même, la baisse de Trisk 95 par siRNA dans les cellules C2C12 diminue les relâchements de Ca^{2+} du RyR (Wang *et al.*, 2009). Donc à l'inverse, ces deux dernières publications auraient tendance à supposer un effet plutôt activateur de Trisk 95.

De façon globale, toute modification du taux de Trisk 95 semblerait réduire le couplage-EC (Marty *et al.*, 2009) (Triadin: what possible function 20 years later? I. Marty, J. Faure, A. Fourest-Lieuvin, S. Vassilopoulos, S. Oddoux, J. Brocard).

La fonction de Trisk 51 n'a été étudiée qu'au laboratoire, en surexprimant la protéine dans des cultures primaires de myotubes de rat grâce au virus AdV-Trisk 51. Contrairement à Trisk 95, aucun effet dû à la surexpression de Trisk 51 n'a été observé sur les relâchements de Ca^{2+} par le RyR (Rezgui *et al.*, 2005). Ces deux résultats montrent clairement que les deux triadines n'ont pas la même fonction dans le muscle squelettique.

La suppression totale de toutes les isoformes de la triadine par invalidation génique chez la souris (knock out, KO) ne compromet pas la survie des animaux ni leur capacité de reproduction (Shen *et al.*, 2007). Une baisse des stocks calciques et des relâchements de Ca^{2+} par le RyR a été montrée lors d'une stimulation électrique des myotubes en culture primaire provenant de ces souris.

Dans le cœur, la fonction de CT1/Trisk 32 n'a été étudiée que par surexpression, jusqu'à cette année, et les résultats sont moins sujets à controverse que pour Trisk 95. Une souris transgénique a été créée en 2001 avec laquelle différentes expériences ont été réalisées (Kirchhefer *et al.*, 2001). Tout d'abord, des expériences de voltage clamp on montré que la surexpression de Trisk 32 diminue l'entrée de Ca^{2+} par le DHPR et augmente la durée nécessaire à son inactivation. Cependant, *in cellulo*, la concentration de Ca^{2+} est augmentée

dans le cytoplasme (Kirchhefer *et al.*, 2001). Cette contradiction peut être due à une activation de RyR2 par la surexpression de Trisk 32 qui a été démontrée par ailleurs. Des expériences d'imagerie calcique dans des cultures primaires de cette souris transgénique ont montré que la surexpression de CT1/Trisk 32 augmente la durée et l'amplitude des relâchements de Ca^{2+} (Kirchhefer *et al.*, 2007; Kirchhof *et al.*, 2007). La synthèse de ces différents résultats indique que CT1/Trisk 32 serait donc plutôt activatrice de RyR2. Cet effet activateur du RyR est d'ailleurs responsable d'arythmies ventriculaires déclenchées par les catécholamines (tachycardies ventriculaires polymorphiques catécholaminergiques, TVPC) qui ont été mise en évidence dans tous les modèles d'étude CT1/Trisk 32.

Le cœur de la souris KO triadine publiée en 2007 a été étudié et présente une diminution des relâchements de Ca^{2+} par le RyR et une augmentation du Ca^{2+} dans le cytoplasme probablement due à la diminution du nombre de canaux (Chopra *et al.*, 2009). De façon surprenante, comme dans la souris transgénique qui surexprime Trisk 32, la durée nécessaire à l'inactivation du DHPR est plus élevée que la normale dans la souris KO triadine (Kirchhefer *et al.*, 2001; Chopra *et al.*, 2009). La taille du RS jonctionnel est augmentée dans le cœur de la souris KO triadine, et le nombre de contacts RS jonctionnel/tubule-T, ainsi que leur surface, sont diminués.

Ces deux souris génétiquement modifiées, l'une surexprimant Trisk 32/CT1, l'autre n'ayant plus Trisk 32/CT1 (ni CT3) présentent des troubles du rythme cardiaque, avec une altération du RS.

Globalement la fonction de la triadine, surtout dans le muscle squelettique reste relativement mal définie, son étude fournissant de nombreux résultats contradictoires. Il est cependant certain qu'elle module le couplage excitation-contraction, tant dans le muscle squelettique que dans le muscle cardiaque. D'autre part, les modèles de souris génétiquement modifiées laissent supposer que la triadine pourrait être impliquée dans la mise en place ou le maintien de l'architecture de la triade. En effet, une mauvaise orientation des triades a été observées dans le muscle KO triadine: 30% des triades du muscle KO sont longitudinales, parallèles à l'axe du muscle, au lieu d'être transversales (Shen *et al.*, 2007).

4. La junctine

La junctine est une protéine du RS de 26 kDa (Jones *et al.*, 1995) clonée chez le chien, le lapin et l'homme (Trevés *et al.*, 2000). Elle provient de l'épissage alternatif du gène en 8q12.1 chez

l'homme, gène qui code également pour la junctate (32 kDa) et l'aspartate β -hydroxylase (90 kD), deux autres protéines transmembranaires du RS (Korioth *et al.*, 1994; Treves *et al.*, 2000).

La junctine n'est exprimée que dans les muscles striés (Jones *et al.*, 1995). Elle est composée d'une partie N-terminale cytoplasmique de 22 acides aminés, d'une partie transmembranaire de 21 acides aminés et d'une partie C-terminale intraluminale de 165 acides aminés (Guo *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997). La séquence C-terminale possède un domaine KEKE et est donc chargée positivement. Les séquences transmembranaires de la junctine et de la triadine présentent 60% d'identité (Jones *et al.*, 1995).

La junctine est localisée dans les triades (Damiani & Margreth, 1990; Jones *et al.*, 1995) où elle est associée à la calséquestrine (Zhang *et al.*, 1997), au RyR via ses domaines KEKE (Zhang *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2000), et à la triadine. Le domaine d'interaction de la junctine sur la triadine est localisé entre les acides aminés 69 à 264 de la triadine, c'est-à-dire dans le domaine intraluminal commun à toutes les isoformes qui est également impliqué dans l'association avec le RyR et la calséquestrine. La junctine aurait à la fois, une fonction structurale dans la triade, et régulatrice des relâchements de Ca^{2+} . En effet, la surexpression de la junctine dans le cœur (souris transgénique), qui conduit à une baisse de 50% de la triadine, provoque la réduction de l'épaisseur des citernes terminales avec une augmentation de la densité de la calséquestrine sous les feet de RyR, ainsi que l'augmentation des contacts entre la citerne terminale et le tubule-T (Zhang *et al.*, 2001). Ces caractéristiques étant parfois observées dans le cœur de souris sauvage, les auteurs pensent que la répartition de la junctine dans les triades est variable. La suppression de la junctine, quant à elle, provoque la mort prématurée des souris, puisque 25% meurent avant trois mois et 50% avant un an (Yuan *et al.*, 2007). Ces deux souris génétiquement modifiées, l'une surexprimant la junctine l'autre ne l'exprimant plus, présentent des troubles du rythme cardiaque, une bradychardie et des fibrillations auriculaires liées à une hypertrophie dans le cas des souris transgéniques, et des TVPC dans le cas du KO. Ces résultats indiquent que la junctine pourrait avoir une fonction de régulation des relâchements de Ca^{2+} . Cette hypothèse a été étudiée par différents moyens qui ont montré qu'elle régulait effectivement les relâchements du RyR et transmettait la sensibilité au Ca^{2+} de la calséquestrine au RyR au même titre que la triadine (Gyorke *et al.*, 2004).

La junctate est une protéine du RS de 32 kDa, de structure identique à la junctine, exprimée dans de multiples types cellulaires. Elles partagent d'ailleurs les mêmes domaines N-terminal et transmembranaire. La partie C-terminale de la junctate est commune à l'aspartate β -hydroxylase mais sans le domaine catalytique. Elle est chargée négativement, ce qui lui permet de lier le Ca^{2+} avec une haute capacité et une faible affinité comme l'ont

montré des expériences de liaison au $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Treves *et al.*, 2000). La junctate est associée à l'IP₃R dans la lignée de cellules COS-7 où sa surexpression augmente significativement la libération de Ca^{2+} par l'IP₃R lors d'une stimulation à l'ATP (Treves *et al.*, 2000 ; Treves *et al.*, 2004).

L'aspartate β -hydroxylase (Asph) partage également la même séquence transmembranaire que la junctate et la junctine, domaine qui présente 60% d'identité avec la triadine (Figure 15). Des expériences de fractionnement du RS cardiaque ont montré que l'Asph a une localisation différente de la junctate et de la junctine qui, elles, sont dans les mêmes fractions (Treves *et al.*, 2000). Le domaine transmembranaire pourrait donc être impliqué dans la rétention de ces protéines et de la triadine dans le RS mais pas dans leur adressage à la triade.

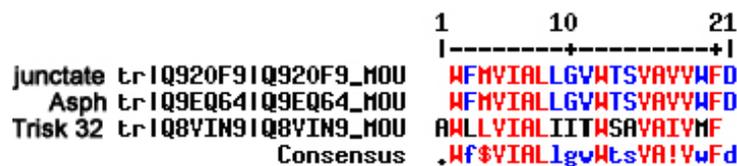


Figure 15: Alignement des séquences transmembranaires de la junctate, de l'aspartate β -hydroxylase et de Trisk 32. L'alignement montre la forte homologie de séquence (acides aminés en rouge dans la séquence consensus) de l'hélice transmembranaire de ces protéines du RS. Les séquences utilisées pour cet alignement sont les séquences des trois protéines clonées chez la souris.

5. La calséquestrine

La calséquestrine est une protéine intra-luminale du RS jonctionnel (Fliegel *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1988) qui est dépourvue de la séquence canonique de rétention dans le RS lysine-aspartate-glutamate-leucine, nommée séquence KDEL (Munro & Pelham, 1987). Sa rétention dans le RS jonctionnel est donc réalisée par un mécanisme inconnu. En présence de fortes concentrations de Ca^{2+} , la calséquestrine forme des polymères linéaires qui sont essentiels à sa bonne localisation dans le RS (Wang *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2007) (Figure 16). Ainsi, l'insertion d'étiquettes dans la séquence de la calséquestrine, ou la modification du milieu intraluminal du RS, provoquent la perte de la rétention de la protéine (Houle *et al.*, 2006).

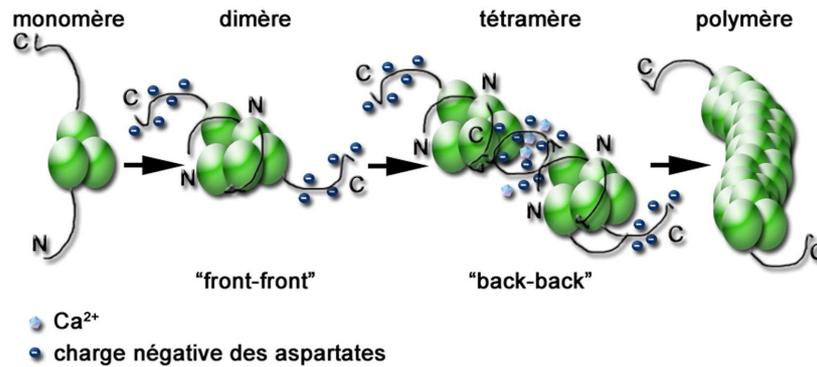


Figure 16: Les étapes de polymérisation de la calséquestrine. Représentation schématique de la polymérisation de la calséquestrine. La calséquestrine existe sous forme de monomères ou de polymères de différents poids moléculaires. Le domaine N-terminal de la calséquestrine lui permet de se dimériser en « front-to-front ». L'extrémité C-terminale libre permet la tétramérisation et la formation de polymères linéaires de haut poids moléculaire. Schéma d'après Park *et al.*, 2003.

La calséquestrine est une protéine qui piège le Ca²⁺ à proximité du RyR avec une forte capacité mais une faible affinité (MacLennan & Wong, 1971). Elle est reliée au RyR par la junctine et la triadine de façon Ca²⁺ dépendante: cette interaction est abolie en présence de fortes concentrations de Ca²⁺ (Mitchell *et al.*, 1988). Sa séquence d'interaction avec la triadine est localisée dans sa région riche en aspartate, donc chargée négativement, entre les acides aminés 354 à 367 (Figure 14) (Shin *et al.*, 2000). Il existe deux isoformes de la calséquestrine codées par deux gènes différents: une isoforme squelettique, la calséquestrine 1 (Fliegel *et al.*, 1987), et une isoforme cardiaque, la calséquestrine 2 (Scott *et al.*, 1988). En réalité, si le cœur n'exprime que la calséquestrine 2, les deux isoformes sont présentes dans le muscle squelettique, dans des proportions différentes au cours du développement et en fonction du type de fibre. Dans les fibres lentes immatures, l'isoforme la plus abondante est CSQ 2, qui est ensuite co-exprimée avec CSQ1 dans un rapport de une CSQ2 pour trois CSQ1 chez l'adulte (Damiani *et al.*, 1990). Dans les fibres rapides, la calséquestrine 2 disparaît totalement après la naissance, et seule la calséquestrine 1 est exprimée chez l'adulte (Sacchetto *et al.*, 1993). La calséquestrine tamponne le Ca²⁺ dans la lumière du RS et permet de conserver la concentration de Ca²⁺ libre relativement basse, ce qui facilite l'entrée de Ca²⁺ par SERCA contre le gradient de concentration. La calséquestrine a été impliquée dans la régulation du RyR: comme activateur (Ohkura *et al.*, 1995) ou comme inhibiteur (Beard *et al.*, 2002). Elle aurait une fonction de senseur intraluminal de Ca²⁺ pour le RyR (Gyorke *et al.*, 2004).

L'étude la fonction de la calséquestrine a été réalisée par sa surexpression, sa suppression et sa mutation. La surexpression de la calséquestrine 2 dans des cardiomyocytes isolés (Terentyev *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005), ou dans des souris transgéniques (Jones *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998) augmente la capacité de stockage du Ca²⁺ dans le RS ainsi que l'amplitude des relâchements de Ca²⁺. La suppression de la calséquestrine 1 par KO affecte la structure des triades, la

quantité et la cinétique des relâchements de Ca^{2+} (Paolini *et al.*, 2007). Dans les muscles KO CSQ1, la quantité de RyR est fortement augmentée tandis que la quantité de triadine et de junctine reste inchangée. Les citernes terminales sont réduites et les triades dédoublées, ce qui peut permettre à la fois le stockage d'une plus grande quantité de RyR, et la compensation de la réduction de la taille des citernes terminales par l'augmentation de leur nombre. L'ablation de la calséquestrine 1 a des conséquences plus dramatiques pour l'EDL, un muscle rapide, que pour le soleus, un muscle lent qui a donc de la calséquestrine 2 pour compenser la perte de la calséquestrine 1. Ainsi, l'EDL de souris KO calséquestrine 1 se contracte beaucoup plus lentement que le WT. Des expériences d'imagerie calcique sur des cultures primaires de myotubes ont montré que les relâchements de Ca^{2+} déclenchés par une stimulation électrique sont fortement réduits dans les KO. Cette diminution de Ca^{2+} relâché au cours du VICR peut expliquer la lenteur de la contraction de l'EDL KO. L'EDL a également une augmentation de la résistance à la fatigue qui résulterait du doublement de la quantité de mitochondries. Une conséquence surprenante de la perte de cette protéine est la sensibilité des souris au stress thermique et aux anesthésiques halogénés (halothane) (Dainese *et al.*, 2009). Lorsqu'elles sont exposées à ces stress, les souris KO calséquestrine 1 (plus particulièrement les mâles) présentent une contracture généralisée conduisant à leur décès, réaction qui mime l'hyperthermie maligne. Chez l'homme aucune mutation de CSQ1 n'a été associée à l'hyperthermie maligne jusqu'à présent.

La perte de la calséquestrine cardiaque (Knollmann *et al.*, 2006) ne provoque d'altération des relâchements de Ca^{2+} que lors de stimulations catécholaminergiques, ce qui provoque des TVPC. A la perte de la calséquestrine 2 s'ajoute une baisse drastique (environ 70%) de la triadine et de la junctine dans le cœur. La baisse de l'expression de ces protéines est un frein à l'interprétation des résultats car les souris KO triadine et junctine développent également des TVPC.

A ce jour, aucune pathologie humaine n'a été associée à une mutation de la calséquestrine 1. Mais différentes mutations pathologiques ont été mises en évidence dans la calséquestrine 2 (Kim *et al.*, 2007). Les mutations R33Q et D307H empêchent sa polymérisation et la mutation L167H provoque l'agrégation de la protéine. Dans tous les cas, la capacité de stockage du Ca^{2+} est limitée et les patients présentent des TVPC. La mutation R33Q créée chez la souris mime la pathologie humaine avec des TVPC. Elle induit également une forte baisse de la triadine cardiaque (Rizzi *et al.*, 2008).

6. FKBP12

La protéine FKBP12, la protéine de 12 kDa qui lie l'immunosuppresseur FK506, est associée avec la partie cytoplasmique de chaque monomère de RyR1 (Jayaraman *et al.*, 1992; Wagenknecht *et al.*, 1996). L'isoforme cardiaque, FKBP12.6 est associée avec RyR2 (Lam *et al.*, 1995). Il a été montré par des expériences en bicouche lipidique que FKBP12 stabilise les états ouverts et fermés du RyR (Brillantes *et al.*, 1994; Kaftan *et al.*, 1996; Ahern *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1997). Les muscles squelettiques de souris KO FKBP12 sont normaux, mais la majorité des souris meurent entre E14,5 et la naissance à cause d'une cardiomyopathie sévère (Shou *et al.*, 1998). Si les muscles squelettiques ne présentent pas de défaut de couplage-EC, les études *in vitro* en bicouche lipidique ont montré une forte augmentation de la probabilité d'ouverture de RyR1 et de RyR2. Dans le cœur, l'isoforme FKBP12.6 ne compense donc pas la perte de FKBP12. L'hypothèse avancée est que l'augmentation de la libération de Ca^{2+} augmente la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme au repos, et provoque des dysfonctions au cours du cycle de contraction cardiaque générant donc une cardiomyopathie. Ce phénotype cardiomyopathique reproduit les effets observés chez l'homme lors de traitements avec l'immunosuppresseur FK506. Les mâles KO FKBP12.6 (Xin *et al.*, 2002) présentent également une hypertrophie cardiaque. Celle-ci n'est reproduite chez les femelles que lorsqu'elles sont traitées au tamoxifène, un antagoniste des récepteurs aux oestrogènes. Les oestrogènes semblent donc protéger contre les dérégulations de l'homéostasie calcique. Cette différence de sensibilité aux altérations de l'homéostasie calcique entre mâles et femelles a également été observée chez les souris KO calséquestrine 1 (§ II.B.5), mais jusqu'à présent aucune hypothèse n'a été formulée pour expliquer cette différence de sensibilité. Il semblerait toutefois que la piste des oestrogènes soit à privilégier.

C. Autres mécanismes de l'homéostasie calcique

Les relâchements de Ca^{2+} lors du couplage excitation-contraction s'incrivent dans le cadre de l'homéostasie calcique. Les mouvements et concentrations de Ca^{2+} dans les différents compartiments cellulaires sont régulés par de nombreux mécanismes, comme les échanges de Ca^{2+} entre le RS et les mitochondries ou l'entrée capacitive. Le maintien de cet équilibre implique une régulation fine des entrées et des sorties de Ca^{2+} par les différents canaux calciques présent dans la membrane de chaque organite. Parmi les acteurs de cette homéostasie calcique se trouvent les protéines du CRC, mais également l' IP_3R , VDAC, et les protéines de l'entrée capacitive, STIM1, Orai1 et les TRPC.

1. Le récepteur de l' IP_3

Le récepteur de l' IP_3 (IP_3R) est un canal calcique du RS qui partage des caractéristiques structurales et fonctionnelles avec le RyR. Il a été purifié pour la première fois à partir du cervelet de rat où il est très abondant (Supattapone *et al.*, 1988). Trois isoformes de l' IP_3R provenant de trois gènes différents ont été clonées (Furuichi *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 1992; Blondel *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1999): $\text{IP}_3\text{R-I}$, $\text{IP}_3\text{R-II}$ et $\text{IP}_3\text{R-III}$ (Tableau 2). Leurs séquences en acides aminés présentent 60 à 80% d'identités surtout dans le domaine de liaison à l' IP_3 et dans le pore du canal (Patel *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999). L' IP_3R est un tétramère dont chaque sous-unité est d'environ 300 kDa. Les monomères peuvent former des homo ou des hétérotétramères (Joseph *et al.*, 1995; Joseph *et al.*, 1997).

Tableau 2: Clonage des isoformes de l' IP_3R chez le rat, la souris et l'homme.

		Rat	Souris	Homme
$\text{IP}_3\text{R-I}$	Nombre d'aa	2750	2749	2695 (314kDa)
	Localisation génomique			3p25-26
	publication	Mignery <i>et al.</i> , 1990	Furuichi <i>et al.</i> , 1989b	Yamada <i>et al.</i> , 1994
$\text{IP}_3\text{R-II}$	Nombre d'aa	2701 (307kDa)		2701
	Localisation génomique			12p11
	publication	Sudhof <i>et al.</i> , 1991	Ross <i>et al.</i> , 1992	Yamada <i>et al.</i> , 1994
$\text{IP}_3\text{R-III}$	Nombre d'aa	2670 (304kDa)		2671
	Localisation génomique			6p21
	publication	Blondel <i>et al.</i> , 1993	Kume <i>et al.</i> , 1993	Yamamoto-Hino <i>et al.</i> , 1994

Chaque monomère contient un domaine N-terminal cytoplasmique (85% de la masse de la protéine), six hélices transmembranaires (Figure 17, TM1 à TM6) (Michikawa *et al.*, 1994; Galvan

et al., 1999) et une courte partie C-terminale cytoplasmique. La délétion des 410 premiers acides aminés empêche toute liaison à l'IP₃, cette région a donc été définie comme son domaine de liaison sur le récepteur (Mignery *et al.*, 1990). Le pore du canal est constitué des hélices transmembranaires 5 et 6 (Michikawa *et al.*, 1994). La délétion des quatre premières hélices transmembranaires n'empêche pas la formation d'un canal. Le canal composé des hélices 5 et 6 a une conductance et des propriétés de sélectivité normales (Ramos-Franco *et al.*, 1999).

Les relâchements de Ca²⁺ par l'IP₃R sont activés par l'IP₃. L'IP₃ provient de la coupure du PIP₂ en IP₃ et DAG par la phospholipase C, elle-même activée par une protéine G de la membrane plasmique (Berridge, 1993). L'IP₃R est également activé par le Ca²⁺ (CICR), et par les drogues qui stimulent la production d'IP₃ comme l'ATP. Comme le RyR, l'IP₃R est activé par la caféine, ce qui rend difficile son étude fonctionnelle en présence du RyR.

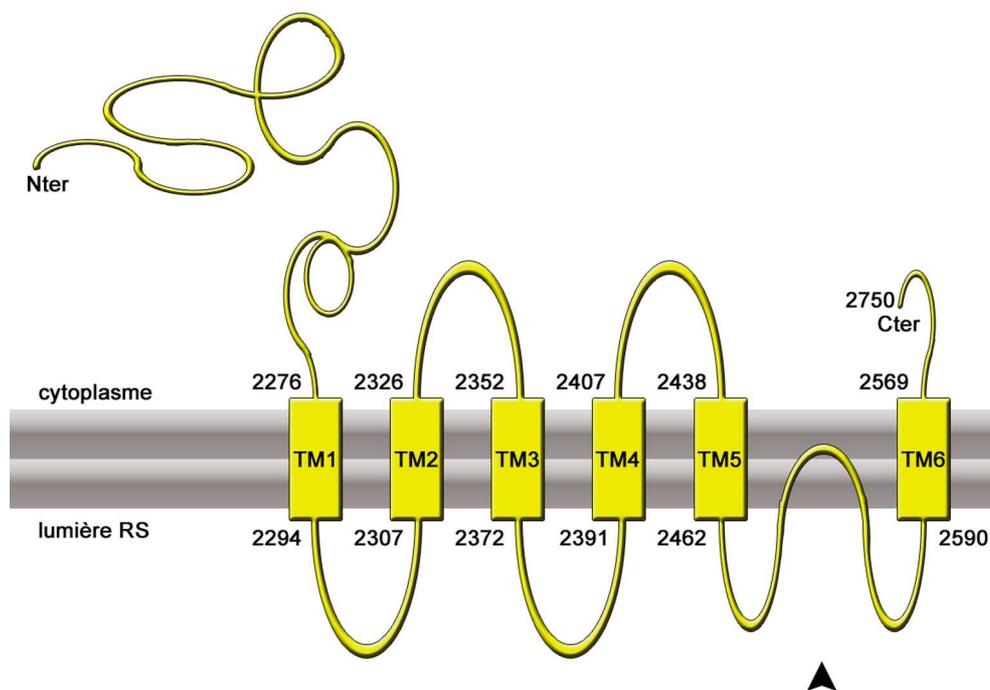


Figure 17: Topographie de l'IP₃R. Tête de flèche: pore du canal. TM: hélice transmembranaire. *Adaptation du schéma de Foskett et al., 2007.*

Dans le muscle squelettique, l'IP₃R-III est l'isoforme majoritaire (Powell *et al.*, 2001). Il est localisé dans la membrane du RS longitudinal au niveau de la bande I, entre les triades (Powell *et al.*, 2001; Salanova *et al.*, 2002). Son marquage est continu avec le RE périmoléculaire, côté nucléoplasme, où l'IP₃R est régulé l'expression des gènes par la signalisation calcique (Harding *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 2001). Lors d'une dépolarisation de myotubes en culture avec du KCl, deux vagues calciques sont observées: une première, rapide, due au RyR, et une seconde, lente, due à l'IP₃R. Cette seconde vague résulte en une augmentation du Ca²⁺ dans le nucléoplasme, suivie d'une

phosphorylation de facteurs de transcription. Ainsi, dans le muscle squelettique comme dans les neurones, l'IP₃R pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. Dans le cœur, l'IP₃R-II est l'isoforme majoritaire. Il est localisé dans le reticulum périmoléculaire où ses relâchements de Ca²⁺ sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (Bare *et al.*, 2005). L'IP₃R-II est également localisé dans le RS jonctionnel sous membranaire, avec RyR2, où il joue un rôle de modulation du couplage-EC (Lipp *et al.*, 2000).

De nombreuses protéines régulatrices sont associées avec ce canal, dont la junctate (Treves *et al.*, 2004) et la calmoduline. Une association avec FKBP12 a également été montrée (Cameron *et al.*, 1995a; Cameron *et al.*, 1995b; Cameron *et al.*, 1997) et bien qu'elle soit aujourd'hui controversée (Bultynck *et al.*, 2001a; Bultynck *et al.*, 2001b), des données obtenues par électrophysiologie montrent que FKBP12 est capable de réguler les relâchements de Ca²⁺ par l'IP₃R-I (Dargan *et al.*, 2002).

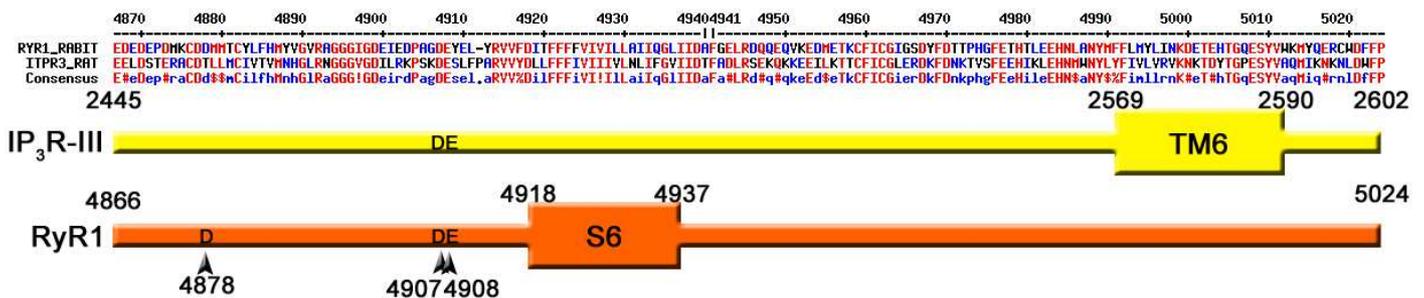


Figure 18: Identités entre les séquences des pores de sélectivité du RyR1 de lapin et de l'IP₃R-III de rat, et domaines d'interaction du RyR avec la triadine. Les rectangles représentent les hélices transmembranaires. Les nombres sous les têtes de flèches indiquent la position des acides aminés du RyR qui interagissent avec les domaines KEKE de la triadine.

L'IP₃R et le RyR présentent des identités de séquence au niveau du pore du canal (Galvan & Mignery, 2002). Les aspartates 4907 et 4908 du RyR, qui permettent son interaction avec un domaine KEKE de la triadine, sont conservés dans l'IP₃R (Figure 18, têtes de flèche). En raison des identités de séquence de l'IP₃R avec le RyR et de sa colocalisation avec Trisk 32 dans le RS longitudinal, l'association de l'IP₃R-III avec Trisk 32 a été recherchée et montrée au laboratoire par immunoprécipitation dans les cellules L6 transfectées avec l'ADNc de Trisk 32 (Vassilopoulos *et al.*, 2005).

2. Le dialogue calcique entre le RS et les mitochondries

Les mitochondries sont localisées soit sous la membrane plasmique, soit entre les myofibrilles où elles fournissent l'énergie pour la contraction. Les mitochondries localisées entre les myofibrilles sont situées entre les triades, donc près des citernes terminales de RS.

Le RS et les mitochondries peuvent stocker le Ca^{2+} et le relâcher dans l'interstice qui les sépare, créant des microdomaines de forte concentration calcique. Ainsi, il existe un dialogue calcique entre le RS et les mitochondries qui permet de réguler l'homéostasie calcique et qui est directement lié à la distance séparant les deux organites (Sharma *et al.*, 2000). Parmi les principales protéines impliquées dans ce dialogue se trouvent le RyR, l' IP_3R et VDAC.

Le canal VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) est un canal de la membrane mitochondriale externe de 30-35 kDa qui laisse passer anions (Benz, 1994), cations (Mannella & Wang, 1989) et adénonucléotides (Colombini, 1989). Il a également été retrouvé dans la membrane du RS du muscle strié (Junankar *et al.*, 1995; Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) où il pourrait permettre l'entrée d'ATP (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996).

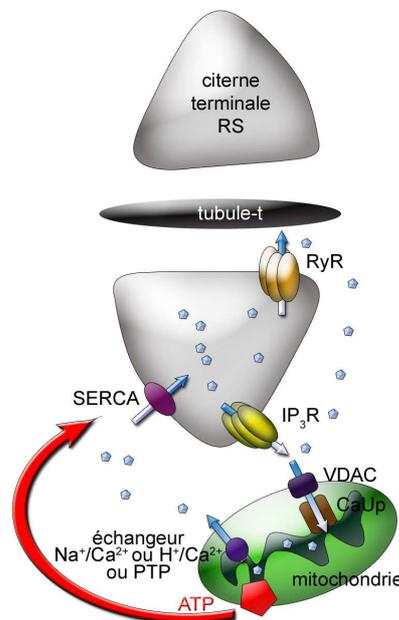


Figure 19: Le dialogue calcique entre les mitochondries et le RS.

Il a été constaté qu'au cours de la contraction musculaire, quelques ms après une augmentation de Ca^{2+} dans le cytoplasme, la concentration calcique augmente dans les mitochondries (Rudolf *et al.*, 2004). Le Ca^{2+} relâché par le RyR au cours de la contraction (relâchement qui peut être amplifié par l' IP_3R activé par CICR), entre par VDAC (Ginzel *et al.*, 2001; Rapizzi *et al.*, 2002), et traverse la membrane interne par le Ca^{2+} uniporteur (CaUp) (Hajnoczky *et al.*, 1995) (Figure 19). Cette entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries favorise la décroissance rapide du pic calcique, d'une part en tamponnant le Ca^{2+} du cytoplasme, d'autre part en favorisant le repompage du Ca^{2+} par SERCA. En effet, comme son nom l'indique, SERCA est une pompe ATPase, or l'entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale active la synthèse d'ATP qui sera ensuite libéré à proximité de SERCA (Territo *et al.*, 2001). Le Ca^{2+} stocké dans les mitochondries au

cours de la contraction, et relâché par l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$, est lui aussi repompé dans le RS par SERCA. Le Ca^{2+} peut également quitter les mitochondries par le pore de transition de perméabilité, lequel active l'entrée de Ca^{2+} par SERCA dans le RE (Bowser *et al.*, 2002).

Les mitochondries sont des organites dynamiques, qui évoluent sur le cytosquelette microtubulaire. Pour faciliter l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries, il a été proposé qu'elles s'immobilisent suite à une libération de Ca^{2+} du RS (Yi *et al.*, 2004). Les auteurs émettent l'hypothèse que l'immobilisation des mitochondries pendant la contraction favorise l'entrée de Ca^{2+} dans la matrice et la libération d'ATP à proximité des sites où il est nécessaire (contraction et repompement du Ca^{2+} dans le RS par SERCA). Toutefois, ces expériences ont été réalisées *in vitro* dans la lignée de cardiomyocytes H9c2. Or, les mitochondries sont dynamiques dans le muscle au cours du développement, dans le muscle adulte, elles sont localisées à proximité des triades, donc des sites de relâchement de Ca^{2+} , et ne sont plus mobiles car elles sont rattachées au RS (Boncompagni *et al.*, 2009). Il semble donc peu probable que cette dynamique ait lieu dans le muscle adulte *in vivo*, mais au cours du développement musculaire post-natal, parallèlement à l'association des mitochondries avec le RS (Boncompagni *et al.*, 2009) (cf. § III.B).

3. L'entrée capacitive

Le RS a une capacité de stockage de Ca^{2+} limitée. Ce stock est susceptible d'être épuisé lors de contractions musculaires soutenues. La déplétion des stocks calciques provoque alors une entrée de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique par le mécanisme de l'entrée capacitive (Parekh & Penner, 1997). L'existence de ce mécanisme a été mise en évidence dans les myotubes de muscles squelettiques en culture (Hopf *et al.*, 1996) et dans les fibres musculaires adultes (Kurebayashi & Ogawa, 2001). Cette entrée capacitive, ou SOCE (Store Operated Calcium Entry), pourrait fournir le Ca^{2+} nécessaire à la contraction lors d'épisode d'exercice physique intense ou de fatigue musculaire (Ma & Pan, 2003).

Le passage de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique pour l'entrée SOC nécessite des canaux calciques. Parmi les canaux impliqués dans ce mécanisme on peut citer certains TRPC (Transient Receptor Potential Cation Channel) et Orai1. Orai préexiste dans la membrane plasmique sous forme de dimères qui, suite à la déplétion des stocks internes de Ca^{2+} ,

s'assemblent en tétramère pour former un canal calcique très sélectif (Mignen *et al.*, 2008; Penna *et al.*, 2008).

L'activation d'Orai1 est réalisée par STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), une phosphoprotéine de la membrane du RS. STIM1 est le senseur de la déplétion du RS en Ca^{2+} (Liou *et al.*, 2005). Ainsi lors de l'épuisement du Ca^{2+} contenu dans le RS, STIM1 s'accumule dans les sites du RS proches des canaux calciques de la membrane plasmique (Wu *et al.*, 2006). STIM1 facilite ainsi la tétramérisation des dimères d'Orai1 pour former un canal calcique (Penna *et al.*, 2008). Orai1 est alors activé, ce qui permet l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule (Luik *et al.*, 2006). Ce calcium est ensuite pompé dans le cytoplasme.

D. Le métabolisme du muscle au cours de la contraction

A chaque étape du cycle contraction–relaxation, le muscle consomme de l'énergie sous forme d'ATP. Le stock d'ATP disponible étant très rapidement épuisé, l'ATP doit être produit en permanence pour permettre au muscle de continuer à fournir un travail mécanique. L'ATP peut être produit par les mitochondries (métabolisme oxydatif, aérobie) ou par la glycolyse (métabolisme anaérobie). Le métabolisme oxydatif est plus lent que la glycolyse mais permet de produire de l'ATP pendant plus longtemps. Ainsi les muscles rapides, comme l'EDL (Extenseur Digitorum Longus) ou le FDB (Flexor Digitorum Brevis), ont plutôt un métabolisme anaérobie et s'épuisent rapidement. A contrario, les muscles lents comme le soleus ont plutôt un métabolisme oxydatif et possèdent donc plus de mitochondries que les muscles rapides. Grâce à ce métabolisme, ils sont plus résistants à la fatigue que les muscles rapides. Les gros groupes musculaires comme le quadriceps, le gastrocnémien, ou le tibialis, possèdent un panaché de fibres de lentes et rapides.

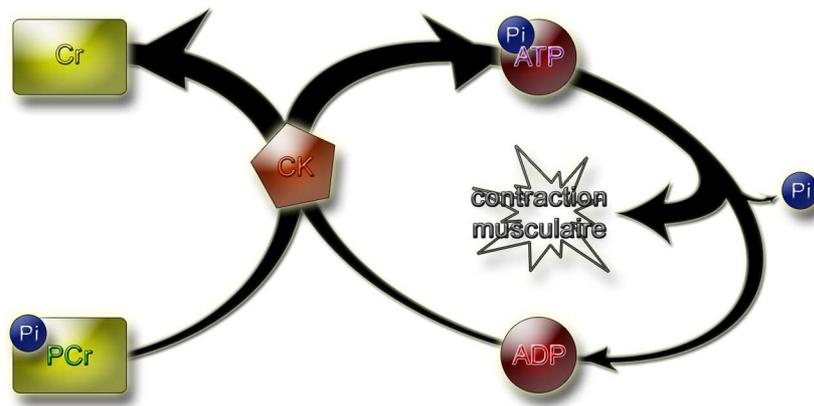


Figure 20: Synthèse d'ATP par le cycle de la phosphocréatine à l'effort. CK: créatine kinase, Cr: créatine, PCr: phosphocréatine, Pi: phosphate inorganique.

L'ATP consommé par la myosine pour la contraction provient de l'ajout d'un phosphate inorganique (Figure 20, en bleu) sur l'ADP par la créatine kinase (CK, en orange). Ce phosphate provient de la phosphocréatine (PCr, en jaune) qui diffuse à travers la membrane externe de la mitochondrie vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la PCr est utilisée pour régénérer l'ATP cytoplasmique consommé par la myosine. Le phosphate est transféré jusqu'au site d'utilisation par l'intermédiaire de la navette créatine/phosphocréatine (Bessman & Geiger, 1981) (Figure 21). Il a été démontré qu'au niveau des myofibrilles, la priorité est réservée à la PCr en tant que molécule porteuse de phosphate par rapport à l'ATP, la créatine étant une molécule non chargée et beaucoup plus petite que l'ATP (Jacobus, 1985). Il existe donc une microcompartimentation de l'ATP dans le cytoplasme (Saks *et al.*, 1994). La PCr produite est acheminée au niveau des myofibrilles afin de régénérer l'ATP via la CK myofibrillaire située au niveau de la bande M (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). En retour, la créatine diffuse vers la mitochondrie pour être de nouveau phosphorylée. Il existe deux raisons à l'existence de cette navette:

- la restriction de la diffusion : l'ATP est une molécule chargée négativement et beaucoup plus grosse que la créatine, cette dernière diffuse donc plus facilement;
- l'inhibition par l'ADP: si l'ADP produit au niveau des ATPases n'était pas aussitôt transformé en ATP par la CK, on aurait une inhibition par accumulation du produit

Ainsi, le suivi de la baisse de la phosphocréatine au cours de l'effort constitue un indicateur de l'état du métabolisme musculaire.

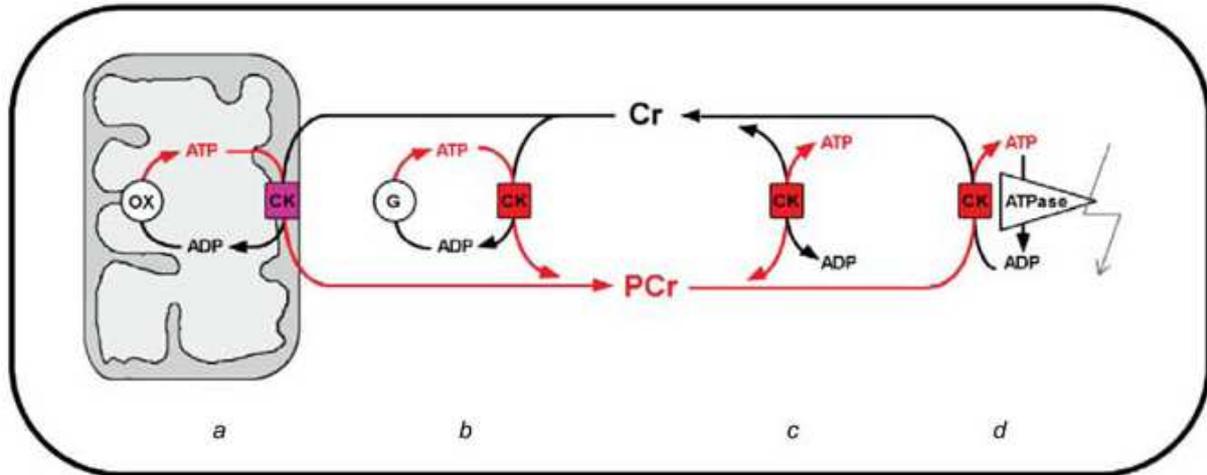


Figure 21: Le transfert énergétique de la mitochondrie aux sites de contraction par le système créatine kinase / phosphocréatine. Les créatines kinases (CK) sont localisées dans différents compartiments comme les mitochondries (a) et le cytoplasme (b-d), sous forme soluble (c) ou associées à l'ATP pour son transport (a et b) ou sa consommation (d). La phosphocréatine (PCr) cytosolique provient de la phosphorylation oxydative (OX) comme dans le cœur (a) ou pendant la glycolyse (G) dans le muscle rapide par exemple (b). Dans le muscle squelettique, l'enzyme CK, avec la PCr, maintient un transport énergétique entre les sites de production et de consommation d'ATP (a et d). Une fraction cytosolique de CK est liée à la bande M pour régénérer l'ATP hydrolysé par la myosine au cours de la contraction (Saks *et al.*, 2006)

A la fin de la glycolyse, la transformation de l'acide lactique en lactate libère un proton selon la réaction $C_3H_6O_3 \rightarrow C_3H_5O_2^- + H^+$. Cette réaction contribue à l'acidification du muscle au cours de l'effort. La mesure du pH est donc un autre indicateur du bon fonctionnement du métabolisme énergétique.

La prédominance du métabolisme oxydatif ou glycolytique n'est pas le seul paramètre qui permet de distinguer les fibres lentes des fibres rapides. Ainsi le type de myosine exprimée a des conséquences sur la vitesse de contraction du muscle. Les muscles rapides, qui expriment donc l'isoforme rapide de la chaîne lourde de la myosine, développent leur force maximale quasiment immédiatement après une stimulation. Les muscles lents, quant à eux, mettent plus de temps à atteindre leur force maximale, du fait de l'expression de l'isoforme lente de la chaîne lourde de la myosine.

III. La formation des triades

A. La cavéoline-3

Les cavéoles sont des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre (Palade, 1953), riches en cholestérol et en glycosphingolipides (Montesano *et al.*, 1982; Rothberg *et al.*, 1990) dont le composant majoritaire, la cavéoline, forme le manteau protéique des cavéoles en liant le cholestérol et les glycosphingolipides (Rothberg *et al.*, 1992). Trois isoformes de la cavéoline ont été clonées: la cavéoline-1 (Glenny & Soppet, 1992; Rothberg *et al.*, 1992), la cavéoline-2 (Scherer *et al.*, 1996) et la cavéoline-3 (Way & Parton, 1995; Tang *et al.*, 1996). Elles sont toutes trois exprimées dans le muscle strié. Les cavéolines 1 et 2 sont exprimées dans les stades précoces de la différenciation, l'expression de la cavéoline-3 augmente au cours de la différenciation pour devenir majoritaire chez l'adulte (Schubert *et al.*, 2007). Cette protéine de 17 kDa forme des homo-oligomères de 14 à 16 monomères (Williams & Lisanti, 2004).

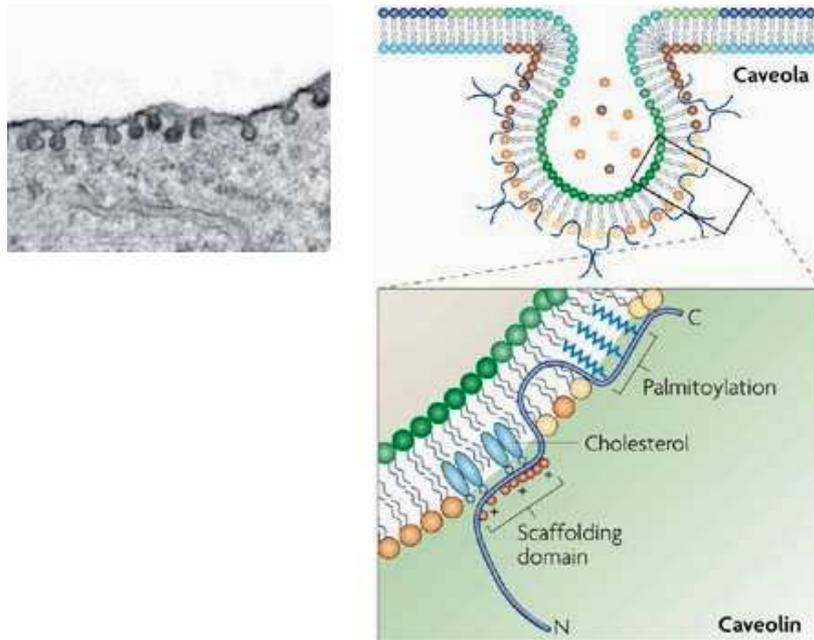


Figure 22: Cavéoles et cavéoline. En haut à gauche, cavéoles vue en microscopie électronique dans un adipocyte. A droite: représentation schématique de la cavéoline dans la membrane. Les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. *Schéma adapté d'après Parton., 1996.*

En plus de sa localisation dans les cavéoles, la cavéoline-3 est présente dans les tubules transverses au cours de la différenciation musculaire (Parton *et al.*, 1997) et dans le muscle adulte (Ralston & Ploug, 1999) où elle est principalement localisée aux extrémités du tubule (Murphy *et*

et al., 2009). La composition lipidique des tubules-T étant différente de celle de la membrane plasmique (Roseblatt *et al.*, 1981; Roseblatt & Scales, 1989), la cavéoline-3 servirait à empêcher la diffusion des lipides entre ces deux membranes. Les muscles de souris KO pour la cavéoline-3 n'ont plus de cavéoles et leurs tubules-T sont mal orientés (Galbiati *et al.*, 2001). La surexpression de la cavéoline-3 par transgénèse génère un phénotype de type dystrophie musculaire de Duchenne avec des fibres musculaires hypertrophiées, nécrotiques ou en régénération (Galbiati *et al.*, 2000), plus sévère que celui du KO cavéoline-3.

Les cavéoles sont impliquées, entre autre, dans la transduction du signal (Lisanti *et al.*, 1994) et dans certaines voies du trafic endocyttaire (Anderson, 1993). Elles sont d'ailleurs transportées sur le réseau microtubulaire (Mundy *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2008). Les cavéoles ont également un rôle à jouer dans l'homéostasie calcique (Fujimoto *et al.*, 1992; Fujimoto, 1993; Isshiki *et al.*, 1998): en effet, nombre de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique ont été mises en évidence dans les cavéoles où elles peuvent être associées avec la cavéoline. Dans le cœur, c'est le cas notamment du DHPR (Balijepalli *et al.*, 2006) et du RyR (Head *et al.*, 2005).

Les mutations de la cavéoline provoquent des dystrophies musculaires des ceintures (LGMD1c, Limb Girdle Muscular Dystrophy), une pathologie dont la sévérité est variable avec une évolution clinique généralement lente et peu progressive chez l'adulte. Des mutations ont été identifiées dont T78M et T78K (Traverso *et al.*, 2008), et P104L, la plus étudiée (Minetti *et al.*, 1998; Betz *et al.*, 2001). A l'état hétérozygote, cette dernière mutation a un effet dominant négatif: la cavéoline-3 mutée polymérise avec la cavéoline-3 sauvage et provoque son accumulation dans l'appareil de Golgi (Galbiati *et al.*, 1999). Ces agrégats sont ensuite dégradés par le protéasome. Il n'y a donc ni cavéoline ni cavéoles à la membrane plasmique, ce qui entraîne une désorganisation de la membrane plasmique et un défaut de formation des tubules-T.

B. La formation des triades et l'association des mitochondries

Le développement myofibrillaire débute à 14 jours de développement embryonnaire (E14), lorsque les cellules forment des myotubes. Les myofibrilles sont en périphérie de la fibre et les noyaux sont centraux. Le RS est déjà formé et son compartiment jonctionnel est associé préférentiellement avec la ligne Z via l'obscurine (Bagnato *et al.*, 2003). A E15, les cavéoles

bourgeonnent à la membrane plasmique et s'invaginent dans la cellule (Ishikawa, 1968; Schiaffino *et al.*, 1977). Ce sont les futurs tubules-T. Ils ont une orientation longitudinale. Ils prendront ensuite leur orientation transversale. A E17, les premières diades se forment ainsi que quelques triades. Les diades se transforment en triades pendant la maturation du muscle.

Des agrégats de RyR dispersés dans le cytoplasme du myotube immature apparaissent dès E15 et leur nombre augmente jusqu'à E18. Ils s'incorporent alors aux diades/triades préformées et ne sont donc pas nécessaires à leur formation. Ceci a d'ailleurs été montré dans les muscles de souris dyspédiques, (Takekura *et al.*, 1995; Felder *et al.*, 2002) dysgéniques (Flucher *et al.*, 1992; Felder *et al.*, 2002) et double KO RyR1/DHPR α_{1s} (Felder *et al.*, 2002), qui possèdent tous des triades.

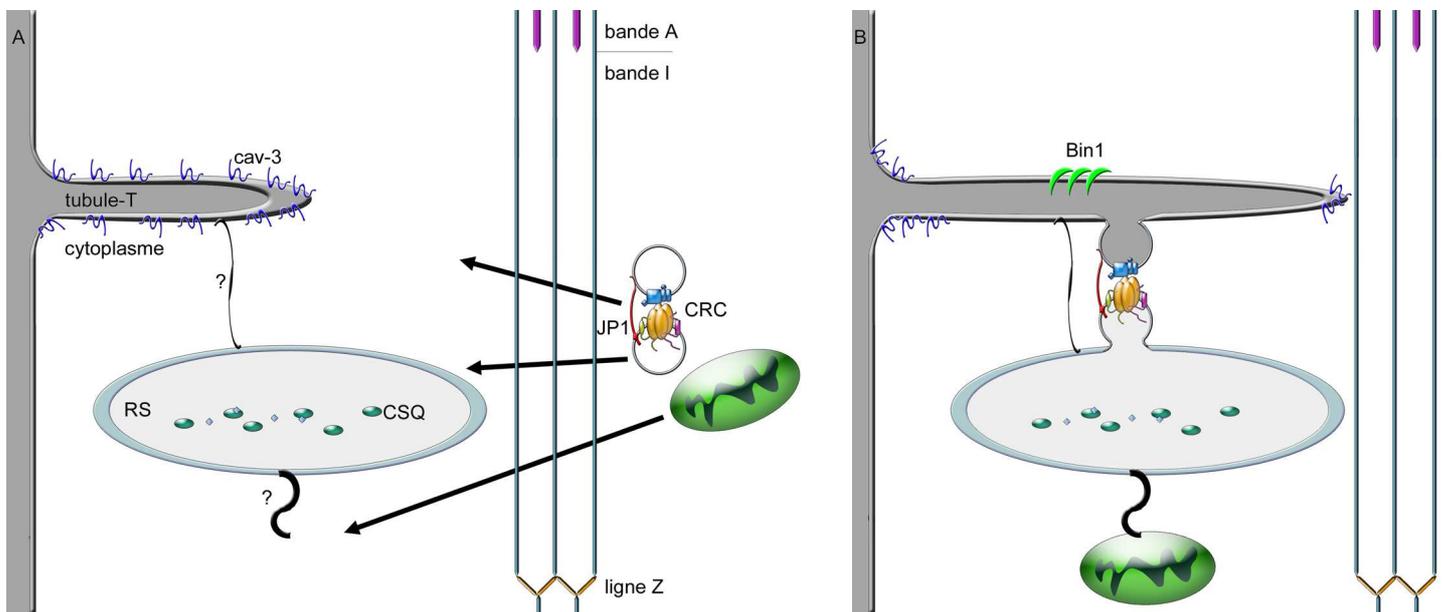


Figure 23: Séquence de formation des triades et de la mise en place des protéines. **A.** adressage d'un complexe préformé à la triade et migration d'une mitochondrie au niveau de la bande I vers le RS longitudinal. **B.** Situation finale chez l'adulte. Les membranes fusionnent et la mitochondrie est reliée au RS. Chez l'adulte la cavéoline est localisée aux extrémités du tubule-T: à son embouchure à la membrane plasmique et dans les parties arrondies. Bin1 est localisée dans les parties rectilignes du tubule-T. JP1: junctophiline-1, cav-3: cavéoline-3, CRC: complexe de relâchement du Ca^{2+} , CSQ: calséquestrine, ?: lien de nature inconnue.

La mise en place des protéines à la triade reste difficile à suivre. En microscopie électronique classique, le RyR est visible par ses « feet », les polymères de calséquestrine sont denses aux électrons, et le DHPR est visible par cryofracture. Les propriétés de ces protéines ont été utilisées pour suivre leur agencement dans le muscle cardiaque. Les diades sont formées d'abord en périphérie, puis ensuite à l'intérieur de la fibre (Franzini-Armstrong *et al.*, 2005). La calséquestrine est présente dans le RS de la triade préformée avant l'arrivée du RyR et du DHPR. Le RyR et le DHPR arrivent ensuite simultanément à la jonction préformée, où le complexe peut alors s'assembler (Figure 23 A). Il a été supposé que la junctophiline 1

permettait la préformation de la jonction en maintenant le RS jonctionnel proche de la membrane plasmique. Cependant, la présence de triades dans le KO junctophiline 1 remet en cause cette hypothèse. En outre, il a été montré récemment dans des cultures primaires de myotubes que les complexes RyR–triadine–junctine–junctophiline 1 seraient préformés puis adressés au RS jonctionnel (Cusimano *et al.*, 2009) (Figure 23 A).

La formation des triades implique de nombreuses protéines de la membrane plasmique, comme Bin 1 ou la cavéoline-3, ou du RS, comme la mitsugumine 29. Des animaux KO pour ces protéines ont été créés et tous présentent des perturbations de la tubulogénèse avec des conséquences sur la structure des triades chez l'adulte. Ainsi, les muscles de la souris KO cavéoline-3 présentent des triades mal orientées.

Bin1 (ou amphiphysine 2) est une protéine localisée le long du tubule-T chez l'adulte. Sa suppression chez la drosophile provoque un défaut majeur de la tubulogénèse qui résulte en une désorganisation du réseau de tubules-T chez l'adulte (Razzaq *et al.*, 2001).

Il en est de même pour la mitsugumine 29, une protéine du RS jonctionnel (Takeshima *et al.*, 1998b) qui a une interaction fonctionnelle avec le RyR (Pan *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2004). Les muscles de la souris KO mitsugumine 29 ont un réseau de RS longitudinal très appauvri et des triades mal orientées (Nishi *et al.*, 1999).

La présence des mitochondries à proximité des triades a été étudiée récemment au cours du développement par microscopie électronique sur des muscles de souris entre 15 jours post-natal (P15) et l'âge adulte (Boncompagni *et al.*, 2009). Il a été mis en évidence qu'à P15 les mitochondries se déplacent librement autour des myofibrilles, de préférence au niveau de la bande I, où il y a plus de place (Figure 23 A). Puis progressivement le nombre de mitochondries augmente et elles vont se stabiliser entre les triades, à l'interface des bandes A et I. Cette stabilisation serait due à la mise en place d'un lien dense aux électrons dont la quantité augmente en parallèle avec le nombre de mitochondries au cours du développement post-natal. Ce lien servirait à accrocher puis à stabiliser les mitochondries aux triades (Figure 23 B). Le nombre de mitochondries par paire de triades a été compté en microscopie électronique par surfaces de $100 \mu\text{m}^2$. Il est multiplié par 9 entre P15 jours et l'âge adulte.

IV. Objectifs de ce travail

Il subsiste encore de nombreuses questions, tant sur la mise en place des triades, que sur le fonctionnement du complexe de mobilisation du Ca^{2+} , et sur le rôle que la triadine pourrait y jouer. De façon globale, la fonction de la triadine reste mal comprise.

Les études réalisées par les autres équipes portent sur Trisk 95 dans le muscle squelettique et Trisk 32 dans le cœur, et uniquement dans le cadre de la régulation des relâchements de Ca^{2+} du RyR. L'objectif de notre équipe depuis plusieurs années est l'identification de la fonction de la triadine dans le muscle strié (squelettique en particulier). Mon travail de thèse se situe au carrefour de projets déjà entamés à mon arrivée (caractérisation de Trisk 95 et Trisk 51) et de nouveaux projets (caractérisation de Trisk 32 et de la souris KO triadine).

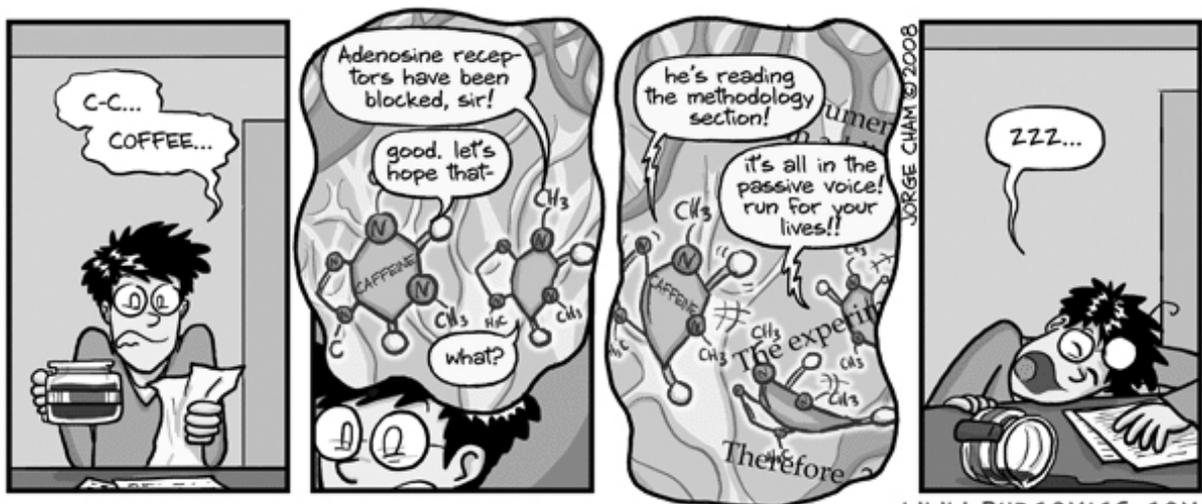
Dans ce contexte, j'ai complété une étude initiée par S. Vassilopoulos, en collaboration avec le laboratoire de Kevin Campbell (Iowa City, USA) portant sur l'association entre les triadines Trisk 95 et Trisk 51 et la cavéoline-3.

En parallèle, mon projet de thèse a porté plus particulièrement sur l'isoforme Trisk 32 et l'identification de sa fonction. Pour cela, j'ai recherché ses partenaires et j'ai étudié précisément sa localisation, notamment dans le muscle squelettique. J'ai poursuivi les travaux montrant l'interaction entre Trisk 32 et le récepteur de l' IP_3 , et j'ai mis en évidence l'association de ces deux protéines dans le tissu musculaire. Il était initialement prévu que je réalise la sur-expression de Trisk 32 dans des cultures primaires de myotubes de rat et dans des cultures primaires de souris KO triadine afin d'étudier la fonction du récepteur de l' IP_3 après modification de Trisk 32. Cependant la production des virus AdV-Trisk 32 indispensables pour cette étude ayant pris du retard je n'ai pas eu le temps de finir cette étude.

Une souris KO triadine a été créée au laboratoire. J'ai initié sa caractérisation afin de pouvoir ensuite étudier la fonction de chaque isoforme séparément. La souris KO triadine est arrivée au laboratoire en décembre 2007, au cours de ma seconde année de thèse. Mon projet a porté sur l'étude de la morphologie des muscles de cette souris (localisation des protéines du CRC par marquages immunofluorescents, étude ultrastructurale par microscopie électronique). J'ai également réalisé une étude fonctionnelle de ces souris en collaboration avec le laboratoire de L. Csernoch à Debrecen (Hongrie) où je suis restée un mois, et en collaboration avec le laboratoire de David Bendahan (Marseille).

Pendant ces trois années de thèse j'ai donc pu étudier la localisation, les partenaires et la fonction des isoformes de la triadine par des approches différentes et complémentaires sur des modèles allant de la lignée cellulaire à l'animal génétiquement modifié. Ce choix vaste de techniques et de modèles d'étude a permis de tester les hypothèses de travail émises au cours de ma thèse de la façon la plus appropriée possible.

MATERIEL & METHODES



JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

I. Matériel

A. Anticorps

Les anticorps primaires (Tableau 3) et secondaires (Tableau 4) utilisés au cours de cette étude sont listés dans les tableaux suivants. Certains d'entre eux ont été développés au laboratoire, notamment tous les anticorps anti-triadines (les séquences des peptides ayant permis l'immunisation sont précisées après le nom de l'anticorps).

Tableau 3: Anticorps primaires utilisés pour cette étude.

antigène	espèce	dilution IF	dilution WB	origine
Nter des triadines TEITAEGNASTTTTVIY	lapin		1/10 000	produit au laboratoire
Cter Trisk 32 isoforme de rat YGGPKRILDKKQI	lapin, cobaye	1/500, 1/200	1/10 000	produits au laboratoire
Cter Trisk 32 isoforme souris RRQQEVQRE	lapin	1/500	1/10 000	produit au laboratoire
Cter Trisk 49 isoforme de rat YSTTGKHS	Lapin	1/500		produit au laboratoire
Cter Trisk 51 YEQKKKSEAG	lapin, cobaye	1/500, 1/200	1/10 000	produit au laboratoire
Cter Trisk 95 YNPGKSNSPGQKQEQ	lapin, cobaye	1/500, 1/200	1/10 000	produit au laboratoire
RyR	lapin	1/500	1/10 000	produit au laboratoire
Cter du RyR	cobaye	1/200		produit au laboratoire
CSQ	souris	1/100	1/10 000	ABR Affinity BioReagent ref MA3-913
Nter α_1 s DHPR	lapin, cobaye		1/10 000, 1/5000	produit au laboratoire
α_1 s DHPR	souris	1/100	1/500	Abcam ref 2862
SERCA	lapin	1/100	1/10 00	Don du Dr. M.J. Moutin
Cavéoline-3	souris	1/500	1/1000	BD Biosciences ref 610420
IP ₃ R-III	souris	1/20	1/1000	BD biosciences ref 610312
FoF1 ATPase	lapin	1/100	1/10 000	Don du Pr J. Lunardi

Tableau 4: Anticorps secondaire couplés à un fluorochrome ou à la peroxydase

espèce cible	couplage	dilution IF	dilution WB	origine
cobaye	Alexa 546	1/500	x	Invitrogen ref 11074
cobaye	Alexa 488	1/500	x	Invitrogen ref 11073
lapin	HRP	x	1/1000	eBioscience ref 18-8816 (TrueBlot)
lapin	HRP	x	1/10 000	Jackson ImmunoResearch ref 111 035 144
lapin	Alexa 488	1/500	x	Invitrogen ref 11008
lapin	Alexa 546	1/500	x	Invitrogen ref 11010
souris	HRP	x	1/1000	eBioscience ref 18-8817 (TrueBlot)
souris	HRP	x	1/10 000	Jackson ImmunoResearch ref 115 036 072
souris	Alexa 488	1/500	x	Invitrogen ref 11029
souris	Alexa 546	1/500	x	Invitrogen ref 21133

B. Virus

Nous disposons d'adénovirus pour exprimer chacune des isoformes de la triadine clonée chez le rat dans des cultures cellulaires ou chez l'animal. Les adénovirus AdV-Trisk 95, AdV-Trisk 51, et AdV-DsRed ont été produits au Généthon (Evry, France) et l'AdV-Trisk 32 a été développé au service de production de vecteurs viraux de Nantes. L'ADNc est sous le contrôle du promoteur CMV dans toutes les constructions, de même pour la DsRed.

C. Cellules

1. Culture primaire de cellules satellites

Les muscles squelettiques des pattes arrières d'embryons de rat à 20 jours de développement embryonnaire, ou de souriceaux nouveaux-nés, sont prélevés, coupés en petits morceaux et incubés en Trypsine 30 min à 37°C. Après dissociation mécanique et centrifugation, les cellules sontensemencées à $1-3 \cdot 10^6$ cellules/ml dans des boîtes recouvertes de laminine, dans du milieu de prolifération (Ham's F10, 20% sérum de veau fœtal, 2% Ultrosor, 2% pénicilline – streptomycine). Une fois à confluence, les cellules sont différenciées dans du milieu de différenciation (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Glutamax Glucose 1 g/l, 5% sérum de cheval, 1% pénicilline-streptomycine) ou congelées dans du milieu cryoprotectant 90% FBS-10, 10% DMSO.

2. Culture de lignées cellulaires: la lignée L6

Les cellules L6 sont une lignée de myoblastes de rat immortalisés qui peuvent être différenciés en myotubes. Les ampoules de cellules congelées dans du DMSO sont rapidement décongelées au bain-marie à 37°C et directement versées dans 9 ml de milieu de culture (DMEM 4,5 g/l glucose, 20% FBS, 1% pénicilline-streptomycine) dans une boîte de 100 mm de diamètre. Après avoir laissé adhérer les cellules, le milieu est changé pour retirer le DMSO. Les cellules sont passées tous les 2 jours au moins au 1/10 pour les garder à faible confluence et éviter la formation de clones et les différenciations incontrôlées.

II. Méthodes

Les étapes des protocoles suivants pour lesquelles la température n'est pas précisée sont réalisées à température ambiante

A. Surexpression de protéines par infection virale

1. Infections de cellules en cultures

Les cellules peuvent être infectées adhérentes ou en suspension, ce qui est plus efficace. Les virus sont dilués dans du milieu de culture classique dans le cas d'infection de lignées cellulaires, ou dans du milieu de prolifération pour l'infection de cultures primaires. Pour la dilution des virus, on compte 40 à 200 virus/cellule (MOI 40 à MOI 200) selon les virus et le type d'expérience prévue avec les cellules infectées. Pour une infection avec plusieurs virus, le total des MOI de chaque virus doit être égale à celle qui aurait été utilisée pour une infection simple. Les cellules sont infectées avec des MOI élevées pour les expériences d'immunoprécipitation et avec des MOI plus faibles pour faire de l'imagerie calcique. Les virus dilués sont directement déposés sur les cellules lorsqu'elles sont adhérentes ou mélangés de façon homogène avec des cellules en suspension. Pour être remises en suspension, les cellules doivent être préalablement incubées en trypsine 5 min à 37°C puis centrifugées 5 min à 1000 rpm pour retirer la trypsine. Les cellules sont laissées en présence des particules infectieuses une journée puis le milieu est renouvelé après trois rinçages avec du PBS. Dans le cas d'infection de myoblastes, la différenciation en myotubes peut-être induite lors du changement de milieu. Il faut 3 à 5 jours pour permettre une bonne (sur)expression de la protéine en parallèle à une bonne différenciation des myoblastes.

Les virus sont utilisés dans une pièce de culture de niveau de sécurité 2 (P2). Tout au long de l'expérience, des précautions sont prises pour ne pas répandre les virus. Les virus sont inactivés par de l'eau de javel, donc tous les milieux et tout le matériel ayant été en contact avec les virus sont incubés en présence d'eau de javel pendant plusieurs heures.

2. Infection de muscle *in vivo*

Les expériences d'infection *in vivo* ont été réalisées par S. Vassilopoulos au laboratoire de Kevin Campbell à Iowa City selon le protocole suivant.

Des souriceaux C57/Bl6 de 3 jours sont anesthésiés au contact de la glace pendant quelques minutes. Les virus AdV-Trisk 95, AdV-Trisk 51 et AdV-DsRed dilués 10 fois dans une solution saline stérile 0,9% NaCl sont injectés en intramusculaire avec une seringue à insuline en 4 points différents. La patte contro-latérale subit une injection avec la solution saline seule. Les injections de 10 µl chacune sont réalisées dans la cuisse et le mollet. Les souriceaux sont ensuite replacés avec leur mère pendant 3 jours dans un compartiment réservé aux souris infectées puis replacés dans l'animalerie conventionnelle. Les souris sont sacrifiées 30 jours après l'injection de virus et les muscles du mollet et de la cuisse sont prélevés.

B. Coloration histologique à l'hématoxyline-éosine

Les colorations histologiques à l'hématoxline-éosine ont été réalisées par S. Vassilopoulos au laboratoire de K. Campbell dans le cadre de l'étude de la surexpression *in vivo* de la triadine.

Les coupes de muscle d'une épaisseur de 8 à 15 µm collectées sur des lames de microscope recouvertes de poly-L-Lysine sont fixées 5 min dans une solution de formaline 10% puis rincées 10 min à l'eau du robinet. Les coupes sont colorées dans une solution d'hématoxyline de Mayer pendant 1 min. Pour obtenir une coloration correcte, l'excès de colorant doit être éliminé de la coupe de muscle. Elles sont donc rincées par trente bains successifs d'eau distillée puis placées dans un bain d'alcool acide à 0,5% puis dans une solution alcaline (substitut d'eau de Scott) et dans une solution d'éthanol 80%. Les structures cytoplasmiques sont colorées avec une solution aqueuse d'éosine pendant exactement 20 s. Les coupes de muscle sont déshydratées par vingt bains successifs dans une solution d'éthanol 95%, 3 min d'incubation dans une solution d'éthanol 10% et trente bains de xylène. Les coupes sont finalement montées avec un milieu de montage résineux (Permount). Une coloration d'hématoxyline-éosine optimale permet d'obtenir une coloration bleu/noirâtre des noyaux et une coloration rouge/pourpre du cytoplasme.

C. Marquage immunofluorescent

1. Prélèvement et inclusion des muscles

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale ou asphyxie au CO₂, les rats sacrifiés par asphyxie au CO₂. Les muscles (muscle squelettique ou coeur) sont prélevés, congelés dans de l'isopentane refroidi à -80°C par de l'azote liquide, inclus dans du Tissu-tek (Microscopy Electron Sciences), puis stockés à -20°C. Les tissus musculaires sont ensuite coupés au cryomicrotome (épaisseur des coupes: 10 à 20 µm) et les coupes sont déposées sur des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine et stockée à -20°C après avoir été chauffées 30 min à 50°C pour favoriser l'adhérence des coupes sur la poly-L-Lysine.

2. Préparation de fibres dissociées

La préparation de fibres dissociées de Flexor Digitorum Brevis (FDB) est réalisée selon le protocole décrit par Sandrine Pouvreau (Pouvreau *et al.*, 2007).

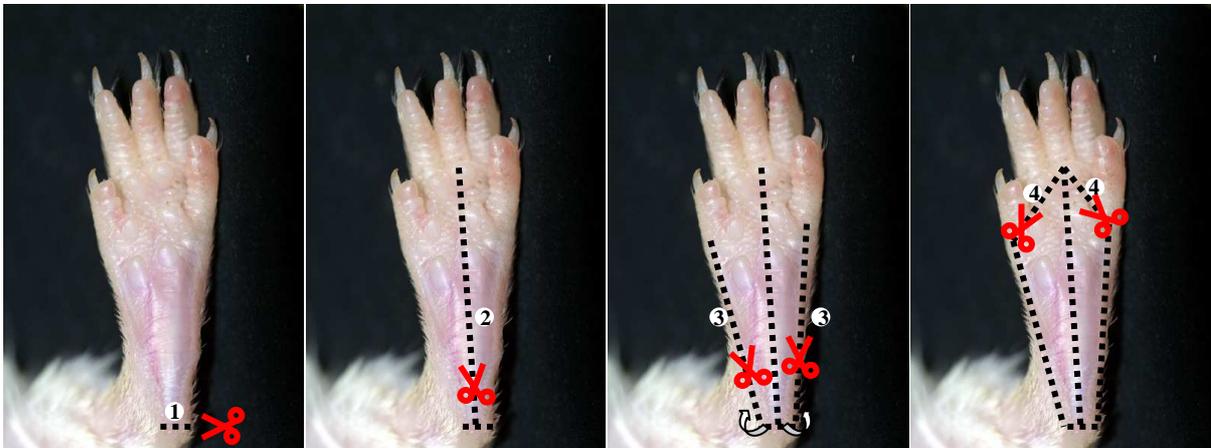


Figure 24: Prélèvement du FDB d'une patte de rat

Après sacrifice de l'animal, la patte est coupée au dessus du jarret au milieu de la cuisse puis immobilisée par des aiguilles sur un support dans du Ringer-Glucose (NaCl 136 mM, Hepes 10 mM, Glucose 10 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2,6 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 7,2) à 37°C. A partir d'une boutonnière réalisée au niveau du talon, la peau est coupée jusqu'à la base des doigts (Figure 24, 1) puis les parties latérales de la peau sont retirées (2 à 4). Le FDB est le muscle le plus superficiel de la plante de la patte. Après avoir coupé le tendon relié au talon,

le muscle est libéré par section des faisceaux à la base des doigts. Les muscles sont ensuite digérés par de la collagénase de type IA 2 mg/ml au bain-marie à 37°C pendant 30 à 45 min selon le poids de la souris (10 à 5 min de plus que le poids de la souris). Après un rinçage de 10 min dans un grand volume de Ringer-Glucose, les muscles sont stockés au moins 2 h à 4°C avant l'étape de dissociation mécanique consistant en une dizaine d'aspiration dans des cônes de 1 ml coupés de plus en plus fin. Les fibres ainsi dissociées sont ensuite déposées sur le support adéquat (lame de verre, boîte de pétri... selon utilisation) avec un revêtement de laminine permettant leur adhérence.

3. Marquage immunofluorescent

Les cellules ou les coupes de tissu sont fixées à la paraformaldéhyde 4% pendant 15 min ou au méthanol pendant 6 min à -20°C. Après 2 lavages au PBS, la membrane plasmique est perméabilisée au PBS-Triton X100 0,5% (1% pour le FDB) pendant 5 min (10-15 min pour le FDB, même après une fixation méthanol). Le blocage des sites de fixation non spécifiques est réalisé dans du tampon de saturation (sérum de chèvre 2%, BSA 0,5%, Triton X100 0,1%, PBS) durant 30 min. L'incubation avec les anticorps primaires est faite sur la nuit à 4°C ou 1-2 h à température ambiante. Après 3 lavages de 10 minutes au PBS-Triton 0,1%, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaire 45 min à 1 h. Les anticorps non fixés sont lavés 3 fois 10 min au PBS-Triton X100 0,1%. Les noyaux sont colorés au topopro3 dilué au 1/5000 dans le dernier lavage, puis après un rinçage au PBS, les lames sont montées avec du liquide montage. Les marquages sont observés au microscope confocal.

D. Microscopie électronique à transmission

Toutes les solutions (sauf les anticorps et les fixateurs) utilisées en microscopie électronique sont filtrées sur des tamis de 0,22 µm pour éliminer toutes les poussières, amas ou micro-organismes éventuels qui pourraient gêner l'observation.

1. Microscopie classique

a. Préparation de grilles pour l'ultramicrotomie

Les grilles 100 mesh CP (mesh: nombre de barreaux/grille, plus il y a de barreaux plus les carrés sont petits, CP: cuivre sur une face, palladium sur l'autre) sont lavées avec 25 ml d'éthanol pur dans un tube Falcon puis mises à sécher à l'étuve à 60°C sur du papier Watman. Vingt grilles sont ensuite déposées sur un film de Formvar flottant à la surface d'un ménisque d'eau distillée dans un cristalliseur.

Le film de Formvar est réalisé en lâchant une lame de verre dans un récipient contenant le Formvar et en la retirant lentement et régulièrement. Les trois arêtes de la lame sont grattées avec une lame de rasoir et les deux coins inférieurs sont coupés pour permettre au film de formavar de se désolidariser de la lame de verre en la plongeant dans l'eau avec un angle de 45°.

Les grilles sont récupérées en plongeant verticalement, sur le film de Formvar, une lame de verre recouverte d'une étiquette blanche (type étiquette de bureau). Le Formvar vient se coller sur la lame. Les grilles recouvertes de Formvar sont ensuite carbonées.

b. Coloration des compartiments en communication avec le milieu extracellulaire

La coloration a été adaptée à partir du protocole décrit par Galbiati et al. (2001). La souris est anesthésiée au pentobarbital et perfusée avec un fixateur (2% PFA, 0,2% Glutaraldéhyde, tampon phosphate 0,1 M), les muscles prélevés sont dilacérés en petits paquets de fibres. Après trois rinçages en tampon cacodylate, les fibres sont post-fixées en 2,5% glutaraldéhyde, 75 mM CaCl₂, tampon cacodylate 0,1 M, 2 h à 4°C. Le fixateur est rincé trois fois en tampon cacodylate puis les tubules transverses sont colorés avec 1% OsO₄, 0,4% K₃Fe(CN)₆ 2 h, à l'obscurité. L'excès est rincé une fois en tampon cacodylate puis quatre fois par de l'eau et le contraste est amélioré par une coloration à l'acétate d'uranyl 4% pH = 4 (2 h sur glace à l'obscurité). Les fibres sont ensuite incluses en résine Epon.

c. Immunomarquage à l'or en préinclusion

Les muscles sont prélevés sur une souris anesthésiée au pentobarbital et perfusée en intracardiaque avec du fixateur comme décrit dans le paragraphe précédent. Les muscles sont ensuite dilacérés pour obtenir des paquets d'une à trois fibres. La PFA est inactivée par de la glycine 50 mM diluée dans du PBS pendant 15 min. Les membranes sont ensuite perméabilisées pendant 30 min dans le tampon A (50 mM glycine, 0,5% BSA, 0,05% azide, 0,03% saponine, dans du PBS) et les fibres sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans ce même tampon à 4°C sur la nuit. Après trois lavages de 30 min dans le tampon A, les fibres sont incubées avec l'anticorps secondaire qui est un fragment F_{ab} , anti-espèce couplé à des nano-particules d'or de taille suffisamment petite pour permettre leur pénétration à travers la membrane perméabilisée (Nanogold® Gold-Antibody Conjugates, Nanoprobes). L'excédent et les particules fixées de façon non spécifiques sont éliminés par trois lavages dans le tampon A pendant 1 h. Les fibres sont rincées au PBS et le marquage est fixé en glutaraldéhyde 2% tampon phosphate 0,1 M pH = 7,2 durant 1 h. Après plusieurs lavages à l'eau, la taille des nano-particules d'or est augmentée par enrobage de couche d'argent pour permettre leur observation (HQ Silver™ enhancement kit, Nanoprobes). Les fibres sont de nouveau rincées à l'eau puis stockées pour la nuit dans du tampon phosphate à 4°C. Les fibres sont colorées le lendemain à l'obscurité 20 min sur glace avec du tetroxyde d'osmium 0,5% dilué dans du tampon phosphate. Après quatre lavages à l'eau les fibres sont colorées à l'acétate d'uranyl 1% pH = 4, dilué dans l'eau, à l'obscurité 15 à 20 min. Comme pour l'inclusion simple des tissus, les fibres sont ensuite déshydratées et incluses dans la résine puis coupées à l'ultramicrotome.

d. Inclusion des tissus en résine

L'inclusion des muscles en résine épon peut être précédée d'un immunomarquage à l'or en préinclusion ou d'une coloration des compartiments en communication avec le milieu extracellulaire. Les muscles sont prélevés après perfusion intracardiaque de fixateur (2% PFA, 0,2% Glutaraldéhyde, tampon Phosphate 0,1 M pH = 7,2) (tampon phosphate: mélange 81:19 de Na_2HPO_4 0,5 M, NaH_2PO_4 0,5 M dilué 5 fois dans de l'eau) sur une souris préalablement anesthésiée au pentobarbital. La fixation est achevée par une incubation de 2 h en glutaraldéhyde 2,5%, tampon cacodylate 0,1 M. Les muscles sont ensuite coupés en petits morceaux d'environ 1 mm³. Après trois lavages de 5 min en tampon cacodylate, les muscles

sont post-fixés et colorés au tetroxyde d'osmium (1% OsO₄, tampon cacodylate 0,1 M) 1 h sur glace. L'excès d'osmium est lavé dans du tampon cacodylate puis dans de l'eau et le tissu est coloré à l'acétate d'uranyl 1% pH = 4 sur la nuit à 4°C. Les muscles sont déshydratés par des bains d'alcool successifs de concentrations croissantes (30%, 60%, 90%, 3 x 100%). L'éthanol est ensuite substitué dans le muscle par de la résine epon par une incubation dans un mélange 50% ethanol -50% résine Epon. Le tissu est ensuite incubé et inclus en résine Epon pure. La polymérisation de la résine est réalisée pendant trois jours à 60°C.

e. Coupe et coloration

Les blocs de résine sont coupés en tranches ultrafines de 70 nm d'épaisseur à l'ultramicrotome. Une seconde étape de coloration à la suite de la coupe permet d'augmenter les contrastes. Les sections sont incubées dans de l'acétate d'uranyl 5% pH = 4 pendant 10 min à l'obscurité puis rincées à l'eau avant d'être réincubées dans du citrate de plomb 4%, NaOH 10 mM, 5 min à l'obscurité. Le citrate de plomb est rincé à l'eau.

2. Cryométhode

a. Congélation des tissus

Les souris sont anesthésiées et perfusées à la PFA 2%, glutaraldéhyde 0,2%, dans du tampon phosphate 0,1 M. Les muscles sont prélevés, découpés en petits morceaux d'1 mm³ et incubés dans du cryoprotecteur (2,3 M sucrose, 0,1 M tampon phosphate) pendant une nuit à 4°C sous agitation. Les muscles sont ensuite montés sur des clous de microscopie électronique en enlevant le maximum de sucrose avec du papier filtre. Le bloc clou-échantillon est congelé dans l'azote liquide en agitant pendant 15 s pour éviter la formation de cristaux.

b. Coupe des tissus congelés à l'ultramicrotome

La chambre de coupe, les couteaux et le bloc de tissu sont refroidis à -90°C à l'azote liquide pour la taille grossière (400 nm, 50 mm/s) des quatre côtés (couteau de tungstène) et de la face principale (couteau de verre). La température est ensuite abaissée à -115°C pour les coupes ultra fines (65 nm, 1 mm/s, couteau de diamant). Les coupes sont récupérées sur le

couteau avec un anneau retenant une goutte de méthyl cellulose–sucrose. Puis la goutte contenant la coupe est déposée sur la grille carbonée.

c. Immunomarquage à l'or

Les grilles sont déposées sur de la gélatine 2% côté coupe pour retirer la méthyl cellulose. La gélatine est chauffée à l'étuve (45-60°C) jusqu'à ce que les grilles soient bien mobiles à sa surface. Pour bien retirer toute la gélatine des grilles, elles sont incubées sur des gouttes de PBS–glycine 50 mM préalablement chauffée à l'étuve (sinon la gélatine se fige sur les grilles) trois à quatre fois 3 min (jusqu'à ce que les grilles soient bien mobiles sur la goutte de PBS-glycine). Les sites non spécifiques sont bloqués au PBS–BSA 10 mg/ml 15 à 20 min. Les coupes sont ensuite mises en présence de l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation pendant 20 à 60 min. Après trois lavages de 3 min en PBS-BSA 1 mg/ml, les coupes sont incubées 30 min avec la protéine-A couplée à des billes d'or de 70 nm diluée dans le tampon de lavage. L'excédent est éliminé par quatre lavages de 5 min en PBS. Le marquage est fixé 5 min par de la glutaraldéhyde 1% diluée dans du PBS. Après trois fois 3 min de lavage au PBS et dix lavages d'1 min à l'eau, les coupes sont rincées deux fois 5 s puis 10 min, sur glace et à l'obscurité, en méthyl cellulose 2% acétate d'uranyl 0,4%. L'excès de méthyl cellulose est absorbé sur du papier Watman.

E. Préparation d'échantillons pour la biochimie

1 Lyse de cellule

Les cellules en culture sont rincées 2 fois par du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} puis incubées 5 min à 37°C en présence de trypsine. Elles sont ensuite collectées et la trypsine est inactivée par un volume équivalent de milieu de culture. Les cellules sont centrifugées 10 min à 3000 rpm et resuspendues dans 120 à 300 μl de tampon de lyse hypo-osmotique NaCl 15 mM/EDTA 1 mM en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF 0,2 μM , DFP 1 mM). Elles sont ensuite soniquées dans ce même tampon dix fois 1 s pour casser l'ADN.

2. Homogénat total de tissu musculaire

Un morceau de muscle encore congelé est découpé le plus finement possible au scalpel. Le muscle découpé est ensuite broyé dans un tube Eppendorf dans un volume de 100 μ l de tampon de broyage (Sucrose 200 mM, HEPES 20 mM pH = 7,4, CaCl₂ 0,4 mM, inhibiteurs de protéases: DFP 100 μ M, PMSF 20 μ M). Le broyage est réalisé avec un petit potter adapté au tube Eppendorf, en environ trois fois vingt mouvements en rajoutant 100 μ l de tampon entre chaque série de vingt mouvements. Entre les séries l'homogénat est refroidi sur glace. La concentration de protéines membranaires est ensuite dosée par la méthode de Folin Lowry.

3. Préparation de microsomes

Les microsomes sont une préparation tissulaire enrichie en fragments membranaires. Environ 0,80g de muscle squelettique ou de cœur de rat encore congelés sont découpés très finement au scalpel puis broyés au Potter de Thomas dans trois fois 10 ml de tampon de broyage (Sucrose 200mM, HEPES 20mM pH = 7,4, CaCl₂ 0,4mM, inhibiteurs de protéases: DFP 100 μ M, PMSF 20 μ M). Une première centrifugation à basse vitesse permet d'éliminer les gros débris cellulaires et les noyaux (10 min à 1500 g). Le surnageant est ensuite centrifugé à haute vitesse (50 min à 41000 g) pour collecter les membranes. Le culot est repris dans 500 μ l de tampon de stockage (NaCl 0,1 M, imidazole 30 mM pH = 6,8, sucrose %, inhibiteurs de protéases: PMSF 0,2 μ M, DFP 1 mM), un aliquot est conservé pour réaliser un dosage de protéines par la méthode de Folin-Lowry. Les microsomes sont conservés dans l'azote liquide.

4. Dosage de protéines par la méthode de Folin Lowry

Une gamme de BSA de 0 à 80 μ g est réalisée à partir de BSA 1 mg/ml. La BSA est déposée dans des tubes à hémolyse, ainsi que 2 et 5 μ l de l'échantillon à doser. 10 μ l de SDS sont ajoutés puis 2,5 ml du mélange 1:1 EDTA-Cu²⁺ 0,05%, Na₂CO₃ 4% et NaOH 0,2 M. 125 μ l de réactif de Folin (Sigma-Aldrich ref F9252) sont ajoutés pour colorer les protéines. La réaction se développe pendant 45 min à l'obscurité et la DO est ensuite lue à 660 nm. La concentration des protéines est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe de la gamme passant par 0 suivant la formule: concentration = DO / pente de la droite.

F. Co-immunoprécipitation

1. Co-immunoprécipitation sur billes de sépharose-4B

Le principe de la co-immunoprécipitation est schématisé ci-dessous.

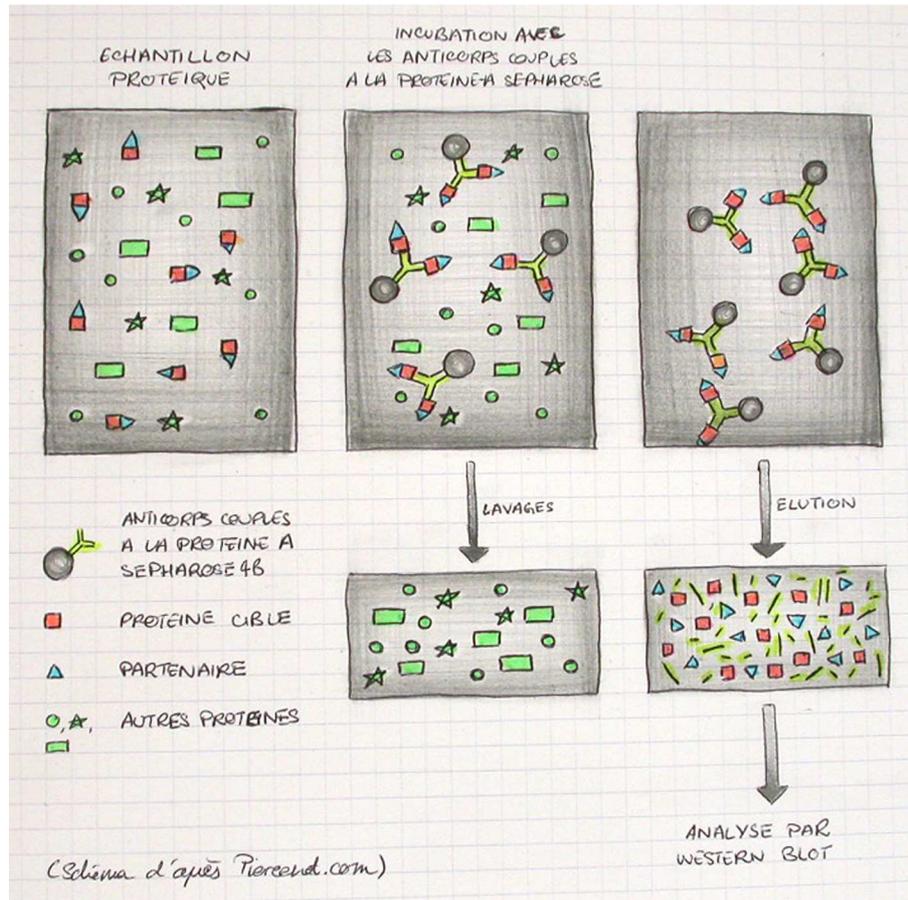


Figure 25: Représentation schématique du principe de co-immunoprécipitation

Pour chaque IP, 200 μg à 1 mg de protéines membranaires (microsomes, cellules) est solubilisés à 2 mg/ml dans du tampon de solubilisation (CHAPS 1,6%, lipides 1 mg/ml, Pipes 20 mM, CaCl_2 100 μM , EGTA 50 μM , NaCl 0,9 M, inhibiteurs de protéases). Après 45 min de solubilisation sur glace, on réalise une dilution au 1/3 avec du PBS et de l'eau en quantités égales. On utilise 10 mg de billes de protéine A-sépharose 4B (Sigma-Aldrich ref P3391) par immunoprécipitation. Le signal non spécifique est éliminé en incubant les protéines solubilisées avec de la sépharose 4B, 30 min sur glace, ainsi qu'en saturant les billes de protéine A-sépharose avec de la BSA (10 mg/ml). Après 2 h d'incubation des protéines solubilisées avec 10 μl d'anticorps ou de sérum pré-immun, la protéine A-sépharose est

ajoutée. Après 2 h d'incubation à 4°C sur agitateur, les billes sont lavées au PBS, centrifugées dans des tubes SpinX (Costar), puis incubées dans 25 µl de tampon de décrochage (glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 5%, SDS 2%, Tris base 385 mM, DTT 160 mM, bleu de Bromophénol) pendant 30 min, pour décrocher les protéines des anticorps et les anticorps de la protéine A. Les protéines sont dénaturées pendant 3 min à 100°C puis sont récupérées par centrifugation. Une seconde élution est réalisée avec 25 µl de tampon de décrochage pendant 15 min. La présence des protéines immunoprécipitées dans les échantillons est recherchée par Western blot.

Classiquement, il est impossible d'utiliser en Western blot des anticorps primaires provenant de la même espèce animale que les anticorps utilisés pour la co-immunoprécipitation. Les anticorps secondaires anti-espèce couplés à la peroxydase reconnaissant les anticorps utilisés en grande quantité pour l'immunoprécipitation, ce qui rend le Western blot totalement illisible et ininterprétable. Pour pallier ce problème et utiliser comme anticorps primaire en Western blot un anticorps provenant de la même espèce que l'anticorps utilisé pour réaliser l'immunoprécipitation, j'ai utilisé les anticorps secondaires du kit TrueBlot (Mouse TrueBlot™ ULTRA: Horseradish Peroxidase anti-mouse IgG et Rabbit IgG TrueBlot™ Set, eBioscience). Ces anticorps ne reconnaissent que les anticorps non dénaturés, c'est à dire les anticorps primaires utilisés pour le Western Blot, les anticorps utilisés pour les immunoprécipitations étant dénaturés au cours de l'élution.

2. Co-immunoprécipitation sur billes magnétiques pour la spectrométrie de masse

Les échantillons analysés par spectrométrie de masse doivent être dépourvus de contaminants pour éviter les résultats erronés. Pour cela des précautions sont prises tout au long de l'expérience. Trisk 32 a été immunoprécipitée avec des anticorps préalablement purifiés. Les anticorps ont été fixés sur une colonne de protéine-A non pas couplée à de la sépharose 4B mais à des billes magnétiques, qui n'ont pas besoin d'être saturées avec de la BSA. Les billes (60 µl) ont été préalablement incubées pendant 2 h sous agitation avec 300 µl d'anticorps polyclonaux purifiés dirigés contre Trisk 32. Puis 3 mg de microsomes de muscle squelettique ou de cœur de rat solubilisés ont été ajoutés, l'incubation dure 4 h à 4°C sous agitation. Pour soustraire le bruit de fond des protéines immunoprécipitées non spécifiquement de la liste des protéines identifiées dans l'immunoprécipitation, une

immunoprécipitation avec du serum pré-immun de lapin a également été criblée par spectrométrie de masse. L'élution a été faite avec 60 μ l de tampon de décrochage (glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 5%, SDS 2%, Tris base 385 mM, DTT 160 mM, bleu de Bromophénol), puis les protéines ont été dénaturées pendant 3 min à 100°C.

L'efficacité de l'immunoprécipitation a été vérifiée par Western blot sur une partie de l'éluat. Le reste de l'éluat a été déposé sur un gel gradient 4-12% de polyacrylamide. La migration électrophorétique a été faite sur une distance de 2 cm, en « pseudo-separating », ce qui permet de concentrer les protéines dans un minimum d'acrylamide. Cette migration peut parfois limiter la pénétration des très grosses protéines dans le gel. Celui-ci est ensuite coloré au bleu de Coomassie (Brilliant Blue R250, BioRad) puis les bandes colorées sont prélevées par découpe du gel. Sept bandes de gel sont prélevées sur les 2 cm de la migration. Ces bandes de gel contenant les protéines immunoprécipitées avec Trisk 32 subissent différentes étapes. Les protéines sont digérées avec de la trypsine pour générer des fragments de coupures suffisamment petits pour être identifiés par le spectromètre. La séquence de ces peptides est ensuite comparée à une base de donnée. L'expérimentateur décide de la taille des peptides à partir de laquelle le peptide identifié par le spectromètre est comparé à la base de donnée. Plus ce seuil est bas plus la comparaison avec la base de donnée est longue. On estime ensuite la probabilité de présence d'une protéine dans l'échantillon en fonction du nombre de peptides identifiés qui lui sont attribués. Plus ce nombre est grand plus la présence de la protéine dans l'échantillon est certaine.

G. Western Blot

Les protéines sont séparées par migration sur un gel gradient 5%-15% d'acrylamide à 40 mA, puis transférées sur membrane Immobilon P (Millipore) pendant 3 h à 0,5A dans du tampon de transfert (10% éthanol, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,025%) . Les membranes sont saturées 30 min dans du tampon de saturation PBS-Tween 20, 4% lait. Le pourcentage de Tween 20 dépend des anticorps utilisés: 0,1% pour les anticorps purifiés, 0,5% ou 0,3% pour les sérums non purifiés. Puis les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation. Après six lavages de 5 min par du PBS-Tween 20, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (HRP) pendant 3 h. Les membranes sont lavées trois fois 10 min dans

du PBS-Tween 2000 puis la révélation est faite avec un substrat chémiluminescent de la peroxydase (Perkin Elmer).

H. Souris invalidée pour le gène de la triadine

1. Construction de la souris KO triadine

Les souris KO triadine et triadine flox ont été réalisées à l'Institut Clinique de la Souris à Strasbourg (<http://www-mci.u-strasbg.fr>). Le vecteur a été réalisé de la façon suivante: le fragment de 1,2 kb comprenant l'exon 1 avec l'ATG et les segments homologues 5' de 3,7 kb et 3' de 3,3 kb ont été amplifiés par PCR puis clonés dans un vecteur contenant les sites LoxP et la cassette de résistance à la néomycine flanquée par des sites FRT pour excision ultérieure par la recombinaison FLP. La région codante et les jonctions ont été vérifiées par séquençage. La construction linéaire a été électroporée dans des cellules souches embryonnaires de souris 129S2/SvPas et après sélection, les clones cibles ont été identifiés par PCR avec des amorces externes et confirmés par Southern blot avec des sondes externes 3' et Neo. Trois clones positifs ont été obtenus. Un des clones a été microinjecté dans des blastocystes de souris C57BL/6J et les mâles chimériques ont été utilisés pour la transmission germinale. Pour obtenir des souris KO triadine total, les souris floxées hétérozygotes ont été croisées avec des souris CMV Cre^{+/+} exprimant la recombinaison Cre pour générer des souris KO triadine hétérozygotes (triadine^{+/-}). Ces souris ont ensuite été croisées pour obtenir des WT (triadine^{+/+}) et des KO (triadine^{-/-}) au sein d'une même portée.

2. Génotypage par PCR

La lignée est entretenue à partir de croisement de souris hétérozygote (triadine^{+/-}). Un double génotypage par PCR sur ADN génomique est réalisé sur les nouveaux nés par Julie Brocard au laboratoire. Pour toutes les expériences, on utilise des souris KO et WT provenant si possible d'une même portée.

I. Mesure de force musculaire

1. Mesure de force *in vivo*

a. Test d'agrippement

Les souris sont posées sur une grille. La grille est secouée pour provoquer un réflexe d'agrippement de la souris puis la grille est retournée. La force globale de la souris est évaluée par la mesure du temps qu'elle reste accrochée à la grille. Le test est arrêté au bout de 5 min si la souris n'est pas tombée.

b. Spéctrométrie-RMN

Ces expériences ont été réalisées par David Bendahan et Benoît Giannesini au CRMBM de Marseille sur 10 mâles KO et 10 mâles WT du même âge (5-6 mois).

i. Préparation des animaux

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane 4% dans 66% de N₂O et 33% d'O₂, anesthésie maintenue en continu toute la durée de l'expérience. Les pattes arrières sont rasées, et les animaux sont placés sur le dos dans un berceau équipé de deux électrodes transcutanées qui se logent sous le genou et sous le talon et qui sont connectées à un stimulateur électrique. Au sein du berceau, la patte gauche de la souris est attachée à un ergomètre composé d'une pédale reliée à un transducteur de force (Figure 26). La position de la pédale est ajustée de sorte que le gastrocnémien soit étiré passivement au repos et produise ainsi une force isométrique maximale en réponse à une stimulation supraliminaire (2-4 mA, 1,5 ms) redéfinie pour chaque animal. Deux antennes sont insérées dans le berceau: une pour le proton, une pour le phosphore (³¹P). La température corporelle est contrôlée par une boucle de régulation incluant une couverture chauffante électrique et un thermomètre rectal, reliés à une unité de contrôle de la température. Le berceau contenant la souris est inséré au centre de l'aimant de RMN.

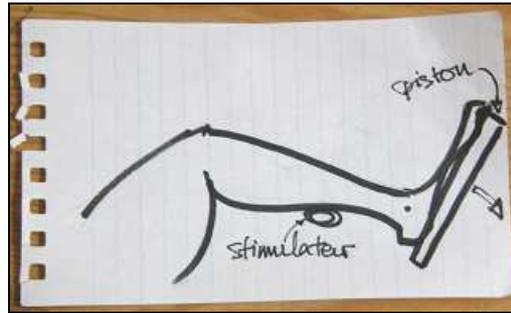


Figure 26 : Un électrostimulateur est placé sous la patte de la souris fixée à une pédale.

ii. Protocole de stimulation de la patte et mesure de force

Le protocole de stimulation transcutanée consiste en 6 min de contractions supraliminaires isométriques répétées à une fréquence de 1,7 Hz. La force isométrique est ensuite normalisée par le volume musculaire.

iii. Acquisition des images RMN et traitement

La mesure de force du gastrocnémien se déroule dans un aimant de RMN horizontal de 4,7 Tesla, il est possible de suivre le métabolisme du muscle en parallèle à la mesure de force (spectre ^{31}P). De plus, les groupes musculaires peuvent être identifiés par l'imagerie anatomique (imagerie proton). De l'imagerie fonctionnelle peut également être réalisée pour mettre en évidence les zones d'inflammation et d'infiltration par identification des composants eau/graisse/muscle. Pour l'imagerie, dix sections axiales sont réalisées, couvrant toute la région du genou à la cheville (1 mm d'épaisseur et espacées de 0,5 mm). Pour chaque section, le gastrocnémien est entouré manuellement pour mesurer sa surface puis son volume est calculé.

Le spectre du phosphore est réalisé avant chaque série de contraction. Ce spectre reflète le métabolisme musculaire grâce au suivi des variations de phosphocréatine (PCr), de phosphate inorganique (Pi), d'ATP et du pH intracellulaire (pHi). Les pics de PCr, de Pi et d'ATP sont identifiés informatiquement. Le pHi est calculé à partir du décalage du signal du Pi sur la PCr.

2 Mesure de force sur muscle isolé

Ces expériences ont été réalisées à Debrecen au département de Physiologie, au sein de l'équipe de L. Csernoch sur cinq femelles WT et six femelles KO de six mois.

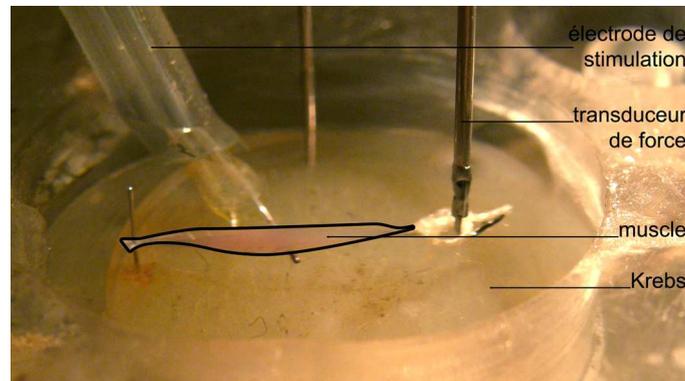


Figure 27: Photo d'un EDL de souris monté dans le système de mesure de force sur muscle isolé. Pour une meilleure lisibilité, le muscle est cerné de noir.

Les EDL ou les soleus sont disséqués et un nœud est attaché à l'une des extrémités du muscle (Figure 27). Le muscle est placé dans une chambre perfusée avec du Krebs (10 ml/min) (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 10 mM NaHCO₃; 10 mM Hepes pH = 7,2, température ambiante) où il est tendu entre une aiguille d'un côté et un tenseur de force accroché au nœud de l'autre côté. Deux électrodes de platine sont placées sous le muscle pour la stimulation électrique. Le muscle est ensuite étiré en ajustant la position du transducteur de force à la longueur à laquelle le muscle développe une force maximale pour une stimulation de 2 à 5 V pendant 1 ms à 1 Hz. Ces stimulations uniques permettent d'obtenir des contractions simples. Les tetanus sont déclenchés par des stimulations de 9 V à 200 Hz pendant 200 ms pour les EDL et 100 Hz pendant 500 ms pour le soleus. La fatigabilité du muscle est mise en évidence par une série de 150 tetani à une fréquence de 0,5 Hz. L'amplitude de chaque tetanus est normalisée par rapport à la plus grande amplitude de la série (en général le 1^{er} ou le 2nd tetanus) puis la courbe est tracée point par point en fonction de sa position dans la série.

RESULTATS

Partie I : Etude de la surexpression *in vivo* de Trisk 95 et Trisk 51

La fonction de Trisk 95 et de Trisk 51 a été étudiée par surexpression *in vivo* dans le muscle de souris. L'influence de cette surexpression sur les autres membres du complexe de mobilisation du Ca^{2+} a été caractérisée. Des conséquences de la surexpression sur la morphologie de la cellule et notamment sur la localisation de la cavéoline-3 ont été mises en évidence. Les résultats ainsi obtenus nous ont conduits à chercher une association de la cavéoline-3 avec les protéines du complexe de relâchement du Ca^{2+} .

Partie II : Caractérisation de Trisk 32

Trisk 32 est l'isoforme cardiaque de la triadine mais elle est également présente dans le muscle squelettique où elle n'a quasiment jamais été étudiée. J'ai donc étudié sa localisation et ses partenaires dans ce muscle strié en vue d'étudier ensuite sa fonction.

Partie III : Etude fonctionnelle de la triadine

Dans le but d'étudier la fonction de toute les isoformes de la triadine, une souris KO triadine a été créée au laboratoire. Avant son utilisation en routine comme modèle d'étude, j'ai débuté sa caractérisation par différentes méthodes complémentaires. Des études biochimiques, ultrastructurales et physiologiques sont ressortis un certain nombre d'indices quant à la fonction de la triadine dans le muscle squelettique.

Partie I : Etude de la surexpression in vivo de Trisk 95 et de Trisk 51

Les fonctions de Trisk 95 et Trisk 51 ont jusqu'à présent été étudiées sur des modèles cellulaires avec des surexpressions aiguës à court terme (Rezgui *et al.*, 2005). Dans le cadre d'une étude plus physiologique de la fonction de la triadine, elle a été surexprimée *in vivo*, de façon chronique, dans le muscle squelettique de souris. La caractérisation histologique de ces muscles ainsi que leur étude par marquages immunofluorescents a été réalisée par S. Vassilopoulos au cours de sa thèse au laboratoire en collaboration avec K. Campbell (Iowa City, USA). J'ai poursuivi ce travail par la quantification des protéines impliquées dans le couplage-EC dans les muscles infectés puis par la caractérisation de l'association caveolin-3-complexe de relâchement du Ca^{2+} dans le muscle normal. Ces différents résultats font l'objet d'un article qui sera prochainement soumis à publication et dont le manuscrit est inséré en annexe.

A. Infection de muscles de souris

La surexpression de la triadine a été effectuée par injection des adénovirus codant pour Trisk 95 et Trisk 51 (AdV-Trisk 95, AdV-Trisk 51). Le contrôle est un adénovirus codant pour la protéine fluorescente rouge, la DsRed (AdV-DsRed). Ces virus ont été injectés dans différents groupes musculaires de pattes de souris âgées de trois jours. Trente jours après l'infection, les muscles ont été prélevés.

B. Surexpression de la triadine et niveau d'expression des protéines du RS

J'ai évalué par Western blot l'efficacité de la surexpression de la triadine, ainsi que les niveaux d'expression des protéines du RS dans des muscles infectés avec AdV-Trisk 95, AdV-Trisk 51 ou le virus contrôle AdV-DsRed (Figure 28). La surexpression des triadines a été visualisée avec un anticorps anti-N-terminal qui reconnaît les trois isoformes par leur partie commune et permet de les quantifier les unes par rapport aux autres. Le niveau d'expression de chaque protéine a été normalisé par rapport à celui de la chaîne lourde de la myosine, visualisée par coloration des membranes au bleu de Coomassie (Tableau 5). Globalement, dans le muscle total infecté par AdV-Trisk 95 ou AdV-Trisk 51 respectivement, chaque isoforme est surexprimée d'un facteur 1,6 par rapport au contrôle, les autres protéines restant approximativement à leur niveau initial.

Cependant avec ce type d'expérience sur muscle entier, seule l'expression globale des différentes protéines est visible, le signal des fibres infectées étant moyenné par le signal des fibres non infectées. Il est ainsi fort probable que la surexpression de la triadine dans les fibres infectées soit en réalité bien supérieure à 1,6 et que les autres protéines du RS présentent des variations dans les fibres infectées indétectables en Western blot sur muscle entier.



Figure 28: Niveau d'expression des protéines du RS dans les muscles gastrocnémiens surexprimant Trisk 95 ou Trisk 51. 20 µg de microsomes de gastrocnémien de souris infecté pendant 30 jours avec les virus AdV-Trisk 95 (T95), AdV-Trisk 51 (T51) ou avec le virus contrôle AdV-DsRed (DsRed) ont été déposés sur gel d'acrylamide. Les anticorps anti-RyR, anti sous-unité α_{1s} du DHPR, anti calcium ATPase et anti-calséquestrine ont été utilisés. Les expressions de Trisk 95 et Trisk 51 sont visualisées grâce à l'utilisation de l'anticorps anti-N-terminal.

Tableau 5: Quantification de l'expression des protéines du RS dans les muscles infectés.

	Inf AdV-Trisk 95	inf. AdV-Trisk 51	Inf. AdV-DsRed
RyR	0,92	0,97	1
DHPR	0,95	0,93	1
SERCA	0,98	1,1	1
Trisk 95	1,6	0,96	1
Trisk 51	1,04	1,6	1
CSQ	1,06	0,94	1

C. Localisation des protéines du complexe de relâchement du Ca^{2+} dans les fibres infectées

Pour s'affranchir du moyennage du signal en Western blot des fibres infectées par les fibres non infectées, et pour évaluer les effets de la surexpression de Trisk 95 et de Trisk 51 sur la localisation des autres protéines du complexe de relâchement du calcium, S. Vassilopoulos a réalisé des marquages immunofluorescents de ces protéines sur coupes

transversales de muscle squelettique. Les fibres non infectées servent alors de contrôle interne.

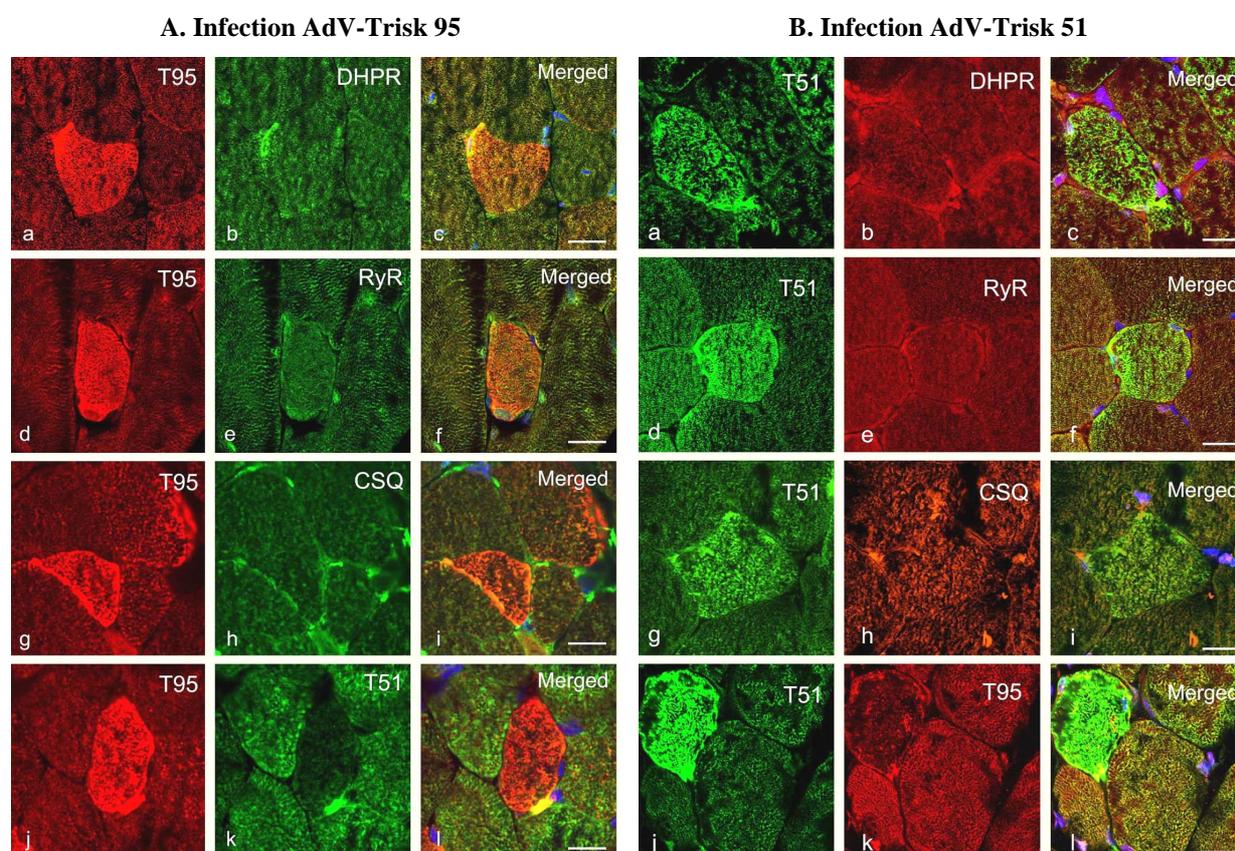


Figure 29: Localisation des protéines du complexe de relâchement du calcium dans les fibres surexprimant Trisk 95 ou Trisk 51. Double marquage immunofluorescent sur des coupes transversales de muscles infectés avec AdV-Trisk 95 (A) ou AdV-Trisk 51 (B) observées au microscope confocal. Des anticorps anti RyR (e), α_{1s} du DHPR (b) et calséquestrine (h) ont été utilisés. Les triadines ont été visualisées avec (A) des anticorps anti-Trisk 95 (a, d, g, j) et Trisk 51 (k) et (B) Des anticorps anti-Trisk 51 (a, d, g, j) et Trisk 95 (k). La triadine surexprimée est en rouge et ses partenaires en vert. Barre d'échelle: 15 μ m.

Dans ces cellules qui surexpriment Trisk 95 (Figure 29 A), l'intensité de la fluorescence de Trisk 51 est plus faible que dans les cellules environnantes non infectées (Figure 29 A, k). Cette baisse d'expression n'est pas suffisamment importante pour être visible en Western blot et doit donc être inférieure au facteur de surexpression de Trisk 95 (car on voit la surexpression de Trisk 95 en Western blot). La surexpression de Trisk 95 est donc compensée par la baisse de Trisk 51, mais pas dans un rapport 1:1.

Concernant les autres protéines du complexe de relâchement du calcium, dans les fibres infectées avec AdV-Trisk 95 par comparaison avec les fibres contrôles environnantes, aucune modification d'intensité ou de localisation n'est visible sur les marquages du DHPR (Figure 29, A, b), et de la calséquestrine (h). Le RyR a toutefois un marquage différent dans la fibre

qui surexprime Trisk 95 par rapport aux fibres environnantes. La surexpression de Trisk 95 modifie donc le niveau d'expression de Trisk 51 et pourrait également avoir une influence sur le RyR.

Dans les fibres qui surexpriment Trisk 51, on peut constater une baisse de l'expression de Trisk 95 (Figure 29 B, k), tandis que le marquage des autres partenaires de la triadine dans les fibres infectées avec Trisk 51 est indifférentiable des fibres contrôles ((Figure 29 B, b, e, h). La surexpression de Trisk 51, à la différence de celle de Trisk 95, ne semble pas affecter le RyR.

D. Etude histologique des fibres surexprimant la triadine

Les conséquences anatomo-pathologiques de la surexpression de Trisk 95 et de Trisk 51 ont été étudiées par coloration histologique à l'hématoxyline-éosine sur coupes transversales de gastrocnémien (Figure 30). Les fibres musculaires sont colorées en rouge, les noyaux en bleu et le tissu interstitiel est en blanc. Les signes d'inflammation dus à l'infection sont visibles pendant deux semaines puis disparaissent. Les muscles infectés sont alors indistingables des muscles ayant reçu des injections de solution saline. Trente jours après infection, il n'y a donc aucun signe d'inflammation visible. On peut noter la présence de tissu interstitiel dans les muscles infectés, des fibres atrophiées (astérisque), nécrotiques (tête de flèche) et en régénération (flèches). Les muscles infectés avec AdV-Trisk 51 (Figure 30, c) ont plus de fibres nécrotiques que les muscles infectés avec AdV-Trisk 95 (Figure 30 b). Le défaut majeur des muscles infectés avec AdV-Trisk 51 est la perte de contact des fibres entre elles et leur forme arrondie.

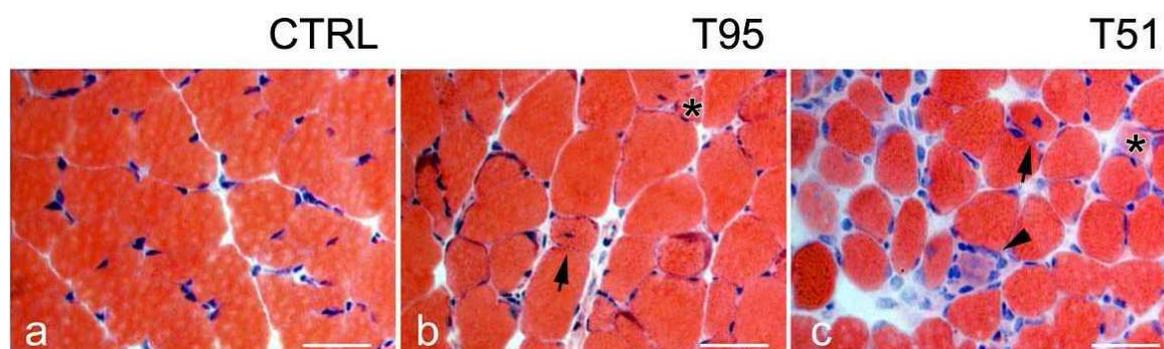


Figure 30: Coloration à l'hématoxyline-éosine des muscles infectés avec les virus AdV-Trisk 95 et AdV-Trisk 51 30 jours après infection. Les fibres sont colorées en rouge et les noyaux en bleu. Des infiltrations de tissu fibreux (blanc) sont observables dans les muscles infectés avec AdV-Trisk 51. Astérisque: fibres atrophiées; tête de flèche: fibre nécrotique; flèche: fibre en régénération. Barre d'échelle: 50 μ m.

E. Morphologie cellulaire

L'étude histologique ne donne qu'une vue globale de l'atteinte musculaire, or, d'après les marquages immunofluorescents, l'infection n'a pas touché toutes les fibres du muscle. Pour déterminer si les modifications de forme, de taille et les centralisations nucléaires observées en coloration histologique atteignent spécifiquement les fibres infectées, S. Vassilopoulos a réalisé un marquage immunofluorescent de la membrane plasmique des muscles infectés.

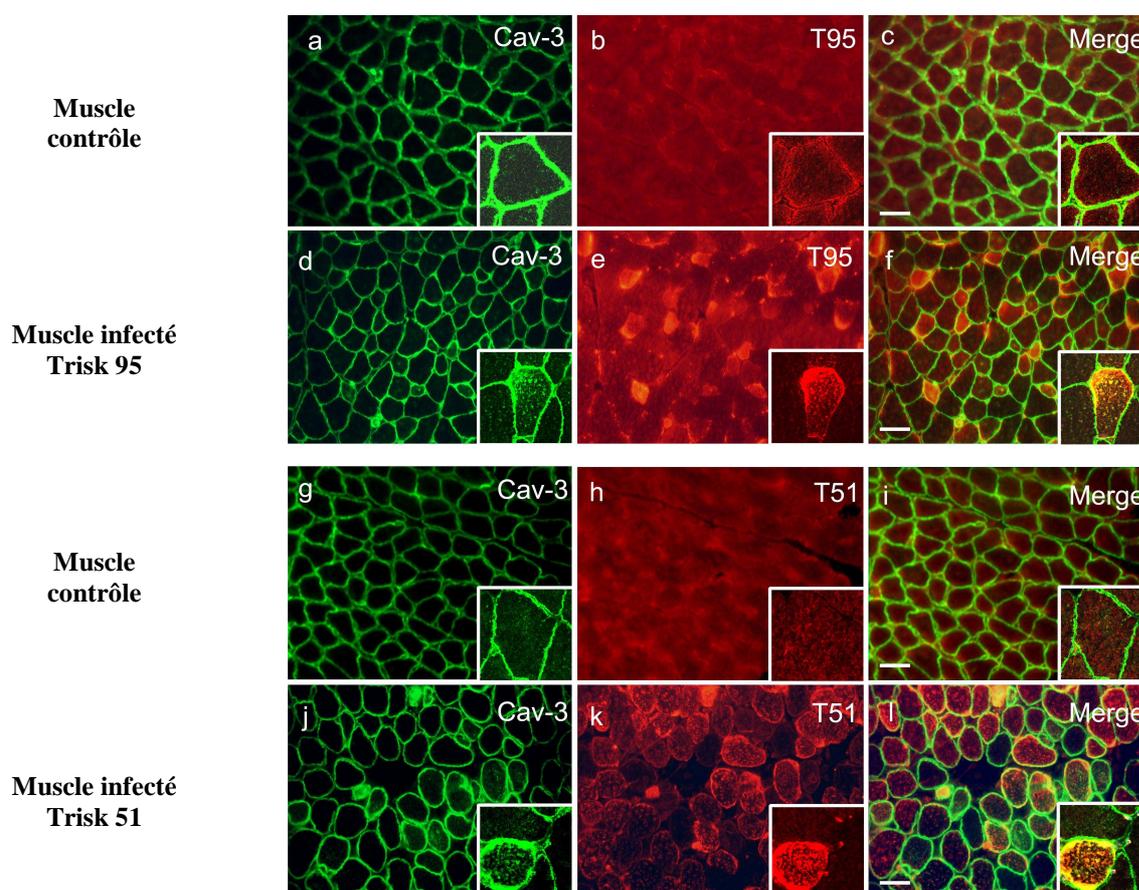


Figure 31. Modification du motif d'expression de la cavéoline-3 dans les fibres surexprimant la triadine. Double marquage immunofluorescent de la triadine et de la cavéoline-3 sur des coupes transversales de gastrocnémien infecté avec AdV-DsRed (a, b, c, g, h, i), AdV-Trisk 95 (d, e, f) ou AdV-Trisk 51 (j, k, l) observé au microscope confocal. Trisk 95 et Trisk 51 sont en rouge et la cavéoline-3 en vert. Barre d'échelle: 40 μ m.

Les fibres infectées ont été identifiées par un marquage avec des anticorps anti-Trisk 95 ou Trisk 51 (Figure 31, en rouge) et leurs tailles ainsi que leurs morphologies ont été visualisées grâce au marquage d'une protéine de la membrane plasmique, la cavéoline-3 (Figure 31 en vert). La taille des fibres dans le muscle infecté avec AdV-Trisk 95 (Figure 31, d, e, f) est moins homogène que dans le muscle contrôle (Figure 31, a, b, c). Il apparaît que beaucoup de

fibres qui surexpriment Trisk 95 sont plus petites que les fibres contrôles avoisinantes. Les fibres infectées avec Trisk 51, quant à elles, sont plus rondes et subissent une perte de contact avec les cellules voisines (Figure 31, j, k, l). Le trait le plus marquant est la modification du marquage de la cavéoline-3 uniquement dans les cellules qui surexpriment la triadine. D'une part le marquage de la cavéoline-3 intracellulaire est beaucoup plus intense dans les fibres infectées que dans les fibres non infectées, d'autre part, il semble recouper le marquage de la triadine.

La cavéoline-3 est impliquée dans la différenciation des cellules satellites en myotubes. Pour savoir si l'effet observé sur la cavéoline-3 est la conséquence d'une régénération cellulaire, les noyaux ont été marqués au Hoechst. Aucune centralisation nucléaire n'a été observée dans les fibres infectées. Toutes ces caractéristiques n'ont jamais été observées dans les muscles infectés avec AdV-DsRed et ne sont donc pas dues à l'infection en elle-même.

L'augmentation de l'intensité du marquage de la cavéoline-3 et la modification de sa localisation dans les fibres surexprimant la triadine peuvent être dues à une surexpression de la cavéoline-3 suivie d'une relocalisation. J'ai testé cette hypothèse par Western blot sur muscles infectés avec AdV-Trisk 95, AdV-Trisk 51 ou avec le virus contrôle AdV-DsRed (Figure 32). La quantification du niveau d'expression de la cavéoline-3 par rapport à la chaîne lourde de la myosine indique que la cavéoline-3 n'est pas modifiée dans les muscles infectés ou du moins pas suffisamment pour être détectable en Western blot. Comme aucune variation n'est donc visible en Western blot, il n'est pas possible de déterminer si la présence de la cavéoline-3 à l'intérieur des fibres qui surexpriment la triadine est due à une relocalisation simple ou à une surexpression suivie d'une relocalisation.

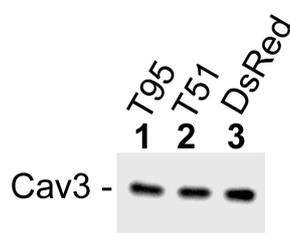


Figure 32 :L'expression de la cavéoline-3 dans le muscle n'est pas modifiée par la surexpression de la triadine. L'expression de la cavéoline-3 a été analysée par Western blot sur des microsomes de gastrocnémien de souris infecté avec AdV-Trisk 95 (T95), AdV-Trisk 51 (T51) ou avec AdV-DsRed (DsRed). 5 µg de microsomes ont été déposés dans chaque puits.

F. Interaction des protéines du complexe de relâchement du Ca²⁺ avec la cavéoline-3

La présence de cavéoline-3 à l'intérieur des fibres musculaires qui surexpriment la triadine suite à l'injection des AdV-Trisk 95 et Trisk 51 suggère que la triadine pourrait être associée avec la cavéoline-3. Dans le but de tester l'interaction entre Trisk 95, Trisk 51, Trisk 32 et la cavéoline-3, j'ai réalisé différentes expériences de co-immunoprécipitation sur des microsomes de muscles squelettiques de rat et de souris non infectés avec les adénovirus.

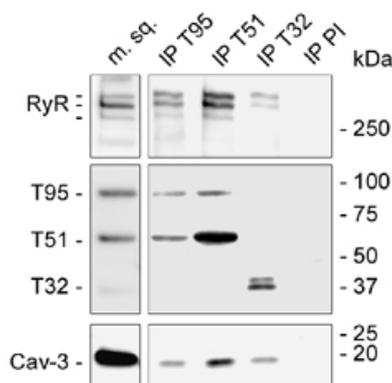


Figure 33: Interaction entre le complexe de relâchement du Ca²⁺ et la cavéoline-3. Immunoprécipitations de Trisk 95 (IP T95), Trisk 51 (IP T51), Trisk 32 (IP T32) et contrôle avec du sérum pré-immun (IP PI) sur des microsomes de muscle squelettique de rat. L'efficacité de l'immunoprécipitation ainsi que la présence du RyR et de la cavéoline-3 co-immunoprécipités ont été testés par western blot avec un mélange d'anticorps spécifiques de chaque triadine, des anti-RyR et un anticorps monoclonal anti-cavoline-3. Contrôle positif: 10 µg de microsomes de muscle squelettique de rat (m.sq.).

L'association de la triadine avec la cavéoline-3 a tout d'abord été testée par immunoprécipitation de Trisk 95 (Figure 33, IP T95), Trisk 51 (IP T51) et Trisk 32 (IP T32) sur microsomes de muscle squelettique de rat. Un sérum pré-immun a également été utilisé comme contrôle négatif (IP PI). La cavéoline-3 est présente dans ces trois immunoprécipitations et elle est invisible dans l'immunoprécipitation réalisée avec le sérum pré-immun. Elle interagit donc avec les trois isoformes de la triadine.

Le RyR est également présent dans les immunoprécipitations. Son interaction avec Trisk 95 et Trisk 51 a été publiée précédemment (Vassilopoulos *et al.*, 2005), et son interaction avec Trisk 32 sera développée en partie II de ce manuscrit.

Cependant, il a été montré que le RyR est associé avec le DHPR (Marty *et al.*, 1994) et le DHPR avec la cavéoline-3 (Balijepalli *et al.*, 2006). L'expérience précédente ne permet donc pas de discriminer quelle protéine entre le DHPR, le RyR ou les triadines est associée avec la

cavéoline-3. Pour savoir si l'interaction de la triadine avec la cavéoline-3 passe par le DHPR, une immunoprécipitation du DHPR a été réalisée (Figure 34). L'immunoprécipitation du DHPR entraîne le RyR et la cavéoline-3 (IP DHPR) mais pas les triadines. Les immunoprécipitations des triadines Trisk 95 et Trisk 51 entraînent le RyR et la cavéoline-3 comme présenté en Figure 34, mais ne permettent pas de co-immunoprécipiter le DHPR (Figure 34, IP T95 et IP T51). Donc la cavéoline-3 co-immunoprécipitée avec la triadine n'est pas entraînée par le DHPR et, inversement, l'association du DHPR avec la cavéoline-3 ne passe pas par les triadines. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de déterminer si la cavéoline-3 est directement liée à la triadine, ou si l'association triadine-cavéoline-3 passe par le RyR.

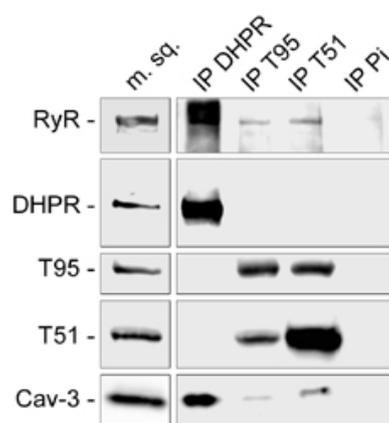
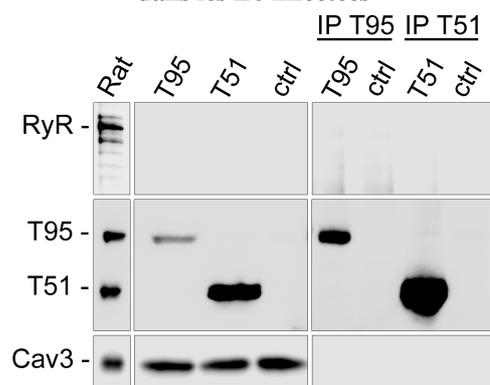


Figure 34: L'association de la triadine avec la cavéoline-3 ne dépend pas du DHPR. Immunoprécipitation du DHPR (IP DHPR), de Trisk 95 (IP T95), Trisk 51 (IP T51) et contrôle avec du sérum pré-immun (IP Pi) sur des microsomes de muscle squelettique de rat. L'efficacité de l'immunoprécipitation ainsi que la présence du DHPR, RyR et de la cavéoline-3 co-immunoprécipités ont été testés par Western blot. Contrôle positif: 10 μ g de microsomes de muscle squelettique de rat (m. sq.).

Pour répondre à cette question et s'affranchir de la présence du RyR, la triadine a été exprimée par infection virale dans des L6 non différenciées, et des immunoprécipitations ont été réalisées sur les cellules infectées (Figure 35). Les cellules L6 sont une lignée de cellules musculaires squelettiques qui, au stade myoblaste, donc indifférencié, n'expriment pas le RyR mais expriment la cavéoline-3 de façon endogène, comme le montrent les contrôles des infections avec Trisk 95 (Figure 35 A, T95) ou Trisk 51 (T51) ou sans infection (ctrl). Dans ces cellules musculaires indifférenciées, les immunoprécipitations de Trisk 95 et Trisk 51 (IP T95, IP T51) ne permettent pas de co-immunoprécipiter la cavéoline-3. Ainsi, dans des cellules musculaires indifférenciées qui n'expriment pas le RyR, la caveoline-3 n'est pas associée avec ces triadines.

Dans le muscle *in vivo*, Trisk 95 et Trisk 51 sont toutes deux associées dans le complexe de relâchement du calcium. Il est donc envisageable que la présence des deux triadines soit nécessaire pour l'association avec la cavéoline-3. Elles ont donc été exprimées ensemble par co-infection dans la lignée L6 puis immunoprécipitées (Figure 35 B). Les deux triadines sont bien co-immunoprécipitées l'une par l'autre, cependant la cavéoline n'est pas co-immunoprécipitée. La formation d'un complexe Trisk 95/Trisk 51 n'est donc pas la condition pour l'association de la triadine avec la cavéoline-3.

A. Immunoprécipitations de Trisk 95 et Trisk 51 dans les L6 infectées



B. Immunoprécipitations de Trisk 95 et Trisk 51 dans des L6 exprimant les deux isoformes

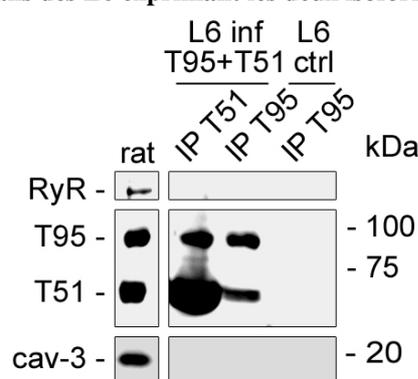


Figure 35: Trisk 95 et Trisk 51 ne sont pas associées directement avec la cavéoline-3. **A.** Vérification de l'infection des cellules L6 et des immunoprécipitations par Western blot. Les cellules sont infectées avec les AdV-Trisk 95 (T95) ou AdV-Trisk 51 (T51) ou ne sont pas infectées (ctrl). 60 µg de lysat cellulaire ont été déposés. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec les anticorps anti-Trisk 95 (IP T95) ou anti-Trisk 51 (IP T51). Contrôle positif: 10 µg de microsomes de muscle squelettique de rat. **B.** Immunoprécipitations de Trisk 95 (IP T95) et de Trisk 51 (IP T51) sur des cellules L6 infectées avec AdV-Trisk 95 et AdV-Trisk 51. Contrôle positif: 10 µg de microsomes de muscle squelettique de rat.

Le résultat précédent montre qu'en l'absence de RyR, Trisk 95 et Trisk 51 ne sont pas associées avec la cavéoline-3, ce qui suggère que l'interaction de la triadine avec la cavéoline-3 dans le muscle squelettique dépend du RyR. Pour tester l'interaction du RyR avec la cavéoline-3 dans un contexte où la triadine est absente, le RyR a été immunoprécipité dans des microsomes de souris KO triadine (décrite en Partie III) (Figure 36). Comme dans le muscle de souris sauvage (WT), la cavéoline-3 est co-immunoprécipitée avec le RyR dans le muscle KO triadine. Ceci indique que l'interaction RyR-cavéoline-3 ne nécessite pas de triadine et pourrait être directe. De manière surprenante, dans le muscle KO triadine, il y a plus de cavéoline-3 dans le contrôle et dans la co-immunoprécipitation que dans les microsomes de muscle WT et ce pour une quantité de RyR immunoprécipitée qui semble inférieure dans le muscle KO.

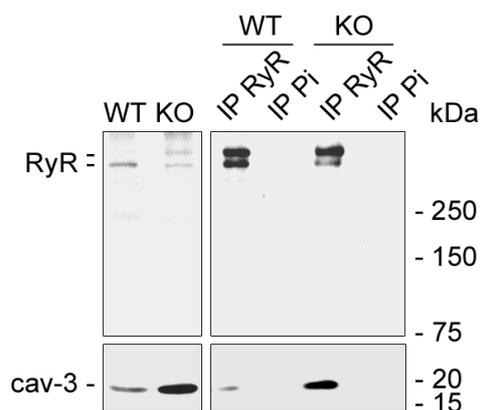


Figure 36: La cavéoline-3 est associée avec le RyR. Immunoprécipitations réalisées avec des anticorps polyclonaux anti-RyR (IP RyR) ou avec du sérum pré-immun de lapin (IP Pi) dans des microsomes de muscles de souris WT ou KO triadine. L'efficacité de l'immunoprécipitation et la présence de la cavéoline-3 co-immunoprécipitée ont été testées par Western blot. Contrôles: 7 μ g de protéines de muscle WT ou KO triadine.

Ces résultats impliquent que la cavéoline-3, décrite comme une protéine de la membrane plasmique, pourrait également être présente dans le RS. Des travaux récents ont montré la présence de cavéoline-3 dans des préparations de vésicules de RS (Li *et al.*, 2006), cependant elle n'a jamais été montrée distinctement dans le RS du muscle squelettique intègre. Pour clarifier cette situation, un immunomarquage à l'or de la cavéoline-3 a été effectué sur coupe longitudinale de muscle squelettique puis observé au microscope électronique (Figure 37). J'ai choisi d'utiliser une technique de marquage en pré-inclusion qui permet de conserver une belle morphologie bien lisible en plus du marquage. Cette technique a été utilisée notamment pour montrer la localisation de la cavéoline-3 dans les tubules-T dans le muscle de souris adulte (Ralston & Ploug, 1999). La cavéoline-3 est bien visible sous la membrane plasmique, dans les cavéoles (Figure 37 A). Le marquage observé dans les triades est faible par rapport au marquage membranaire mais néanmoins présent (Figure 37 B, C, D, E). Il semble donc qu'il puisse y avoir de la cavéoline-3 dans le RS. Toutefois, ce résultat demande à être confirmé par des expériences complémentaires.

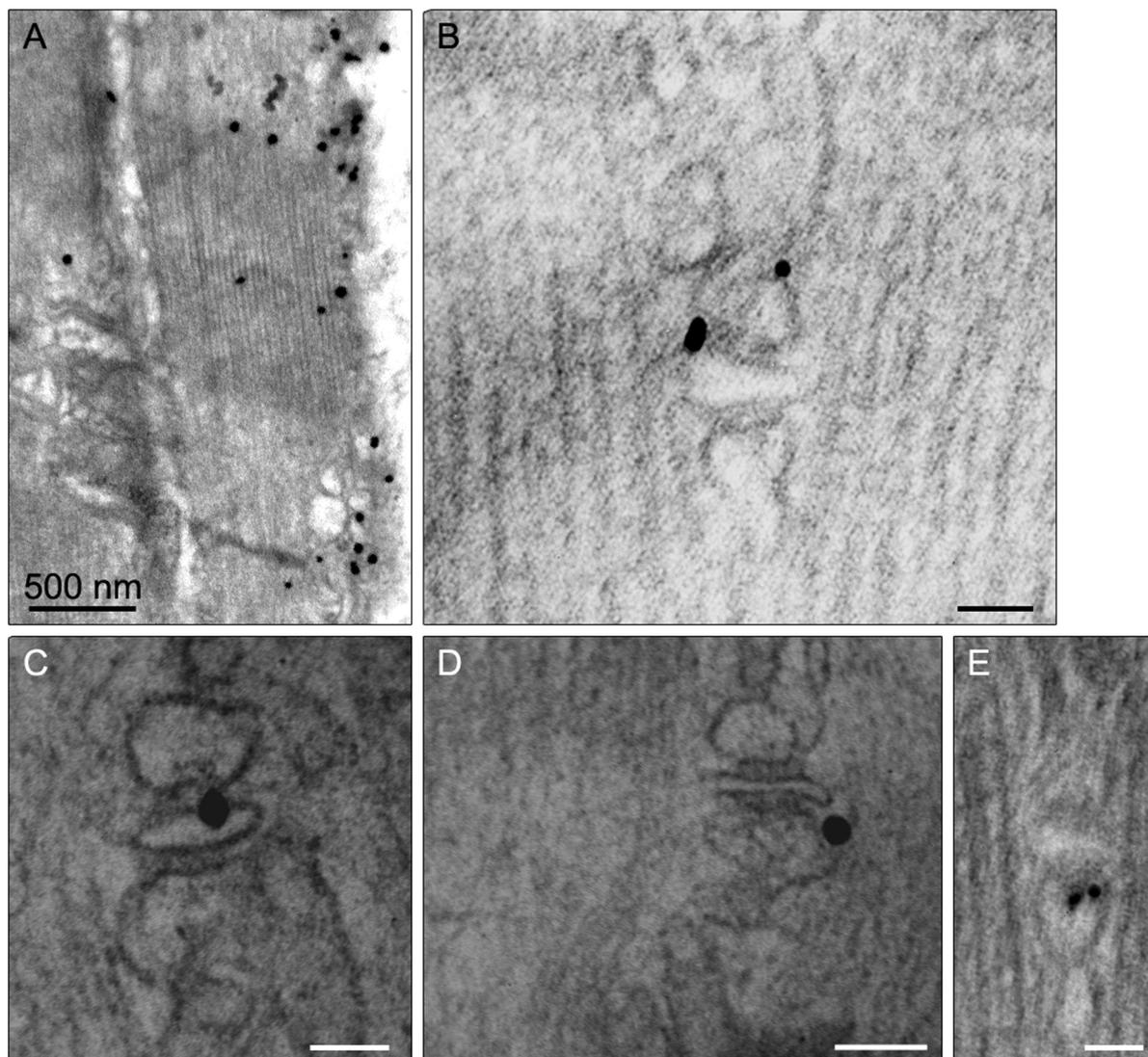


Figure 37: Localisation de la cavéoline-3 dans le RS. Immunomarquage de la cavéoline-3 en pré-inclusion sur EDL de souris. Les coupes de 70 nm ont été observées au microscope électronique. **A.** Marquage sous-membranaire de la cavéoline-3 à faible grossissement. **B; C; D; E,** marquage de la cavéoline-3 dans le RS ou le tubule transverse des triades, observation à fort grossissement (barres d'échelle: 50 nm).

G. Discussion

La surexpression à long terme des isoformes Trisk 95 et Trisk 51 a été induite *in vivo* par des injections intra-musculaires d'adénovirus dans les pattes arrières de souris, trois jours après la naissance. La surexpression de l'une des isoformes de la triadine est compensée par la réduction du niveau d'expression de l'autre isoforme. Les autres protéines du CRC (DHPR, RyR, CSQ et SERCA) ne sont pas affectées par la surexpression de la triadine. Cependant, ses conséquences sont visibles par la coloration hématoxyline-éosine de coupes transversales de muscles infectés: les fibres sont atrophiées, arrondies, dans le cas de Trisk 51, avec une infiltration de tissus fibreux, des fibres nécrotiques ou en régénération; autant de phénomènes observés dans les muscles pathologiques humains. Il est intéressant de noter que l'aspect des muscles infectés avec l'AdV-Trisk 95 est différent de ceux infectés avec l'AdV-Trisk 51, qui entraîne un phénotype plus marqué. Il apparaît clairement que l'infection modifie le marquage de la cavéoline-3. Le marquage de la cavéoline-3 est très intense à l'intérieur des fibres infectées par comparaison avec le contrôle, et il semble colocalisé avec Trisk 95 et Trisk 51. Il existe donc peut-être un lien fonctionnel entre la cavéoline-3 et la triadine, deux protéines aux localisations et aux fonctions différentes. Comme la cavéoline-3 est présente dans les tubules transverses (Ralston & Ploug, 1999) et régule le fonctionnement du DHPR (Couchoux *et al.*, 2007), l'interaction entre la triadine et la cavéoline-3 au sein du CRC pourrait être réalisée par une autre protéine.

Les expériences de co-immunoprécipitation ont montré que les isoformes Trisk 95, Trisk 51 et Trisk 32 sont associées avec la cavéoline-3 *in vivo* dans le muscle adulte. Cependant, l'association directe n'a pas été retrouvée par co-immunoprécipitation dans les L6 indifférenciées, donc dépourvues des autres membres du CRC, et infectées avec Trisk 95, Trisk 51 ou Trisk 32. L'association de la triadine et de la cavéoline *in vivo* nécessite donc probablement un intermédiaire. Comme l'association de la cavéoline-3 avec le DHPR et le RyR a été montrée dans le cœur (Head *et al.*, 2005; Balijepalli *et al.*, 2006), ces protéines pouvaient être des interacteurs potentiels entre la triadine et la cavéoline-3. L'absence de DHPR dans les immunoprécipitations de la triadine montre qu'il n'est pas cet intermédiaire. Au contraire, l'immunoprécipitation du RyR dans les souris KO triadine entraîne la cavéoline-3. La triadine est donc probablement associée avec la cavéoline-3 via le RyR, ce qui semble logique au vu de la modification de la localisation du RyR dans les fibres infectées avec Trisk 95. Comment

et pourquoi, la cavéoline-3, une protéine de la membrane plasmique, est ainsi relocalisée dans la cellule suite à la surexpression de la triadine, une protéine du RS?

Plusieurs résultats de la littérature concernant la fonction de la cavéoline et des cavéoles dans le muscle permettent d'émettre des hypothèses sur l'association fonctionnelle existante entre la cavéoline, le RyR et la triadine: i) le rôle de la cavéoline dans le trafic intracellulaire (Parton & Simons, 2007) ii) le rôle de la cavéoline-3 dans l'homéostasie calcique et dans l'entrée capacitive (Popescu *et al.*, 1974; Fujimoto *et al.*, 1992; Fujimoto, 1993; Isshiki & Anderson, 2003).

La cavéoline-3 est impliquée dans le trafic intracellulaire de différentes protéines membranaires dont la dysferline (Ampong *et al.*, 2005; Hernandez-Deviez *et al.*, 2006), et le complexe dystrophine-glycoprotéines (Galbiati *et al.*, 2001). Les marquages du RyR et du DHPR sont perturbés dans la souris KO cavéoline-3 ce qui suggère un rôle de cette protéine dans l'adressage à la triade ou la formation du CRC, en plus de la formation des tubules-T. Comme il a été montré que, au cours du développement, le CRC est préformé puis adressé à la triade, il est possible que l'augmentation de la quantité de Trisk 95 et Trisk 51, associées au RyR dans le CRC préformé, nécessite plus de cavéoline-3. Ceci soit par augmentation de la taille des vésicules contenant le complexe, soit par augmentation de leur nombre, ce qui augmenterait la quantité de cavéoline-3 à l'intérieur de la cellule. Cette délocalisation pourrait perturber le trafic des autres protéines membranaires et être responsable du phénotype observé dans les muscles infectés avec la triadine de la même façon que la mutation P104L de la cavéoline-3 détourne la cavéoline normale qui ne peut alors pas assurer sa fonction dans le trafic et provoque une dystrophie musculaire (Minetti *et al.*, 1998; Galbiati *et al.*, 1999).

Il est par ailleurs intéressant de noter que la quantité de cavéoline-3 associée au RyR est bien supérieure dans le muscle KO triadine que dans le muscle WT. L'expression du RyR n'est pas modifiée dans le muscle de souris KO et la cavéoline-3 n'a pas été quantifiée. Si le niveau d'expression de la cavéoline-3 est inchangé dans le muscle KO triadine, alors on peut conclure que, du fait de l'absence de triadine, le RyR est peut-être plus accessible à la cavéoline-3. Il est donc indispensable d'évaluer le niveau d'expression de la cavéoline-3 dans les muscle KO pour déterminer si la proportion de protéines au sein de cette association est modifiée.

Enfin, de plus en plus de protéines de l'homéostasie calcique sont retrouvées dans les cavéoles ou des radeaux lipidiques: le DHPR (Balijepalli *et al.*, 2006), l'IP₃R (Fujimoto *et al.*, 1992; Fujimoto *et*

et al., 1995), la pompe à Ca^{2+} de la membrane plasmique (PMCA (Fujimoto, 1993), TRPC1 (Gervasio *et al.*, 2008), mais également SERCA dans la membrane du RS (Li *et al.*, 2006). Il a également été montré que le regroupement de STIM1 dans le RS sous la membrane plasmique, au niveau des régions où il interagit avec Orai1, est lié à la présence de radeaux lipidiques, qui impliquent donc la présence de cavéoline-3 (Pani *et al.*, 2008). Ces différents acteurs de l'entrée capacitive (TRPC, Orai1, STIM1) sont donc liés, au moins fonctionnellement, avec la cavéoline-3 à la membrane plasmique. Or, la surexpression de Trisk 95 dans les myotubes de rat réduit l'entrée capacitive (Vassilopoulos *et al.*, 2007). Il est envisageable que la surexpression de la triadine relocalise la cavéoline-3 de la membrane plasmique vers le RS et, par ce mécanisme, altère le fonctionnement de l'entrée capacitive. De même, si du fait de sa surexpression, la triadine forme de larges plateformes dans le RS, il est possible que l'agrégation de STIM1 dans le RS soit perturbée, ce qui, là encore, ne favorise pas l'entrée capacitive.

Partie II : Caractérisation de Trisk 32

Trisk 32 est l'isoforme majoritaire du muscle cardiaque (CT1), et notre équipe l'a récemment mise en évidence dans le muscle squelettique, où elle est faiblement exprimée. Son clonage dans le muscle squelettique, sa localisation dans le RS longitudinal et son association *in vitro* avec l'IP₃R-III ont été réalisés au laboratoire (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Cependant, sa localisation précise dans les différents compartiments du RS reste à étudier, et ses partenaires dans le muscle squelettique n'ont pas encore été identifiés *in vivo*, notamment son association avec l'IP₃R-III reste à confirmer. Dans le cœur, Trisk 32/CT1 est associée avec RyR2 (Guo *et al.*, 1996b). Il est donc important de tester son association avec RyR1 dans le muscle squelettique. Les résultats obtenus concernant sa localisation et ses partenaires constituent les premiers pas vers l'étude de sa fonction dans le muscle squelettique.

A. Expression de Trisk 32 au cours du développement

Pour déterminer le niveau d'expression des triadines au cours du développement embryonnaire et de la croissance chez la souris, l'expression des triadines a été analysée par Western blot à différents âges prénataux (Figure 38) et chez l'adulte (Figure 39).

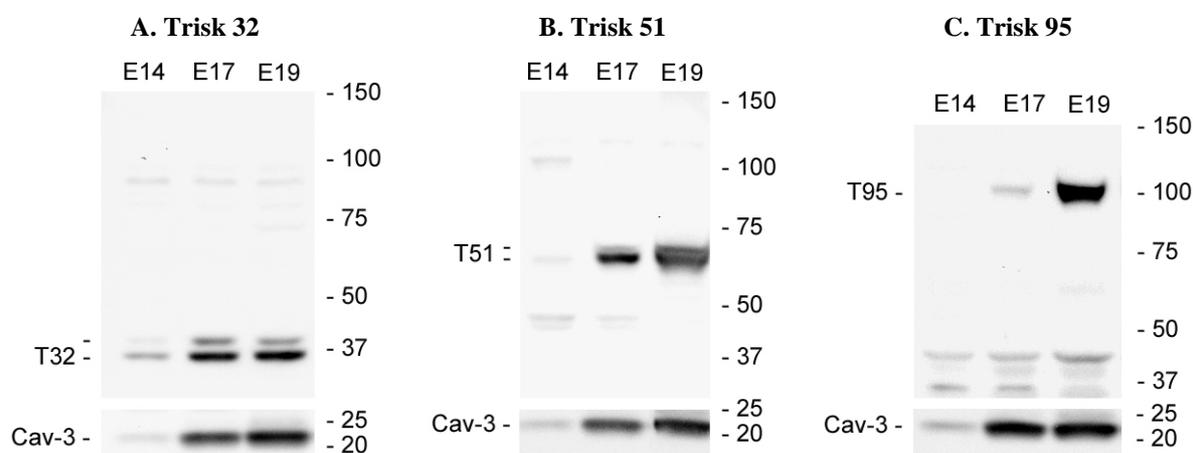


Figure 38: Expression prénatale des triadines et de la cavéoline-3 chez la souris. Western blot réalisé sur des microsomes de muscles squelettiques prélevés sur des souris à 14 jours de développement embryonnaire (E14), 17 jours de développement embryonnaire (E17) et à 19 jours de développement embryonnaire (E19). 40 µg protéines ont été déposés dans chaque puits d'un gel gradient 5%-15% de polyacrylamide. La membrane a été coupée entre 25 et 37 kDa, la partie supérieure a été incubée avec des anticorps anti-C-terminal de chaque triadine: Anti-Trisk 32 de isoforme de souris (A), anti-Trisk 51 (B) et anti-Trisk 95 (C). La partie inférieure a été incubée avec des anticorps anti-cavéoline-3.

Les expressions de Trisk 95, Trisk 51, Trisk 32, et de la cavéoline-3 comme contrôle, ont été étudiées par Western blot sur des microsomes de muscle squelettique de souris à 14,

17 et 19 jours de développement embryonnaire (E14, E17, E19) (Figure 38). Trisk 32 se présente sous la forme d'un doublet/triplet à 37 kDa, dû à des modifications post-traductionnelles. Trisk 32 et Trisk 51 s'expriment déjà à E14. La quantité de Trisk 32 augmente entre E14 et E17 puis semble être stable à partir de E17. Trisk 51 augmente entre E14 et E19. Une bande apparaît au dessus de la première entre E17 et E19, probablement due à une modification post-traductionnelle. Enfin, l'expression de Trisk 95 est indétectable à E14 puis elle apparaît à E17 et augmente de E17 à E19. Parmi les isoformes testées, Trisk 32 est donc la seule à avoir une expression stable entre 17 et 19 jours de développement embryonnaire.

Les expressions de chaque isoforme chez la souris adulte ont ensuite été visualisées par Western blot (Figure 39). Trisk 32 est très faiblement exprimée, Trisk 95 est l'isoforme majoritaire.

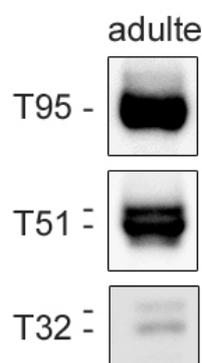


Figure 39: Expression des différentes isoformes de la triadine chez la souris adulte. Western blot réalisé sur des microsomes de muscles squelettiques de souris adulte. 20 μ g protéines ont été déposés sur un gel gradient 5%-15% de polyacrylamide. Un mélange d'anticorps anti-C-terminal de chaque triadine a été utilisé.

Il ressort de ces deux expériences que Trisk 95 et Trisk 51 sont exprimées majoritairement chez l'adulte alors que Trisk 32 est exprimée beaucoup plus précocement chez l'embryon. Trisk 51 et Trisk 95 joueraient principalement un rôle à l'âge adulte alors que Trisk 32 aurait plutôt une fonction dans le stade prénatal.

L'expression de chaque isoforme entre E19 et les premiers mois de la souris sera détaillée par des expériences complémentaires. Les niveaux d'expression des triadines seront également quantifiés les uns par rapports aux autres par Western blot grâce à l'utilisation de

l'anticorps anti N-terminal des triadines. Ces résultats nous permettront de détailler précisément les niveaux d'expression de chaque isoforme entre les stades précoces de développement embryonnaire et la souris adulte.

B. Localisation de Trisk 32 dans les muscles striés

Il a été publié précédemment par le laboratoire que Trisk 32 est située entre les triades, au niveau de la strie Z, où elle est colocalisée avec l'IP₃R-III, à proximité des mitochondries. La localisation de Trisk 32 a été précisée par une série d'immunomarquages observés à très forts grossissements, jusqu'à la limite de résolution du microscope confocal. Les résultats n'étant pas très clairs quant à sa localisation exacte, j'ai réalisé des immunomarquages à l'or observés au microscope électronique, ce qui permet d'identifier les compartiments subcellulaires qui contiennent Trisk 32.

1. Localisation de Trisk 32 par rapport aux canaux calciques du RS

La localisation précise de Trisk 32 dans les muscles striés de rat adulte a été étudiée par marquage immunofluorescent sur coupes longitudinales de muscle cardiaque et de muscle squelettique avec des anticorps anti-Trisk 32 et anti-RyR (anticorps réactifs avec les isoformes cardiaques et squelettiques) (Figure 40). Comme il a déjà été publié dans le muscle cardiaque, Trisk 32, en rouge sur ces images, colocalise parfaitement avec RyR2, en vert, sur une strie simple ponctuée (Figure 40 A). La reproduction de ce résultat publié fourni donc un contrôle positif quant à l'étude précise de la localisation de Trisk 32 par rapport au RyR1 dans le muscle squelettique.

Dans le muscle squelettique, le marquage de Trisk 32 forme une simple strie ponctuée qui se situe entre les deux rangées de points de RyR1, c'est-à-dire entre les triades (Figure 40 B). A très fort grossissement, si il est clair que la majeure partie de Trisk 32 est située dans le RS longitudinal, le long de la ligne Z, il apparaît également que son marquage s'étend jusqu'aux triades où Trisk 32 colocalise en partie avec RyR1 (Figure 40 C).

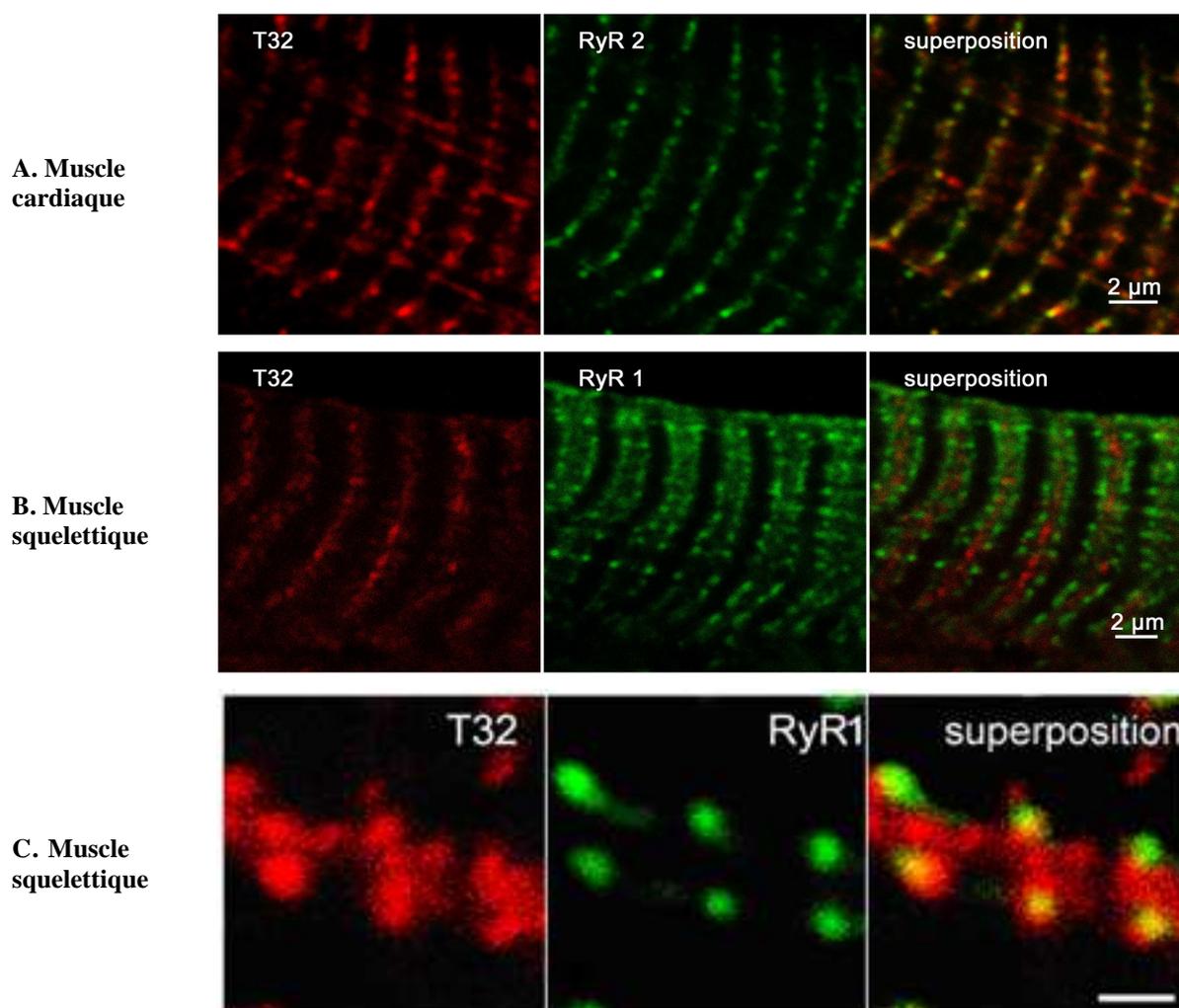


Figure 40: Immunomarquage de Trisk 32 et du RyR sur coupe longitudinale de muscles striés. La localisation de Trisk 32 (rouge) et du RyR (vert) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent sur coupes longitudinales de muscle cardiaque (A), et de muscle squelettique (B et C à fort grossissement) de rat avec un anticorps anti-Trisk 32 et un anti-RyR, observé au microscope confocal. L'anticorps utilisé pour le RyR reconnaît toutes les isoformes du RyR. Barre d'échelle (C) = 1 μm.

Le RS longitudinal, où se situe la majorité du marquage de Trisk 32, abrite un autre canal calcique, l'IP₃R-III. La localisation de Trisk 32 par rapport à l'IP₃R-III a été étudiée par marquage immunofluorescent sur coupes longitudinales de muscle squelettique et de cœur de rat (Figure 41). Dans ces deux muscles striés, l'IP₃R-III, en vert, est situé sur une simple strie ponctuée et le marquage de Trisk 32, en rouge, est localisé dans la même région. Ce résultat indique que l'IP₃R-III est dans la même région que Trisk 32 dans le muscle squelettique et dans le cœur.

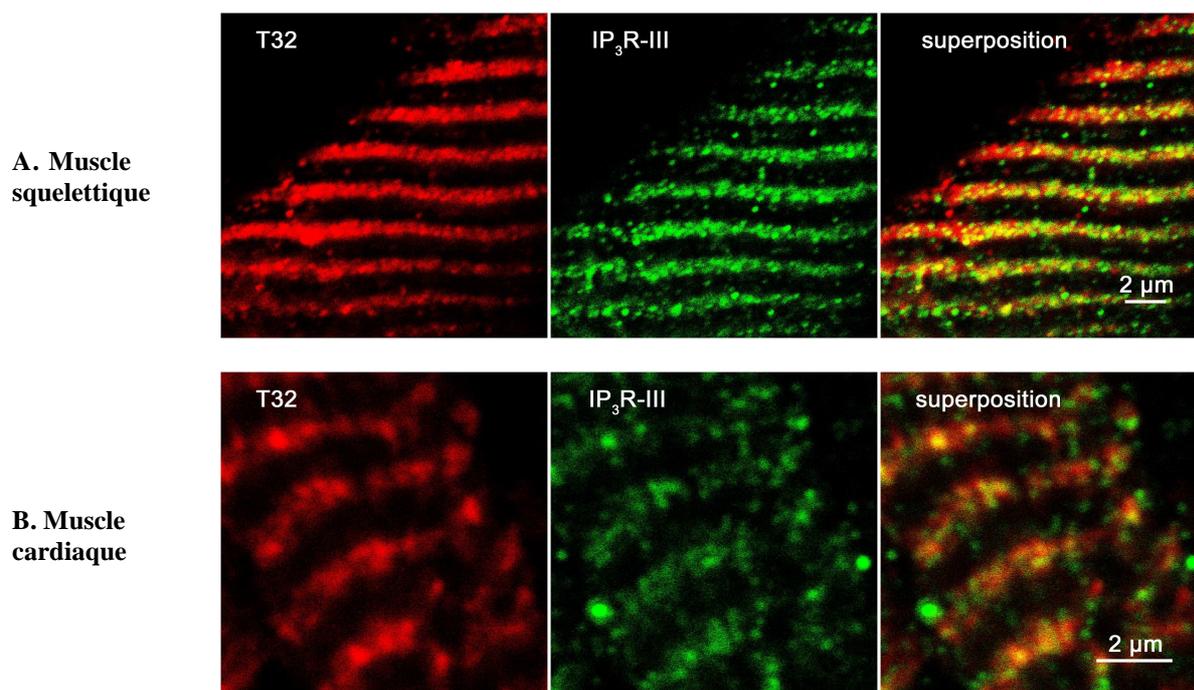


Figure 41: Immunomarquage de Trisk 32 et de l'IP₃R-III sur coupe longitudinale de muscles striés. Les localisations de Trisk 32 (rouge) et de l'IP₃R-III (vert) ont été mises en évidence par marquages immunofluorescents sur coupes longitudinales de muscle squelettique (A), et de muscle cardiaque (B) de rat observés au microscope confocal. Barre d'échelle: 2 μm

2. Localisation de Trisk 32 par rapport aux mitochondries

L'organisation des muscles striés, et en particulier celle du muscle squelettique, est très précise. Ainsi, dans le muscle squelettique, chaque couple de triade est situé de part et d'autre de deux mitochondries. Comme les mitochondries sont extrêmement proches du RS longitudinal, il est probable que Trisk 32 soit localisée dans la région péri-mitochondriale. La localisation de Trisk 32 par rapport aux mitochondries a été étudiée par marquage immunofluorescent avec des anticorps anti-FoF1-ATPase, une protéine de la membrane mitochondriale interne (Figure 42). Le marquage de Trisk 32 est dans la même région que le marquage FoF1-ATPase aussi bien dans le muscle squelettique que dans le cœur.

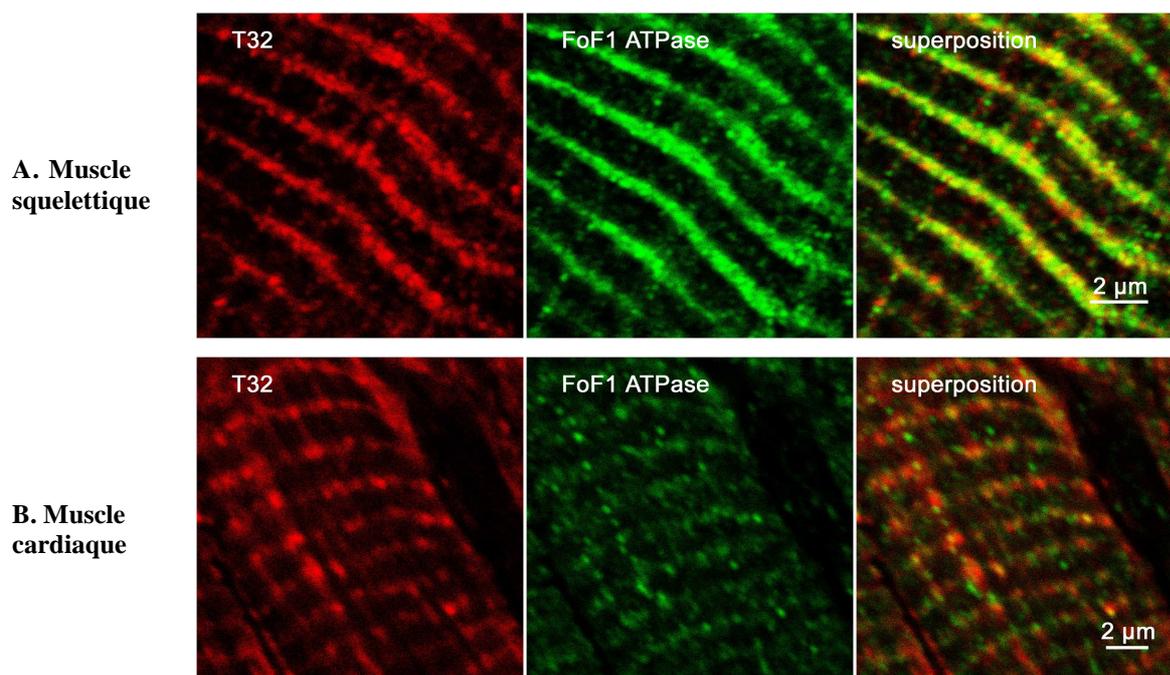


Figure 42: Trisk 32 est localisée dans la région mitochondriale le long de la strie Z dans les muscles striés. Les localisations de Trisk 32 (rouge) et des mitochondries (FoF1-ATPase, vert) ont été mises en évidence par marquage immunofluorescent sur coupes longitudinales de muscle squelettique (A), et de muscle cardiaque (B) de rat observées au microscope confocal. La superposition des deux marquages indique que Trisk 32 se trouve dans la même zone que les mitochondries.

J'ai réalisé un marquage à l'or en microscopie électronique sur muscle squelettique (Figure 43) pour identifier les compartiments où se situe Trisk 32. Ce marquage a été effectué sur des coupes congelées et coupées à froid, qui n'ont pas subi de coloration au tétr oxyde d'osmium. Les images apparaissent donc avec un contraste négatif par rapport à la microscopie électronique classique. Cette expérience a permis de montrer que Trisk 32 est localisée dans les triades et dans le RS longitudinal (Figure 43 B et C). Elle est parfois localisée à l'interface RS/mitochondrie (Figure 43 A et B). Un marquage de Trisk 32 a également été observé dans les mitochondries (Figure 43 A et C).

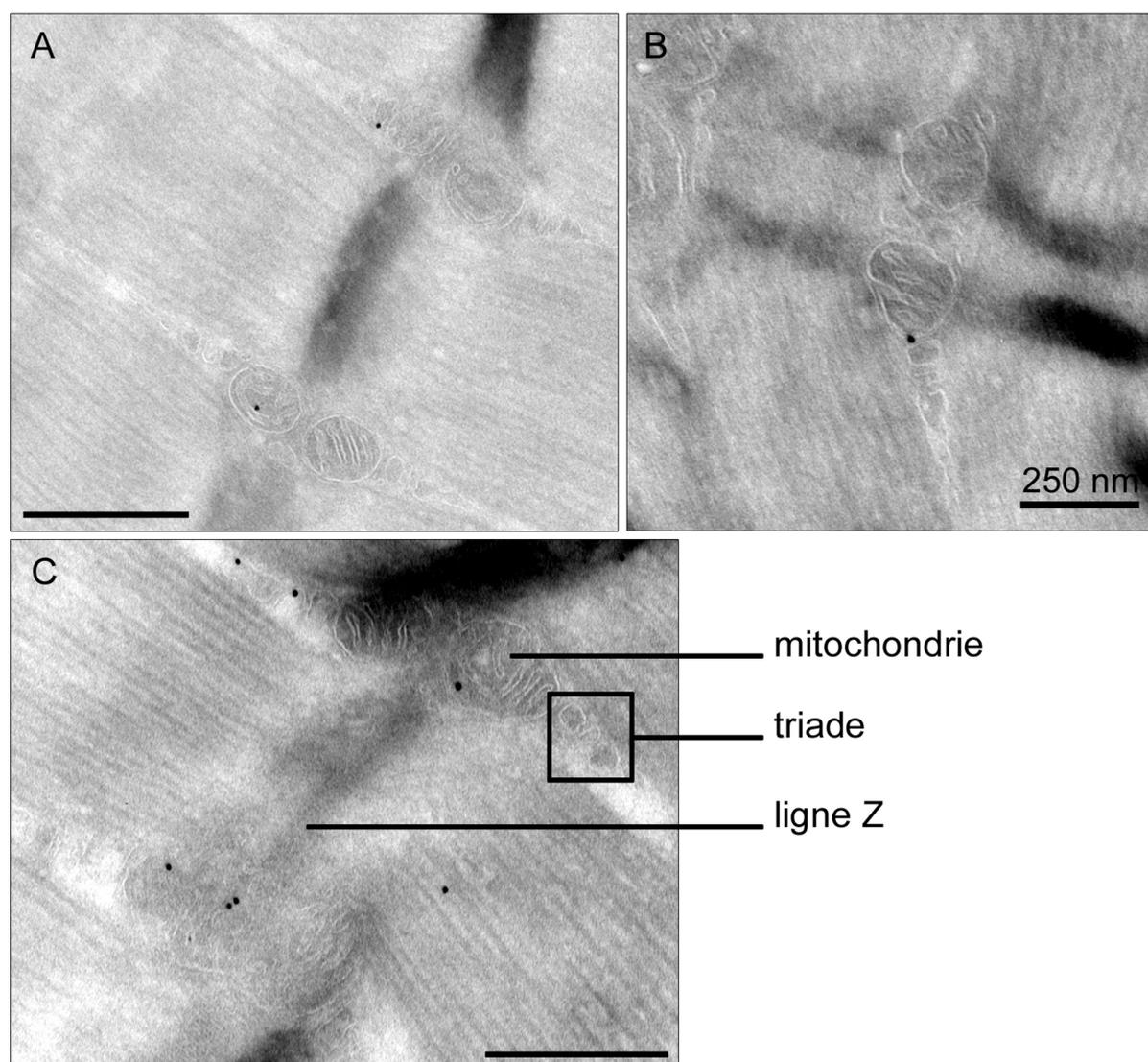


Figure 43: Localisation de Trisk 32 dans le RS de muscle squelettique de rat par immunomarquage à l'or en microscopie électronique. La localisation de Trisk 32 dans le RS a été mise en évidence par marquage à l'or sur coupe longitudinale d'EDL de rat. Trisk 32 est localisée dans le RS longitudinal (C), à l'interface du RS longitudinal et des mitochondries (A, B), et dans les mitochondries (A et C). Barres d'échelle sur A et C: 500 nm.

Ces résultats montrent donc que Trisk 32 est colocalisée avec le RyR dans les triades (RyR1 dans le muscle squelettique, RyR2 dans le cœur), et avec l'IP₃R-III dans le RS longitudinal à proximité des mitochondries. La localisation de Trisk 32 dans les mitochondries doit être plus amplement étudiée.

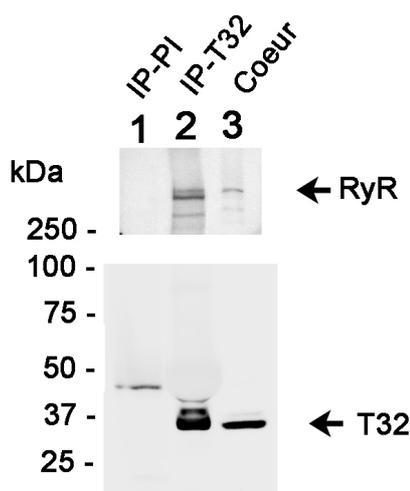
C. Les partenaires de Trisk 32

Les différents partenaires de Trisk 32 ont été mis en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation dans plusieurs modèles. Les partenaires potentiels ont été soit identifiés par une approche ciblée, soit recherchés par une approche de criblage sans à priori.

1. Association de Trisk 32 avec les canaux calciques du RS

Il a déjà été publié que Trisk 32/CT1 est associée avec RyR2 dans le cœur de lapin (Guo *et al.*, 1996b) ce que j'ai confirmée dans le cœur de rat (Figure 44 A). Ceci, avec la colocalisation de Trisk 32 et RyR1 dans le muscle squelettique, suggèrerait que Trisk 32 pourrait être associée avec RyR1. Cette association n'avait pas été observée jusqu'à présent au laboratoire.

A. Immunoprécipitation sur muscle cardiaque



B. Immunoprécipitation sur muscle squelettique

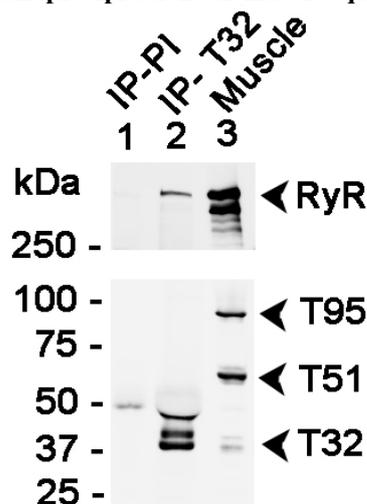


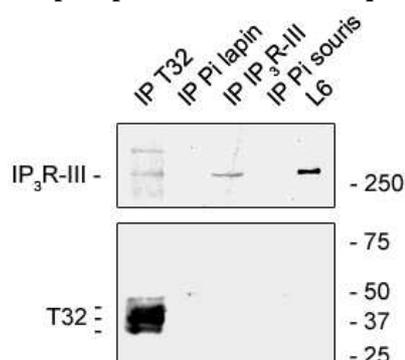
Figure 44: Trisk 32 est associée avec le RyR dans le cœur et dans le muscle squelettique. Immunoprécipitations réalisées avec des anticorps contre Trisk 32 (IP-T32) et du sérum pré-immun de lapin (IP-PI) sur microsomes de cœur (A) ou de muscle squelettique de rat (B). La présence du RyR et de Trisk 32 a été testée par Western blot. Contrôle positif (A et B puits 3): 20 µg de microsomes de cœur ou de muscle squelettique de rat.

L'association de Trisk 32 avec RyR1 a été testée par co-immunoprécipitation sur muscle de rat avec un sérum polyclonal spécifique de Trisk 32 (Figure 44 B, IP-T32), et en contrôle négatif avec un sérum pré-immun provenant du même lapin avant immunisation (IP-PI). Le résultat des immunoprécipitations a été analysé par Western blot. Le RyR (identifié par une ou plusieurs bandes en fonction de sa dégradation protéolytique) a été co-immunoprécipité avec Trisk 32 dans le muscle squelettique (Figure 44 B) comme observé dans le muscle cardiaque (Figure 44 A). Trisk 32 est donc bien associée avec RyR1 dans le muscle

squelettique comme elle l'est avec RyR2 dans le cœur. Trisk 95 et Trisk 51 ne sont pas co-immunoprécipitées avec Trisk 32 (Figure 44 B) ce qui montre que l'immunoprécipitation d'une protéine du RS n'entraîne que ses partenaires et pas la totalité des protéines présentes dans la membrane du RS. D'autre part, l'absence de Trisk 95 et de Trisk 51 dans l'immunoprécipitation de Trisk 32 suggère l'existence de deux types de complexes, un avec RyR1/Trisk 95/Trisk 51, un avec RyR1/Trisk 32.

Trisk 32 est en partie seulement associée à RyR1 ce qui s'explique par sa colocalisation partielle dans les triades, et ce qui explique pourquoi leur association n'avait pas été mise en évidence précédemment.

A. Immunoprécipitations sur muscle squelettique.



B. Immunoprécipitations sur muscle cardiaque.

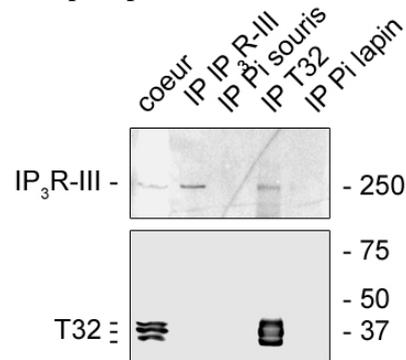


Figure 45: Trisk 32 est associée avec l'IP₃R-III dans les muscles striés. Immunoprécipitations réalisées sur microsomes de muscle squelettique de rat avec des anticorps de lapin contre Trisk 32 (IP T32), du sérum pré-immun de lapin (IP Pi lapin), des anticorps monoclonaux anti-IP₃R-III (IP IP₃R-III), et du sérum pré-immun de souris (IP Pi souris). La présence de Trisk 32 et de l'IP₃R-III a été testée par Western blot. Contrôles positifs: **A.** 80 µg de lysat de la lignée de cellules musculaires L6 et **B.** 120 µg de microsomes de cœur de rat.

Dans mes expériences de colocalisation en microscopie confocale, nous avons observé que Trisk 32 ne colocalisait que partiellement avec RyR1, et se trouvait principalement avec l'IP₃R-III. L'IP₃R-III présente des homologies avec la séquence de la partie canal du RyR qui comporte un domaine d'interaction avec la triadine. Ces informations font de l'IP₃R-III un partenaire potentiel direct de Trisk 32. Cette association a été montrée au laboratoire par co-immunoprécipitation *in vitro* dans la lignée de cellules musculaire L6 transfectée avec l'ADNc de Trisk 32 (Vassilopoulos *et al.*, 2005). Pour tester l'association *in vivo* de ces deux protéines dans le cœur et le muscle squelettique, j'ai réalisé des immunoprécipitations de Trisk 32 dans des microsomes de muscle squelettique ou cardiaque de rat (Figure 45) et j'ai testé la présence de l'IP₃R-III co-immunoprécipitée par Western blot. Un lysat de L6 a été déposé comme contrôle positif pour l'IP₃R-III car ces cellules indifférenciées l'expriment fortement à la différence du muscle squelettique adulte dans lequel il est très peu exprimé. Trisk 32 immunoprécipitée dans le muscle squelettique (Figure

45 A, IP T32) et le cœur (Figure 45 B, IP T32) entraîne l'IP₃R-III. Mais inversement, l'immunoprécipitation de l'IP₃R-III ne permet pas la co-immunoprécipitation de Trisk 32 (IP IP₃R-III). Il apparaît donc que seule une partie de l'IP₃R-III est associée avec Trisk 32. Trisk 32 est donc associée à la fois avec le RyR et l'IP₃R-III dans le cœur et dans le muscle squelettique.

2. Recherche de partenaires de Trisk 32 par spectrométrie de masse

Dans le but de balayer objectivement un large spectre de protéines susceptibles d'interagir avec Trisk 32 et non plus seulement de cibler celles pour lesquelles une interaction peut être à priori envisagée, de nouveaux partenaires ont été recherchés par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire de Chimie des Protéines dirigé par Jérôme Garin (CEA Grenoble).

Une immunoprécipitation de Trisk 32 a été réalisée sur du muscle squelettique et sur du muscle cardiaque, et les protéines co-immunoprécipitées ont été analysées par spectrométrie de masse. Pour soustraire le bruit de fond des protéines co-immunoprécipitées de façon non spécifique de la liste des protéines identifiées dans l'immunoprécipitation, une immunoprécipitation avec du serum pré-immun de lapin a également été criblée par spectrométrie de masse. Les immunoprécipitations de Trisk 32 dans le cœur et le muscle squelettique ont été traitées séparément.

Malgré l'enrichissement de l'échantillon en Trisk 32, celle-ci n'a pas été retrouvée dans le muscle squelettique. Ceci peut être expliqué par l'utilisation de trypsine avant analyse au spectromètre de masse. La trypsine coupe les protéines au niveau des arginines et des lysines, or Trisk 32 contient 57 lysines sur un total de 287 acides aminés. Il y a 60 sites de coupure de la trypsine sur Trisk 32 (Figure 46 en rouge). La taille des fragments ainsi générés au cours de la digestion tryptique de Trisk 32 était inférieure au seuil fixé dans la base de données lors de la première expérience réalisée sur le muscle squelettique. Dans le muscle cardiaque, Trisk 32 a été retrouvée en diminuant la taille des peptides à comparer avec la base de donnée.

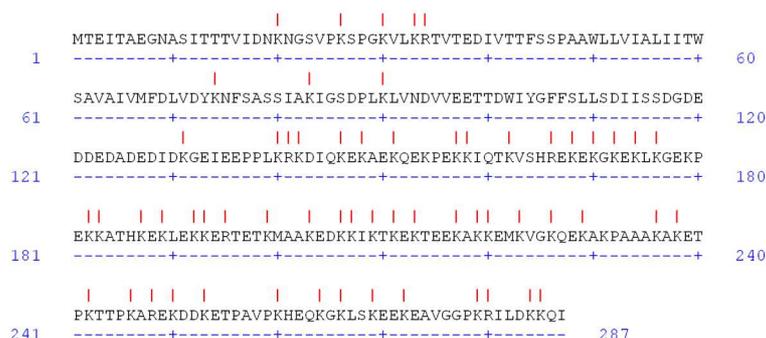


Figure 46: Sites de coupure de la trypsine sur la séquence de Trisk 32. 60 sites de coupure de la trypsine (en rouge) ont été identifiés le long de la séquence de Trisk 32. La taille des fragments varie en moyenne de 1 à 7 acides aminés. Trois gros fragments de 20, 40 et 41 acides aminés sont également générés.

En excluant les anticorps, l’analyse différentielle des immunoprécipitations réalisées avec les anti-Trisk 32 et le serum pré-immun a permis d’identifier 16 protéines pertinentes co-immunoprécipitées avec Trisk 32 dans les muscles squelettique et cardiaque (Tableau 6). Parmi elles, 13 sont mitochondriales dont seulement deux, les Voltage Dependend Anion Channels 1 et 2 (VDAC1 et 2), appartiennent à la membrane mitochondriale externe. Les onze autres protéines mitochondriales identifiées sont des protéines de la chaîne respiratoire, elles appartiennent donc à la membrane mitochondriale interne. Trois protéines du RS ont également été identifiées dans le muscle squelettique: RyR1, la calséquestrine 1, et la mitsugumine 23 (MG23). Dans le muscle cardiaque, trois protéines du RS ont été identifiées: Trisk 32, la calséquestrine 2 et la mitsugumine 23.

Tableau 6: Synthèse des protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 32 identifiées par spectrométrie de masse. (OMM: membrane mitochondriale externe, IMM, membrane mitochondriale interne)

Type de muscle	Muscle squelettique	Muscle cardiaque
Protéines du RS		Trisk 32 *
	RyR1	
	CSQ1	CSQ2
	Mitsugumine 23	Mitsugumine 23
Protéines de l’OMM	VDAC1, VDAC2	VDAC1, 2
Protéines de l’IMM	Protéines de la chaîne respiratoire	Protéines de la chaîne respiratoire

La présence du RyR et de la calséquestrine était attendue. La mitsugumine 23 est une protéine transmembranaire présente dans la totalité du RS, qui a été clonée en 1998 puis n’a plus jamais été étudiée (Nishi *et al.*, 1998). Sa fonction est donc totalement inconnue. Ayant très peu d’information sur cette protéine et aucun outil n’étant disponible dans l’immédiat, j’ai choisi de ne pas poursuivre l’étude de l’association de Trisk 32 avec la mitsugumine 23.

Les VDAC sont intéressants car ils sont dans la membrane mitochondriale externe et dans le RS. En outre leur fonction de canaux les rapproche de deux autres partenaires de Trisk 32, le RyR et l’IP₃R.

La présence d'un très grand nombre de protéines de la membrane mitochondriale interne, les marquages immuno fluorescents de Trisk 32 et les marquages à l'or (Figure 42 et Figure 43) indiquent que Trisk 32 est en relation avec les mitochondries. Si la présence de Trisk 32 au niveau des points de contact du RS semble tout à fait envisageable du fait de son interaction avec l'IP₃R-III, sa présence dans les mitochondries reste un résultat étonnant et inattendu. Des expériences complémentaires sont indispensables pour déterminer si Trisk 32 est mise en évidence dans les mitochondries de façon artefactuelle ou si il s'agit d'une réalité.

D. Etude de la régulation des canaux calciques du RS par Trisk 32

Trisk 32 est associée avec les deux canaux calciques du RS, le RyR et l'IP₃R, et peut donc potentiellement réguler leur activité. Afin d'étudier la modulation des relâchements de Ca²⁺ du RyR par Trisk 32, j'ai débuté des expériences de surexpression de Trisk 32 dans des cultures primaires de myotubes avec le virus AdV-Trisk 32, disponible depuis peu au laboratoire. Ultérieurement les relâchements de Ca²⁺ par le RyR seront visualisés par imagerie sur des cultures primaires de myotubes de souris WT et KO dans lesquelles Trisk 32 sera surexprimée ou réintroduite par infection. La régulation des relâchements de Ca²⁺ de l'IP₃R par Trisk 32 sera étudiée au laboratoire de L. Csernoch par imagerie calcique sur une lignée stable de cellules L6 qui surexpriment Trisk 32.

1. Surexpression de Trisk 32 dans des cultures primaires de myoblastes en vue de l'étude de la régulation du RyR par Trisk 32

L'adénovirus AdV-Trisk 32 a été testé sur cultures primaires de myoblastes de rat. Les myoblastes ont été infectés à MOI36 (36 particules infectieuse/cellule) pendant deux jours. L'efficacité de l'infection a ensuite été testée par Western blot (Figure 47). Trisk 32 est surexprimée d'un facteur 4,5 dans les cellules infectées avec l'AdV-Trisk 32 par rapport aux cellules contrôles.

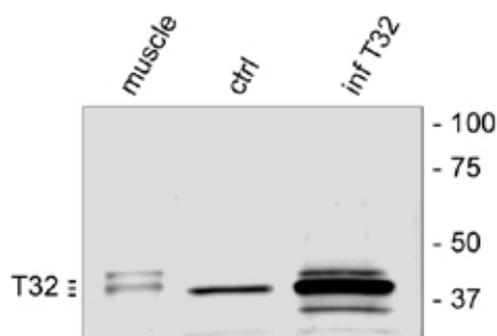


Figure 47: Surexpression de Trisk 32 dans des myoblastes de rat par infection virale. L'efficacité de l'infection par AdV-Trisk 32 a été testée par Western Blot sur 60 μg de protéine de myoblastes contrôles (ctrl) ou infectés (inf T32). 5 μg de protéines de microsomes de muscle squelettique de rat ont été déposés comme contrôle positif.

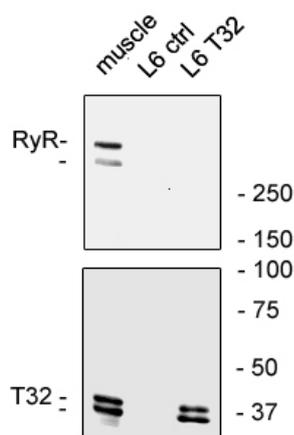
Ces virus vont être utilisés pour ré-exprimer Trisk 32 dans des cultures primaires de myoblaste de souris KO triadine. Les myoblastes seront ensuite induits en différenciation et les relâchements de calcium par le RyR seront testés dans les myotubes KO et KO ré-exprimant Trisk 32.

2. Etude de la régulation de l'IP₃R par Trisk 32

Les relâchements de calcium par l'IP₃R sont difficiles à étudier en présence du RyR car ces deux canaux sont sensibles aux mêmes agonistes, dont le Ca²⁺. Comme les relâchements de Ca²⁺ par l'IP₃R sont de très faible amplitude par rapports à ceux du RyR, l'ouverture du RyR par CICR suite à l'ouverture de l'IP₃R risque de masquer les relâchements de Ca²⁺ par l'IP₃R. La régulation de l'IP₃R par Trisk 32 sera donc étudiée dans une lignée de L6 surexprimant Trisk 32 de façon stable créée au laboratoire de L. Csernoch. Cette lignée de L6 est incapable de se différencier et n'est donc pas supposée exprimer le RyR. J'ai vérifié la surexpression de Trisk 32 et l'absence du RyR par Western blot (Figure 48 A) J'ai ensuite réalisé une co-immunoprécipitation pour tester l'interaction entre Trisk 32 et l'IP₃R-III dans cette lignée cellulaire (Figure 48 B).

Cette lignée de L6 qui ne se différencie pas en myotubes (et donc n'expriment pas le RyR) et qui surexprime Trisk 32, laquelle est associée avec l'IP₃R-III, constitue donc un excellent modèle d'étude de la régulation de l'IP₃R par Trisk 32 par imagerie calcique.

A. Expression de Trisk 32 et du RyR



B. Interaction de Trisk 32 avec l'IP₃R-III

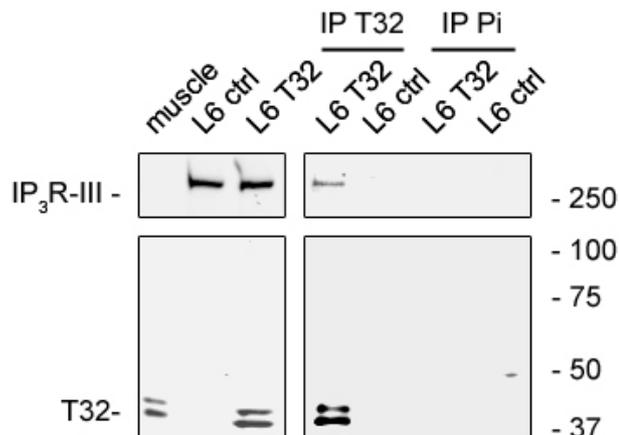
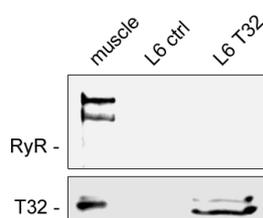


Figure 48: L'IP₃R est le seul canal calcique du RS dans la lignée de L6 qui surexprime Trisk 32. **A.** Vérification, par Western blot, de l'expression de Trisk 32 et de l'absence du RyR dans la lignée de L6 stable (L6 T32), 60 µg de protéines de lysat cellulaire ont été déposés, contrôle: 10 µg de microsomes de muscle squelettique de rat. **B.** Vérification de l'association de Trisk 32 avec l'IP₃R dans les L6 surexprimant Trisk 32 par immunoprécipitation avec des anticorps anti-Trisk 32 (IP T32) ou avec du sérum pré immun (IP Pi) suivie d'une analyse par Western blot.

Pour étudier la régulation de l'IP₃R-III par Trisk 32, nous disposons également du virus AdV-Trisk 32 pour la surexprimer. J'ai vérifié par co-immunoprécipitation que Trisk 32 surexprimée pas infection virale se comportait de la même façon que la protéine surexprimée par transfection de l'ADNc (Vassilopoulos *et al.*, 2005) et que Trisk 32 exprimée dans la lignée de L6 stable présentée ci-dessus. Les cellules L6 ont donc été infectées avec AdV-Trisk 32 (Figure 49 A). L'immunoprécipitation de Trisk 32 sur ces cellules infectées permet bien la co-immunoprécipitation de l'IP₃R-III (Figure 49 B). Selon les besoins, nous disposons donc de différents outils pour étudier Trisk 32 et l'IP₃R : des virus AdV-Trisk 32 efficaces dans différents types cellulaires, et une lignée stable pour la surexpression de Trisk 32.

A. Lignée L6 infectée avec AdV-Trisk 32



B. Immunoprécipitation de Trisk 32 dans les L6 infectés

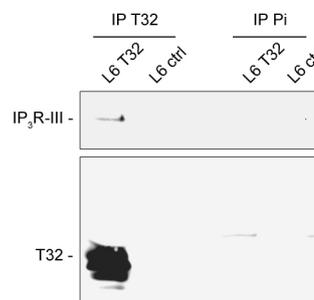


Figure 49: Efficacité de la surexpression de Trisk 32 par infection virale et association avec l'IP₃R-III. **A.** Western blot sur 60 µg de lysat de cellules non infectées (L6 ctrl) ou infectées avec AdV-Trisk 32 (L6 T32) pour vérifier l'efficacité de l'infection, et l'absence de RyR. **B.** Immunoprécipitations avec des anticorps spécifiques de Trisk 32 (IP T32) ou avec du sérum pré-immun (IP Pi). La présence de de Trisk 32 et de l'IP₃R-III a été testée par Western blot.

E. Discussion

L'isoforme Trisk 32 de la triadine se comporte différemment de Trisk 95 et Trisk 51 de par ses localisations, ses partenaires et son expression dans le coeur, suggérant une fonction toute différente. Les marquages immunofluorescents et à l'or ont montré les multiples localisations de Trisk 32 dans les différents compartiments du RS et les co-immunoprécipitations ont mis en évidence des partenaires connus pour être présents dans les mêmes endroits que Trisk 32. Nos résultats suggèrent donc que Trisk 32 est localisée d'une part dans les triades où elle est associée au RyR et à la calséquestrine, et d'autre part dans le RS longitudinal où elle est associée à l'IP₃R-III et semble également avoir un lien particulier avec les mitochondries.

1. Les partenaires de Trisk 32

Au cours de cette étude j'ai identifié de nombreux partenaires de Trisk 32. Ses interactions avec les canaux calciques RyR1, RyR2 et IP₃R-III seront discutées dans les paragraphes suivants. La spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence des partenaires de Trisk 32 connus (RyR et calséquestrine), ce qui valide l'expérience, mais aussi de nouveaux partenaires: VDAC et la mitsugumine 23 (MG23).

La mitsugumine 23 est une protéine de 23 kDa, exprimée dans de nombreux types cellulaires, et qui possède trois segments transmembranaires permettant sa localisation dans différents compartiments membranaires. Elle a été localisée dans la couronne de RS périnucléaire, dans le RS longitudinal et dans le RS jonctionnel. Aucun partenaire ni aucune fonction ne lui ont été attribués jusqu'à ce jour (Nishi *et al.*, 1998). Il n'est pas possible de déterminer si Trisk 32 lui est associée directement, mais il est envisageable, par exemple que Trisk 32 lui soit associée via l'IP₃R ou VDAC. Il est prévu de rechercher la localisation de Trisk 32 dans la couronne de RS périnucléaire du fait de la localisation de deux de ses partenaires dans ce compartiment, (l'IP₃R-III et MG23).

VDAC est un canal de faible sélectivité (qui laisse passer le Ca²⁺) localisé dans les mitochondries et dans le RS au niveau des MAM (les membranes de RS associées aux mitochondries). Son association avec Trisk 32 semble tout à fait probable, tant par sa localisation à l'interface mitochondrie/RS que par sa fonction canal.

2. Deux complexes de relâchement du Ca²⁺

Dans le cœur, il a été montré que Trisk 32/CT1 est associée avec RyR2 et la calséquestrine 2 (Zhang *et al.*, 1997). Dans le muscle squelettique, son association avec RyR1 est plus discrète que celle de Trisk 95 et Trisk 51. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les co-immunoprécipitations de Trisk 95 ou de Trisk 51 entraînent systématiquement l'autre isoforme en plus de RyR1. Trisk 95 possède deux cystéines dans sa partie C-terminale et il a été montré qu'elle forme des homopolymères de haut poids moléculaire par ponts disulfures (Froemming *et al.*, 1999). Comme Trisk 51 possède également une cystéine, elle peut s'associer avec Trisk 95 par pont disulfure. Trisk 32, qui ne possède pas de cystéine, n'est jamais retrouvée dans les immunoprécipitations de Trisk 95 et de Trisk 51, et inversement Trisk 95 et Trisk 51 ne sont pas entraînées dans les co-immunoprécipitations Trisk 32/RyR1. Il est donc probable que l'absence de cystéine dans la séquence de Trisk 32 l'empêche de s'associer avec Trisk 95 et Trisk 51, formant ainsi deux types de complexes: un complexe composé de Trisk 32/RyR, et un complexe Trisk 95/Trisk 51/RyR. Cette hypothèse peut être testée en rajoutant une cystéine à la séquence de Trisk 32 par mutagenèse dirigée, et en transfectant cet ADNc modifié avec celui de Trisk 95 et de Trisk 51 dans des cellules L6 et de les induire en différenciation pour qu'elles expriment le RyR. Si les immunoprécipitations de Trisk 95 et de Trisk 51 montrent une association de Trisk 32-cystéine, alors c'est que cette cystéine est importante pour la ségrégation de Trisk 32 et de Trisk 95/Trisk 51. Inversement, il pourrait être intéressant de retirer la cystéine de Trisk 51 pour voir si elle se comporte de la même façon que Trisk 32. On pourra ainsi voir si elle peut toujours former des complexes avec Trisk 95, si elle se trouve localisée dans la triade ou dans le RS longitudinal et, pourquoi pas, si elle est associée avec l'IP₃R-III. Ces expériences permettraient de déterminer quelle(s) particularité(s) de Trisk 32 sont liées à l'absence de cystéine sur sa séquence C-terminale.

Dans le cœur, RyR2 n'est pas couplé physiquement au DHPR α_{1c} et il a été montré que, dans le muscle squelettique, la moitié des canaux RyR1 n'est pas couplée au DHPR α_{1s} (Block *et al.*, 1996). On pourrait alors imaginer que, comme dans le muscle cardiaque, Trisk 32 s'associerait au RyR sans que le DHPR y soit physiquement associé, et qu'il pourrait ainsi y avoir deux complexes: un complexe Trisk 32/CSQ1/RyR1 et un complexe Trisk 51/Trisk 95/CSQ1/RyR1/DHPR (Figure 50). L'existence d'un complexe couplé et d'un complexe non couplé au DHPR ne peut pas être testée par co-immunoprécipitation *in vivo* car l'immunoprécipitation des triadines ne permet pas d'entraîner le DHPR et inversement. Ce

résultat indique: i) soit que la technique d'immunoprécipitation utilisée n'est pas suffisamment efficace ou trop stringente pour co-immunoprécipiter des protéines en série (triadine, puis RyR, puis DHPR), ii) soit que les triadines en général, et pas seulement Trisk 32, sont associées aux RyR non couplés.

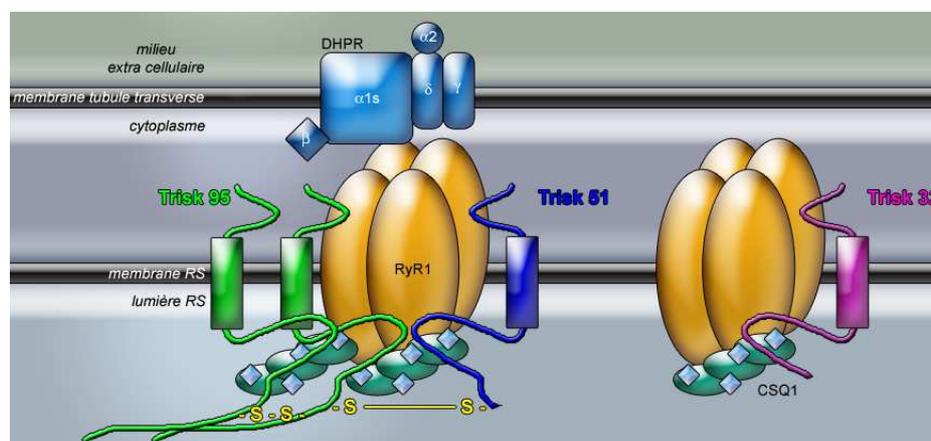


Figure 50: Deux complexes de relâchement du Ca^{2+} dans la triade du muscle squelettique.

En considérant l'hypothèse de l'existence de deux types de complexe sans tenir compte du DHPR on peut envisager la possibilité d'une compétition entre Trisk 95/Trisk 51 et Trisk 32 pour l'association avec le RyR. Cette hypothèse peut être testée par immunoprécipitation des triadines dans des myotubes de souris KO triadine infectés avec les AdV des triadines. L'infection par AdV-Trisk 32 plus ou moins AdV-Trisk 95 ou AdV-Trisk 51 devrait permettre de voir si l'ajout de ces isoformes déplace l'interaction de Trisk 32 avec le RyR. Cette hypothèse pourrait également être testée en réincorporant le RyR purifié en bicouche lipidique pour suivre les mouvements de Ca^{2+} . L'ajout de Trisk 32 purifiée devrait modifier les courants calciques. Si il y a compétition entre les isoformes, l'ajout de Trisk 95/Trisk 51 purifiées après Trisk 32 ne devrait pas modifier les courants calciques du RyR une seconde fois. Et inversement, l'ajout de Trisk 32 après Trisk 95/Trisk 51 ne devrait pas re-modifier leur effet sur le fonctionnement du RyR.

En admettant que l'absence de DHPR dans les immunoprécipitations de Trisk 95 et de Trisk 51 n'est due qu'à des considérations techniques, et que le RyR associé à Trisk 95 et à Trisk 51 l'est également au DHPR, on peut alors imaginer une association préférentielle du DHPR avec le complexe Trisk 95/Trisk 51/RyR plutôt qu'avec le complexe Trisk 32/RyR.

La fonction de régulation de RyR2 par Trisk 32/CT1 est avérée dans le cœur. Sa surexpression dans un modèle de souris transgénique augmente la sensibilité de RyR2 à la caféine (Kirchhefer *et al.*, 2007) et augmente la durée et l'amplitude des relâchements de Ca^{2+} (Kirchhof *et al.*, 2007). Sa surexpression par infection avec un virus codant pour l'ADNc dans des cardiomyocytes en culture augmente également l'amplitude et la durée des relâchements de Ca^{2+} par RyR2 (Terentyev *et al.*, 2005). Trisk 32 semble donc avoir un effet activateur sur RyR2. Il semble donc que l'infection de myotubes de souris KO triadine (décrite en partie III) avec AdV-Trisk 32 devrait porter ses fruits quant à l'étude de la régulation de RyR1 par Trisk 32 par imagerie calcique dans le muscle squelettique.

3. Trisk 32 et l'IP₃R-III : une implication de Trisk 32 dans le développement musculaire?

L'IP₃R est localisé dans le RS jonctionnel, associé à la junctate qui lie le Ca^{2+} (Treves *et al.*, 2004). Il est également associé à Trisk 32. Ces trois protéines pourraient former un 3^{ème} complexe de relâchement du Ca^{2+} , IP₃R/junctate/Trisk 32. Il a été montré que les relâchements de Ca^{2+} par l'IP₃R dans les neurones régulent l'expression de gènes (Perez *et al.*, 1997) et que son activité de canal calcique permet également d'amorcer la cascade de phosphorylation des facteurs de transcription CREB et MAPK dans le muscle squelettique (Powell *et al.*, 2001). Comme Trisk 32 est la première isoforme de la triadine à s'exprimer dans le muscle squelettique au cours du développement embryonnaire, et que l'IP₃R s'exprime majoritairement dans le muscle en développement, il semble probable que Trisk 32 puisse réguler les relâchements de Ca^{2+} de l'IP₃R et par là même qu'elle puisse être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement musculaire.

La régulation de la différenciation des myotubes par Trisk 32 sera étudiée par ré-expression de Trisk 32 dans des myoblastes de souris KO triadine et par analyse des marqueurs de différenciation dans ces cellules par rapport aux KO. Ainsi, le suivi de la phosphorylation de CREB et des MAPK après le déclenchement de vagues calciques de l'IP₃R pourra permettre de déterminer les effets de Trisk 32 sur la régulation de l'expression des gènes. Le nombre de noyaux par myotubes en fonction du temps de différenciation (indice de fusion) et la mise en place d'un appareil contractile strié sont également de bons indicateurs de la différenciation musculaire.

Nous avons vu que Trisk 32 est la première isoforme exprimée au cours du développement embryonnaire. Or, dans le muscle immature à l'instar du muscle cardiaque, ce sont les isoformes RyR2 et DHPR α_{1c} qui sont exprimées. On peut donc envisager l'existence d'un complexe Trisk 32/RyR2/DHPR α_{1c} dans le muscle immature qui sera ensuite remplacé par le complexe Trisk 95/Trisk 51/RyR1/DHPR α_{1s} dans le muscle adulte. Trisk 32 pourrait donc jouer un rôle dans le développement musculaire. Cette hypothèse est confortée par l'association de Trisk 32 avec l'IP₃R-III, qui est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes.

La régulation des relâchements de Ca²⁺ de l'IP₃R par Trisk 32 n'a jamais été étudiée ni dans le cœur ni dans le muscle squelettique. Ce projet sera réalisé en collaboration avec L. Csernoch. La lignée de cellule L6 qui surexprime Trisk 32 et ne peut pas se différencier est un modèle d'étude idéal. L'IP₃R-III y est exprimé en grande quantité et le RyR est absent. J'ai montré que dans ces cellules Trisk 32 surexprimée est associée avec l'IP₃R-III endogène, ce qui rend donc possible l'étude de la régulation de ce canal par Trisk 32 en imagerie calcique.

4. Trisk 32 et les mitochondries

La mise en évidence de Trisk 32 dans les mitochondries par marquages immunofluorescents et par marquages à l'or, et l'identification de protéines mitochondriales par spectrométrie de masse dans l'immunoprécipitation de Trisk 32 sont autant de résultats indiquant la présence de Trisk 32 dans les mitochondries.

Cependant, il est indispensable de déterminer si ce lien entre Trisk 32 et les mitochondries est, ou non, artefactuel. Si les mitochondries sont reconnues de façon non spécifique par les anticorps anti-Trisk 32, même purifiés, ou si elles « collent » dans les immunoprécipitations, ce résultat serait totalement artefactuel. Ces différents éléments amènent de nombreuses questions. Ce résultat est-il réel ou artefactuel ? Trisk 32 est-elle située dans les mitochondries, sachant qu'elle ne possède pas de séquence d'adressage ? Quelle pourrait y être sa fonction ?

Pour savoir si l'anticorps spécifique de la séquence C-terminale de Trisk 32 peut reconnaître une protéine mitochondriale, une recherche *in-silico* de protéines mitochondriales contenant la séquence spécifique de Trisk 32 utilisée pour immuniser les lapins a été réalisée. Aucune protéine mitochondriale connue contenant cette séquence n'a été trouvée, n'invalidant pas

l'hypothèse de la détection de Trisk 32 dans les mitochondries. L'isolation de mitochondries par fractionnement subcellulaire pour y chercher la présence de Trisk 32 par Western blot est une méthode risquée car il est très difficile de n'avoir aucune contamination des mitochondries par le RS, ne serait-ce qu'à cause de la présence de MAM. Dans l'immédiat, l'utilisation de la souris KO triadine pour faire un marquage Trisk 32 et vérifier son absence est impossible car la séquence spécifique de Trisk 32 n'est pas conservée entre le rat et la souris et les anticorps produit au laboratoire contre Trisk 32 de souris ne fonctionnent ni en marquage immunofluorescent ni en marquage à l'or. Il faudrait donc reproduire des anticorps. Une solution pour éclaircir la présence de Trisk 32 dans les mitochondries en s'affranchissant des problèmes de spécificité des anticorps, serait la transfection de l'ADNc de Trisk 32 de rat couplé à la GFP dans des cultures primaires de souris KO triadine. La fluorescence de la GFP doublée d'un immunomarquage des mitochondries indiquerait si Trisk 32 est effectivement localisée dans les mitochondries. Un marquage à l'or avec des anticorps anti-GFP est également réalisable sur ces cellules pour la microscopie électronique.

La réalité biologique de la présence de Trisk 32 dans les mitochondries n'est pas inconcevable. RyR1 a été retrouvé dans la membrane mitochondriale interne (Beutner *et al.*, 2001; Beutner *et al.*, 2005), or lui non plus ne comporte pas de séquence d'adressage aux mitochondries. Trisk 32 pourrait donc être transportée avec ce RyR non couplé au DHPR dans les mitochondries. VDAC, un canal de la membrane mitochondriale externe, est également retrouvé dans la liste de protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 32 identifiées par spectrométrie de masse. VDAC est localisé dans la membrane mitochondriale externe mais également dans le RS (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) où il est supposé permettre l'entrée d'ATP dans le RS de part sa faible sélectivité. Il permet le mouvement d'anions, mais également de cations comme le Ca^{2+} et d'adénonucléotides. Cette protéine canal pourrait être associée avec Trisk 32 de la même façon que les autres canaux du RS. Ces différents interacteurs placeraient Trisk 32 au cœur du dialogue calcique entre le RS et les mitochondries. Il peut être envisagé de faire des expériences de relâchement de Ca^{2+} sur mitochondries isolées de cultures primaires de myotubes souris KO triadine, infectés avec l'AdV-Trisk 32, par rapport à des mitochondries provenant de cellules non infectées pour voir si la modification de la quantité de Trisk 32 modifie les mouvements de Ca^{2+} . De même, si Trisk 32 régule le dialogue calcique entre différentes organites, de l'imagerie calcique peut-être réalisée avec des sondes calciques de type caméléons adressées au RS et aux mitochondries (Bowser *et al.*, 2002), là encore

dans des myotubes de souris KO triadines par rapport à des myotubes qui ré-expriment Trisk
32.

Partie III : Etude fonctionnelle des triadines

L'outil de choix pour l'étude physiologique de la fonction de la triadine et la mise en évidence d'une pathologie associée à son défaut est une souris invalidée pour le gène de la triadine. Le développement de cette souris KO a été entrepris au laboratoire en 2005 et les premières souris, créées à la Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg), ont été obtenues fin 2007. La stratégie utilisée pour déléter la triadine est la suppression du 1^{er} exon du gène, commun à toutes les isoformes. La souris KO triadine est viable et fertile. Je me suis attachée à sa caractérisation phénotypique, réalisée au laboratoire et en collaboration. Ces différents résultats font l'objet d'un article pour J.Biol.Chem., actuellement en cours de révision, inséré en annexe, en fin du manuscrit.

A. Validations moléculaires et biochimiques de la souris KO triadine

Le premier exon du gène de la triadine, représenté en bleu clair sur la Figure 51 A, a été flanqué de deux sites LoxP (allèle « floxé »). Ces souris « floxées » ont été croisées avec des souris qui expriment la recombinaison Cre. La recombinaison a supprimé les séquences qui se situent entre les sites LoxP, donc l'exon 1 de la triadine, ce qui a donné naissance à des souris KO triadine (-/-). Un double génotypage est réalisé sur chaque souris, afin de s'assurer de leur statut avant caractérisation (Figure 51 B).

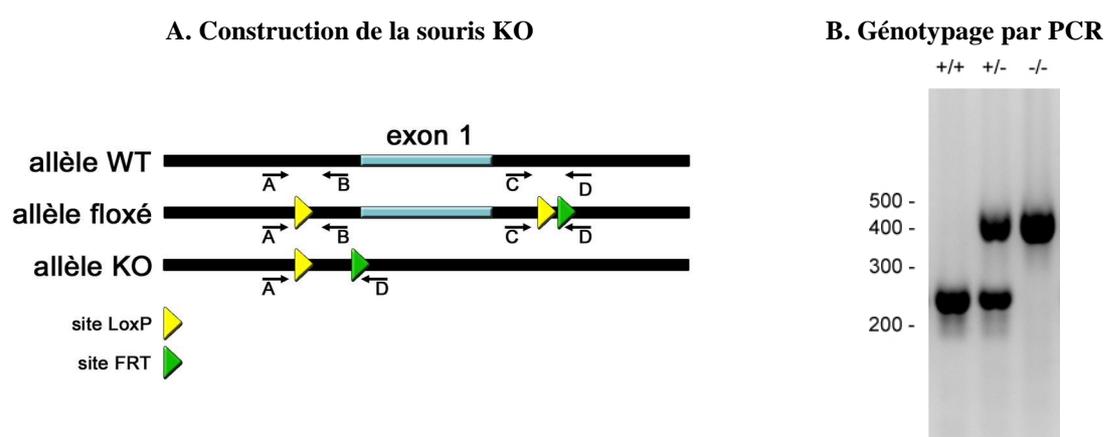


Figure 51: Construction utilisée pour invalider le gène de la triadine et génotypage des souris par PCR. .
A. Représentation schématique des allèles sauvages, floxés et KO avec les amorces A, B, C et D utilisées pour la PCR. **B.** Amplification par PCR de l'ADN génomique avec les amorces A, C et D. La bande à 240 kb correspond aux animaux WT (+/+) (amorces C et D), la bande à 477 kb aux animaux KO (-/-) (amorces A et D) et la présence de 2 bandes indique que l'animal est hétérozygote (+/-).

L'absence de la triadine dans les souris KO a été vérifiée par Western blot sur microsomes de muscles squelettiques et cardiaques avec l'anticorps anti-N-terminal des triadines (Figure 52 A) et un mélange d'anticorps anti-C-terminal spécifiques pour vérifier qu'il n'y a pas d'expression de triadine tronquée dans leur partie N-terminale (Figure 52 B). Le Western blot réalisé avec les anticorps anti-N-terminal montre trois bandes: la bande correspondante à Trisk 49 est confondue avec celle de Trisk 51. Toutes ces bandes disparaissent dans les microsomes de muscle squelettique de souris KO triadine.

Dans le cœur, Trisk 32/CT1 a également été visualisée avec les deux anticorps, anti-N-terminal (A) et anti-C-terminal spécifique de Trisk 32 (B). La bande à 37 kDa signalant sa présence dans les microsomes de cœur WT disparaît dans le cœur KO.

La suppression du 1^{er} exon du gène de la triadine abolit donc bien l'expression de toutes les isoformes de la triadine.

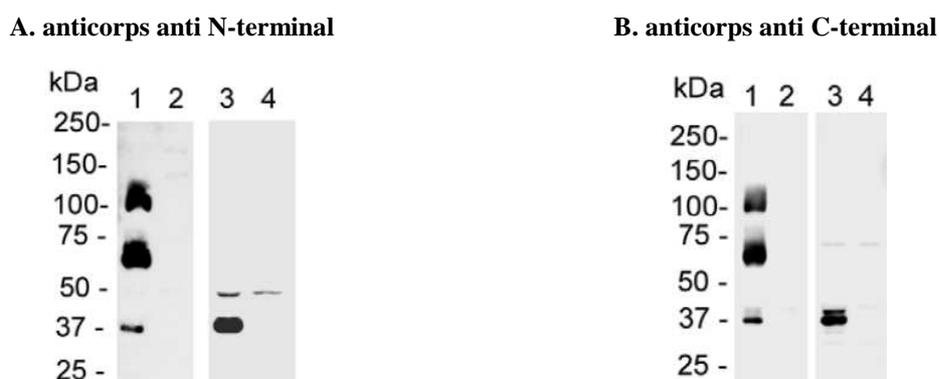


Figure 52: La souris KO triadine n'exprime aucune des isoformes de la protéine. Vérification par Western blot de l'absence de triadine dans la souris KO. Des quantités équivalentes de protéines de microsomes de muscle squelettique de souris WT (ligne 1), de muscle squelettique de souris KO, (ligne 2), de cœur de souris WT (ligne 3) et de cœur de souris KO (ligne 4) ont été déposées sur un gel d'acrylamide 5%-15%. (A) Les triadines sont ciblées par un anticorps anti-N-terminal ou (B) avec un mélange d'anticorps anti C-terminal spécifique. Les signaux correspondants à Trisk 95 (100 kDa), Trisk 51 (60 kD) et Trisk 32 (37 kD) sont absents des muscles squelettiques et cardiaques de souris KO.

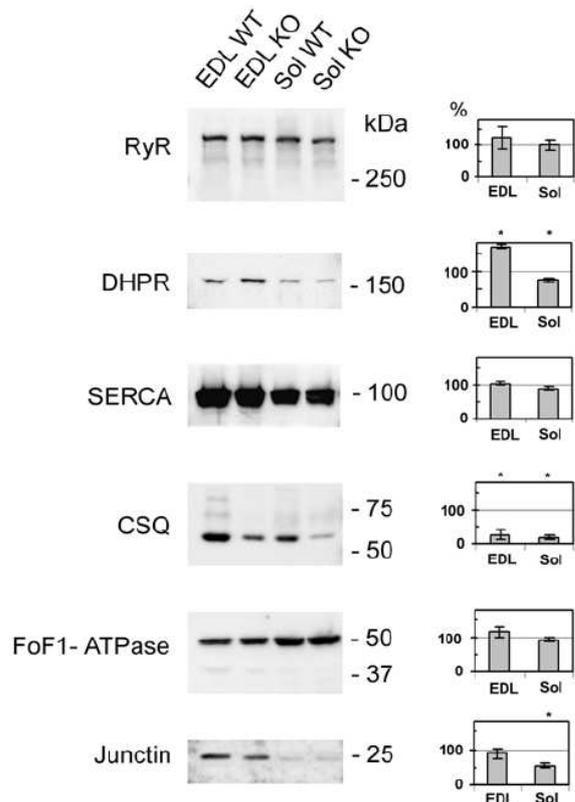
B. Expression des protéines du complexe de relâchement du Ca²⁺

L'absence d'une protéine étant souvent compensée par des variations d'expressions d'autres protéines, les niveaux d'expression des protéines de l'homéostasie calcique ont été évalués par Western blot quantitatif dans le muscle rapide (EDL) et lent (soleus) (Figure 53 et tableau associé). Le RyR, le DHPR, SERCA, la calséquestrine 1, la junctine et la quantité de mitochondries (visualisées grâce à un anticorps anti-FoF1-ATPase) ont donc été ciblés avec des anticorps spécifiques puis quantifiés par rapport à la chaîne lourde de la myosine. Le niveau d'expression de ces protéines dans les muscles WT est pris comme référence et fixé à

100%. Les expressions du RyR, de SERCA, et de la FoF1-ATPase ne sont pas modifiées significativement dans les EDL et les soleus KO. La junctine est sous-exprimée dans le soleus de souris KO. Le DHPR est surexprimé dans l'EDL KO et sous-exprimé dans le soleus KO. Quant à la quantité de calséquestrine 1, elle est divisée par 4 dans le muscle KO. Ces variations importantes indiquent donc une adaptation des muscles à la perte de la triadine.

Niveaux d'expressions de protéines des muscles rapides et lents de la souris KO triadine

Quantification de l'expression des protéines de l'homéostasie calcique.



	EDL KO	Sol KO
RyR	125% ± 33%	102% ± 17%
DHPR	170% ± 14% *	75% ± 14% *
SERCA	104% ± 5%	90% ± 6%
CSQ	27% ± 4% *	19% ± 4% *
FoF1-ATPase	116% ± 6%	94% ± 8%
junctine	89% ± 12%	55% ± 12% *

Figure 53: Quantification des niveaux d'expressions de protéines des muscles rapides et lents de la souris KO triadine. 40 à 80 µg de protéines d'homogénats d'EDL (muscle rapide) et de soleus (muscle lent) de souris WT et KO ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 5%-15%. Des anticorps spécifiques anti RyR, sous-unité α1s du DHPR, SERCA, calséquestrine 1, FoF1-ATPase et junctine ont été utilisés pour l'analyse par Western blot. La quantification du niveau d'expression de chaque protéine a été normalisée par rapport à la quantité de chaîne lourde de myosine visualisée par coloration des membranes au bleu de Coomassie. Les quantifications correspondantes sont représentées par des histogrammes à droite de chaque blot. Le niveau d'expression des protéines dans le WT est fixé à 100%. Les expériences ont été réalisées sur 3 souris WT et 3 souris KO de 6 à 9 mois. **Tableau :** Données représentées en histogrammes sur la figure de gauche. Les * indiquent les valeurs significatives

C. Localisation des protéines du complexe de relâchement du Ca²⁺

Pour mettre en évidence une influence de la perte de la triadine sur la localisation de ses partenaires, la localisation du DHPR et du RyR a été étudiée par marquage immunofluorescent. Des doubles marquages immunofluorescents du RyR (en vert) et du

DHPR (en rouge) (Figure 54 A) ont donc été réalisés sur fibres dissociées de FDB de souris WT et KO.

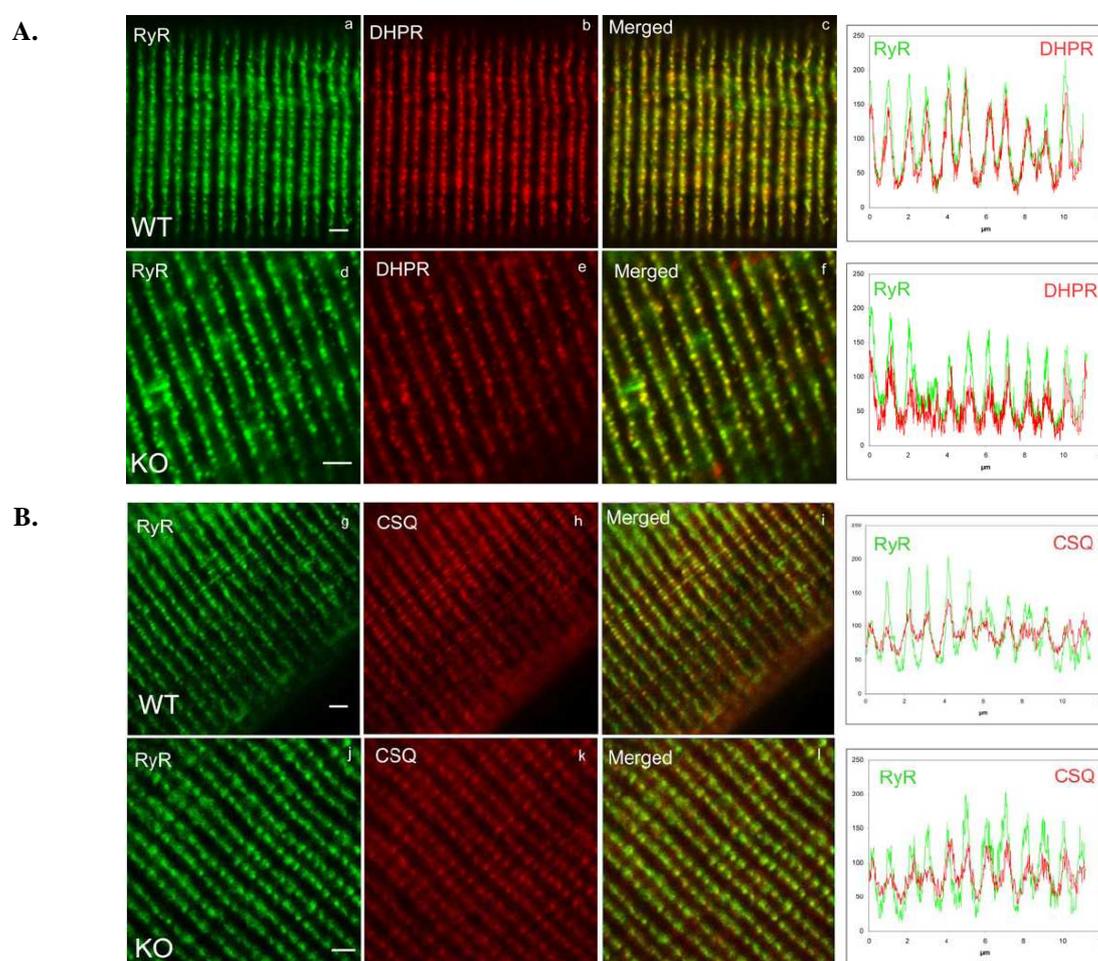


Figure 54: L'absence de triadine ne modifie pas la localisation des protéines du complexe de mobilisation du calcium à la triade. Un double marquage immunofluorescent a été réalisé sur fibres dissociées de FDB de souris WT et KO puis observé au microscope confocal. Les localisations du RyR (a, d, g, j), du DHPR (b, e), et de la calséquestrine (h, k) ont été mises en évidence grâce à des anticorps spécifiques de chaque protéine. L'intensité de la fluorescence sur une ligne parallèle à l'axe de la fibre passant par 6 paires de triades consécutives a été reportée sur les graphiques à droite de chaque panneau. Le code couleur utilisé sur les graphiques correspond à la couleur de chaque marquage: la courbe verte représente la fluorescence du marquage avec le fluorochrome vert et la courbe rouge la fluorescence du marquage avec le fluorochrome rouge. Barre d'échelle: 1 µm.

Le RyR et le DHPR ont tous deux un marquage en doubles rangées de points (chaque point étant une triade), marquages qui colocalisent parfaitement (en jaune). Ces marquages sont identiques dans le muscle WT et dans le muscle KO. Dans le but de mettre en évidence des différences fines entre les deux marquages, des courbes représentant l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance sur une ligne droite ont été tracées. La courbe verte représente le marquage du RyR, et la courbe rouge celui du DHPR. Ces courbes ont le même

profil pour les FDB de souris KO et de souris WT. Il ne semble donc pas y avoir de modification de la localisation du DHPR et du RyR dans les muscles de souris KO.

La même expérience a été réalisée pour étudier la localisation de la calséquestrine (Figure 54 B). Comme la triadine est un lien entre les polymères de calséquestrine et le RyR, il est possible que la suppression de ce lien entraîne une dispersion de la calséquestrine dans le RS. Étonnamment, les marquages de la calséquestrine par rapport au RyR sont toujours parfaitement colocalisés et tout à fait semblables dans les FDB WT et KO. Les graphiques de l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance ne montrent pas non plus particulièrement un étalement du marquage de la calséquestrine dans le FDB KO.

L'absence de la triadine ne semble donc pas modifier la localisation des autres protéines du complexe.

D. Etude ultrastructurale

La morphologie des muscles de souris KO triadine a été étudiée par microscopie électronique (Figure 55). Certains muscles de souris WT et KO ont subi une étape supplémentaire de coloration des compartiments qui communiquent avec le milieu extracellulaire, coloration qui permet donc de visualiser les tubules transverses, et dans le cas de désorganisations importantes des membranes, de les distinguer du RS (Figure 55 a, c, d). Dans l'EDL de souris WT, l'orientation des tubules transverses (colorés en noir) est perpendiculaire à l'axe des sarcomères, et parallèle aux lignes Z (Figure 55 a). Dans l'EDL de souris KO triadine, on remarque un certain nombre de tubules transverses obliques ou parallèles à l'axe de la fibre, perpendiculaires à la ligne Z (Figure 55 c). A fort grossissement, on peut voir que ces tubules-T sont associés à des vésicules allongées de RS, ce qui forme une triade mal orientée (Figure 55 d). L'EDL KO compte en moyenne 25% de triades mal orientées contre 3% dans l'EDL WT (soit 8 fois plus). Cette situation est souvent observée sur des triades en série, entre deux myofibrilles, sur toute la longueur de la fibre. Le soleus ne présente pas ce défaut de désorganisation des triades.

Une diminution de l'épaisseur des citernes terminales de RS a également été observée dans les muscles KO (Figure 55, comparer b et e). Ainsi, les citernes terminales ont une épaisseur moyenne de $68 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ ($n = 34$) dans les muscles WT et de $26 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ ($n = 55$) dans les KO, soit une réduction de 60%.

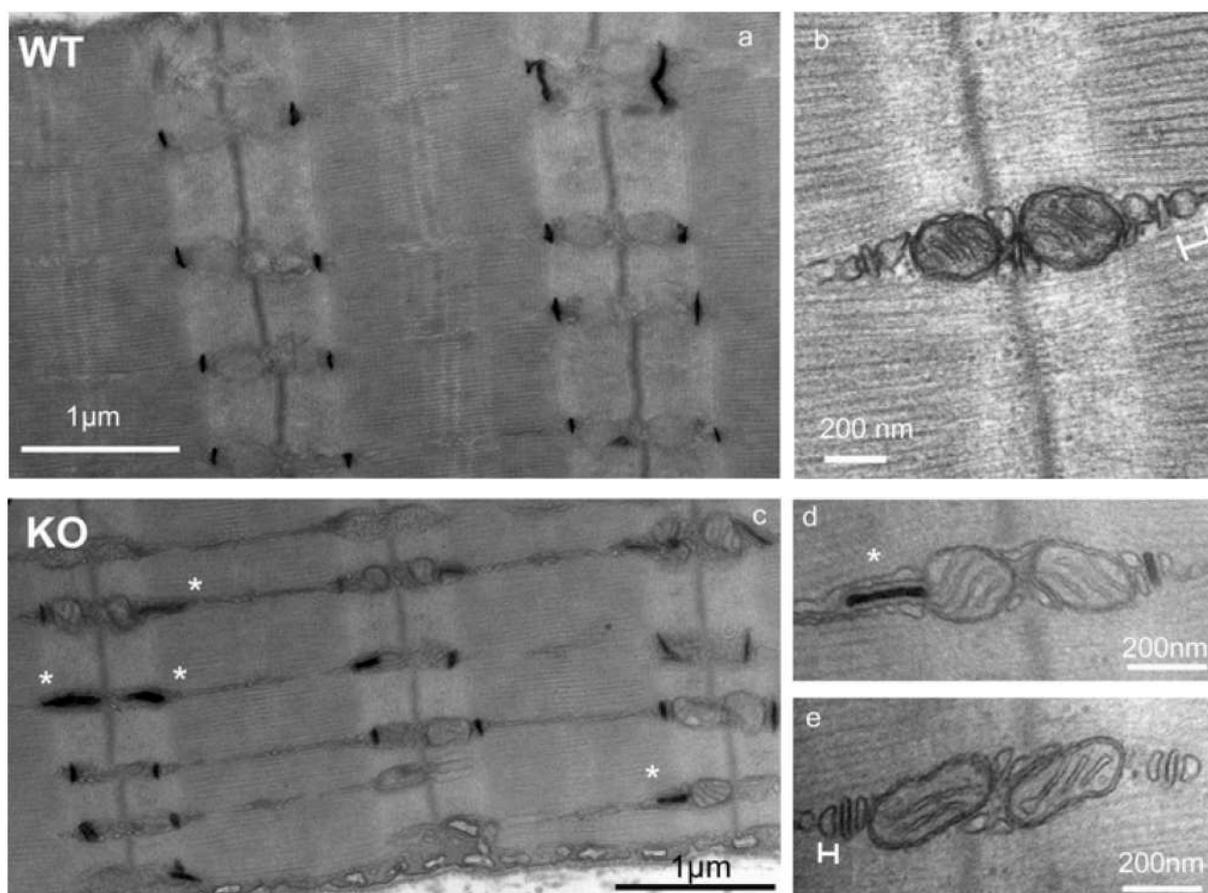


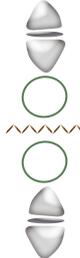
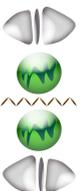
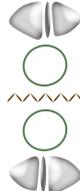
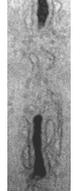
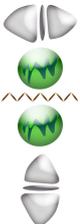
Figure 55: Les triades sont orientées longitudinalement dans les muscles de souris KO triadine et les citernes terminales du RS sont atrophiées. Les EDL de souris WT (a, b) et KO (c, d, e) ont été observés au microscope électronique. Les coupes de 70 nm d'épaisseur ont été observées à faible grossissement (a, c) et à fort grossissement (b, d, e) avec (a, c, d) ou sans (b, e) coloration des tubules au ferrocyanate de potassium. 25% des triades de l'EDL KO sont orientées longitudinalement au lieu de transversalement (astérisques) et l'épaisseur des citernes terminales de la souris KO est réduite de 60% par rapport à celle de la souris WT (e).

Dans l'EDL KO, lorsque les triades sont mal orientées, on peut constater qu'elles sont souvent dépourvues de mitochondries adjacentes. Ainsi, dans une situation classique où les deux triades d'une même paire sont orientées correctement, deux mitochondries sont présentes dans 58% des cas, et elles sont absentes pour 26% des paires de triades (Tableau 7). A l'opposé, lorsque les deux triades sont mal orientées il y a deux mitochondries pour 19% des paires et aucune mitochondrie pour 80% des paires. Plus précisément, dans la situation intermédiaire où une triade de la paire est normale et l'autre mal orientée, on peut observer que la proportion de paires de triades avec deux, une ou aucune mitochondrie est sensiblement la même que dans le cas où les deux triades sont normales. Pourtant dans 10% des cas où une seule mitochondrie est présente, elle est du côté de la triade normale et dans 3% des cas, du côté de la triade mal orientée (soit trois fois moins souvent).

Il y a donc une corrélation entre l'orientation des triades et la présence d'une mitochondrie adjacente, probablement due à la mise en place des mitochondries au cours du développement

qui nécessite leur ancrage à la citerne terminale du RS pour être présente à proximité des triades.

Tableau 7: Corrélation entre l'orientation des triades et le nombre de mitochondries associées dans l'EDL de souris KO.

2 triades transversales						
	58,2%		15,1%		26,7%	
2 triades longitudinales						
	19%		1%		80%	
1 triade longitudinale + 1 triade transversale						
	53%		10%		3%	
			13%		34%	
Légende						
						
triade transversale	mitochondrie	ligne Z	absence de mitochondrie	triade longitudinale		

E. Etudes physiologiques

La triadine étant une protéine du complexe de relâchement du Ca^{2+} , complexe indispensable à la contraction musculaire, nous avons recherché une faiblesse musculaire chez la souris KO triadine. La force musculaire de la souris KO triadine a été testée par différentes

méthodes. La force globale a été évaluée par des tests d'agrippement sur animal vigile. La force de différents groupes musculaires a ensuite été testée soit sur animal anesthésié pour le gastrocnémien au laboratoire de David Bendahan (IGBMC, Marseille), soit par mesure de force directe pour l'EDL et le soleus au laboratoire de L. Csernoch (Physiologie Département, Debrecen, Hongrie).

1. Mesure de force globale

La force globale de la souris KO triadine a été évaluée par un test d'agrippement simple: la souris est déposée sur une grille à plat. Puis la grille est retournée et le temps que la souris passe suspendue à la grille est chronométré. Les souris WT restent accrochées $290 \text{ s} \pm 10 \text{ s}$ tandis que les souris KO triadine tombent au bout de $45 \text{ s} \pm 12 \text{ s}$. Cette différence d'un facteur 7 dénote clairement une faiblesse musculaire globale des souris KO triadine.

2. Mesure de force du gastrocnémien

Pour s'affranchir de toute composante autre que musculaire squelettique (problème d'équilibre, composante neurologique ou cardiaque), la mesure de force a été faite sur le muscle gastrocnémien de souris anesthésiées en continu. Ces expériences auxquelles j'ai pu assister ont été réalisées à Marseille en collaboration avec David Bendahan et Benoît Giannesini.

Pour mesurer la force du gastrocnémien, un stimulateur transcutané est placé contre la peau du mollet et la patte est attachée à un piston qu'elle enfonce à chaque stimulation. Le muscle est stimulé à 1,7 Hz pendant 6 min. Les résultats sont présentés sous forme d'une courbe de la force isométrique développée par le muscle en $\text{mN}/\text{contraction}/\text{mm}^3$ en fonction du temps (Figure 56 A). La force isométrique est la force développée par le muscle sans raccourcissement des fibres. L'augmentation de la force au cours de la 1^{ère} minute de stimulation est l'effet « staircase ». Au bout d'une minute de stimulation, la force décroît car le muscle se fatigue. En début d'expérience, le gastrocnémien de souris KO (●) développe une force inférieure d'1/3 au WT (○), puis atteint un maximum qui correspond à la force de départ du WT. Après 6 min de contraction, le gastrocnémien KO développe une force égale au gastrocnémien WT. L'absence de triadine engendre donc une faiblesse musculaire.

Le calcul du rapport de la force développée à chaque stimulation sur la force de départ représente la fatigue musculaire (Figure 56 B). Le niveau de référence étant la première

stimulation, il est fixé à 100%. Étonnamment, la force du gastrocnémien KO augmente plus que la force du gastrocnémien WT. Le rapport diminue ensuite mais celui du KO reste supérieur à celui du WT jusqu'à la fin de l'expérience. Les muscles de souris KO triadine présentent donc une résistance accrue à la fatigue. Les gastrocnémiens qui n'expriment pas la triadine développent donc moins de force que les WT mais résistent mieux à la fatigue.

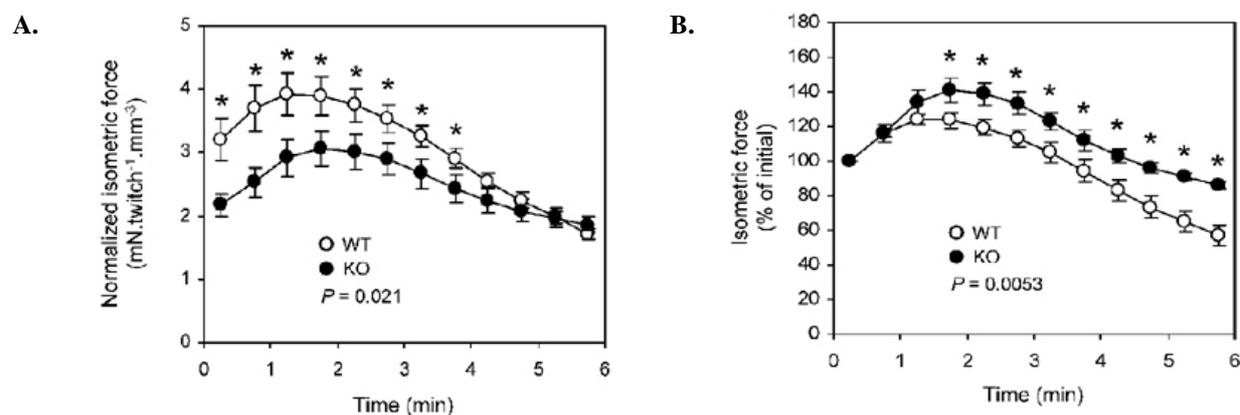


Figure 56: La souris KO triadine a une faiblesse musculaire mais résiste à la fatigue. **A.** Force isométrique des gastrocnémiens normalisée au volume musculaire en fonction du temps développée à chaque contraction déclenchée par une stimulation électrique supraliminaire à 1,7 Hz. **B.** Force relative développée à chaque stimulation. Les astérisques indiquent une différence significative entre les groupes de souris ($p < 0.05$).

3. Distinction entre muscle lent et muscle rapide

Le gastrocnémien est un muscle composé de fibres lentes et de fibres rapides. Pour tester la force de chaque type de fibre, des tests de contraction sur muscles isolés ont été réalisés sur EDL (muscle rapide) et soleus (muscle lent). J'ai réalisé cette série d'expérience à Debrecen (Hongrie) en collaboration avec Laszlo Csernoch et Peter Szentesi.

Pour mesurer la force de l'EDL et du soleus, des contractions musculaires uniques ont été déclenchées par stimulation supraliminaire à une fréquence de 1 Hz. L'EDL de souris WT développe une force supérieure à l'EDL de souris KO triadine (Figure 57 A). Le soleus de souris WT développe également une force supérieure au KO (Figure 57 B). Globalement, l'EDL et le soleus de souris KO triadine produisent environ 50% de la force des WT.

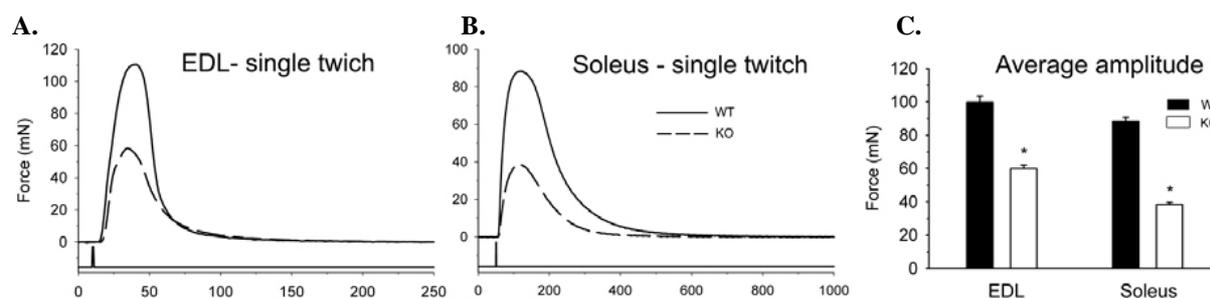


Figure 57: Les contractions simples de l'EDL et du soleus indiquent une faiblesse musculaire chez les souris KO. Les contractions provoquées par des stimulations supraliminaires à 1 Hz (A: EDL, et B: soleus) montrent une faiblesse musculaire des KO (ligne discontinue) par rapport aux WT (ligne continue). C. Histogramme des forces maximales moyennes des EDL et soleus de 5 souris WT (■) et de 6 souris KO (□). Les astérisques indiquent une différence significative entre les groupes de souris ($p < 0.05$).

La force maximale de chaque muscle a été atteinte par des trains de stimulation supraliminaires à haute fréquence (stimulations téaniques de 100 Hz pour les EDL et 500 Hz pour les soleus). La courbe de la force (mN) en fonction du temps (ms) des EDL est typique des muscles rapides avec une augmentation rapide de la force suivie d'un bref pic et d'un court plateau puis d'une diminution très rapide dès la fin de la stimulation (Figure 58 A). La forme de la courbe des KO est différente de celle des WT: le plateau à la suite du pic est absent. De plus, une fois encore, l'EDL WT développe une force supérieure au KO. Le soleus, quant-à-lui, développe sa force maximale très progressivement puis elle décroît immédiatement après arrêt de la stimulation (Figure 58 B). Le soleus WT développe une force supérieure au soleus KO. Ces résultats indiquent que quel que soit le type de muscle ou de contraction, les muscles de souris KO développent une force inférieure aux muscles de souris WT.

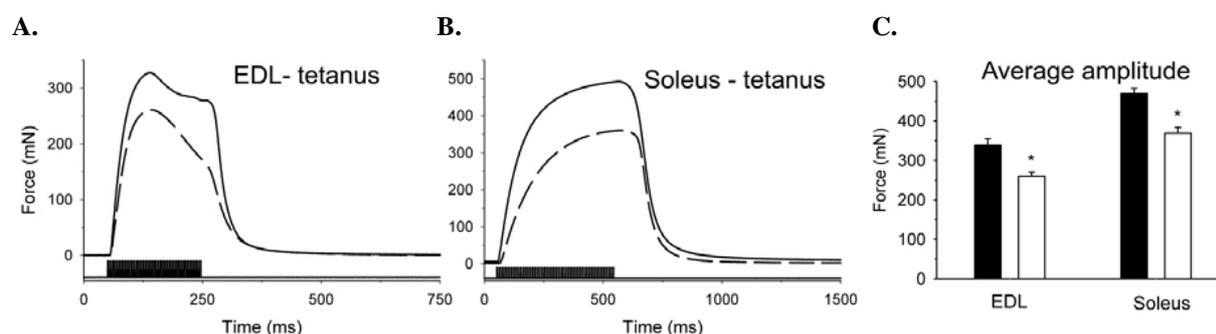


Figure 58. Les contractions téaniques de l'EDL et du soleus indiquent une faiblesse musculaire de la souris KO. Les tetani provoqués par des trains de stimulations supraliminaires à haute fréquence (A: 100 Hz pour les EDL, et B: 500 Hz pour les soleus) montrent une faiblesse musculaire des KO (ligne discontinue) par rapport aux WT (ligne continue). C. Histogramme des forces maximales moyennes des EDL et soleus de 5 souris WT (■) et de 6 souris KO (□). Les astérisques indiquent une différence significative entre les groupes de souris.

Les stimulations téaniques ont été répétées 150 fois consécutives toutes les 4 secondes (0,25 Hz). La force développée par le muscle à chaque tetanus a été normalisée à la force maximale produite au cours de la série de contractions. La courbe de ce pourcentage de force maximale en fonction du nombre de tetani représente la fatigue musculaire (Figure 59). L'EDL WT et l'EDL KO sont à 100% à la première contraction téanique. Au 150^{ème} tetanus, le pourcentage de force du WT (ligne continue) est inférieur à celui du KO (ligne discontinue). Il en est de même pour le soleus. L'absence de triadine dans les muscles rapides et lents des souris KO induit donc une résistance à la fatigue musculaire accrue.

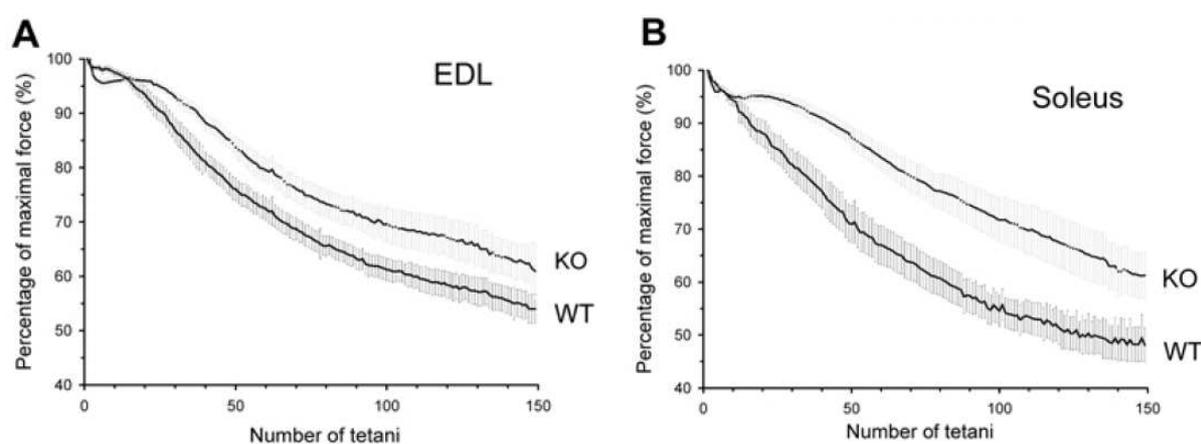


Figure 59. Les muscles de souris KO triadine sont moins sensibles à la fatigue que les muscles de souris WT. Evolution de l'amplitude des tetani de l'EDL (A) et du soleus (B) au cours de séries de 150 stimulations répétées toutes les 4 s. L'amplitude de chaque tetanus a été normalisée par l'amplitude maximale de chaque train de stimulations. (WT ligne continue, KO ligne discontinue).

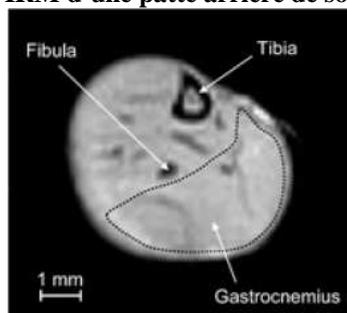
4. Etude anatomique et métabolique par IRM

La mesure de force du gastrocnémien a été réalisée au cœur d'un aimant de Résonance Magnétique Nucléaire ce qui permet d'effectuer de l'imagerie par résonance magnétique pour obtenir des images de la patte de la souris en même temps qu'un suivi du métabolisme du muscle par spectrométrie. L'imagerie anatomique permet d'identifier et de mesurer les groupes musculaires, et l'imagerie fonctionnelle permet de mettre en évidence des zones d'inflammation et d'infiltration par visualisation des composants eau/graisse/muscle

Le volume du gastrocnémien mesuré par imagerie anatomique (Figure 60 A) révèle que le gastrocnémien KO est réduit d'un facteur 1,2 environ par rapport au WT (Tableau en B). Le poids des souris n'est cependant pas significativement différent entre les deux groupes. Les souris KO ont donc une légère atrophie musculaire, insuffisante pour entraîner une

modification de poids corporelle. Aucun défaut pathologique n'a été observé en imagerie fonctionnelle.

A. IRM d'une patte arrière de souris



B. Volume du gastrocnémien et poids des souris WT et KO

	WT	KO
volume du gastrocnémien	109,4 mm ³ ± 3,3 mm ³ *	92,6 mm ³ ± 4,3 mm ³
poids des souris	28,6 g ± 1,4 g	26,8 g ± 0,9 g

Figure 60. Imagerie anatomique et suivi du métabolisme au cours de l'exercice par Résonance Magnétique Nucléaire. **A.** Image par Résonance Magnétique Nucléaire de la patte arrière d'une souris montrant la délimitation du muscle gastrocnémien et les deux os de la patte. **B.** Volume moyen du gastrocnémien mesuré par IRM et poids moyen de 10 mâles WT et 10 mâles KO âgées de 5 à 6 mois. Les astérisques indiquent les valeurs significatives.

Le suivi de la consommation de la PCr au cours de l'effort par spectrométrie (Figure 61 A) ne montre aucune différence significative entre le groupe de souris KO et le groupe de souris WT. De même, aucune différence n'a pu être observée quant au pH intracellulaire des gastrocnémiens WT et KO (Figure 61 B): l'acidification des muscles WT et KO au cours de l'effort est totalement similaire.

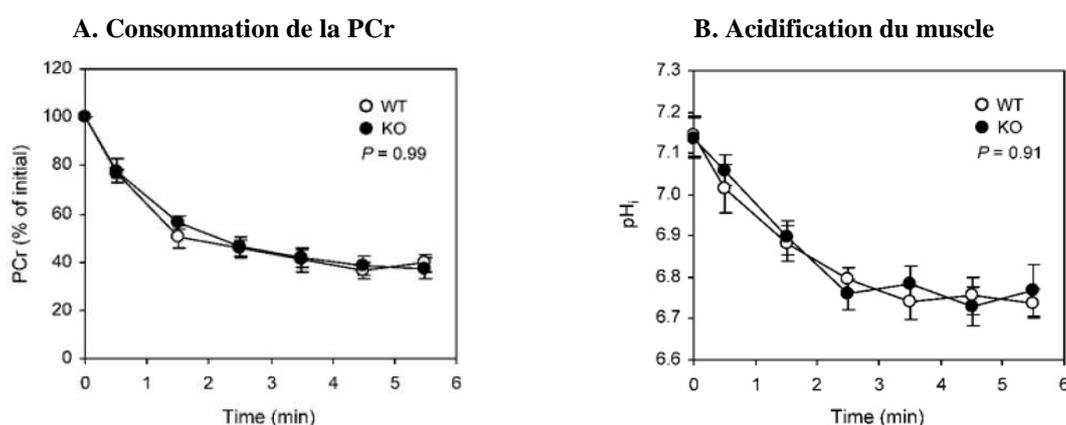


Figure 61: Les souris KO n'ont pas d'altération du métabolisme. **A.** Variation de la Phosphocréatine (PCr) dans le muscle gastrocnémien en % de la quantité initiale tout au long des stimulations. **B.** Variation du pH intracellulaire pendant les 6 min de contractions répétées. Le premier point à t = 0 min indique la valeur au repos.

Aucune altération du métabolisme n'a donc pu être observée, la faiblesse musculaire de la souris KO ainsi que sa résistance accrue à la fatigue ne peuvent donc pas être expliquées par une modification du métabolisme cellulaire.

F. Discussion

La suppression d'une protéine chez la souris est un outil de choix pour l'étude de sa fonction *in vivo*. Dans la souris KO triadine, l'expression de toutes les isoformes de la triadine a été supprimée. Le niveau d'expression des autres protéines du complexe de mobilisation du Ca^{2+} a été modifié, ce qui témoigne d'une adaptation du muscle à la perte des triadines. En outre, les muscles présentent des défauts majeurs dans la structure des triades. Ces muscles KO triadine ont une importante faiblesse musculaire, mais, de façon surprenante, une meilleure résistance à la fatigue que leurs homologues sauvages.

1. Expression du complexe de relâchement du Ca^{2+} à la triade et organisation du muscle KO triadine : un rôle structural de la triadine

Les muscles rapides de la souris KO triadine présentent une baisse drastique de CSQ1, beaucoup plus importante que celle observée dans un autre modèle de souris KO triadine développé simultanément aux Etats-Unis (réduction d'un facteur 4 dans notre modèle contre 1,5 dans le modèle précédent) (Shen *et al.*, 2007).

Comme la triadine lie la calséquestrine, il aurait été possible que cette dernière subisse des altérations de sa localisation comme cela a été montré dans les cardiomyocytes KO triadine (Chopra *et al.*, 2009). Mais ce n'est pas le cas dans le muscle squelettique de notre modèle. Ceci peut être expliqué par la présence de la junctine, qui est toute indiquée pour contrebalancer la perte de la triadine pour cette fonction (Tijsskens *et al.*, 2003). Il est possible que la junctine seule puisse compenser l'absence de triadine car il y a 4 fois moins de CSQ1 à ancrer près de RyR1. Il est donc probable que si le niveau de CSQ1 n'était pas diminué, la junctine seule ne suffirait plus pour son ancrage et une colocalisation imparfaite de CSQ1 avec RyR1 pourrait être observée.

L'expression du DHPR est augmentée d'un facteur 1,7 dans l'EDL mais n'est pas modifiée dans le soleus. Ce résultat peut être mis en corrélation avec les 25% de triades orientées longitudinalement, uniquement dans l'EDL de souris KO. Les tubules de ces triades longitudinales apparaissent beaucoup plus longs que ceux des triades normales. Ils pourraient donc être le reflet d'une augmentation de DHPR dans la membrane, ce qui pourrait être

confirmé (ou infirmé) en mesurant la conductance membranaire calcique dépendante du voltage de ces cellules musculaires.

La désorientation des triades est un phénomène récurrent dans les muscles des animaux KO pour une protéine impliquée dans la structure ou la formation de la triade. Ainsi, ce phénomène a été observé chez les souris KO Bin1 (Razzaq *et al.*, 2001), KO cavéoline-3 (Galbiati *et al.*, 2001) ou encore KO mitsugumine-29 (Nishi *et al.*, 1999), la mitsugumine-29 étant une protéine du RS, jusque-là impliquée dans la régulation des relâchements de Ca^{2+} . La suppression de la junctophiline produit également des désordres des triades, mais ces désordres sont différents de ceux générés par les protéines ci-dessus. Ainsi le muscle KO junctophiline présente une diminution globale du nombre de triades et de diades et une vacuolisation du RS, mais pas de défaut d'orientation des triades (Ito *et al.*, 2001; Komazaki *et al.*, 2002).

Dans le muscle squelettique du modèle de souris KO triadine précédent, une mauvaise orientation des triades a été décrite, dans les mêmes proportions que les nôtres. Une baisse de la junctophiline a également été observée (Shen *et al.*, 2007). Nous n'avons pas visualisé le niveau de la junctophiline dans notre modèle, mais les défauts retrouvés dans le muscle KO triadine sont différents de ceux observés dans le KO junctophiline, il semble donc peu probable qu'il soient dus à une modification de la junctophiline.

De même, les défauts structuraux observés dans notre muscle de souris KO triadine ne peuvent pas être dus à la baisse de CSQ1, car ils sont différents des défauts observés dans le KO CSQ1 qui en plus ne présente aucune modification de l'expression de la triadine (dédouplements des triades et augmentation du nombre de mitochondries) (Paolini *et al.*, 2007). Le seul point commun entre les KO CSQ1 et triadine sont la réduction de l'épaisseur des citernes terminales du RS, probablement dues à la diminution de la quantité de CSQ1 à stocker.

Ces résultats suggèrent donc un rôle structural de la triadine, dans la mise en place ou le maintien de la triade. Un tel rôle correspondrait d'ailleurs aux résultats d'expression de la triadine dans les cellules COS obtenus au laboratoire qui montrent clairement que la triadine est impliquée dans la structure des membranes de RE (J. Fauré et A. Fourest-Lieuvain, travaux en cours).

D'autre part il semble que la taille des trois compartiments de la triade soit liée à la quantité de protéine à stocker:

- l'augmentation du DHPR dans notre modèle peut être associée à de plus long tubules-T

- l'augmentation de RyR1 dans le KO CSQ1 (Paolini *et al.*, 2007) à un dédoublement des triades et donc des citernes de RS
- la baisse de RyR2 dans le cœur KO triadine est à relier à une diminution de la surface et du nombre de contacts RS/tubules (Chopra *et al.*, 2009)
- et la baisse ou l'absence de CSQ1 conduirait à une réduction de la taille des citernes terminales de RS (Paolini *et al.*, 2007).

On peut noter que, dans l'EDL de notre modèle de souris KO triadine, les triades mal orientées sont en général privées de la présence de mitochondries. Selon le travail de S. Boncompagni *et al.* (2009), les mitochondries se déplacent entre les myofibrilles, le long des bandes I, jusqu'à ce qu'elles soient raccrochées au RS par des liens dont le nombre augmente au cours du développement musculaire, liens pour le moment non identifiés. Ce processus a été montré entre 0,5 et 4 mois post-natal (Boncompagni *et al.*, 2009). Nos observations en microscopie électronique ont été réalisées sur des souris KO triadine de 2 mois, donc avant la fin de l'installation et de la liaison des mitochondries au RS. Si les triades sont en configuration longitudinale avant que les mitochondries ne soient installées et reliées au RS, il est probable que les mitochondries ne puissent y être rattachées au vu de la toute petite surface de RS disponible pour leur ancrage. En effet, la courbure du RS des triades longitudinales présente une surface très réduite pour l'amarrage des mitochondries au niveau de la bande I. Lorsqu'une mitochondrie est associée à une triade longitudinale, soit elle l'est sur le côté de la triade et donc déborde sur la bande A (Figure 62 B), soit la courbure du RS prend un aspect « écrasé » (Figure 62 B et C).

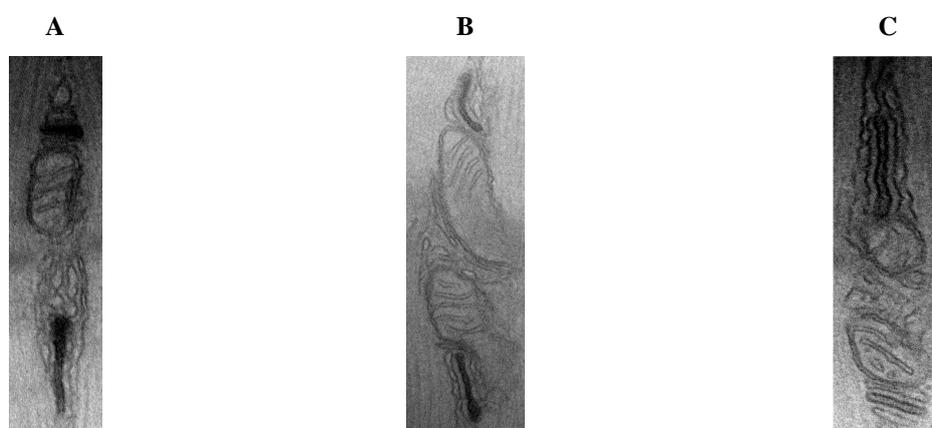


Figure 62: Les mitochondries sont associées préférentiellement aux triades ayant une orientation transversale. A. Les mitochondries sont plus fréquemment associées aux triades transversales. **B.** Lorsqu'elles sont associées aux triades longitudinales, elles le sont sur le côté de la triade, ou **B** et **C.** l'extrémité du RS a un aspect « écrasé » par la mitochondrie

Une autre explication à l'absence de mitochondries associées aux triades pourrait être que Trisk 32 serve d'ancrage aux mitochondries et que son absence rende le lien avec le RS plus fragile et donc susceptible de se briser du fait du travail mécanique déployé par la contraction. Cependant, de même que l'hypothèse que les triadines relierait le RyR au DHPR (Caswell *et al.*, 1991), voire même le RS au tubule-T, a été invalidée du fait de la très faible longueur de la partie cytoplasmique de la triadine (47 acides aminés) comparée aux 15 nm à franchir, il semble peu probable que cette hypothèse puisse s'appliquer dans le cas de l'ancrage des mitochondries, la distance moyenne entre le RS et les mitochondries étant de 10 nm. Cependant Trisk 32 pourrait être reliée indirectement à une molécule occupant cette fonction. Par exemple, il a été montré qu'il existe un lien entre l'IP₃R dans le RS et VDAC dans la membrane mitochondriale externe (la protéine grp75) (Szabadkai *et al.*, 2006). On pourrait donc imaginer que l'absence de Trisk 32 pourrait altérer la localisation de l'IP₃R ou son association à VDAC via ce lien et donc fragiliser l'ancrage des mitochondries au RS.

2. Le paradoxe des muscles KO triadine: faiblesse musculaire et résistance à la fatigue

L'augmentation de la résistance à la fatigue était pour le moins inattendue. Cette observation a également été faite dans le cas des souris KO CSQ1, mais a été attribuée au doublement de la quantité de mitochondries dans les muscles, ce qui n'a pas été observé dans notre modèle de souris KO triadine (Paolini *et al.*, 2007).

Il est intéressant de noter que l'augmentation de la résistance à la fatigue a été montrée dans la souris KO sarcaluménine (Zhao *et al.*, 2005). La sarcaluménine est une protéine du RS longitudinal associée à SERCA et qui lie le Ca²⁺ (Yoshida *et al.*, 2005). Le RS du muscle de ces souris KO sarcaluménine est moins chargé en Ca²⁺ que celui des souris sauvages (Yoshida *et al.*, 2005). Or il s'est avéré que la résistance à la fatigue des souris KO sarcaluménine était liée à la concentration en Ca²⁺ extracellulaire: les expériences de contracture sur EDL isolé ont montré qu'en présence de 2,5 mM de Ca²⁺ extracellulaire, les muscles de souris KO sarcaluménine résistaient plus à la fatigue que les WT, différence abolie en absence de Ca²⁺ extracellulaire. Ainsi, les muscles KO sarcaluménine résistent mieux à la fatigue grâce à une augmentation de l'entrée capacitive de Ca²⁺.

Il a été montré que les stocks de Ca²⁺ de la souris KO triadine américaine sont diminués (Shen *et al.*, 2007) et, sur notre modèle, toutes les expériences de mesure de fatigue sur muscle isolé

réalisées au laboratoire de L. Cernoch ont été faites en présence de Ca^{2+} extracellulaire. Comme la surexpression de Trisk 95 diminue l'entrée capacitive de Ca^{2+} (Vassilopoulos *et al.*, 2007), il est envisageable que cette résistance à la fatigue soit due, ici aussi, à une augmentation de l'entrée capacitive suite à la perte de la triadine. Il serait donc très intéressant de tester cette hypothèse sur les muscles de souris KO triadine en réalisant le protocole de fatigue sur muscle isolé en absence de Ca^{2+} extracellulaire. Comme cela a été réalisé pour le KO sarcaluménine, l'entrée capacitive peut être évaluée sur fibres dissociées, en chargeant les tubules-T avec une sonde calcique imperméante et en déclenchant l'entrée capacitive de Ca^{2+} par un cocktail thapsigargine-caféine. La diminution de l'intensité de la sonde dans les tubules-T reflète l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules: plus l'intensité de la sonde diminue, moins il y a de Ca^{2+} dans les tubules-T, donc plus il y a de Ca^{2+} qui entre dans les cellules, c'est-à-dire d'entrée capacitive de Ca^{2+} (Launikonis *et al.*, 2003). L'entrée capacitive des cellules KO triadine peut être également testée grâce à des expérience de «Manganese quenching»: les cellules sont chargées avec une sonde calcique et l'entrée capacitive est déclenchée par vidange des stocks internes. Le Ca^{2+} extracellulaire est remplacé par du Mn^{2+} qui a la propriété de rentrer dans la cellule par les mêmes voies que le Ca^{2+} et de se fixer sur la sonde calcique intracellulaire. Cependant, à l'inverse du Ca^{2+} , le Mn^{2+} éteint la fluorescence de la sonde de façon irréversible. Ainsi, plus l'entrée capacitive est importante, plus la fluorescence de la sonde diminue.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES



[HTTP://PHD.STANFORD.EDU/COMICS](http://phd.stanford.edu/comics)

Le but de ce travail de thèse était d'étudier la localisation et les partenaires de la triadine en général, et de Trisk 32 en particulier, pour comprendre leurs fonctions au sein du muscle squelettique. Des approches complémentaires ont été mises en œuvre sur différents modèles. Des études biochimiques, physiologiques et de microscopie ont été utilisées pour étudier la triadine dans des cultures de lignées cellulaires infectées avec des adénovirus, des cultures primaires, ou *in vivo* dans des muscles qui la surexpriment ou qui ne l'expriment pas. Les résultats ainsi obtenus nous ont permis d'identifier des processus qui mettent en jeu la triadine et donc d'avancer dans la compréhension de sa fonction.

Trisk 95, 51 et 32 sont toutes trois associées avec RyR1 dans les triades du muscle squelettique. Cependant, il apparaît qu'il pourrait y avoir deux types de complexes: un comprenant RyR1 couplé au DHPR, avec Trisk 95 et Trisk 51 (Figure 63, a), et l'autre avec RyR1 non couplé et Trisk 32 (Figure 63, b). Ces deux complexes sont associés avec la cavéoline-3 via le RyR. Trisk 32 est également associée avec l'IP₃R-III dans le RS longitudinal, formant avec la junctate, un 3^{ème} complexe (Figure 63, c). Si il apparaît clairement que Trisk 32 est localisée à l'interface RS/mitochondrie où elle est associée avec l'IP₃R-III, sa localisation dans les mitochondries reste à préciser. Elle pourrait y être associée avec RyR1 dans la membrane mitochondriale interne (Figure 63, e). Trisk 32 peut être associée avec VDAC dans les MAM du RS ou dans les mitochondries (Figure 63, d). La mitsugumine 23, présente dans la totalité du RS (jonctionnel, longitudinal et péri-nucléaire) est associée avec Trisk 32 et pourrait faire partie de plusieurs de ces complexes (Figure 63, c, d).

L'association des triadines avec différents canaux calciques les désigne comme régulateurs de ces canaux et c'est toujours dans ce sens qu'elles ont été étudiées jusqu'à présent dans la littérature. Toutes ces études ont d'ailleurs montré, par modification du niveau d'expression de la triadine (en général Trisk 95 dans le muscle squelettique et Trisk 32/CT1 dans le cœur), qu'elles pouvaient effectivement moduler l'homéostasie calcique de la cellule même si les résultats sont parfois contradictoires.

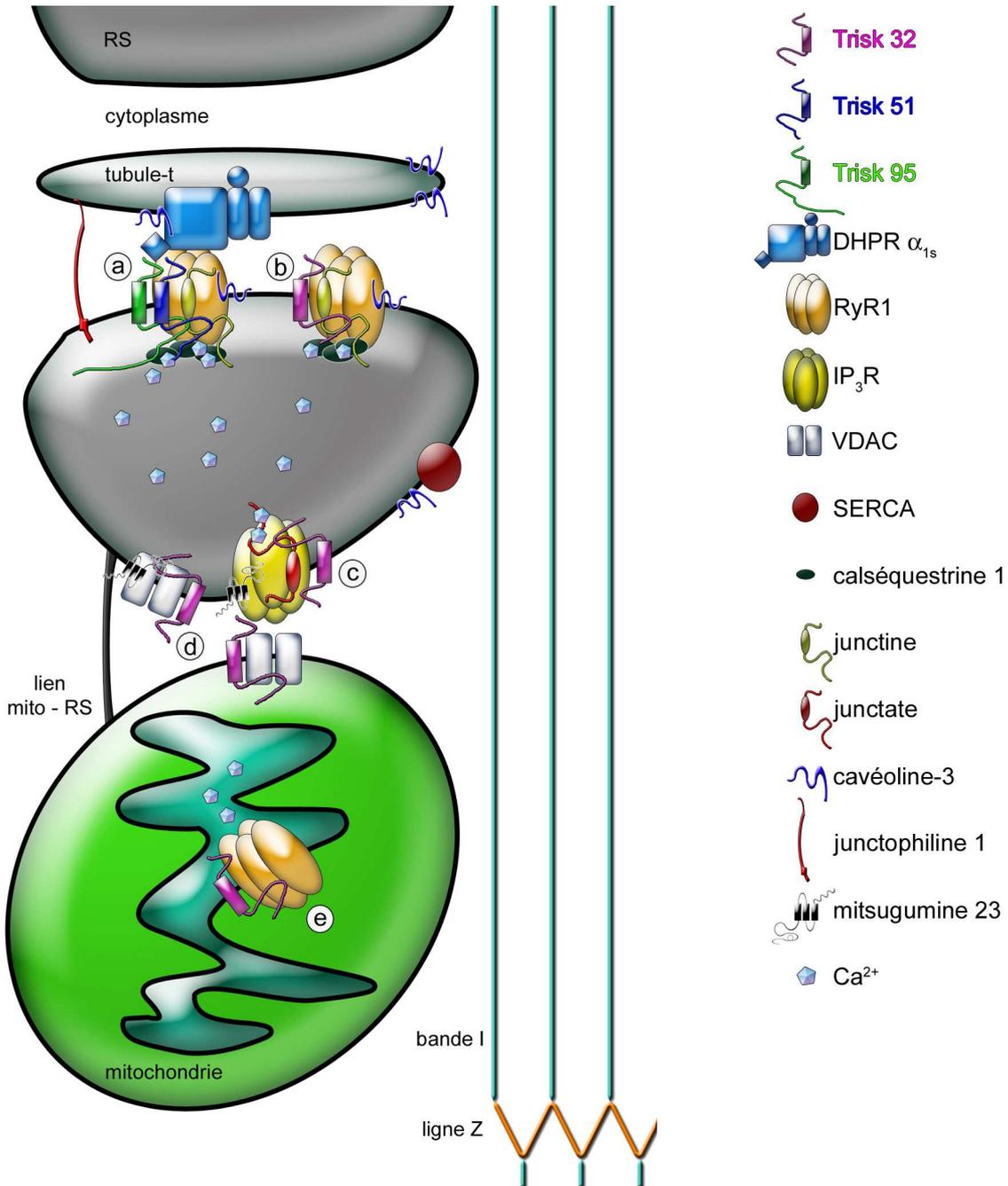


Figure 63: Schéma récapitulatif des différents partenaires et localisations de la triadine. Les triadines ont plusieurs partenaires, notamment Trisk 32 qui serait au centre de l'homéostasie calcique. Différents complexes peuvent exister dans le RS jonctionnel, dans le RS longitudinal et dans les mitochondries:

a. Trisk 95/Trisk 51/CSQ1/junctine/RyR1/cav-3/DHPR, dans le RS jonctionnel

b. Trisk 32/CSQ1/junctine/RyR1/cav-3, dans le RS jonctionnel

c. Trisk 32/junctate/IP₃R-III ± MG23, dans le RS longitudinal

d. Trisk 32/VDAC ± MG23, dans le RS longitudinal et dans les mitochondries (sans MG23)

e. Trisk 32/RyR1, dans les mitochondries.

Actuellement, un nombre grandissant de résultats de notre équipe indique que la triadine pourrait également avoir un rôle structural, ce qui n'est pas incompatible avec une fonction de régulation de canaux calciques. Ainsi la suppression de toutes les isoformes chez

la souris entraîne une myopathie structurale avec des triades mal orientées. Ce phénomène a déjà été observé dans les muscles de souris KO pour des protéines de structure du tubule-T ou du RS comme la cavéoline-3, associée au RyR dans le CRC. Parmi les isoformes, Trisk 49 qui est colocalisée avec la titine au niveau de la jonction A/I et qui n'est associée ni avec le RyR ni avec l'IP₃R, pourrait avoir un rôle d'ancrage du RS aux sarcomères. Ainsi l'absence de Trisk 49 pourrait fragiliser la liaison RS/sarcomère. La contraction musculaire étant responsable de fortes contraintes mécaniques sur la cellule, elle pourrait faire céder la liaison RS/sarcomère et provoquer des dégâts structuraux dans la cellule.

Les cultures primaires de muscle squelettique de souris KO triadine ainsi que les adénovirus disponibles au laboratoire pour chaque isoforme constituent un moyen efficace pour l'étude de la fonction de chaque triadine. Les triadines pourront être ré-exprimées séparément ou ensemble. Les cultures pourront être ensuite utilisées pour étudier les canaux calciques par imagerie calcique bien sûr, mais des tests de différenciation peuvent être pratiqués, la mise en place des triades peut être suivie, etc....

La souris KO triadine est d'ores et déjà un outil puissant pour l'étude de la fonction de la triadine et de son implication dans les myopathies. Il est déjà évident que l'absence totale de triadine, si elle n'est pas létale en elle-même, est toutefois responsable d'une myopathie, et de troubles du rythme cardiaque chez la souris (Chopra *et al.*, 2009). Cette souris KO peut donc être considérée comme un modèle de myopathie structurale: les défauts sont d'ordre structural et peuvent être la cause ou la conséquence des problèmes de l'homéostasie calcique de la contraction musculaire. Il serait donc fort intéressant de séquencer la triadine pour les patients atteints d'une myopathie ou d'une cardiomyopathie d'origine inconnue.

Le travail que j'ai réalisé a apporté de nouvelles réponses sur la fonction de la triadine dans le muscle, et il ouvre également sur de nombreuses questions qui feront l'objet de prochains travaux de l'équipe.

ANNEXES

Manuscript I : Caveolin-3 is associated with the calcium release complex and is modified under *in vivo* triadin modification

Caveolin-3 is associated with the calcium release complex and is modified under *in vivo* triadin modification

Stéphane Vassilopoulos*^{1,2}, Sarah Oddoux*^{1,2}, Séverine Groh³, Julien Fauré^{1,2,4}, Julie Brocard^{1,2}, Kevin P. Campbell³, Isabelle Marty^{1,2,4} §.

¹INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologies, Grenoble, F-38000 France

²Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000 France;

³Howard Hughes Medical Institute, University of Iowa College of Medicine, Department of Physiology and Biophysics, Neurology, Iowa City, Iowa 52242, USA

⁴CHRU de Grenoble, Hopital Michallon, Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000 France

* These two authors contributed equally to this work

§ to whom correspondence should be sent

mailing address :

Isabelle Marty

Grenoble Institut des Neurosciences

INSERM U836/ Eq Muscle et Pathologies

UJF Site Santé

BP170

38042 Grenoble Cedex 9 - France

E-mail : isabelle.marty@ujf-grenoble.fr

Tel : 33 4 56 52 05 71

Fax : 33 4 56 52 05 72

Running title : Association of triadin and caveolin-3.

Key words: triadin, caveolin-3, ryanodine receptor, dihydropyridines receptor, mouse skeletal muscle, adenovirus.

INTRODUCTION

The excitation-contraction coupling process (E-C) takes place at close contacts between the membrane of the T-tubules and the SR called “triads”. Ultrastructural and biochemical studies have shown that a protein complex in the triad membrane of skeletal muscle fibers is responsible of the calcium release, which occurs during muscle contraction (Meissner and al., 1989, Fleisher and al., 1994, Franzini-Armstrong and al., 1994, Marty and al, 1994). This complex includes the dihydropyridines receptor (DHPR), a voltage dependant calcium channel in the T-tubule membrane, the ryanodine receptor (RyR), the calcium channel of the sarcoplasmic reticulum membrane responsible for Ca^{2+} -release during muscle contraction, calsequestrin, the luminal protein that sequesters Ca^{2+} near RyR, and triadin.

Triadin is a transmembrane protein of junctional sarcoplasmic reticulum, co-localized with RyR that was initially detected in rabbit skeletal muscle as a specific triad protein of 95 kDa molecular weight. Several isoforms of triadin are expressed in rat skeletal muscle, and we previously cloned four of these isoforms in rat skeletal muscle (Marty et al., 2000, Vassilopoulos et al., 2005). The first one is the rat orthologue of the 95-kDa triadin identified in rabbit muscle skeletal, called Trisk 95 (T95), and the second one, Trisk 51 (T51), is a truncated form of Trisk 95 (461 amino acids instead of 687 amino acids) almost identical for the major part of the protein but with a 6 amino acid specific C-Terminal end. Two others smaller isoforms, Trisk 49 and Trisk 32, were cloned later (Vassilopoulos et al, 2005). It has been shown that in skeletal muscle, triadin inhibits the channel activity of purified RyR (Groh et al, 1999, Ohkura et al, 1998). These experiments were the first to identify a function of triadin in skeletal muscle, and led to the conclusion that triadin could control the function of RyR via the inhibition of the channel. In a previous study, we induced Trisk 95 and Trisk 51 over-expression in primary skeletal muscle cultures by a recombinant adenovirus infection (Smida Rezgui et al, 2005). We showed that the Ca^{2+} release induced by depolarization was significantly decreased in Trisk 95-overexpressing myotubes whereas Trisk 51 over-expression had no effect, which suggested a specific action of an isoform on E-C coupling. In order to study the effect of a long-term over-expression of each isoform, we induced *in vivo* over-expression of Trisk 95 and Trisk 51 by intramuscular injections of recombinant adenoviruses in mouse newborn pups. The over-expression of these two isoforms did

not induce a drastic effect on triadins' partners, DHPR, RyR, and calsequestrin, but disturbed muscle homeostasis and fibers morphology. Trisk 95 or Trisk 51 over-expression has an effect on caveolin-3 (cav-3), a 20 kDa muscle specific caveolin isoform. Caveolins are membrane associated proteins that are essential structural components of caveolae, small invaginations of the plasma membrane involved in intracellular trafficking events (Williams and Lisanti, 2004). Caveolins are mainly found at the plasma membrane, but they also have been described in internal membrane compartments such as the Golgi apparatus and endosomes and have been shown to cycle between these different pools. Caveolin-3 knock-out mice show a complete loss of caveolae, as well as a muscular dystrophy phenotype (Galbiati et al., 2001). In support of these multiple functions for this protein, different forms of limb girdle muscle dystrophies LGMD1c (Minetti C. et al., 1998, 2002) are associated to changes in caveolin-3 (Caveolinopathies). The well characterized caveolin-3 P104L mutation leads to reduced levels of caveolin-3 as well as a re-localization of the protein to the Golgi complex (Galbiati et al., 1999). Caveolae have also been implicated in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy, as in the *mdx* mouse model for this disease, caveolin-3 levels are increased (Vaghy et al., 1998). Therefore, the precise localization and levels of caveolin-3 expression are important for muscle physiology. In this study, we show that proteins of the Ca²⁺-release complex are associated to membrane domains containing caveolin-3 and that over-expression of triadins Trisk 95 and Trisk 51 disturbs caveolin-3 localization.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and microsomes preparation

Anti-calsequestrin monoclonal antibody (clone VIIID12) was obtained from Affinity BioReagents. Mouse anti-caveolin 3 antibody was from Transduction Laboratories (BD Biosciences). Guinea pig anti-Ca²⁺-ATPase was a gift from Dr. A. M. Lompré (Enouf et al., 1988). Sheep anti- α 1 subunit of DHPR was from Upstate Biotechnology. Polyclonal antibody against purified pig ryanodine receptor antibodies has been described previously (Marty et al, 1994), as well as anti-peptide antibodies against Trisk 95 and Trisk 51 (Marty et al, 2000) and antibodies against the N-terminal end of triadins (Marty et al, 1995), with recognizes all isoforms. Crude microsomes were prepared from 1 month old mouse calf muscle as previously described (Vassilopoulos et al, 2005).

Viruses and Infection

We used adenoviral-mediated gene transfer to modify Trisk 95 or Trisk 51 expression. The viruses were engineered and produced by the Gene Vector Production Network, at Genethon III (Evry, France). Three type 5 adenoviruses were used in this study, a control virus (AdV-DsRed) with the cDNA of the red fluorescent protein (DsRed), AdV-Trisk 95, an adenovirus with the full-length sequence of rat skeletal muscle Trisk 95 (EMBL AJ243304, 687 aa), and AdV-Trisk 51, an adenovirus with the full-length sequence of rat skeletal muscle Trisk 51 (EMBL AJ243303, 461 aa). All the transgenes were under the control of a CMV promoter. C57/Bl6 3 day-old new-born pups were anaesthetized by cold. They were injected in one leg (calf, quadriceps and hamstring) with an insulin syringe by four intramuscular injections (10 μ l each), of either AdV-Dsred, or AdV-Trisk 95 or AdV-Trisk 51 adenovirus diluted at about 10¹⁰ IP/ml in 0.9% NaCl, and with 0.9% NaCl in the other leg as a control. After 30 days the mice were sacrificed and the calf, quadriceps and hamstring muscle were collected, frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and stored at -80°C.

Cell Cultures and cell infection

Rat myogenic L6 cells (clone C5) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 1% penicillin-

streptomycin. Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) 200 by the adenoviruses encoding Trisk 95 (AdV-Trisk 95) or encoding Trisk 51 (AdV-Trisk 51). The cells were collected 48h after infection.

Western Blot

The presence of RyR, DHPR, Trisk 95, Trisk 51, calsequestrin, Ca²⁺-ATPase SERCA or caveolin in different samples was assayed by Western blot, using a chemiluminescent reagent (Western lightning Chemiluminescence reagent plus, PerkinElmer Life Science). After electrophoretic separation on a 5–15% acrylamide gel, the proteins were electrotransferred to Immobilon P (Millipore) as previously described (Marty et al 2000). The secondary antibodies were labeled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch laboratories). Quantitative analysis was performed using a Chemidoc XRS and the Quantity One Software (Biorad)

Haematoxylin/eosin staining

Skeletal muscle section of 8 to 15 µm were collected on poly-L-lysine coated slides, fixed for 5 min in 10% formalin and rinsed with water. Sections were stained in Mayer Haematoxylin for 1 min. The excess of stain was removed from the sections by 30 successive baths of distilled water and placed in 0.5% acid ethanol, in an alkaline solution (Scott water) and in 80% ethanol. Cytoplasmic structures were stained with an aqueous eosin solution for exactly 20 s. Muscle section were dehydrated by 20 successive 95% ethanol baths, 3 min in 10% ethanol and 30 xylene baths. Eventually sections are embedded in a resin mounting medium (Permount). Skeletal muscle section were observed under bright field. Nucleus appeared in black/blue and the cytoplasm in red/purple.

Immunoprecipitation

Microsomes from rat skeletal muscle or L6 cells were solubilized in presence of CHAPS, and immunoprecipitation was performed with antibodies against rat Trisk 95, rat Trisk 51 or non immune serum as described previously (Marty et al 1994), using protein A immobilized on sepharose 4B. The immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blotting.

RESULTS

Effect of Trisk 95 and Trisk 51 over-expression on key proteins involved in excitation-contraction coupling

The over-expression of Trisk 95 and Trisk 51 *in vivo* was induced by adenoviral infection. Three different viruses were used: AdV-DsRed, as a control, AdV-T95 and AdV-T51. The adenoviruses were injected into the calf muscles of 3 day-old newborn pups. The muscles were collected 30 days later. In order to determine the effect of each triadin isoform overexpression on its calcium release complex's partners, the expression level of the proteins members of the calcium release complex was checked by Western blot (figure 1). In comparison with the control muscle infected with AdV-Dsred (figure 1, lanes 3) in which the expression level of each protein is fixed to 1 as a standard level, in muscles infected with Trisk 95 (figure 1, lanes 1) the quantity of RyR, of the alpha 1 subunit of DHPR and of SERCA are unchanged, Trisk 95 is overexpressed from 1 to 1.6 whereas Trisk 51 and CSQ are unchanged (table I). In the same way, in muscles infected with Trisk 51 (figure 1, lane 2), RyR, DHPR, SERCA and Trisk 95 are unchanged, Trisk 51 is increased from 1 to 1.6 and CSQ is unchanged (table I). Using Western blot on muscle homogenate, only the whole expression level is visualized, and the expression in infected fibers is averaged with the non infected fibers.

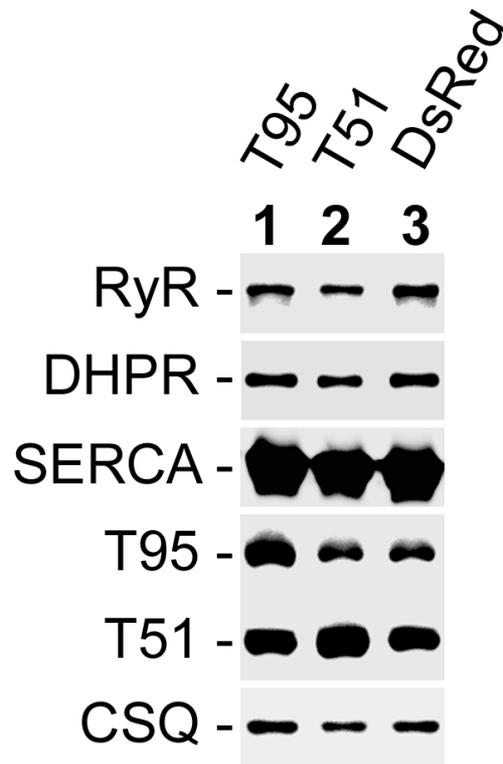


Figure 1 : Western blot analysis of the protein of the calcium release complex in infected muscles

Twenty micrograms of microsomes prepared from Trisk 95 infected muscle (lanes 1), Trisk 51 infected muscle (lanes 2), or DsRed infected muscle (lanes 3) were loaded on a 5-15% acrylamide gel and analyzed with antibodies against RyR, $\alpha 1$ subunit of DHPR, SERCA, Trisk 95, Trisk 51 or CSQ. The signal was acquired with a Chemidoc XRS (Biorad), and the amount of protein in each lane was quantified using Quantity One Software (Biorad). The amount of protein in lanes 1 and 2 were compared to lanes 3 (fixed to 1), after normalization of the amount of myosin to correct in loading differences.

Table I:

	RyR	DHPR	SERCA	T95	T51	CSQ
Inf T95	0.92	0.95	0.98	1.6	1.04	1.06
Inf T51	0.97	0.93	1.1	0.96	1.6	0.94
Inf DsRed	1	1	1	1	1	1

Therefore, the effect of triadin isoforms over-expression was studied using immunofluorescent labelling on muscle sections, in order to discriminate between infected and non infected fibers. Double immunofluorescent labelling was performed on transversal sections of infected muscle using antibodies directed against proteins of the calcium release complex: $\alpha 1_s$ subunit of the DHPR, RyR, calsequestrin, Trisk 95, and Trisk 51. In agreement with the results obtained in Western blot, over-expression of Trisk 95 does not seem to have an effect on the DHPR staining, nor on calsequestrin (figure 2, panels a to i), and the infected fibers are indistinguishable

from the non infected fibers with these antibodies (figure 2, panels b, d). However the staining of the RyR is less well defined in Trisk 95 over-expressing fiber (figure , panel e). A reduced expression of Trisk 51 in Trisk 95 overexpressing fibers is observed (figure 2, panels j-l), indicating a regulatory mechanism between the two isoforms expression.

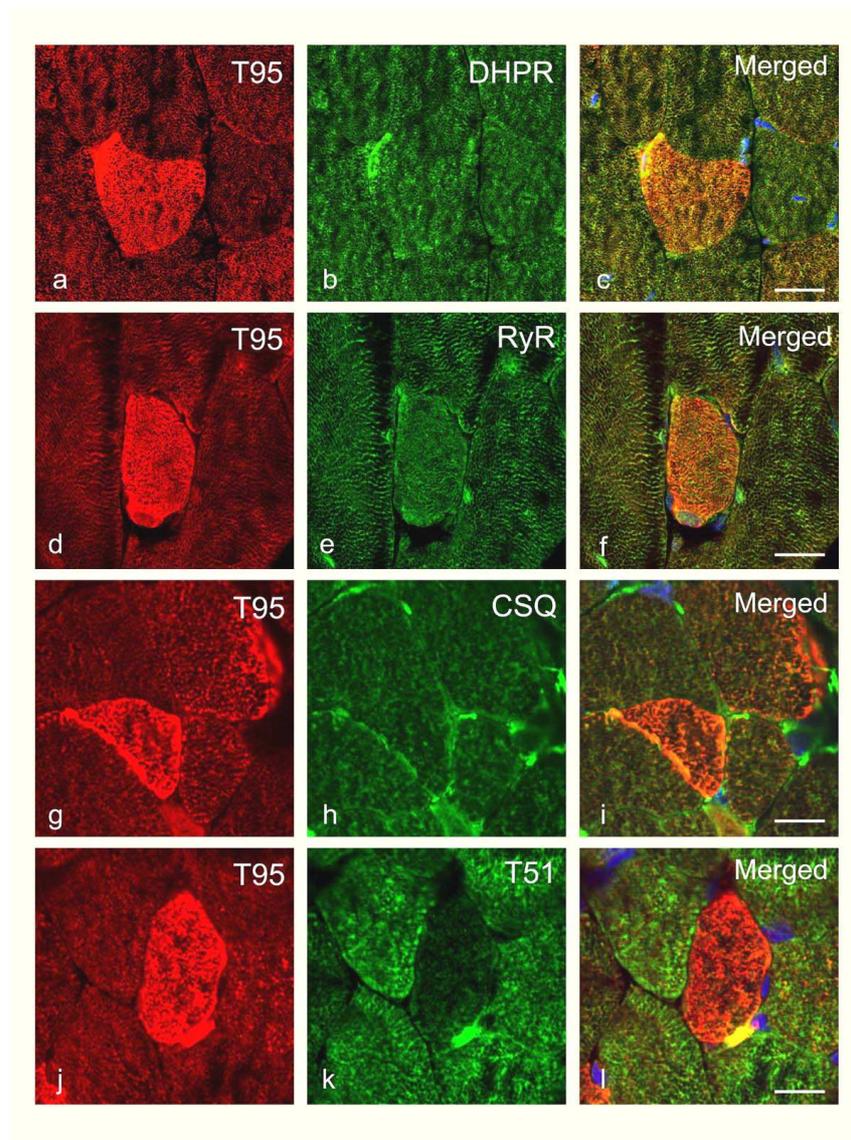


Figure 2: Effect of T95 over-expression on proteins of the calcium release complex.

Double immunofluorescent labelling was performed on transversal sections of muscle infected with AdV-T95 for 30 days, using antibodies directed against T95 and the α_{1s} subunit of the DHPR (a-c), Trisk 95 and RyR (d-f), T95 and calsequestrin (g-i), or T95 and T51 (j-l). Scale bar: 15 μ m.

Over-expression of Trisk 51 did not induce any modification of DHPR, RyR or CSQ observed by immunofluorescent labelling on transverse muscle section (figure 3, panels a to i), and induced a reduction in Trisk 95 labelling (figure 3, panels j-l), compared to the surrounding non infected fibers.

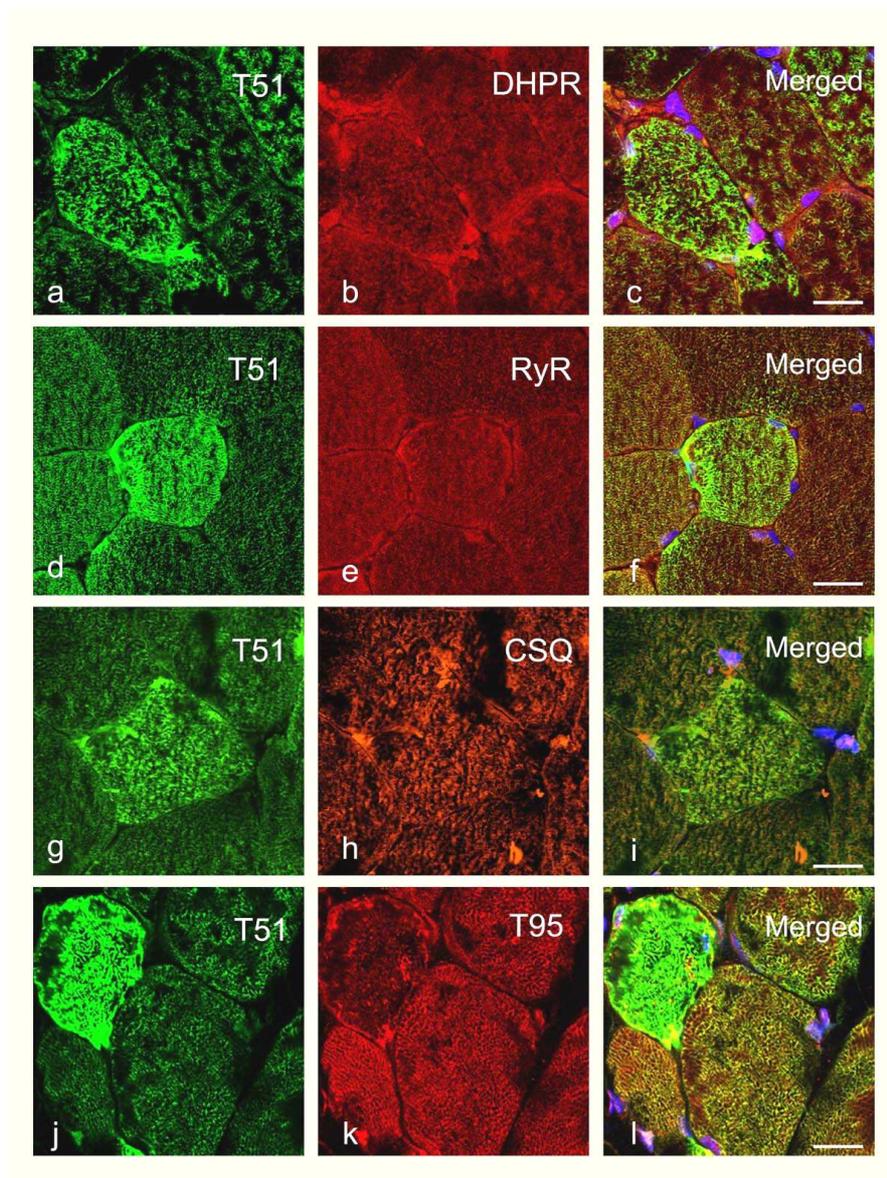


Figure 3: Effect of T51 over-expression on proteins of the calcium release complex.

Double immunofluorescent labelling was performed on transversal sections of muscle infected with AdV-T51 for 30 days using antibodies directed against T51 and the α_{1s} subunit of the DHPR (a-c), Trisk 51 and RyR (d-f), T51 and calsequestrin (g-i), or T51 and T95 (j-l). Scale bar: 15 μ m.

Effect of the over-expression of Trisk 95 and Trisk 51 on muscle fibers

One of the first observations which one could make was that in contrast to fibers infected with the AdV-DsRed virus, the size and the shape of fibers infected with the viruses over-expressing triadins was modified. Histological studies of muscle sections (control or triadin-infected) were performed by haematoxyline-eosine staining. New-born pups have been used to limit the adenovirus induced inflammatory reaction. For fibers infected by the AdV-DsRed virus (control), the few

necrotic fibers and the signs of inflammation (infiltration of macrophages) due to the injection of the virus disappear two weeks after the virus injection and the histological phenotype one month after virus injection is identical to a muscle injected with saline solution. In muscle infected with AdV-Trisk 95 or AdV-Trisk 51 (figure 4), the presence of fibrotic tissue is observed, as well as the presence of few atrophic fibers, and a few regenerating fibers, characterised by their centrally located nuclei. In addition, in muscle infected with AdV-Trisk 51 (figure 4), the fibers display a loss of contact and an increase in fibrotic tissue is observed, as well as the presence of necrotic fibers, stained in pink on haematoxyline-eosine stained sections.

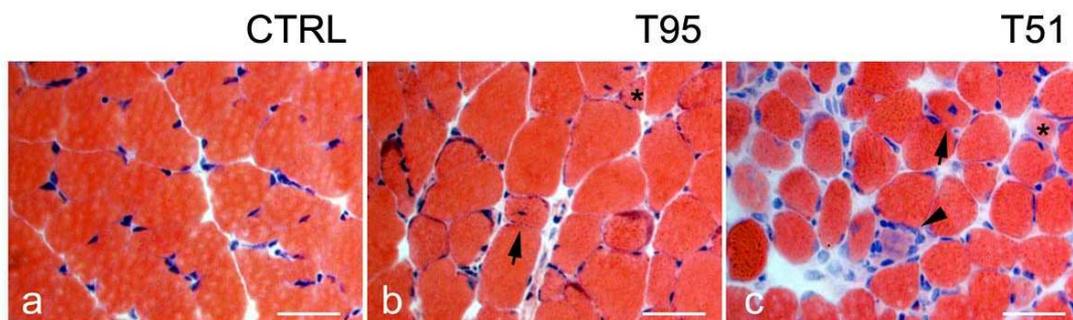


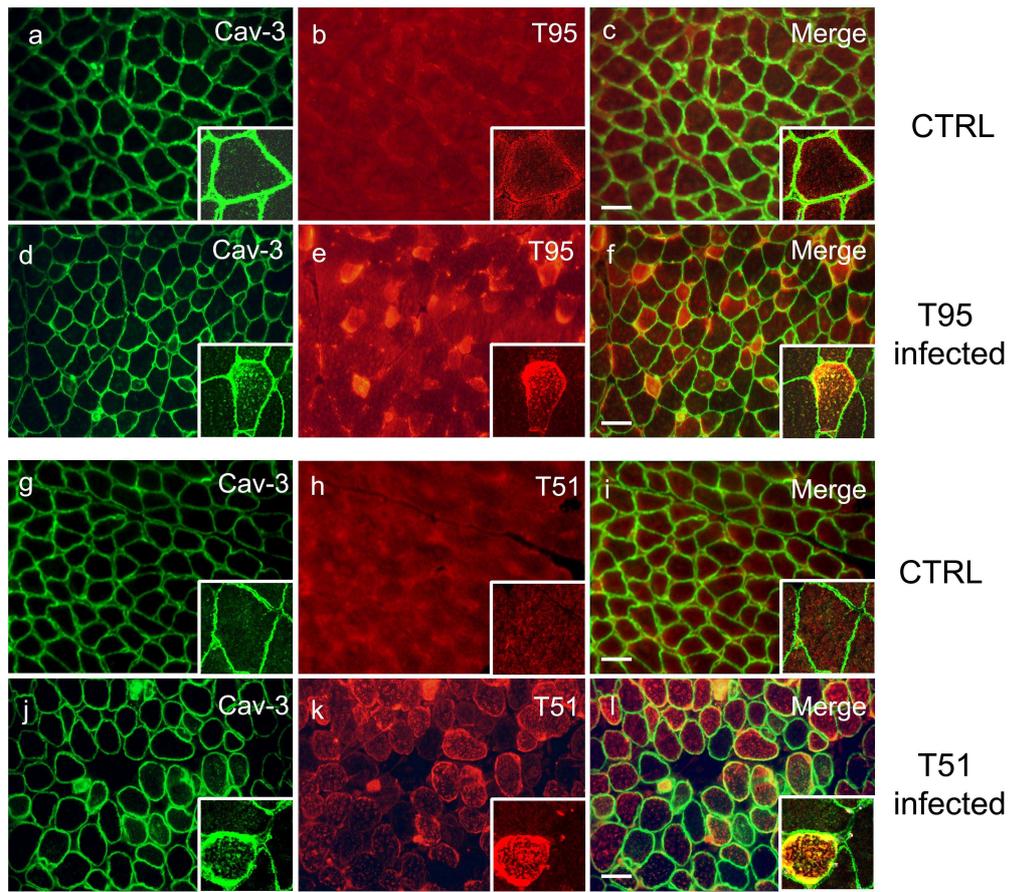
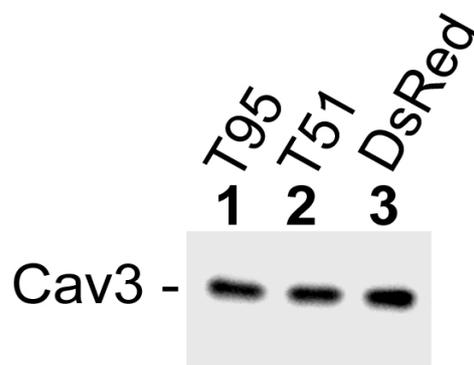
Figure 4: Histological analysis of muscle sections from infected muscle. AdV-DsRed infected (CTRL – panel a), AdV-Trisk 95 infected (T95 –panel b) or AdV-Trisk 51 infected (T51 – panel c) calf from 30 day-old mice were stained with haematoxylin/eosin. In muscle infected with T95 or T51, the presence of fibrotic tissue is observed, as well as the presence of a few atrophic (asterisks), necrotic fibers stained in pink (arrowheads), and a few regenerating fibers, characterised by their centrally located nuclei (arrows). Scale bar: 50 μ m.

Effect of Trisk 95 and Trisk 51 over-expression on caveolin-3

To better visualize the number and the size of fibers over-expressing triadin isoforms, we carried out immunofluorescent labelling with a marker of the plasma membrane. We chose to use caveolin-3 (cav-3) as a marker, the muscle specific caveolin isoform. It clearly appears by the caveolin-3 staining that the size of fibers infected by AdV-Trisk 95 and AdV-Trisk 51 is abnormal (figure 5A). The fibers infected by AdV-Trisk 95 are smaller (figure 5A, panels d-f) whereas the fibers infected by AdV-Trisk 51 are have a round shape (figure 5A, panels j-l) with a loss of contact between fibers, a phenotype never observed in the muscles infected by AdV-DsRed (figure 5A, a-c and g-i). In addition, caveolin-3 expression pattern seems altered in fibers over-expressing Trisk 95 and Trisk 51. These fibers have a much more intense intracellular caveolin-3 staining than the non infected

surrounding fibers, or than control fibers (Figure 5A, insets). Moreover intracellular labelling of caveolin-3 is co-localised with Trisk 95 and Trisk 51 in the fibers which over-express Trisk 95 and with Trisk 51 respectively (insets figure 5A). As caveolin-3 is expressed during the differentiation of the satellite cells in myotubes (Galbiati et al, 2001), it could be hypothesized that the observed effect could result of fibers regeneration, and therefore, by nuclei coloration, we checked that the infected fibers were not in regeneration (no central nuclei, data not shown).

The effect on caveolin-3 could result either of a caveolin-3 over-expression, or of a caveolin-3 relocalization. To discriminate between the two hypotheses, quantitative Western blot analysis was performed (figure 5B). No increase in caveolin-3 was observed in Trisk 95 or Trisk 51 infected muscle compared to DsRed infected muscle (from 1 to 1.07 in Trisk 95 infected muscle or 1.02 in Trisk 51 infected muscle). As the signal of caveolin-3 in infected fiber can be meaned by the non-infected fiber, it impossible to determine if caveolin-3 is over-expressed or. However the modification of its localisation is clear.

A**B****Figure 5 : Caveolin-3 expression in infected muscles.**

A: Double immunohistochemical labelling with anti-cav-3 and anti-T95 antibodies (a-f) or anti-cav-3 and anti-T51 (g-l) antibodies was performed on muscle sections from DsRed infected muscle CTRL (a-c and g-i), T95 infected muscle (d-f) or T51 infected muscle (j-l). Cav-3 and T95 (inset a-c and d-f) or cav-3 and T51 (inset g-i and j-l) intracellular staining was compared by confocal microscopy. Scale bar: 40 μ m. **B:** The expression level of cav-3 was analysed by Western-blot on T95 infected muscle (lane 1), or T51 infected muscle (lane 2) or DsRed infected muscle (lane 3). Five micrograms of mouse skeletal microsomes were loaded in each lane.

Association of caveolin with the calcium release complex

Modification of triadin expression result in caveolin modification, indicating that there is a functional link between triadin and caveolin. Immunoprecipitation experiments were therefore performed in order to analyze the relationship between caveolin and triadin, and to test the possible association of these two proteins. Immunoprecipitations were performed on rat skeletal muscle using antibodies against Trisk 95, Trisk 51 or pre-immune serum, and the presence of caveolin-3 was assayed by Western blot (figure 6). Caveolin-3 was co-immunoprecipitated with Trisk 95 and Trisk 51, whereas immunoprecipitation with a non immune serum do not lead to the immunoprecipitation of caveolin-3. As RyR is co-immunoprecipitated with Trisk 95 and Trisk 51, and as each triadin isoform immunoprecipitates the other isoform, it is not possible to identify the protein which induced this co-immunoprecipitation of caveolin-3. The conclusion is therefore that caveolin-3 is associated with the calcium release complex, with RyR, Trisk 95 or Trisk 51, or with another protein of the complex.

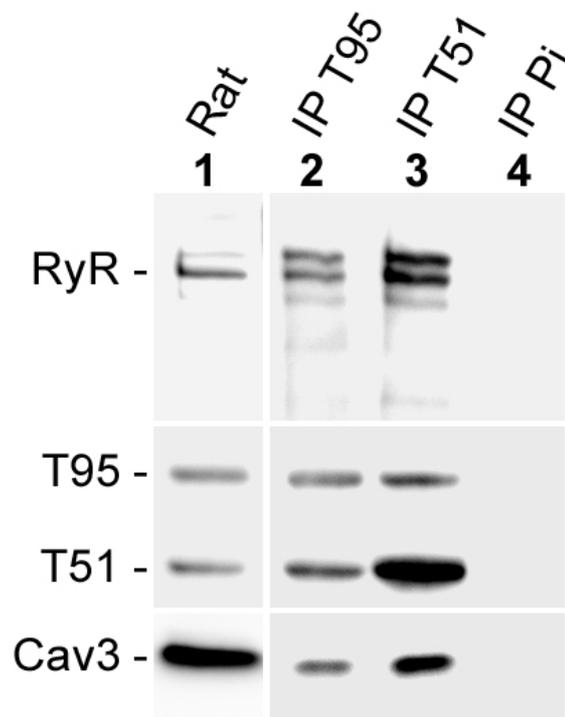


Figure 6 : Co-immunoprecipitation of Caveolin-3 with triadin isoforms in rat skeletal muscle Immunoprecipitation was performed on rat skeletal muscle with antibodies against Trisk 95 (lane 2), Trisk 51 (lane 3) or with pre-immun serum (lane 4). The immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot with antibodies against RyR, against the N-terminal end of triadin or against cav-3. Lane 1 : 5 μ g of rat skeletal muscle microsomes as a control.

Study of the interaction between caveolin-3 and triadin isoforms.

In order to test a possible direct association between caveolin-3 and triadin (in the absence of RyR and of the other proteins of the calcium release complex), L6 cells, a rat muscle cell line expressing endogenously caveolin-3 and devoid of RyR and DHPR when proliferating, were infected by AdV-Trisk 95 or AdV-Trisk 51 in order to induced the expression of each triadin isoform (figure 7). The immunoprecipitation of each triadin isoform was then performed using specific antibodies, and the presence of caveolin-3 among the immunoprecipitated proteins was tested by Western blot. As observed on figure 7, although the infected triadin isoforms are specifically immunoprecipitated by each antibody, and in the presence of caveolin in L6 cells (lanes 2-4), caveolin-3 is not co-immunoprecipitated with Trisk 95 or Trisk 51. Therefore, the direct association of caveolin-3 and Trisk 95 or Trisk 51 is mostly improbable. A linker protein is probably missing.

An association of DHPR and caveolin-3 has already been proposed in skeletal muscle (Couchoux et al, 2007) and shown in cardiac muscle (Balijepalli et al., 2006). As triadin is associated with RyR, and RyR with DHPR (Marty et al., 1994), one of these last two proteins can be the missing link.

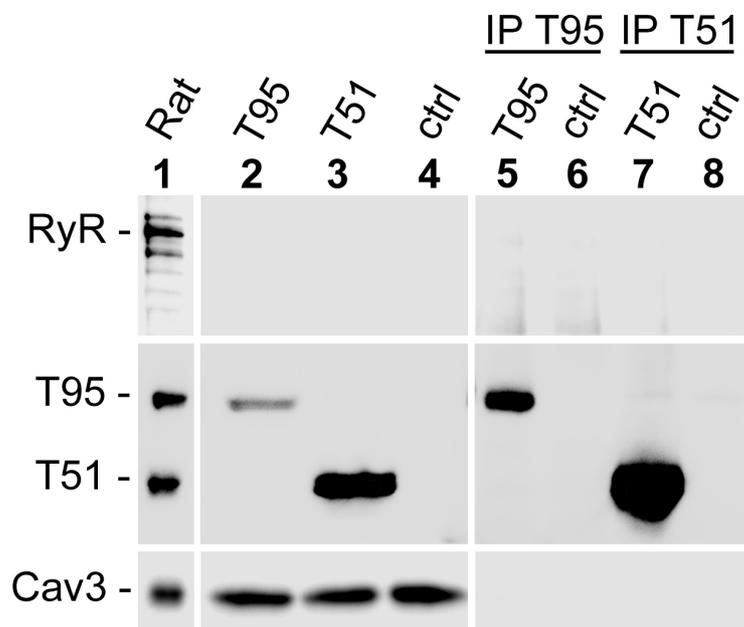


Figure 7 : Co-immunoprecipitation of Caveolin-3 with triadin isoforms in infected L6 cells. Immunoprecipitation was performed on Trisk 95 infected cells (lane 2), Trisk 51 infected cells (lane 3) or control cells (lane 4), with antibodies specific of T95 or of T51. The immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot (lanes 5 to 8) with anti-RyR, anti-Nter triadin or anti-Cav 3. Lane 1 : 5 µg of rat skeletal muscle microsomes as a control. RyR is absent form L6 cells (infected and control, lanes 2-4), and is not co-immunoprecipitated with triadins isoforms (lanes 5-8).

Therefore we checked if triadin interacts with caveolin-3 through DHPR or not by co-immunoprecipitation experiment. We show that, as previously published, DHPR is able to co-immunoprecipitate caveolin-3 and RyR. However the immunoprecipitation of DHPR does not co-immunoprecipitate triadin. Conversely, neither Trisk 95 nor Trisk 51 are able to co-immunoprecipitate DHPR (figure 8). However the interaction of Trisk 95, Trisk 51, RyR, and the caveolin-3 is clearly shown on this Western blot. Consequently the association of triadin and caveolin-3 is not DHPR-dependant but it seems possible that RyR and not triadin would be associated with caveolin-3.

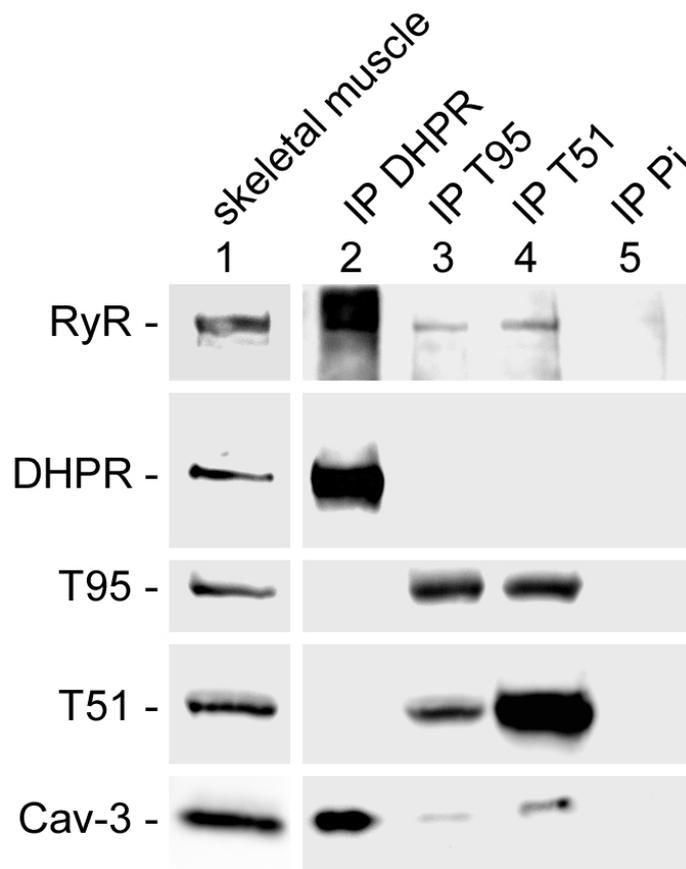


Figure 8 : Co-immunoprecipitation of caveolin-3 with triadin isoforms in rat skeletal muscle. Immunoprecipitation was performed on rat skeletal muscle with antibodies against DHPR (lane 2), Trisk 95 (lane 3), Trisk 51 (lane 4) or with pre-immun serum (lane 5). The immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot with antibodies against DHPR, against RyR, against the C-terminal ends of Trisk 95 and Trisk 51, or against Cav-3. Lane 1 : 5 μ g of rat skeletal muscle microsomes as a control.

RyR is associated with caveolin-3.

An association between RyR and caveolin-3 has been shown in cardiac muscle (Head et al., 2005). To test the association RyR-caveolin-3 in skeletal muscle in the absence of triadin, we performed immunoprecipitation in skeletal muscle of triadin KO mouse (Oddoux et al., unpublished). RyR was immunoprecipitated in microsome from triadin KO mouse skeletal muscle (figure 9, lane 5) and from WT muscle as a control (figure 9, lane 3). The presence of RyR and caveolin-3 was checked by Western blot. RyR is able to co-immunoprecipitate caveolin-3 in both muscles. Therefore RyR is associated with caveolin-3 and might be the missing link between triadin and caveolin-3 in the L6 cell line. In addition, the amount of caveolin-3 associated with RyR is increased in triadin KO mouse.

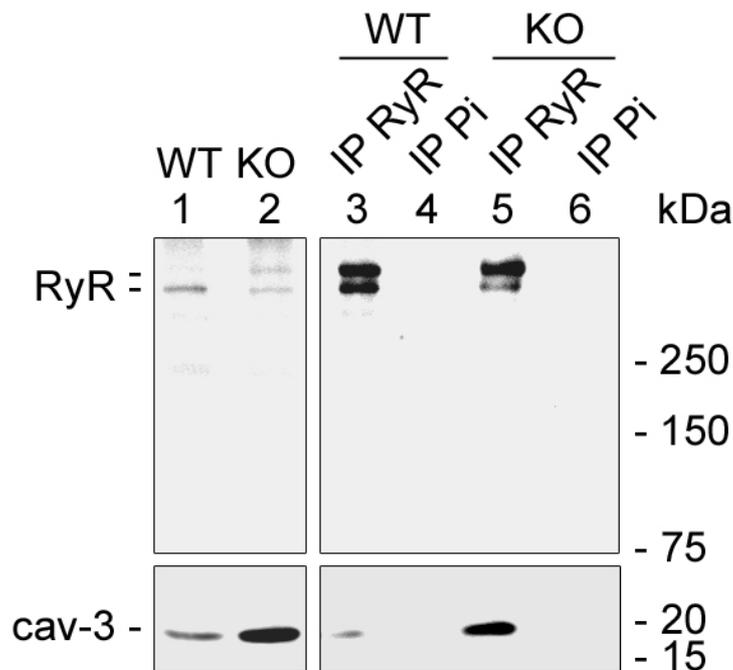


Figure 9: Co-immunoprecipitation of caveolin-3 with RyR in muscle deprived of triadin. Immunoprecipitation was performed on mouse skeletal muscle from WT or triadin KO mouse with antibodies against RyR (lane 3 and 5), or with pre-immun serum (lane 4 and 6). The immunoprecipitated proteins were then analyzed by Western blot with antibodies against RyR or against cav-3. Control: lane 1 and 2. Lane 1 : 10 μ g of WT mouse skeletal muscle microsomes and lane 2: 10 μ g of KO triadin mouse skeletal muscle microsomes.

DISCUSSION

Long-term over-expression of triadin isoforms Trisk 95 or Trisk 51 was induced *in vivo* by intra-muscular injections of recombinant adenoviruses in the hind-leg muscles of new-born pups. Over-expression of one triadin isoform induced a reduction in the expression level of the second isoform, possibly due to compensatory mechanisms between them. The main protein components of the calcium release complex, RyR, CSQ and DHPR, and the Ca²⁺-ATPase SERCA from the longitudinal sarcoplasmic reticulum, are not (or only slightly) affected. Haematoxylin/Eosin staining on transversal sections of skeletal muscle over-expressing Trisk 95 or Trisk 51 revealed changes in fiber size or shape, often observed in pathological muscles. Interestingly, Trisk 95 or Trisk 51 over-expression did not induce the same phenotype in muscle fibers, Trisk 51 over-expression having a more pronounced effect. It clearly appears by the caveolin-3 staining that the size of fibers infected by AdV-Trisk 95 and AdV-Trisk 51 is abnormal, a phenotype never observed in the muscles of mice infected by AdV-DsRed for one month. In addition to the effect of triadin over-expression on fiber size or shape, the caveolin-3 expression pattern seemed altered. An increase in the intracellular caveolin-3 staining was observed, that co-localized with both Trisk 95 and Trisk 51. This is the first demonstration of a functional link between triadin, a protein of the calcium release complex, and caveolin-3, a protein involved in membrane trafficking and in generation of stable membrane micro-domains. This functional link is not just an artefact of triadin over-expression, as we also demonstrate the association of triadin and caveolin-3 in normal rat skeletal muscle. As caveolin-3 has been shown to be present in T-tubules (Ralston and Ploug, 1999), and to regulate DHPR function (Couchoux et al, 2007), this interaction could be performed via the DHPR or another protein of the calcium release complex, or it could be a direct interaction between the two proteins. In order to discriminate between these two hypotheses, we tried, without success, to reconstitute the direct interaction between triadin and caveolin-3 by the concomitant expression of the two proteins in a rat skeletal muscle cell line. However we showed that DHPR was not the missing link between triadin and caveolin-3 in these cells as triadin is unable to co-immunoprecipitate DHPR *in vivo*. As RyR is also not expressed in proliferating L6 cell line and is the only protein of the CRC (excepted triadin) for which a modification of the localization has been observed, we supposed that it could be

required for triadin / caveolin-3 interaction. The hypothesis was tested by immunoprecipitation of RyR in triadin KO mouse skeletal muscle. This experiment showed that RyR is associated with caveolin-3 without triadin. These results raise the question of a specific association of caveolin-3, and more generally of caveolae, with sarcoplasmic reticulum proteins such as RyR. Moreover the association between caveolin-3 and RyR implies the localisation of caveolin-3 in the SR membrane. This hypothesis needs further investigation.

Several different hypotheses have been proposed for caveolin and caveolae function in muscle cells that could help understand the association of caveolin-3 with the calcium release complex and the effect of triadin over-expression on caveolin-3. (*a*) a role for caveolin-3 in calcium homeostasis (Popescu, 1974 Fujimoto, 1992; Fujimoto et al., 1993, Isshiki et al., 2003), and (*b*) a role for caveolin-3 in triad formation during muscle development (Ishikawa, 1968 ; Parton et al., 1997; Hernández-Deviez et al., 2006).

The first hypothesis, concerning a role for muscle caveolae in calcium intake or homeostasis, has been suggested by previous studies showing expression of two proteins involved in calcium homeostasis (IP₃R and SERCA) within caveolae of several different cell types, including muscle cells (Fujimoto, 1992; Fujimoto et al., 1993). It has also been shown that a close spatial relationship exists between caveolae and SR that could be important for Ca²⁺ homeostasis (Gherghiceanu, et al., 2006). The caveolae-SR contacts in the cytoplasm are probably partly responsible for the control of the cytoplasmic free Ca²⁺ concentrations in very precisely defined spaces (Löhn and al, 2000). Calcium release complexes involving triadins could be located at those sites.

Previous studies showing that caveolae are sites of extracellular Ca²⁺ entry (Isshiki et al., 2002) suggested that they are involved in re-filling depleted intracellular calcium stores, a mechanism called store operated calcium entry (SOCE) (Isshiki et al, 2002) or capacitive calcium entry. Caveolae could act as intermediates between the SR and the plasma membrane. We have previously shown that Trisk 95 can modulate the mechanism coupling the depletion of intracellular Ca²⁺ stores to extracellular Ca²⁺ entry (Vassilopoulos et al., 2007). The over-expression of Trisk 95 decreases this Ca²⁺ entry in myotubes. It would therefore be possible that the over-expression of Trisk 95 disturbs capacitive entry by its effect on caveolin-3. The re-localisation of caveolin-3 from the plasma membrane to intracellular compartments following the

over-expression of Trisk 95 would directly disturb the Ca^{2+} entry by caveolae and would therefore reduce store operated Ca^{2+} entry.

Recently Li et al., (2006) showed the presence of microdomains enriched in cholesterol, sphingolipids and caveolin-3 in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. Caveolin-3 has been shown to be involved in the intracellular trafficking and targeting of different membrane proteins or complexes, as dysferlin (Ampong et al., 2005; Hernandez-Deviez et al., 2006) or dystrophin glycoprotein complex (Galbiati et al., 2001) and could also be possibly involved in the association and targeting of the calcium release complex. Caveolin-3^{-/-} mice display a DHPR and RyR staining that is perturbed, which suggests a possible role for caveolin-3 in triad protein targeting or in triad formation. It was shown that Caveolin-3^{-/-} mice and transgenic mice over-expressing caveolin-3, display a dystrophic phenotype (Galbiati et al., 2001). If caveolin-3 plays a role in targeting, maintaining, or recycling Ca^{2+} -release complex proteins, Trisk 95 or Trisk 51 over-expression-induced Caveolin-3 re-localization could perturb the traffic of proteins forming the Ca^{2+} -release machinery that is crucial for Ca^{2+} homeostasis of skeletal muscle fibers. The abnormal muscle phenotype observed upon triadin overexpression could be the result of caveolin-3 trapping, as observed with the mutant form of caveolin-3, P104L, responsible of some case of myopathy (LGMD1d), which is blocked in the Golgi apparatus (Minetti C, et al. 1998, Galbiatti et al, 1999) and is therefore unable to perform correctly its trafficking function.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), and from Agence Nationale de la Recherche (ANR-Maladies rares)

REFERENCES

- Ampong, B.N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., Takeda, S. (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol.* **24**:134-44.
- Anderson, R.G. (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10909-13.
- Carozzi, A.J., Ikonen, E., Lindsay, M.R. and Parton, R.G. (2000). Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic*, **1**:326-41.
- Couchoux H, Allard B, Legrand C, Jacquemond V, Berthier C. (2007). Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells. *J Physiol.*, **580**, 745-754
- Dulhunty, A.F., Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere lengths. *J. Physiol.* **250**:513-39.
- Enouf, J., Lompre, A.M., Bredoux, R., Bourdeau, N., de La Bastie, D., and S. Levy-Toledano. (1988). Different sensitivity to trypsin of the human platelet plasma and intracellular membrane Ca²⁺ pumps. *J. Biol. Chem.* **263**:13922-13929.
- Fleischer, S., and Inui, M. (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**:333–364
- Franzini-Armstrong, C. (1991). Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Dev. Biol.* **146**:353-63.
- Franzini-Armstrong, C., and Jorgensen, A.O. (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 509–534
- Flucher, B.E. (1992). Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev. Biol.* **154**:245-260.
- Fujimoto, T. (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol.* **120**:1147-57.
- Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K. (1992). Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol.* **119**:1507-13.
- Head BP, Patel HH, Roth D, Lai NC, Niesman IR, Farquhar MG, Insel PA. (2005). G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* **280**, 31036-31044.
- Gabella, G. (1978). Inpocketings of the cell membrane (caveolae) in the rat myocardium. *J Ultrastruct Res.* **65**:135-47.

- Gabella, G., Blundell, D. (1978). Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* **190**:255-71.
- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Jr. Kneitz, B., Edelmann, W., Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities. *J Biol Chem*; **276**:21425–21433.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M.P. (2001) Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* **7**:435-41.
- Galbiati, F., Volonte, D., Minetti, C., Chu, J.B. and Lisanti, M.P. (1999). Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J. Biol. Chem*, **274**:25632-41.
- Gherghiceanu, M., Popescu, L.M. (2006). Caveolar nanospaces in smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* **10**:519-28.
- Guo, W. and K.P. Campbell. 1995. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 9027-9030.
- Groh, S., Marty, I., Ottolia, M., Prestipino, G., Chapel, A., Villaz, M. and M. Ronjat. 1999. Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 12278-12283.
- Hernández-Deviez, D.J., Martin S., Laval, S.H., Lo, H.P., Cooper S.T., North, K.N., Bushby, K., Parton, R.G. (2006) Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Hum. Mol. Genet.* **15**:129-42.
- Ishikawa, H. (1968). Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol.* **38**:51-66.
- Isshiki, M., Ying, Y.S., Fujita, T., Anderson, R.G. (2002). A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J. Biol. Chem.* **277**:43389-98.
- Isshiki, M., Anderson, R.G. (2003). Function of caveolae in Ca²⁺ entry and Ca²⁺-dependent signal transduction. *Traffic.* **4**:717-23.
- Kurzchalia, T.V. and Parton, R.G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, **11**:424-31.
- Li, C., Duan, W., Yang, F., Zhang, X.. (2006). Caveolin-3-anchored microdomains at the rabbit sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**:1135-40.
- Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* **4**:231-5.
- Lohn, M., Furstenau, M., Sagach, V., Elger, M., Schulze, W., Luft, F.C., Haller, H., Gollasch, M. (2000). Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ Res.* **87**:1034-9

- Matsuda, C., Hayashi, Y.K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K. and Brown, R.H., Jr. (2001) The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet*, **10**:1761-6.
- Meissner, G. (1994) Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 485–508
- Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G., and M. Villaz. (1995). Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* **307**: 769-774.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., Lai, Y., De Jongh, K.S., Catterall, W.A., and M. Ronjat. (1994). Biochemical Evidence for a complex involving Dihydropyridine Receptor and Ryanodine Receptor in Triad Junctions of Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:2270-2274.
- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., and M. Villaz. 2000. Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J. Biol. Chem.* **275**:8206-8212.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **18**:365–368.
- Minetti C, Bado M, Broda P, Sotgia F, Bruno C, Galbiati F, Volonte D, Lucania G, Pavan A, Bonilla E, Lisanti MP, Cordone G. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):265-70.
- Monnier N., Ferreiro A., Marty I., Labare-Vila A., Mezin P. & Lunardi J. (2003). "A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR1 is associated with MmD congenital myopathy with ophthalmoplegia" *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1171-1178
- Ohkura, M., Furukawa, K., Fujimori, H., Kuruma, A., Kawano, S., Hiraoka, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H., and Ohizumi, Y. (1998) *Biochem.* **37**, 12987-12993.
- Parton, R.G., (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* **42**:155–166.
- Parton, R.G., Simons, K. (1995). Digging into caveolae. *Science.* **269**:1398-9.
- Parton, R.G., Joggerst, B., Simons, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* **127**:1199 –1215.
- Parton RG. Caveolae and caveolins. (1996). *Curr Opin Cell Biol.* **8**:542-8. Review.
- Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N. and Stang, E. (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol*, **136**, 137-54.

- Popescu, L.M., Diculescu, I., Zelck, U., Ionescu, N. (1974). Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell Tissue Res.* **154**:357-78.
- Pouvreau S, Berthier C, Blaineau S, Amsellem J, Coronado R, Strube C. (2004). Membrane cholesterol modulates dihydropyridine receptor function in mice fetal skeletal muscle cells. *J Physiol.* **555**:365-81.
- Prescott L, Brightman MW. (1976). The sarcolemma of Aplysia smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tissue Cell.* **8**:248-58.
- Ralston, E. and Ploug, T. (1999) Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* **246**, 510-5.
- Schiaffino S, Margreth A. (1969). Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* **41**:855-75.
- Smida Rezgui, S., Vassilopoulos, S., Brocard J., Platel, J.C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux, S., Garcia, L., De Waard, M, Marty, I., 2005. Triadin (TRISK 95) over-expression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* **280**:39302-8.
- Smythe GM, Eby JC, Disatnik MH, Rando TA. (2003). A caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci.* **116**:4739-49.
- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Smida Rezgui, S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., DeWaard, M., and Marty, I. (2005). Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **280**:28601–28609.
- Vassilopoulos S., Brocard J., Garcia L., Marty I., and Bouron A., (2007), *Cell Calcium*, **41**, 179-185. "Retrograde regulation of store-operated calcium channels by the ryanodine receptor-associated protein triadin 95 in rat skeletal myotubes"
- Way, M., Parton, R.G. (1996). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* **378**:108-12.
- Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol.* 2004;5(3):214.
- Yuan, S.H., W. Arnold, and A.O. Jorgensen. 1991. 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.* **112**:289–301.

Manuscrit II : Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function

TRIADIN DELETION INDUCES IMPAIRED SKELETAL MUSCLE FUNCTION

**Sarah Oddoux^{1,2}, Julie Brocard^{1,2}, Annie Schweitzer³, Peter Szentesi⁴, Benoit Giannesini⁵,
Jacques Brocard³, Julien Fauré^{1,2,6}, Karine Pernet-Gallay³, David Bendahan⁵, Joël Lunardi^{1,2,6},
Laszlo Csernoch⁴, Isabelle Marty^{1,2,§}**

From : ¹INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologies, Grenoble, F-38000 France ; ²Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000 France; ³INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Physiopathologie du cytosquelette, Grenoble, F-38000 France; ⁴Department of Physiology, MHSC, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; ⁵CRMBM - UMR CNRS 6612, Faculté de Médecine de la Timone, 13000 Marseille, France; ⁶CHRU de Grenoble, Hopital Michallon, Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000 France

Address correspondence to: Isabelle Marty, Grenoble Institut des Neurosciences - INSERM U836 - Eq Muscle et Pathologies, UJF Site Santé, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9 – France
Tel : 33 4 56 52 05 71 - Fax : 33 4 56 52 05 72 - E-mail : isabelle.marty@ujf-grenoble.fr

Running title: Triadin KO mouse

Triadin is a multiple proteins family, some isoforms being involved in muscle excitation-contraction coupling, and some having still unknown functions. In order to obtain clues on triadin functions, we engineered a triadin knock out mouse line, and characterized the physiological effect of triadin ablation on skeletal muscle function. These mice presented a reduced muscle strength, which seemed not to alter their survival, and which has been characterized in the present work. We first checked in these mice the expression level of the different proteins involved in calcium homeostasis, and observed in fast muscles an increase in expression of dihydropyridine receptor, with a large reduction in calsequestrin expression. Electron microscopy analysis of KO muscles morphology demonstrated the presence of triads in abnormal orientation, and a reduction in the sarcoplasmic reticulum terminal cisternae volume. Physiological studies have been performed to evaluate the influence of triadin deletion on skeletal muscle function. Muscle strength has been measured both on whole animal, using hang test or electrical stimulation combined with NMR analysis and strength measurement, or on isolated muscle using electrical stimulation. All the results obtained demonstrate an important reduction in muscle strength, indicating that triadin plays an essential role in skeletal muscle structure and therefore in skeletal muscle function. These results indicate that triadin alteration lead to the development of a myopathy, which could be studied using this new animal model.

Muscle contraction is activated by Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in response to plasma membrane depolarization. This process called excitation-contraction coupling (E-C coupling) takes place at the skeletal muscle triad junction, where T-tubules and the sarcoplasmic reticulum terminal cisternae are in close contact [1]. Calcium release occurs via the calcium release complex, a macromolecular complex specifically localized in the skeletal muscle triad [2]. The main components of this calcium release complex are the ryanodine receptor (RyR) and the dihydropyridine receptor (DHPR) [3], both of which are calcium channels. It is now clear that a number of proteins are associated with these two calcium channels to form the calcium release

complex, among which triadin. Triadin is an integral membrane protein of the sarcoplasmic reticulum, first identified in rabbit skeletal muscle as a 95-kDa glycoprotein specifically located in the triads [4, 5]. Because of its co-localization with RyR in the triads, involvement of triadin in excitation-contraction coupling has been postulated [6, 7]. Protein interaction studies have shown that the major molecular partners of triadin are RyR [8-10], calsequestrin (CSQ), the protein which traps calcium inside the sarcoplasmic reticulum [11-13], and junctin [14]. Functional studies have shown that triadin by itself regulates the activity of the RyR calcium channel *in vitro* [10, 15].

Triadin is expressed in both cardiac and skeletal muscles. In cardiac muscle, several isoforms of triadin have been identified, the major one being CT1 [16]. We have shown that at least 4 isoforms of triadin are expressed in rat skeletal muscle [17, 18]. All these isoforms are issued from the alternative splicing of the same gene [19]. We have previously reported that the major skeletal muscle triadin isoform is Trisk 51, both in rat and in human [18, 19]. Trisk 95, the "classical" 95kDa isoform, is expressed in almost equivalent amounts, and Trisk 32, the 32kDa isoform identical to CT1, represents 10-20% of all triadins [18, 20]. Overexpression studies using adenoviruses have shown that Trisk 95 is able to block the depolarization-induced calcium release, but in the same conditions, no effect was observed with Trisk 51 overexpression, and therefore no function could be attributed to this isoform [21]. Triadin knock-down has also been realized using siRNA in cultured cells [22, 23], and resulted in reduction of the depolarization-induced calcium release. In addition to various functional effects resulting from expression modification, the triadin isoforms have different localizations and partners, and whereas Trisk 95 and Trisk 51 are both located within the triad and are associated with RyR, Trisk 32 is mainly in the longitudinal sarcoplasmic reticulum associated to the inositol-trisphosphate receptor (IP_3R) [18].

Triadin has mainly been characterized on a molecular point of view, and only few physiological studies have been performed. In order to determine functions of triadin in the whole animal, we have engineered a mouse line deleted of all the triadin isoforms. After molecular characterization of the muscles of this mouse, we studied their morphology and

function. Muscle function and muscle strength were studied both on whole animal and on isolated muscle, using hanging test and electrical stimulation combined with force measurement and MR imaging. All the results presented in this study confirmed an important reduction in muscle strength in triadin KO animals, and this mouse line could therefore represent a new animal model to study the development of a structural myopathy.

Experimental procedures

Engineering of the triadin KO mouse

The Triadin conditional mutant mouse line (triadin flox), as well as the full triadin KO (triadin KO) mouse line were established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute - Institut Clinique de la Souris-, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). The targeting vector was constructed as follows: a 1.2 kb fragment corresponding to the floxed fragment (comprising the ATG containing exon 1) as well as the 3.7 kb 5' homolog arm and 3.3 kb 3' homolog arm were amplified by PCR and subsequently cloned into a MCI basic vector. This vector already contained the LoxP sites and the Neomycin resistance cassette flanked by *frt* sites, which was then excised after selection using *flp*. The coding region and the junctions were verified by sequencing. The linearized construct was electroporated in 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blots with Neo and 3' external probes. Three positive ES clones were obtained. One was microinjected into C57BL/6J blastocysts, and derived male chimaeras gave germline transmission. In order to generate full triadin KO mice, heterozygotes triadin flox mice were crossed with CMV Cre^{+/+} mice [24] expressing the Cre recombinase in the zygote, to generate heterozygous triadin KO mice (triadin^{+/-}). These mice were crossed to generate WT (triadin^{+/+}) and KO (triadin^{-/-}) littermates used in the experiments described here.

Antibodies and Western blot analysis

Anti-calsequestrin monoclonal antibody (clone VIIIID1₂) was obtained from Affinity BioReagents. Polyclonal antibody against RyR has been previously described [3], as well as antibodies against Trisk 95 and Trisk 51 [17], and antibodies against the N-terminal end of triadins [25]. An antibody against mouse Trisk 32 (C-terminal peptide: RRQQEVQRE) was produced as previously described [18]. Rabbit anti-bovine mitochondrial FoF₁-ATPase antibody was previously characterized [26]. Rabbit anti-junctin were from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Rabbit anti-SERCA, kindly provided by Dr MJ Moutin, was produced by rabbit immunization with purified large cytoplasmic loop of the Ca²⁺-ATPase [27]. Secondary antibodies used for Western blot were labeled with HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

The presence and the amount of different proteins in samples was assayed by Western blot analysis, using a chemiluminescent reagent (Western lightning Chemiluminescence reagent plus, Perkin Elmer) after electrophoretic separation of the protein on a 5-15% acrylamide gel, and electrotransfer on Immobilon P (Millipore) [17]. The quantification was performed using a ChemiDoc XRS apparatus (Biorad) and the Quantity One Software (Biorad). The signal was normalized to the amount of myosin, measured after staining of the membrane with Coomassie blue.

Muscle fibres preparation and immunofluorescent labeling

All procedures using animals were approved by the Institutional ethics committee and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals. Flexor Digitorum Brevis (FDB) fibres were dissociated according to the procedure described by Pouvreau *et al.* [28]. Intact FDB were excised from the hind paw in Ringer-Glucose solution (136 mM NaCl, 10 mM Glucose, 5 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes pH7.2) and digested 30-45 min at 37°C in collagenase (2mg/ml in Ringer, Sigma Aldrich). Muscles were washed 10 min at room temperature and kept 2h at 4°C in 25ml Ringer. Fibres were then dissociated by several flushing and seeded on laminin coated slides 20 min at room temperature. Immunofluorescent labelling was performed using a protocol adapted from Vassilopoulos *et al.* 2005. Fibres were fixed for

15 min with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature, permeabilized 5 min with 1% Triton X-100 in PBS at room temperature and saturated 30-min with PBS supplemented with 0.1% TritonX-100, 0.5% bovine serum albumin, and 2% goat serum. Fibres were incubated 1 h at room temperature with the primary antibodies (dilution, 1:100 to 1:800) in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100, 0.5% bovine serum albumin, and 2% goat serum and then incubated with secondary antibodies for 30 min at room temperature. The nuclei were stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes), and the samples were mounted with an anti-fading solution (DakoCytomation fluorescent mounting medium; DakoCytomation). For double labelling, the two primary antibodies (from different species) and the two secondary antibodies were added at the same time. The secondary antibodies were labelled with either Alexa-488, Alexa-546 (both from Molecular Probes), or Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Muscle fibres were analyzed by confocal laser scanning microscopy using a Leica SPE operating system, with sequential excitation of the two fluorophores.

Electron microscopy

Extensor Digitorum Longus (EDL) and soleus (Sol) muscles were excised and cut into small pieces. After 3 washes in Cacodylate buffer 0.1M, muscles were post-fixed in 2.5% Glutaraldehyde, Cacodylate buffer 0.1M 2h at 4°C. After 3 washes in Cacodylate buffer, T-tubules were stained in 1% OsO₄, Cacodylate buffer 0.1M, 1h on ice. Muscles were washed 5 min in Cacodylate buffer 0.1M and 4 times in H₂O and then stained in 1% Uranyl Acetate pH4 4°C overnight. After dehydration with a graded series of alcohols and infiltrated in epoxy resin (Fluka), fibres were horizontally embedded in flat molds. For T-tubule staining (adaptation from Galbiati *et al*, [29]), 75mM of CaCl₂ were added in the post-fixation solution and 0.4% K₃Fe(CN)₆ was also added in the OsO₄ solution and incubated for 2h at room temperature. 70nm section were cut from the blocks with the ultramicrotome Leica Ultracut S and post-stained for 10min at room temperature with 5% uranyl acetate pH4, washed four times in water, incubated 5min at room temperature in 4% lead citrate and washed four times in water. The sections were observed with a JEOL JEM 1200EX II at 60kV.

Muscle homogenates preparation

Two types of skeletal muscle i.e. extensor digitorum longus (EDL) and soleus (Sol) were collected from adult (6-9 months) mouse hind legs. Crude homogenates were prepared from each muscle by homogenization in 200 mM sucrose, 20 mM HEPES (pH = 7.4), 0.4 mM CaCl₂, 2 mM leupeptin, 100 mM PMSF, 1 mM DFP. The amount of total protein was estimated using a modified Folin assay in presence of SDS.

Hang tests

For the first test, animals were placed on wires stretched between two poles 50 cm apart and were allowed to freely move along the wire. Each animal was tested 4 or 5 times during a 7 days period, and all the tests were used for the statistical analysis. For the second test, animals were positioned on a cross-wired surface where they could hold on with all four paws. The grid was then turn up side down. We measured the time during which animals were able to stay on wires before falling. The test was repeated 3 times successively for each animal, and only the best score was used for the statistical analysis. After 5 min hanging (300s), the test was stopped.

Isolated muscle contraction measurements

Fast (EDL) or slow (Sol) twitch muscles were placed horizontally in an experimental chamber continuously superfused (10 ml.min⁻¹) with Krebs' solution (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 10 mM NaHCO₃; 10 mM Hepes pH 7.2; room temperature) equilibrated with 95% O₂ plus 5% CO₂.

One end of the muscle was attached to a rod while the other to a capacitive force transducer. Two platinum electrodes placed adjacent to the muscle were used to deliver short (1 ms), supramaximal pulses to elicit single twitches. Force responses were digitized at 2 kHz by using Digidata 1200 A/D card and stored with Axotape software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Muscles were then stretched by adjusting the position of the transducer to a length that produced the maximal force response and allowed to equilibrate for 60 min.

Single pulses (1Hz) were used to elicit single twitches. At least 10 twitches were measured under these conditions from each animal, and the averaged amplitude of all transients was used in order to characterize the given animal. Tetanic contraction was obtained by stimulation at

200 Hz during 200 ms for EDL and at 100 Hz during 500 ms for Sol.

Fatigue test on isolated muscle

In order to test muscle fatigability a series of tetanic contraction (altogether 150) at a frequency of 0.5 Hz were evoked [30]. The amplitude of each tetanus was then normalized to that of the largest in the series (usually the first or the second) and plotted as a function of the position within the series.

Animal preparation for NMR studies

Nine WT and nine triadin KO animals were used for these experiments. For each animal, MR functional investigation was performed in the left gastrocnemius muscles. Mice were initially anesthetized in an induction chamber (Equipment Vétérinaire Minerve, France) using 4 % isoflurane (Forene; Abbot France, Rungis, France) in 33 % O₂ and 66 % N₂O. Once both lower hind limbs were shaved, the anesthetized animal was placed supine in a home-built cradle especially designed for a strictly non-invasive muscle investigation. This cradle integrates two rod-shaped transcutaneous electrodes (located above the knee and under the heel respectively) connected to an electrical stimulator (Stimulator I series, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, USA) and an ergometer consisting of a 9 x 24 mm foot pedal coupled to a force transducer. The transducer was constructed by sticking a strain gauge (ref. 1-LY11-6/120A; HBM GmbH, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer specifications on a 9 x 32 mm Bakelite slat (0.4-mm thickness) in a Wheatstone bridge design. The foot was positioned on the ergometer pedal and the hind limb was immobilized in the cradle. In that position, the hind limb was centered inside a 20-mm-diameter ¹H Helmholtz imaging coil and the belly of the gastrocnemius muscle was located above an elliptic ³¹P-MRS surface coil (8 x 12 mm). The pedal position was adjusted in order to modify the angle between the foot and the lower hind limb so that the gastrocnemius muscle was passively stretched at rest and produced a maximum isometric twitch tension in response to supramaximal square wave pulses (1.5 ms duration). Supra-maximal current (usually 2-4 mA) was determined by inducing contractions with increasing current. Throughout the experiment, anesthesia was maintained by gas inhalation with a facemask continuously supplied with 2.5 % isoflurane in 33 % O₂ (0.4 L/min) and

66 % N₂O (0.8 L/min) and connected to an open-circuit gas anesthesia machine (Isotec 3; Ohmeda Medical, Herts, UK). Animal body temperature was maintained through a feedback loop including an electrical heating blanket (Prang+Partner AG, Pfungen, Switzerland), a temperature control unit (ref 507137; Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) and a home-built rectal thermometer constructed with a NTC thermistor SMC series (ref: NCP18XW220J03RB-2.2K, Murata, Kyoto, Japan).

Whole animal stimulation protocol and force measurements

The transcutaneous stimulation protocol consisted in 6 min of repeated isometric contractions at a frequency of 1.7 Hz. Analog electrical signal coming out from the force transducer was amplified with a home-built amplifier (Operational amplifier AD620; Analog Devices, Norwood, MA, USA; gain = 70 dB; bandwidth 0–5 kHz) converted to a digital signal (PCI-6220; National Instrument, Austin, TX, USA) and recorded on a personal computer using the WinATS software version 6.5 (Sysma, Aix-en-Provence, France). Isometric force production per twitch (in N) was averaged every 30 s and normalized to the MRI-calculated muscle volume.

MR data acquisition and processing.

Investigations were performed in a 4.7 Tesla horizontal magnet (47/30 Biospec Avance, Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a Bruker 120-mm BGA12SL (200 mT/m) gradient insert. Ten non contiguous axial scout slices (1 mm thickness, spaced 0.5 mm) covering the region from the knee to the ankle were selected across the lower hind limb. Multiecho images of these slices (8 echoes; 10.587-ms spaced; 1000-ms repetition time; 42x42 mm² field-of-view; 256 x 256 acquisition matrix; 3.2-min acquisition time) were recorded at rest. ³¹P-MRS spectra (32 scans, 8 kHz sweep width; 2048 data points) from the gastrocnemius region were continuously acquired in 60-s blocks throughout a standardized experimental protocol consisting in 6-min rest, 6-min stimulation and 16-min recovery. MR data acquisition was gated to muscle stimulation in order to reduce potential motion artifacts due to contraction. MR data were processed using a custom-written image analysis program developed on the IDL platform

(Interactive Data Language, Research System, Inc., Boulder, CO, USA). For each MRI slice, gastrocnemius region was manually outlined in order to measure the corresponding cross-sectional areas (CSA, in mm^2). The gastrocnemius muscle volume (mm^3) was calculated as the sum of volumes included between consecutive slices. PCr, inorganic phosphate (P_i) and ATP peaks were identified by a time-domain fitting routine using the AMARES-MRUI Fortran code and using appropriate prior knowledge [31]. Signal areas were corrected for magnetic saturation effects using fully relaxed spectra collected at rest with a repetition time of 20 s. Intracellular pH (pH_i) was calculated from the chemical shift of the P_i signal relative to PCr [32]. Time-points for the time course of pH_i and phosphorylated metabolite concentrations were assigned to the midpoints of the acquisition intervals.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, data were pooled over the animals within the same group, and are presented as means \pm SEM. Significance of the differences between WT and KO animals was assessed using Student's t-test, assuming significance at $p < 0.05$.

NMR variables evolving with respect to time during the stimulation period (isometric force production, metabolite concentrations, and pH_i) were analyzed with one-way repeated-measurements analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's tests using JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Mouse model development:

In order to delete triadin from skeletal and cardiac muscles, we have engineered a triadin mouse in which the first exon has been flanked by two lox-P sites (figure 1A). After mating these "floxed" mice with mice expressing the Cre recombinase in the whole animal, we produced a triadin null mouse line, in which triadin expression has been abolished in all tissues. KO (-/-) and WT (+/+) animals were obtained by mating heterozygote mice (+/-). The genotype of each animal was double-checked by PCR, using specific primers (figure 1B). At first sight, KO animals were indiscernible from WT animals, and the KO mice grew up and reproduced normally. Nevertheless, the adult KO animals seemed quieter in their cage, which could reflect

cardiac or skeletal muscles problems. Before performing the full physiological characterization of the animals, we performed molecular controls, in order to evaluate the extent of protein modifications induced by deletion of triadin gene. We first checked by Western blot the absence of all triadins isoforms in skeletal as well as in cardiac muscles. We used different anti-triadin antibodies, as some react with all triadins and some are specific for single isoforms. No specific signal was detected with an antibody directed against the common N-terminal end of triadin, either in skeletal muscle or in cardiac muscle (figure 1C). In order to confirm the absence of all triadin, and particularly the expression of proteins truncated in the N-terminal end (possibly due to an in frame initiation with another ATG), the reactivity with specific C-terminal antibodies was also assayed (figure 1D). Using a mixture of anti-Trisk 95, anti-Trisk 51 and anti-Trisk 32, a similar result was observed: no triadin was detected in the cardiac and the skeletal muscles of the KO animals. These experiments demonstrate that the deletion of the first exon in triadin gene has indeed led to the production of a full triadin KO animal.

Expression levels of the proteins involved in calcium homeostasis:

We used quantitative Western blot to evaluate the modification of expression induced by triadin suppression in the different proteins involved in calcium homeostasis. The expression level of RyR, DHPR, SERCA, CSQ, Junctin, and the mitochondrial FoF1-ATP synthase were evaluated on EDL and Sol from 3 different WT or KO animals (figure 2). Compared to the expression level in WT muscles, set to 100% as reference, no modification was observed for RyR ($125\% \pm 35\%$, $p = 0.166$ in EDL and $102\% \pm 17\%$, $p = 0.295$ in Sol), for SERCA ($104\% \pm 5\%$, $p = 0.49$ in EDL and $90\% \pm 6\%$, $p = 0.23$ in Sol) and for FoF1-ATPase ($116\% \pm 6\%$, $p = 0.099$ in EDL and $94\% \pm 8\%$, $p = 0.823$ in Sol). Junctin was not modified in EDL ($89\% \pm 12\%$, $p = 0.48$), and decreased in Sol ($55\% \pm 12\%$, $p = 0.023$). An important modification was observed for the alpha1 subunit of DHPR, which is increased to $170\% \pm 14\%$, $p = 0.004$ in EDL, and reduced in Sol ($75\% \pm 7\%$, $p = 0.018$). The major modification concerns CSQ, with a reduction to $27\% \pm 4\%$ ($p < 0.001$) in EDL and $19\% \pm 4\%$ ($p < 0.001$) in Sol.

Influence of triadin deletion on the localization of its partners

Triadin has been shown to interact with RyR and CSQ, and was proposed to anchor the luminal CSQ at the junctional part of sarcoplasmic reticulum, in the triad region [12]. Therefore, triadin deletion could result in CSQ delocalization, whereas no effect is expected *a priori* on DHPR or RyR localization. In order to test this hypothesis, double immunofluorescent labeling were performed on dissociated FDB fibres of WT or KO animals, using RyR/DHPR antibodies or RyR/CSQ antibodies (figure 3). As expected, no modification was observed in DHPR and RyR localization (figure 3, panels a-f and associated quantification graphs), which are perfectly colocalized and display the typical labeling of the triads in double rows of dots. But, CSQ was also perfectly colocalized with RyR, in contrast to our initial hypothesis (figure 3, panels g-l and associated graphs).

Morphological modifications of KO muscle

In order to evaluate more precisely the influence of triadin deletion on muscle ultrastructure, KO and WT muscles were analyzed by electron microscopy. No modification was observed in soleus (data not shown), whereas in EDL, numbers of triads were in abnormal orientation (figure 4), being longitudinal or oblique instead of transversal. The abnormal orientation was better visualized after T-tubules labeling (fig. 4a and c), and the number of triads with longitudinal or oblique orientation was evaluated to 25% (n=722) in KO instead of 3% (n=680) in WT. It is noteworthy that when the triads are longitudinally orientated, they usually lose the associated mitochondria. At last we observed a flattening of the terminal cisternae, which are significantly reduced from 68 nm \pm 3 nm (n=34) to 26 nm \pm 1 nm (n=55), as illustrated on figure 4b and 4e.

Physiological studies

To test the overall muscle performance of triadin KO mice, the animals were subjected to different strength tests. They were either allowed to freely walk on a wire stretched between two rods or hung gripping a cross-wired surface with all four paws. KO mice performed significantly worse than their WT littermates as assessed by the time until they fall. The time spent walking the wire was 50 s \pm 13 s for the WT (n = 5) as compared to 23 s \pm 5 s (n = 6) for the KO mice (p<0.05). Similar results were obtained with the wire grid

test, with a hanging time of 290 s \pm 10 s (n = 11) and 45 s \pm 12 s (n = 15) (p<0.001) for the WT and KO mice, respectively. The weight of the animals had been followed during 2 months, and no difference was noticed between WT and KO (data not shown). These data suggested that KO mice might be weaker than WT mice.

In order to assay the muscle strength independently of any other parameter (equilibrium, walking ability, ...), muscle performance was measured on isolated muscles. Fast and slow twitch muscles were dissected from the animals, and twitch and tetanic force were recorded. Figure 5 presents individual traces of twitches (fig.5A and fig.5B) and tetani (fig.5D and fig.5E) from both EDL and Sol of WT and KO animals. As depicted in figure 5 both single twitches and tetani were smaller in amplitude for KO than for WT mice. Pooled data for the amplitudes of twitches and tetani are presented in figures 5C and F, respectively. Averages present a slightly greater reduction in twitch force for Sol as compared to EDL muscles in the KO mice. This difference was, however, not present for the tetani. Overall, both twitch and tetanic forces were significantly reduced in fast and slow twitch muscles of KO animals. To test how muscles from WT and KO animals endure fatigue, series of tetani were applied. Figure 6 illustrates the evolution of the maximal amplitude of the tetani as normalized to the maximal amplitude in a given series. In these experiments, the absolute force was always greater in WT than in KO mice. The decline in tetanic force was slower for both muscle types in KO than in WT animals suggesting a slower evolution of fatigue. At the end of the test, the maximal force of EDL muscle was 54 % \pm 3 % of the initial value for WT and 61 % \pm 5 % in KO mice, and in Sol, it was 48 % \pm 3% in WT and 61 % \pm 4% in KO mice. Nevertheless, even at the end of the fatigue run the absolute force was not greater in KO than in WT mice (not illustrated). Interestingly, the reduction in peak tetanic force underwent a slight but sudden drop followed by a plateau-like phase early in the run giving rise to a shoulder-like part in the data measured on KO mice. Such a phenomenon was never observed on either EDL or soleus from control mice, and could point to a possible modification in muscle metabolism.

Gastrocnemius muscle volume and mechanical measurements

In order to confirm the results observed in isolated muscle, analyses of muscle morphology, function and metabolism were performed using NMR combined with muscle contraction. The Gastrocnemius muscle was stimulated on an anesthetized animal, in order to induce its contraction, while ^1H and ^{31}P NMR spectra were registered. Muscle volume measured using MRI (figure 7A) was significantly larger in WT mice ($109.4 \pm 3.3 \text{ mm}^3$, $n = 9$) than in KO mice ($92.6 \pm 4.3 \text{ mm}^3$, $n = 9$, $p < 0.05$), but no difference in the animal weight was measured ($28.6 \text{ g} \pm 1.4 \text{ g}$ for WT versus $26.8 \text{ g} \pm 0.9 \text{ g}$ for KO).

Isometric force production was lower in KO mice throughout the whole 6-min stimulation protocol (Fig. 7B). For each group, force transiently increased in the early stage of the stimulation period, to reach a maximal value (Fig. 7B). This increase was significantly larger in the KO group ($+ 40.7 \pm 7.0 \%$) when compared to control animals ($+ 24.0 \pm 3.3 \%$) (Fig. 7C). Afterwards, force decreased progressively until the end of the stimulation period (Fig. 7B and C). The corresponding decrease, measured at the end of the stimulation period and illustrating muscle fatigue, was smaller in the KO group ($85.9 \pm 2.4 \%$ of the initial value) as compared to controls ($57.1 \pm 6.0 \%$ of the initial value) (Fig. 7C).

Energy metabolism

At rest, PCr/ATP ratio did not differ between both groups (Table 1). Basal pH_i was similar in WT (7.14 ± 0.05) and KO (7.14 ± 0.04) (Fig. 7D). During the stimulation period, the time-courses of PCr (Fig. 7D) and pH_i (Fig. 7E) were similar in both groups. PCr was rapidly consumed at the onset of the stimulation period and the corresponding initial rates of PCr consumption were identical (Table 1). After 2 minutes of stimulation, PCr reached a steady-state that was maintained until the end of the stimulation period. At that time, PCr levels were $39.7 \pm 3.6 \%$ and $37.4 \pm 4.5 \%$ of their basal values in WT and KO groups respectively. At the onset of the post-stimulation period, the rate of PCr resynthesis did not differ between groups (Table 1).

In both groups, pH_i , which reflects the anaerobic metabolism, fell rapidly in the early stages of the stimulation period to reach a steady-state after 3 minutes of stimulation (Fig. 7E). This steady-state remained fairly constant until the end of the

stimulation period, when pH_i was 6.74 ± 0.04 in WT and 6.77 ± 0.06 in KO animals respectively.

Discussion

Genetic ablation of a protein has been one of the most powerful technique used in order to identify the precise spectrum of its functions. It has been successfully applied to few members of the skeletal calcium release complex (RyR1 [33], DHPR [34-36], and CSQ1 [37]), to identify which precise function could be associated or not with each protein. Whereas deletion of RyR results in perinatal death, as deletion of the alpha 1 subunit of DHPR, deletion of CSQ1, that was considered as essential, has surprisingly no effect on mouse survival or on muscle function [37]. Triadin precise function is still unknown, but as the triadin gene is expressed in heart, it was initially imagined that its deletion would lead to embryonic death, as for RyR2 [38]. Surprisingly, these mice are viable, as observed in a similar triadin KO mouse model recently developed [39], and contrary to CSQ KO mice, presented important muscle impairment which have been characterized in the present work.

Triadin gene undergoes an important alternative splicing, and all the triadins are possibly not identified up to now. In order to delete all the triadin isoforms, that share at least the 8 first exons, we suppressed the first exon from the triadin gene. As expected, both in cardiac and skeletal muscles of these mice, all known triadin isoforms were deleted. Nevertheless, triadin suppression affects neither the mouse survival nor its reproduction, as observed in the similar model recently reported [39].

As an adaptative mechanism, the expression level of some potential triadin partners, have been modified in our triadin KO model. Calsequestrin expression level undergoes the major modification, confirming the strong relationship between triadin and CSQ. The present reduction in the CSQ expression level is larger than that observed in the triadin KO mouse model described previously (4 fold reduction in all muscle types in the present work whereas a 1.5 fold reduction was shown by Shen *et al.*, [39]). It is noteworthy that triadin suppression did not induce any modification in CSQ triad localization. Therefore, if triadin is indeed responsible of anchoring CSQ at the terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum, it is not the only protein involved in this function, and most probably junctin, which is not modified in this

triadin KO mouse line, is a good candidate to fulfill this function [40]. The important reduction in CSQ expression could indicate either that triadin is able to regulate CSQ gene expression or that defect in CSQ anchoring leads to its degradation, as no mislocalization is observed. The second protein which expression has been surprisingly modified in the present mouse model is the alpha1 subunit of DHPR, which is overexpressed 1.7 fold in fast (EDL) muscle, but not in slow (Soleus) muscle. This is consistent with the absence of defects observed in Soleus, and it could be hypothesized that longitudinal or oblique T-tubules allow the presence of higher amount of DHPR. The mechanisms leading to this overexpression are poorly understood, as no direct relationship has been shown between DHPR and triadin, and most probably reflect an adaptation of the muscle to improve muscle function in absence of triadin.

In agreement with previous results [39], ultrastructural analysis on our KO mice revealed that 25% of triads have an abnormal orientation. Considering the similar results reported in both studies, this strongly supports an involvement of triadin in the setting up or in the maintenance of triad. As for CSQ anchoring, it is mostly probable that triadin is not the only protein involved in this function. One hypothesis could be that triadin would strengthen the triad structure, and allow it to be maintained during contraction. Further experiments will be needed in order to clarify this issue.

One of our first observations is a muscle weakness, in contrast with what has been published on the first triadin KO mouse [39], and an obvious defect in the time the mice spent on the grid of their cage. This prompted us to search for objective evaluation of muscle strength. Considering that the reduction in the time on the grid could induce reduction in the food intake, and in animal development, one could expect a corresponding weight reduction. No modification has been observed on the animal weight, therefore the muscle weakness observed in these mice does not modify their growth and reproduction. A number of tests were performed in order to evaluate muscle strength at whole animal level. All these tests clearly demonstrated a significant muscle strength reduction and this result was further confirmed in isolated muscle. Interestingly this muscle weakness is accompanied by an improved resistance to fatigue, in all muscles tested (EDL, Soleus and Gastrocnemius).

As CSQ is reduced by 4 times in these muscles, could the observed effects at least partially be attributed to CSQ reduction? It is probably not the case, because none of the defects observed here were similar to defects seen in the CSQ KO mouse [37], except for the reduction in terminal cisternae thickness which is most probably directly related to CSQ reduction. In triadin KO mouse, no increase in RyR, nor in mitochondria amount, and no duplication or triplication of triad were observed. In addition, no muscle weakness was observed in CSQ1 KO mouse, contrary to triadin KO mouse. Therefore, the physiological effects observed in this KO mouse are clearly different from CSQ deletion-induced defects, and can clearly be attributed to triadin deletion.

Which function of triadin can then be postulated from this model? Triadin is clearly not essential for triad formation, as triads are still present. Nevertheless, it could be involved in maintaining triads during contraction, and in anchoring mitochondria close to triads. A precise stoichiometry for triadin in the complex is also clearly associated with a correct function of the calcium release complex. We have previously shown that triadin Trisk 95 overexpression results in blocking of EC coupling [21], and here we show that triadin ablation induced muscle function impairment, whereas Shen *et al.* [39] have shown that it induced reduction in depolarization induced calcium release. All these results confirm that triadin is an essential link within the calcium release complex. The triadin KO mouse presents objective muscle dysfunctions, and is therefore undoubtedly suffering from myopathy as identical energy consumption produced a reduced strength. This myopathy is a structural myopathy, as the observed defect is a modification in the structure of the muscle fibre. Mutation in the triadin gene in human could probably lead to a myopathy, and this gene should be screened in patients presenting with a myopathy of unknown origin. This mouse line could therefore be a model to study the development of a structural myopathy, and its evolution during aging and/or exercise.

References

- 1- Flucher, B.E. (1992) *Dev. Biol.* **154**, 245-260.
- 2- Flucher, B.E., and Franzini-Armstrong, C. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 8101-8106.
- 3- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., Lai, Y., De Jongh, K.S., Catterall, W.A., and Ronjat, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 2270-2274.
- 4- Brandt, N.R., Caswell, A.H., Wen, S.R. and J.A. Talvenheimo. (1990) *J. Membr. Biol.* 113: 237-251.
- 5- Kim, K.C., Caswell, A.H., Talvenheimo, J.A. and Brandt, N.R. (1990) *Biochemistry.* **29**, 9281-9289.
- 6- Caswell, A.H., Brandt, N.R., Brunschwig, J.P. and S. Purkerson. (1991) *Biochemistry.* 30: 7507-7513.
- 7- Knudson, C.M., Stang, K.K., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A. and K.P. Campbell. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12646-12654
- 8- Liu, G., Pessah, I.N. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 33028-33034.
- 9- Caswell, A.H., Motoike, H.K., Fan, H. and N.R. Brandt. (1999) *Biochemistry.* 38: 90-97.
- 10- Groh, S., Marty, I., Ottolia, M., Prestipino, G., Chapel, A., Villaz, M. and Ronjat, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12278-12283.
- 11- Guo, W. and Campbell, K.P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 9027-9030.
- 12- Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A., Jones, L.R. (2000). *J Biol Chem.*, **275**, 17639-46.
- 13- Shin, D.W., Ma, J. and Kim, D.H. (2000) *FEBS Lett.* **486**, 178-182.
- 14- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M. and Jones, L.R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23389-23397.
- 15- Ohkura, M., Furukawa, K., Fujimori, H., Kuruma, A., Kawano, S., Hiraoka, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H. and Y. Ohizumi. (1998) *Biochemistry.* **37**, 12987-12993.
- 16- Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28660-28668.
- 17- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., and Villaz, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8206-8212
- 18- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Smida Rezgui, S., Urbani-Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., DeWaard, M., and Marty, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 28601-28609.
- 19- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Romero, N.B., Villaz, V., De Waard, M., and Marty, I., (2003), *Biochem. Biophys. Research Com.*, **303**, 669-675

- 20- Marty, I., Fauré, J., Fourest-Lieuvain, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Brocard, J. (2009) *J. Physiol.* Apr 29. [Epub ahead of print]
- 21- Smida Rezgui, S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J.C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux, S., Garcia, L., De Waard, M., and Marty, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39302-39308.
- 22- Wang, Y., Li, X., Duan, H., Fulton, T.R., Eu, J.P., Meissner G. (2009) *Cell Calcium*. **45**, 29-37.
- 23- Fodor, J., Gonczi, M., Sztretye, M., Dienes, B., Olah, T., Szabo, L., Csoma, E., Szentesi, P., Szigeti, GP., Marty, I., Csernoch, L. (2008) *J Physiol* **586**, 5803-5818.
- 24- Dupé, V., Davenne, M., Brocard, J., Dollé, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., Rijli, F.M. (1997) *Development.*, **124**, 399-410.
- 25- Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G., and M. Villaz. (1995) *Biochem. J.* **307**, 769-774.
- 26- Lunardi, J., Dupuis, A., Frobert, Y., Grassi, J., and Vignais, P.V. (1989) *FEBS Lett.* **245**, 223-228.
- 27- Moutin, M.J., Cuillel, M., Rapin, C., Miras, R., Anger, M., Lompré, A.M., Dupont, Y. (1994) *J. Biol Chem.*, **269**, 11147-54
- 28- Pouvreau, S., Royer, L., Yi, J., Brum, G., Meissner, G., Ríos, E., Zhou, J. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 5235-40.
- 29- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Kneitz, B., Edelmann, W., and Lisanti, M.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21425-21433
- 30- Westerblad, H., Dahlstedt, A. J., and Lännergren, J. (1998) *J. Physiol. (Lond)* **510**, 269-277
- 31- Vanhamme, L., van den Boogaart, A. and Van Huffel, S. (1997) *J Magn Reson* **129**, 35-43
- 32- Arnold, D.L., Matthews, P.M. & Radda, G.K. (1984). *Magn Reson Med* **1**, 307-315.
- 33- Takeshima, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., Noda, T. (1994) *Nature.* **369**, 556-559.
- 34- Knudson, C.M., Chaudhari, N., Sharp, A.H., Powell, J.A., Beam, K.G., Campbell, K.P. (1989) *J. Biol Chem.*, **264**, 1345-1348.
- 35- Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R., Powers, P.A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**, 13961-13966.
- 36- Ahern, C.A., Powers, P.A., Biddlecome, G.H., Roethe, L., Vallejo, P., Mortenson, L., Strube, C., Campbell, K.P., Coronado, R., Gregg, R.G. (2001) *BMC Physiol*, 1-8.
- 37- Paolini, C., Quarta, M., Nori, A., Boncompagni, S., Canato, M., Volpe, P., Allen, P.D., Reggiani, C., Protasi, F. (2007) *J. Physiol.*, **583**, 767-84.
- 38- Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., Iino, M. (1998), *EMBO J.*, **17**, 3309-3316.
- 39- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., Allen, P.D., Perez, C.F. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 7864-7874.

FOOTNOTE

The mouse mutant lines were established at the Mouse Clinical Institute (Institut Clinique de la Souris, MCI/ICS) in the Targeted Mutagenesis and Transgenesis Department with funds from the GIS-Maladies Rares. We thank Dr D. Metzger for his help in the design of triadin KO mouse construct. This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), and from Agence Nationale de la Recherche (ANR-Maladies rares) and Hungarian Research Found (OTKA K75604).

ABBREVIATIONS

CSQ, Calsequestrin; DHPR, dihydropyridine receptor; E-C coupling, excitation-contraction coupling; EDL, Extensor digitorum longus; FDB, Flexor Digitorum Brevis; KO, knock out; PCr, phosphocreatine; RyR, ryanodine receptor; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; Sol, soleus; WT, wild type

FIGURES LEGENDS

Figure 1. *Molecular characterization of the triadin KO mouse.*

Panel A : Schematic representation of the wild type, floxed and KO allele, and positioning of the primers used for the PCR amplification.

Panel B: PCR amplification of genomic DNA was performed with a mix containing primers A, C and D. This gives rise to a band of 240bp on WT animals (+/+, primers C and D), a band of 477bp on KO animals (-/-, primers A and D), and both on heterozygotes animals (+/-). The DNA fragment between primers A and D is too large to be amplified on WT animals.

Panel C: Western blot analysis using an anti-N-terminal antibody on WT skeletal muscle (lane 1), KO skeletal muscle (lane 2), WT heart (lane 3) and KO heart (lane 4). The signals corresponding to Trisk 95 (100kDa), Trisk 51 (60kDa) and Trisk 32 (37kDa) was absent in KO muscles (skeletal and cardiac).

Panel D : Western blot analysis using a mix of specific antibodies against Trisk 95, Trisk 51 and Trisk 32, on WT skeletal muscle (lane 1), KO skeletal muscle (lane 2), WT heart (lane 3) and KO heart (lane 4). The signals corresponding to Trisk 95 (100kDa), Trisk 51 (60kDa) and Trisk 32 (37kDa) was absent in KO muscles (skeletal and cardiac).

Figure 2. *Western blot analyzes of EDL and Soleus*

Forty to eighty micrograms of muscle homogenates were loaded on 5-15% polyacrylamide gel. The homogenates were prepared using EDL and Soleus (SOL) isolated either from wild type (WT) or triadin KO (KO) animal. After electrophoresis separation and Western blot analysis using the indicated antibody (RyR, DHPR, SERCA, CSQ, FoF1-ATPase and junctin), the membranes were stained with Coomassie blue to evaluate the amount of myosin in each lane, and the signal in Western blot was normalized to the amount of myosin. The corresponding quantification is presented on the histogram on the right of each blot, the control in each WT condition being set at 100%.

Figure 3. *Double immunofluorescent labelling on isolated muscle fibres*

Muscle fibres were isolated from wild type (WT) or triadin KO (KO) FDB and used to perform double immunofluorescent labellings, with antibodies directed against RyR and DHPR (panels a-f) or RyR and CSQ (panels g-l). The fluorescence intensity as a function of distance on the fibre was plotted for six successive triads, and was reported on the adjacent graph for each labelling. The colour code is preserved, and the green curve corresponds to the green immunolabelling, whereas the red curve corresponds to the red labelling. Scale bar : 1µm

Figure 4. *Electron microscopy analysis of EDL muscle*

EDL were isolated from WT or KO animals, and examined using electron microscopy at different magnifications, with (a, c and d) or without tubules labelling (b and e). A number of triads are in abnormal orientation in KO muscle (white stars), and presented mainly a longitudinal orientation (c and d). The width of the terminal cisternae was measured as shown on pictures b and e, respectively on WT and KO muscles.

Figure 5. *Force transients in isolated muscles of wild-type and triadin knock-out mice.* Panels A and B: Single twitches elicited by short (1 ms), supramaximal (5 V) stimulation on EDL (A) and Soleus (B) from WT (continuous line) and KO (dashed line) mice. Panels D and E: Tetani elicited by a train of supramaximal stimulation at 200 Hz for 200 ms on EDL (D) and at 100 Hz for 500 ms on Soleus (E) from WT (continuous line) and KO (dashed line) mice. Panels C and F: Data were pooled from 5 WT and 6 KO mice, after averaging the given parameter over each individual record (usually 10) measured on an individual muscle. Average amplitude of the twitches (C) and of the tetani (F). Asterisks denote significant difference between WT and KO mice ($p < 0.05$).

Figure 6. *Fatigability of wild-type and knock-out mice.* Evolution of the amplitude of tetani on EDL (A) and Soleus (B). All together 150 tetani (200 and 500 ms long stimulation at 200 and 100 Hz for EDL and Soleus, respectively), repeated every 2 s, were evoked on both muscle types and their amplitudes normalized to the maximal value in the given train. Measurements were pooled from all mice of the given batch to yield the data points presented in the figure.

Figure 7. *NMR analysis.* (A) NMR image of a hind mouse leg showing delimitation of gastrocnemius. (B) Isometric force normalized to muscle volume and (C) relative isometric force during 6 min of repeated isometric contractions induced electrically at 1.7 Hz in gastrocnemius. Values are shown as means \pm SEM. P-value is the result of a one-way repeated-measures ANOVA. * Significant difference between both groups for corresponding time points ($P < 0.05$). (D) Changes in gastrocnemius PCr level and (E) intracellular pH during 6 min of repeated isometric contractions induced electrically at 1.7 Hz. Values are shown as means \pm SEM. P-value is the result of a one-way repeated-measures ANOVA. The first time point ($t = 0$) indicates the resting value.

Table 1

Gastrocnemius energy metabolism in WT and KO mice

	WT	KO
Basal PCr/ATP ratio	2.52 ± 0.08	2.48 ± 0.23
$VPCr_{stim}$ (%.min ⁻¹)	67.0 ± 7.9	51.4 ± 7.2
$VPCr_{rec}$ (%.min ⁻¹)	34.6 ± 3.9	30.6 ± 6.1

Values are means ± SEM. $VPCr_{stim}$, rate of PCr degradation at the start of the stimulation period ; $VPCr_{rec}$, rate of PCr resynthesis at the start of the post-stimulation period.

Figure 1

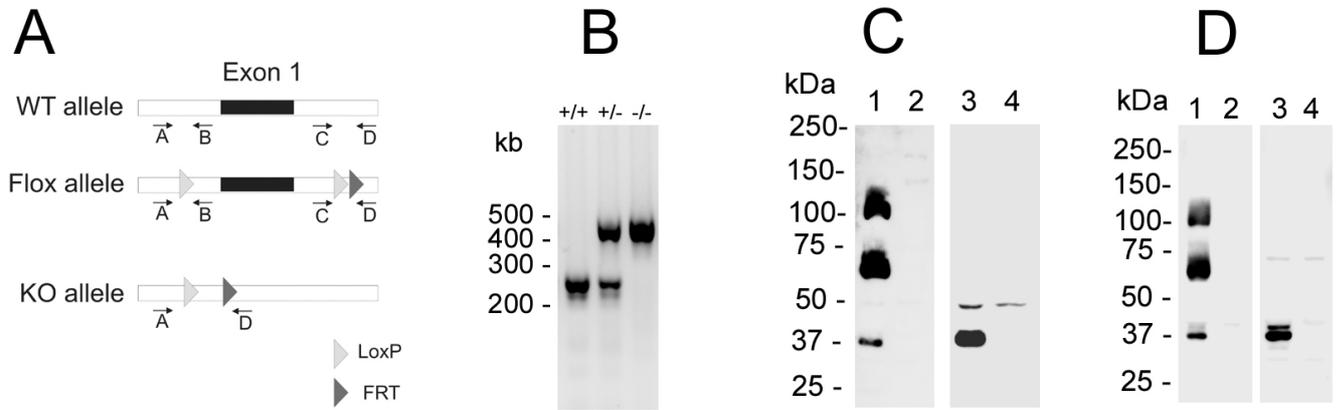


Figure 2

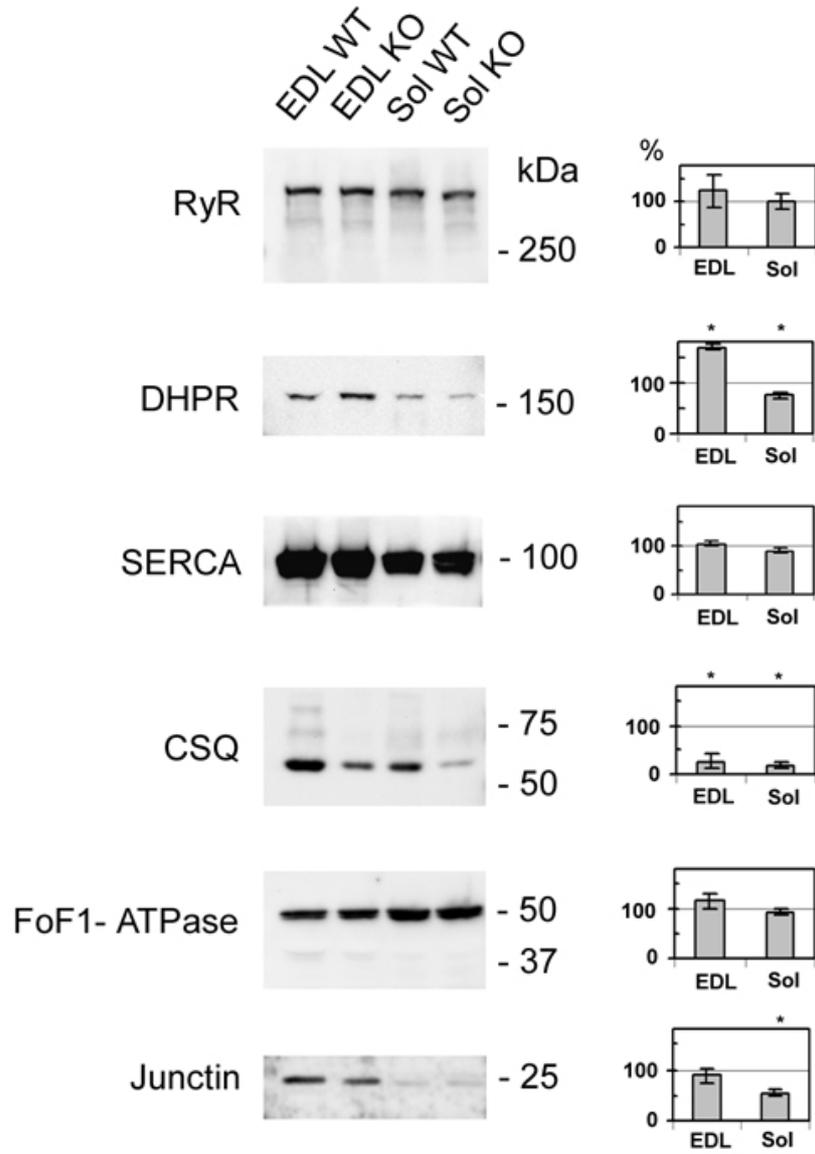


Figure 3

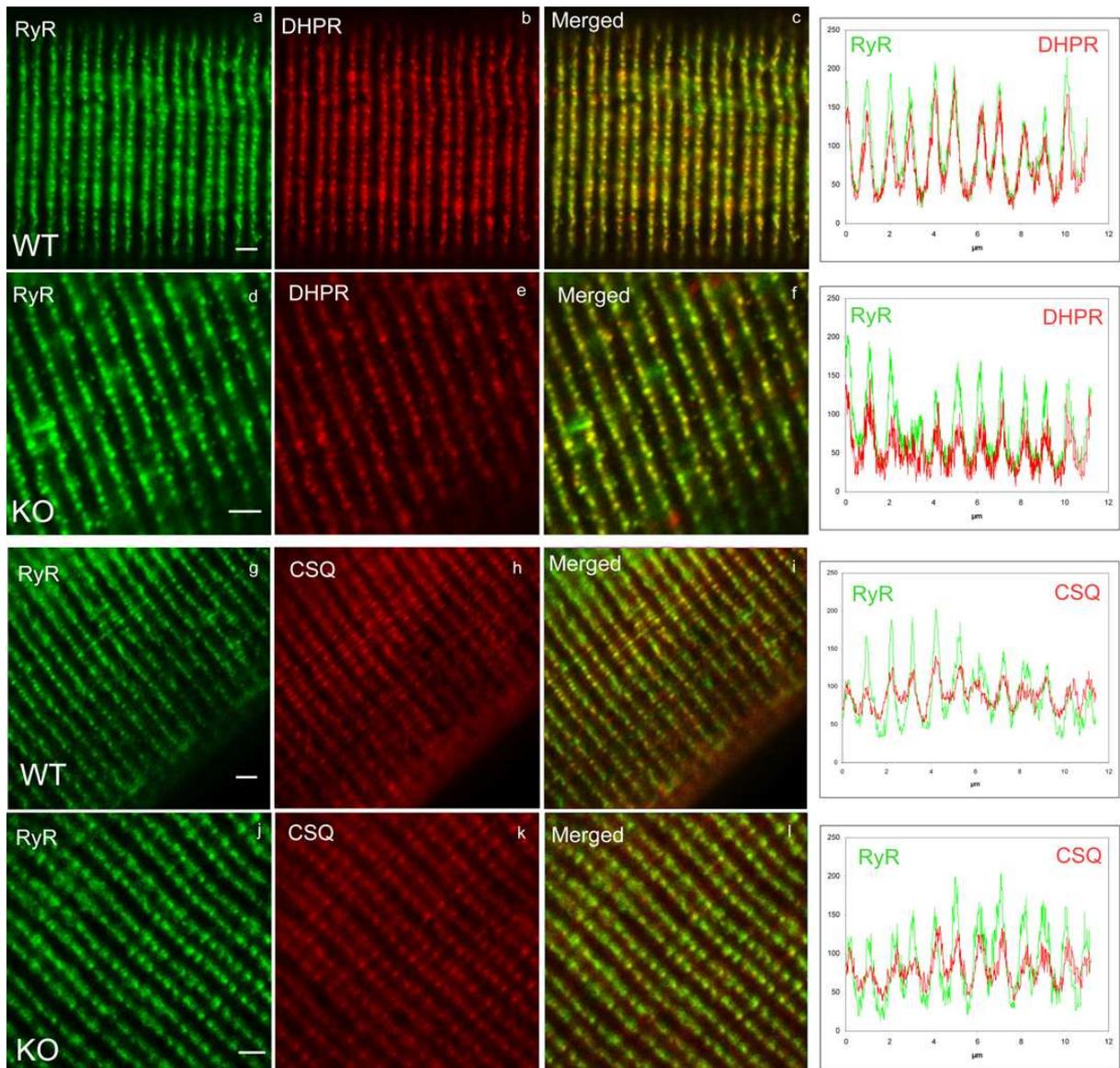


Figure 4

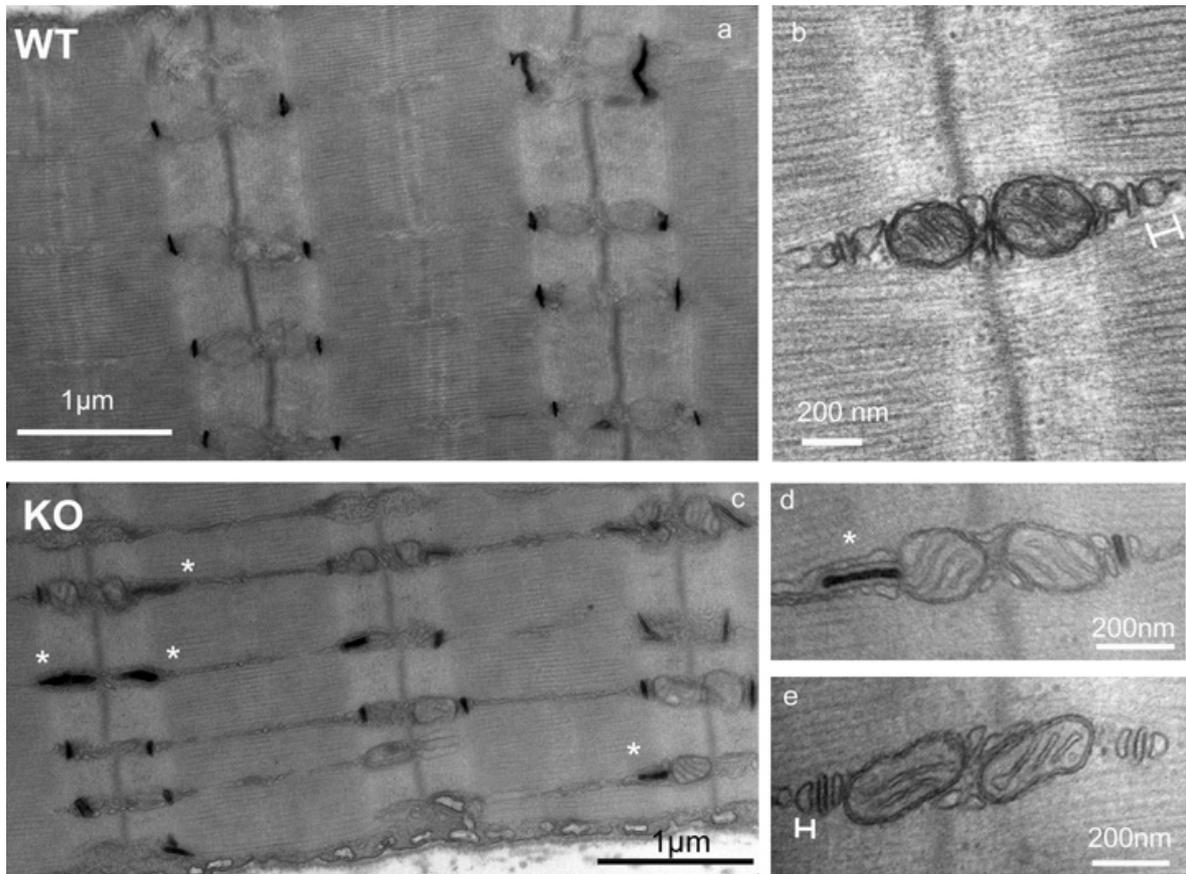


Figure 5

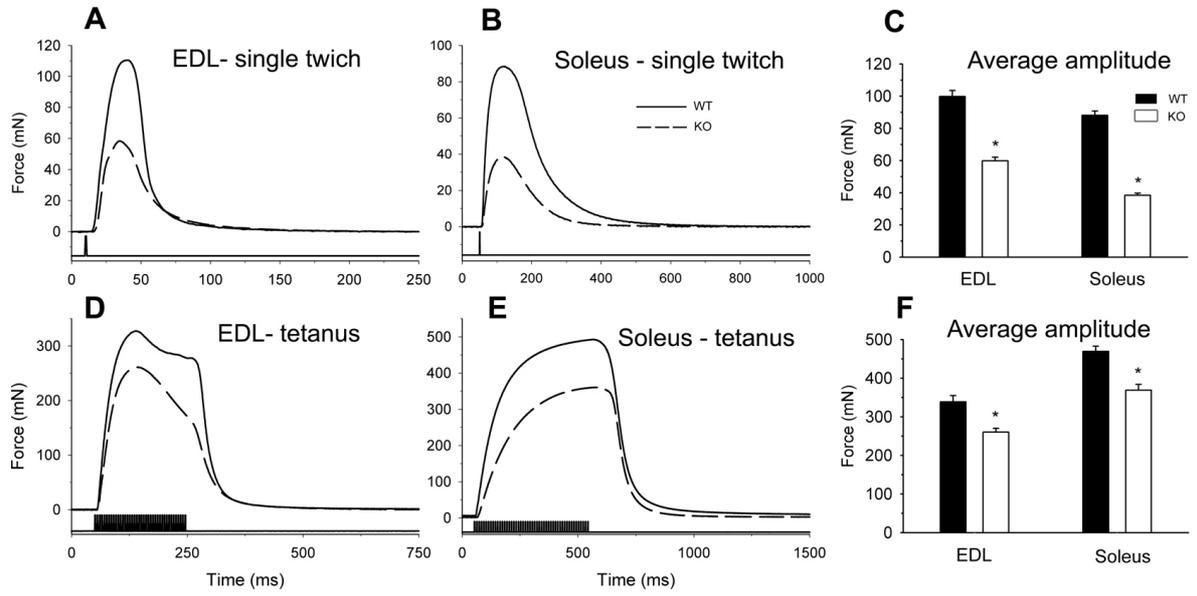


Figure 6

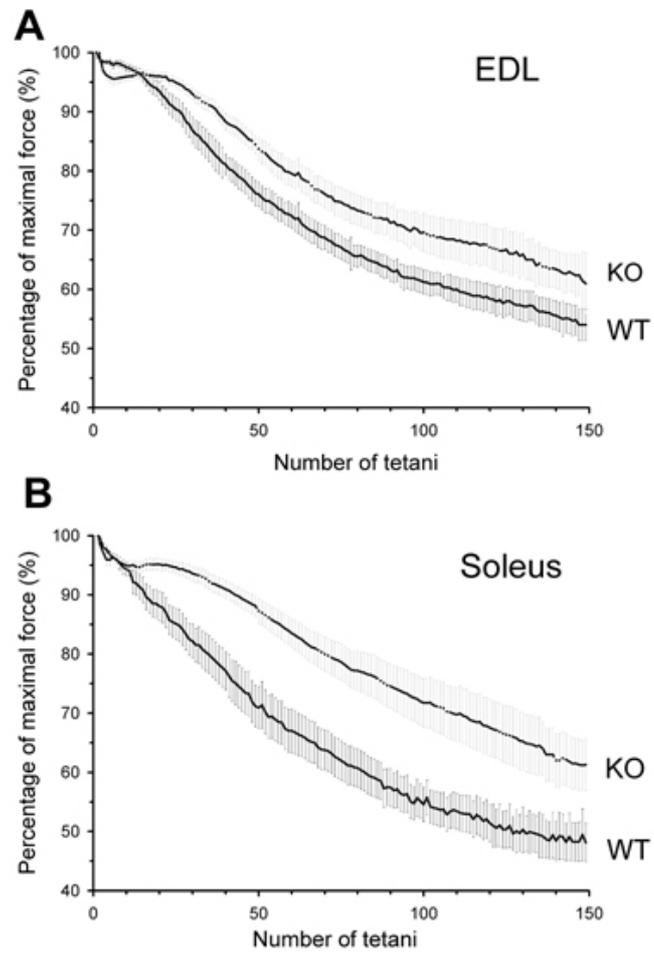
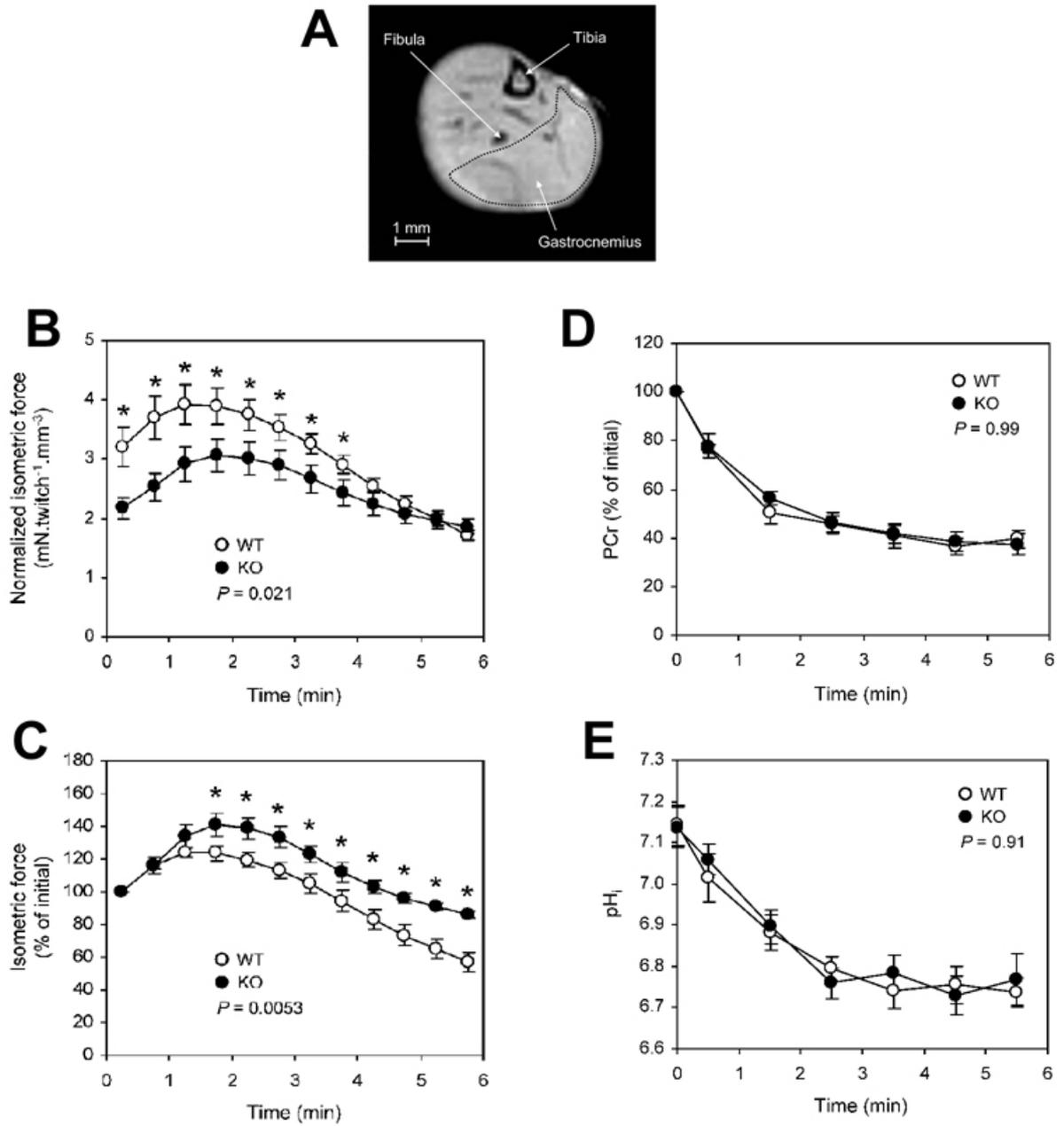


Figure 7



LITTERATURE

A

- AHERN, G. P., JUNANKAR, P. R. & DULHUNTY, A. F. (1997). Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. *Biophys J* **72**, 146-162.
- AMPONG, B. N., IMAMURA, M., MATSUMIYA, T., YOSHIDA, M. & TAKEDA, S. (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol* **24**, 134-144.
- ANDERSON, R. G. (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10909-10913.

B

- BAGNATO, P., BARONE, V., GIACOMELLO, E., ROSSI, D. & SORRENTINO, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol* **160**, 245-253.
- BALIJEPALLI, R. C., FOELL, J. D., HALL, D. D., HELL, J. W. & KAMP, T. J. (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7500-7505.
- BARE, D. J., KETTLUN, C. S., LIANG, M., BERS, D. M. & MIGNERY, G. A. (2005). Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **280**, 15912-15920.
- BEARD, N. A., SAKOWSKA, M. M., DULHUNTY, A. F. & LAVER, D. R. (2002). Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys J* **82**, 310-320.
- BELLINGER, A. M., REIKEN, S., CARLSON, C., MONGILLO, M., LIU, X., ROTHMAN, L., MATECKI, S., LACAMPAGNE, A. & MARKS, A. R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* **15**, 325-330.
- BENZ, R. (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 167-196.
- BERRIDGE, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- BERTOCCHINI, F., OVITT, C. E., CONTI, A., BARONE, V., SCHOLER, H. R., BOTTINELLI, R., REGGIANI, C. & SORRENTINO, V. (1997). Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *Embo J* **16**, 6956-6963.
- BESSMAN, S. P. & GEIGER, P. J. (1981). Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* **211**, 448-452.

- BETZ, R. C., SCHOSER, B. G., KASPER, D., RICKER, K., RAMIREZ, A., STEIN, V., TORBERGSEN, T., LEE, Y. A., NOTHEN, M. M., WIENKER, T. F., MALIN, J. P., PROPPING, P., REIS, A., MORTIER, W., JENTSCH, T. J., VORGERD, M. & KUBISCH, C. (2001). Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet* **28**, 218-219.
- BEUTNER, G., SHARMA, V. K., GIOVANNUCCI, D. R., YULE, D. I. & SHEU, S. S. (2001). Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 21482-21488.
- BEUTNER, G., SHARMA, V. K., LIN, L., RYU, S. Y., DIRKSEN, R. T. & SHEU, S. S. (2005). Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim Biophys Acta* **1717**, 1-10.
- BHAT, M. B., ZHAO, J., TAKESHIMA, H. & MA, J. (1997). Functional calcium release channel formed by the carboxyl-terminal portion of ryanodine receptor. *Biophys J* **73**, 1329-1336.
- BLOCK, B. A., IMAGAWA, T., CAMPBELL, K. P. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* **107**, 2587-2600.
- BLOCK, B. A., O'BRIEN, J. & FRANCK, J. (1996). The role of ryanodine receptor isoforms in the structure and function of the vertebrate triad. *Soc Gen Physiol Ser* **51**, 47-65.
- BLONDEL, O., TAKEDA, J., JANSSEN, H., SEINO, S. & BELL, G. I. (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem* **268**, 11356-11363.
- BONCOMPAGNI, S., ROSSI, A. E., MICARONI, M., BEZNOUSSENKO, G. V., POLISHCHUK, R. S., DIRKSEN, R. T. & PROTASI, F. (2009). Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol Biol Cell* **20**, 1058-1067.
- BOWSER, D. N., PETROU, S., PANCHAL, R. G., SMART, M. L. & WILLIAMS, D. A. (2002). Release of mitochondrial Ca²⁺ via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake. *Faseb J* **16**, 1105-1107.
- BRILLANTES, A. B., ONDRIAS, K., SCOTT, A., KOBRINSKY, E., ONDRIASOVA, E., MOSCHELLA, M. C., JAYARAMAN, T., LANDERS, M., EHRLICH, B. E. & MARKS, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* **77**, 513-523.
- BULTYNCK, G., DE SMET, P., ROSSI, D., CALLEWAERT, G., MISSIAEN, L., SORRENTINO, V., DE SMEDT, H. & PARYS, J. B. (2001a). Characterization and mapping of the 12 kDa FK506-binding protein (FKBP12)-binding site on different isoforms of the ryanodine receptor and of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* **354**, 413-422.

BULTYNCK, G., ROSSI, D., CALLEWAERT, G., MISSIAEN, L., SORRENTINO, V., PARYS, J. B. & DE SMEDT, H. (2001b). The conserved sites for the FK506-binding proteins in ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are structurally and functionally different. *J Biol Chem* **276**, 47715-47724.

C

CALLAWAY, C., SERYSHEV, A., WANG, J. P., SLAVIK, K. J., NEEDLEMAN, D. H., CANTU, C., 3RD, WU, Y., JAYARAMAN, T., MARKS, A. R. & HAMILTON, S. L. (1994). Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* **269**, 15876-15884.

CAMERON, A. M., NUCIFORA, F. C., JR., FUNG, E. T., LIVINGSTON, D. J., ALDAPE, R. A., ROSS, C. A. & SNYDER, S. H. (1997). FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J Biol Chem* **272**, 27582-27588.

CAMERON, A. M., STEINER, J. P., ROSKAMS, A. J., ALI, S. M., RONNETT, G. V. & SNYDER, S. H. (1995a). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell* **83**, 463-472.

CAMERON, A. M., STEINER, J. P., SABATINI, D. M., KAPLIN, A. I., WALENSKY, L. D. & SNYDER, S. H. (1995b). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1784-1788.

CARAFOLI, E., SANTELLA, L., BRANCA, D. & BRINI, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 107-260.

CASWELL, A. H., BRANDT, N. R., BRUNSCHWIG, J. P. & PURKERSON, S. (1991). Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* **30**, 7507-7513.

CATTERALL, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* **64**, 493-531.

CHO, J. H., KO, K. M., SINGARUVELU, G., LEE, W., KANG, G. B., RHO, S. H., PARK, B. J., YU, J. R., KAGAWA, H., EOM, S. H., KIM DO, H. & AHNN, J. (2007). Functional importance of polymerization and localization of calsequestrin in *C. elegans*. *J Cell Sci* **120**, 1551-1558.

CHOPRA, N., YANG, T., ASGHARI, P., MOORE, E. D., HUKU, S., AKIN, B., CATTOLICA, R. A., PEREZ, C. F., HLAING, T., KNOLLMANN-RITSCHER, B. E., JONES, L. R., PESSAH, I. N., ALLEN, P. D., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & KNOLLMANN, B. C. (2009). Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7636-7641.

COLOMBINI, M. (1989). Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* **111**, 103-111.

- COUCHOUX, H., ALLARD, B., LEGRAND, C., JACQUEMOND, V. & BERTHIER, C. (2007). Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells. *J Physiol* **580**, 745-754.
- CSORDAS, G., RENKEN, C., VARNAI, P., WALTER, L., WEAVER, D., BUTTLE, K. F., BALLA, T., MANNELLA, C. A. & HAJNOCZKY, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* **174**, 915-921.
- CURTIS, B. M. & CATTERALL, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**, 2113-2118.
- CUSIMANO, V., PAMPINELLA, F., GIACOMELLO, E. & SORRENTINO, V. (2009). Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4695-4700.
- D**
- DAINESE, M., QUARTA, M., LYFENKO, A. D., PAOLINI, C., CANATO, M., REGGIANI, C., DIRKSEN, R. T. & PROTASI, F. (2009). Anesthetic- and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *Faseb J* **23**, 1710-1720.
- DAMIANI, E. & MARGRETH, A. (1990). Specific protein-protein interactions of calsequestrin with junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 1253-1259.
- DAMIANI, E., PICELLO, E., SAGGIN, L. & MARGRETH, A. (1995). Identification of triadin and of histidine-rich Ca(2+)-binding protein as substrates of 60 kDa calmodulin-dependent protein kinase in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of rabbit fast muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 457-465.
- DAMIANI, E., VOLPE, P. & MARGRETH, A. (1990). Coexpression of two isoforms of calsequestrin in rabbit slow-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **11**, 522-530.
- DARGAN, S. L., LEA, E. J. & DAWSON, A. P. (2002). Modulation of type-1 Ins(1,4,5)P₃ receptor channels by the FK506-binding protein, FKBP12. *Biochem J* **361**, 401-407.
- DE WAARD, M., WITCHER, D. R. & CAMPBELL, K. P. (1994). Functional properties of the purified N-type Ca²⁺ channel from rabbit brain. *J Biol Chem* **269**, 6716-6724.
- DOLPHIN, A. C. (1999). L-type calcium channel modulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**, 153-177.
- DU, G. G., KHANNA, V. K. & MACLENNAN, D. H. (2000). Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca(2+) sensitivity of the skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* **275**, 11778-11783.
- DU, G. G., SANDHU, B., KHANNA, V. K., GUO, X. H. & MACLENNAN, D. H. (2002). Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16725-16730.

DULHUNTY, A. F., JUNANKAR, P. R. & STANHOPE, C. (1992). Extra-junctional ryanodine receptors in the terminal cisternae of mammalian skeletal muscle fibres. *Proc Biol Sci* **247**, 69-75.

E

ELLIS, S. B., WILLIAMS, M. E., WAYS, N. R., BRENNER, R., SHARP, A. H., LEUNG, A. T., CAMPBELL, K. P., MCKENNA, E., KOCH, W. J., HUI, A. & ET AL. (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**, 1661-1664.

ENDO, M. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* **57**, 71-108.

F

FELDER, E., PROTASI, F., HIRSCH, R., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & ALLEN, P. D. (2002). Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys J* **82**, 3144-3149.

FENG, Y., VALLEY, M. T., LAZAR, J., YANG, A. L., BRONSON, R. T., FIRESTEIN, S., COETZEE, W. A. & MANLEY, J. L. (2009). SRp38 regulates alternative splicing and is required for Ca(2+) handling in the embryonic heart. *Dev Cell* **16**, 528-538.

FLIEGEL, L., OHNISHI, M., CARPENTER, M. R., KHANNA, V. K., REITHMEIER, R. A. & MACLENNAN, D. H. (1987). Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1167-1171.

FLUCHER, B. E., ANDREWS, S. B., FLEISCHER, S., MARKS, A. R., CASWELL, A. & POWELL, J. A. (1993). Triad formation: organization and function of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel and triadin in normal and dysgenic muscle in vitro. *J Cell Biol* **123**, 1161-1174.

FLUCHER, B. E., PHILLIPS, J. L., POWELL, J. A., ANDREWS, S. B. & DANIELS, M. P. (1992). Coordinated development of myofibrils, sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. *Dev Biol* **150**, 266-280.

FODOR, J., GONCZI, M., SZTRETVE, M., DIENES, B., OLAH, T., SZABO, L., CSOMA, E., SZENTESI, P., SZIGETI, G. P., MARTY, I. & CSERNOCH, L. (2008). Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca²⁺ release events and global Ca²⁺ signals in skeletal muscle cells in culture. *J Physiol* **586**, 5803-5818.

FOSKETT, A., WILLIAMS, C., BOOBIS, L. & TSINTZAS, K. (2008). Carbohydrate availability and muscle energy metabolism during intermittent running. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 96-103.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2007). ER-mitochondria communication. How privileged? *Physiology (Bethesda)* **22**, 261-268.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C., PROTASI, F. & TIJSENS, P. (2005). The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Ann N Y Acad Sci* **1047**, 76-85.
- FROEMMING, G. R., MURRAY, B. E. & OHLENDIECK, K. (1999). Self-aggregation of triadin in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1418**, 197-205.
- FUJIMOTO, T. (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* **120**, 1147-1157.
- FUJIMOTO, T., MIYAWAKI, A. & MIKOSHIBA, K. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J Cell Sci* **108** (Pt 1), 7-15.
- FUJIMOTO, T., NAKADE, S., MIYAWAKI, A., MIKOSHIBA, K. & OGAWA, K. (1992). Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* **119**, 1507-1513.
- FURUICHI, T., FURUTAMA, D., HAKAMATA, Y., NAKAI, J., TAKESHIMA, H. & MIKOSHIBA, K. (1994). Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* **14**, 4794-4805.
- FURUICHI, T., YOSHIKAWA, S. & MIKOSHIBA, K. (1989). Nucleotide sequence of cDNA encoding P400 protein in the mouse cerebellum. *Nucleic Acids Res* **17**, 5385-5386.

G

- GALBIATI, F., ENGELMAN, J. A., VOLONTE, D., ZHANG, X. L., MINETTI, C., LI, M., HOU, H., JR., KNEITZ, B., EDELMANN, W. & LISANTI, M. P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* **276**, 21425-21433.
- GALBIATI, F., VOLONTE, D., CHU, J. B., LI, M., FINE, S. W., FU, M., BERMUDEZ, J., PEDEMONTE, M., WEIDENHEIM, K. M., PESTELL, R. G., MINETTI, C. & LISANTI, M. P. (2000). Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9689-9694.
- GALBIATI, F., VOLONTE, D., MINETTI, C., CHU, J. B. & LISANTI, M. P. (1999). Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J Biol Chem* **274**, 25632-25641.
- GALIZZI, J. P., FOSSET, M., ROMÉY, G., LADURON, P. & LAZDUNSKI, M. (1986). Neuroleptics of the diphenylbutylpiperidine series are potent calcium channel inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7513-7517.
- GALVAN, D. L., BORREGO-DIAZ, E., PEREZ, P. J. & MIGNERY, G. A. (1999). Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **274**, 29483-29492.

- GALVAN, D. L. & MIGNERY, G. A. (2002). Carboxyl-terminal sequences critical for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunit assembly. *J Biol Chem* **277**, 48248-48260.
- GERVASIO, O. L., WHITEHEAD, N. P., YEUNG, E. W., PHILLIPS, W. D. & ALLEN, D. G. (2008). TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci* **121**, 2246-2255.
- GINCEL, D., ZAID, H. & SHOSHAN-BARMATZ, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* **358**, 147-155.
- GLENNEY, J. R., JR. & SOPPET, D. (1992). Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10517-10521.
- GOONASEKERA, S. A., BEARD, N. A., GROOM, L., KIMURA, T., LYFENKO, A. D., ROSENFELD, A., MARTY, I., DULHUNTY, A. F. & DIRKSEN, R. T. (2007). Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol* **130**, 365-378.
- GREGG, R. G., MESSING, A., STRUBE, C., BEURG, M., MOSS, R., BEHAN, M., SUKHAREVA, M., HAYNES, S., POWELL, J. A., CORONADO, R. & POWERS, P. A. (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13961-13966.
- GROH, S., MARTY, I., OTTOLIA, M., PRESTIPINO, G., CHAPEL, A., VILLAZ, M. & RONJAT, M. (1999). Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* **274**, 12278-12283.
- GRUNWALD, R. & MEISSNER, G. (1995). Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* **270**, 11338-11347.
- GSCHWEND, M. H., RUDEL, R., BRINKMEIER, H., TAYLOR, S. R. & FOHR, K. J. (1999). A transient and a persistent calcium release are induced by chlorocresol in cultivated mouse myotubes. *Pflugers Arch* **438**, 101-106.
- GUO, W. & CAMPBELL, K. P. (1995). Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**, 9027-9030.
- GUO, W., JORGENSEN, A. O. & CAMPBELL, K. P. (1994). Characterization and ultrastructural localization of a novel 90-kDa protein unique to skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **269**, 28359-28365.
- GUO, W., JORGENSEN, A. O. & CAMPBELL, K. P. (1996a). Triadin, a linker for calsequestrin and the ryanodine receptor. *Soc Gen Physiol Ser* **51**, 19-28.

- GUO, W., JORGENSEN, A. O., JONES, L. R. & CAMPBELL, K. P. (1996b). Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J Biol Chem* **271**, 458-465.
- GURNETT, C. A., DE WAARD, M. & CAMPBELL, K. P. (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* **16**, 431-440.
- GYORKE, I., HESTER, N., JONES, L. R. & GYORKE, S. (2004). The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* **86**, 2121-2128.

H

- HAJNOCZKY, G., ROBB-GASPERS, L. D., SEITZ, M. B. & THOMAS, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* **82**, 415-424.
- HAKAMATA, Y., NAKAI, J., TAKESHIMA, H. & IMOTO, K. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **312**, 229-235.
- HARDING, V. B., JONES, L. R., LEFKOWITZ, R. J., KOCH, W. J. & ROCKMAN, H. A. (2001). Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5809-5814.
- HAYEK, S. M., ZHAO, J., BHAT, M., XU, X., NAGARAJ, R., PAN, Z., TAKESHIMA, H. & MA, J. (1999). A negatively charged region of the skeletal muscle ryanodine receptor is involved in Ca(2+)-dependent regulation of the Ca(2+) release channel. *FEBS Lett* **461**, 157-164.
- HEAD, B. P., PATEL, H. H., ROTH, D. M., LAI, N. C., NIESMAN, I. R., FARQUHAR, M. G. & INSEL, P. A. (2005). G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* **280**, 31036-31044.
- HERNANDEZ-DEVIEZ, D. J., MARTIN, S., LAVAL, S. H., LO, H. P., COOPER, S. T., NORTH, K. N., BUSHBY, K. & PARTON, R. G. (2006). Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Hum Mol Genet* **15**, 129-142.
- HONG, C. S., JI, J. H., KIM, J. P., JUNG, D. H. & KIM, D. H. (2001). Molecular cloning and characterization of mouse cardiac triadin isoforms. *Gene* **278**, 193-199.
- HOPF, F. W., REDDY, P., HONG, J. & STEINHARDT, R. A. (1996). A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J Biol Chem* **271**, 22358-22367.
- HOULE, T. D., RAM, M. L., MCMURRAY, W. J. & CALA, S. E. (2006). Different endoplasmic reticulum trafficking and processing pathways for calsequestrin (CSQ) and epitope-tagged CSQ. *Exp Cell Res* **312**, 4150-4161.

I

- ISHIKAWA, H. (1968). Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol* **38**, 51-66.
- ISSHIKI, M. & ANDERSON, R. G. (2003). Function of caveolae in Ca²⁺ entry and Ca²⁺-dependent signal transduction. *Traffic* **4**, 717-723.
- ISSHIKI, M., ANDO, J., KORENAGA, R., KOGO, H., FUJIMOTO, T., FUJITA, T. & KAMIYA, A. (1998). Endothelial Ca²⁺ waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5009-5014.
- ITO, K., KOMAZAKI, S., SASAMOTO, K., YOSHIDA, M., NISHI, M., KITAMURA, K. & TAKESHIMA, H. (2001). Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* **154**, 1059-1067.

J

- JACOBUS, W. E. (1985). Theoretical support for the heart phosphocreatine energy transport shuttle based on the intracellular diffusion limited mobility of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* **133**, 1035-1041.
- JAY, S. D., ELLIS, S. B., MCCUE, A. F., WILLIAMS, M. E., VEDVICK, T. S., HARPOLD, M. M. & CAMPBELL, K. P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **248**, 490-492.
- JAY, S. D., SHARP, A. H., KAHL, S. D., VEDVICK, T. S., HARPOLD, M. M. & CAMPBELL, K. P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem* **266**, 3287-3293.
- JAYARAMAN, T., BRILLANTES, A. M., TIMERMAN, A. P., FLEISCHER, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & MARKS, A. R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* **267**, 9474-9477.
- JONES, L. R., SUZUKI, Y. J., WANG, W., KOBAYASHI, Y. M., RAMESH, V., FRANZINI-ARMSTRONG, C., CLEEMANN, L. & MORAD, M. (1998). Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* **101**, 1385-1393.
- JONES, L. R., ZHANG, L., SANBORN, K., JORGENSEN, A. O. & KELLEY, J. (1995). Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**, 30787-30796.
- JOSEPH, S. K., BOEHRING, D., PIERSON, S. & NICCHITTA, C. V. (1997). Membrane insertion, glycosylation, and oligomerization of inositol trisphosphate receptors in a cell-free translation system. *J Biol Chem* **272**, 1579-1588.

JOSEPH, S. K., LIN, C., PIERSON, S., THOMAS, A. P. & MARANTO, A. R. (1995). Heterooligomers of type-I and type-III inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* **270**, 23310-23316.

JUNANKAR, P. R., DULHUNTY, A. F., CURTIS, S. M., PACE, S. M. & THINNES, F. P. (1995). Porin-type 1 proteins in sarcoplasmic reticulum and plasmalemma of striated muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* **16**, 595-610.

K

KAFTAN, E., MARKS, A. R. & EHRLICH, B. E. (1996). Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle. *Circ Res* **78**, 990-997.

KIM, E., YOUN, B., KEMPER, L., CAMPBELL, C., MILTING, H., VARSANYI, M. & KANG, C. (2007). Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* **373**, 1047-1057.

KIRCHHEFER, U., KLIMAS, J., BABA, H. A., BUCHWALOW, I. B., FABRITZ, L., HULS, M., MATUS, M., MULLER, F. U., SCHMITZ, W. & NEUMANN, J. (2007). Triadin is a critical determinant of cellular Ca cycling and contractility in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H3165-3174.

KIRCHHEFER, U., NEUMANN, J., BABA, H. A., BEGROW, F., KOBAYASHI, Y. M., REINKE, U., SCHMITZ, W. & JONES, L. R. (2001). Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* **276**, 4142-4149.

KIRCHHOF, P., KLIMAS, J., FABRITZ, L., ZWIENER, M., JONES, L. R., SCHAFERS, M., HERMANN, S., BOKNIK, P., SCHMITZ, W., BREITHARDT, G., KIRCHHEFER, U. & NEUMANN, J. (2007). Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 962-971.

KNOLLMANN, B. C., CHOPRA, N., HLAING, T., AKIN, B., YANG, T., ETTENSOHN, K., KNOLLMANN, B. E., HORTON, K. D., WEISSMAN, N. J., HOLINSTAT, I., ZHANG, W., RODEN, D. M., JONES, L. R., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PFEIFER, K. (2006). Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* **116**, 2510-2520.

KNUDSON, C. M., CHAUDHARI, N., SHARP, A. H., POWELL, J. A., BEAM, K. G. & CAMPBELL, K. P. (1989). Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem* **264**, 1345-1348.

KNUDSON, C. M., STANG, K. K., MOOMAW, C. R., SLAUGHTER, C. A. & CAMPBELL, K. P. (1993). Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* **268**, 12646-12654.

KOBAYASHI, Y. M., ALSEIKHAN, B. A. & JONES, L. R. (2000). Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* **275**, 17639-17646.

- KOBAYASHI, Y. M. & JONES, L. R. (1999). Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* **274**, 28660-28668.
- KOMAZAKI, S., ITO, K., TAKESHIMA, H. & NAKAMURA, H. (2002). Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett* **524**, 225-229.
- KORIOTH, F., GIEFFERS, C. & FREY, J. (1994). Cloning and characterization of the human gene encoding aspartyl beta-hydroxylase. *Gene* **150**, 395-399.
- KUREBAYASHI, N. & OGAWA, Y. (2001). Depletion of Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca²⁺ entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* **533**, 185-199.
- L**
- LAM, E., MARTIN, M. M., TIMERMAN, A. P., SABERS, C., FLEISCHER, S., LUKAS, T., ABRAHAM, R. T., O'KEEFE, S. J., O'NEILL, E. A. & WIEDERRECHT, G. J. (1995). A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* **270**, 26511-26522.
- LAUNIKONIS, B. S., BARNES, M. & STEPHENSON, D. G. (2003). Identification of the coupling between skeletal muscle store-operated Ca²⁺ entry and the inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2941-2944.
- LEONG, P. & MACLENNAN, D. H. (1998a). A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **273**, 7791-7794.
- LEONG, P. & MACLENNAN, D. H. (1998b). The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* **273**, 29958-29964.
- LEUNG, A. T., IMAGAWA, T. & CAMPBELL, K. P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem* **262**, 7943-7946.
- LI, C., DUAN, W., YANG, F. & ZHANG, X. (2006). Caveolin-3-anchored microdomains at the rabbit sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 1135-1140.
- LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR. & MEYER, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241.
- LIPP, P., LAINE, M., TOVEY, S. C., BURRELL, K. M., BERRIDGE, M. J., LI, W. & BOOTMAN, M. D. (2000). Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* **10**, 939-942.

- LISANTI, M. P., SCHERER, P. E., TANG, Z. & SARGIACOMO, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* **4**, 231-235.
- LUIK, R. M., WU, M. M., BUCHANAN, J. & LEWIS, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* **174**, 815-825.
- LUNARDI, J. & MONNIER, N. (2004). [Genetic of diseases by abnormal functioning of the skeletal muscle-calcium releasing complex]. *Rev Neurol (Paris)* **160**, S70-77.
- M**
- MA, J. & PAN, Z. (2003). Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells. *Front Biosci* **8**, d242-255.
- MACLENNAN, D. H. & WONG, P. T. (1971). Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 1231-1235.
- MANNELLA, C. A. & WANG, Q. (1989). Permeability of the mitochondrial outer membrane to organic cations. *Biochim Biophys Acta* **981**, 363-366.
- MARTY, I., FAURE, J., FOUREST-LIEUVIN, A., VASSILOPOULOS, S., ODDOUX, S. & BROCARD, J. (2009). Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol* **587**, 3117-3121.
- MARTY, I., ROBERT, M., RONJAT, M., BALLY, I., ARLAUD, G. & VILLAZ, M. (1995). Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* **307** (Pt 3), 769-774.
- MARTY, I., ROBERT, M., VILLAZ, M., DE JONGH, K., LAI, Y., CATTERALL, W. A. & RONJAT, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2270-2274.
- MCPHERSON, P. S. & CAMPBELL, K. P. (1993). Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J Biol Chem* **268**, 19785-19790.
- MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* **56**, 485-508.
- MEISSNER, G., RIOS, E., TRIPATHY, A. & PASEK, D. A. (1997). Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *J Biol Chem* **272**, 1628-1638.
- MEUR, G., PARKER, A. K., GERGELY, F. V. & TAYLOR, C. W. (2007). Targeting and retention of type 1 ryanodine receptors to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**, 23096-23103.

- MICHIKAWA, T., HAMANAKA, H., OTSU, H., YAMAMOTO, A., MIYAWAKI, A., FURUICHI, T., TASHIRO, Y. & MIKOSHIBA, K. (1994). Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **269**, 9184-9189.
- MIGNEN, O., THOMPSON, J. L. & SHUTTLEWORTH, T. J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol* **586**, 419-425.
- MIGNERY, G. A., NEWTON, C. L., ARCHER, B. T., 3RD & SUDHOF, T. C. (1990). Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **265**, 12679-12685.
- MILLER, S. L., CURRIE, S., LOUGHREY, C. M., KETTLEWELL, S., SEIDLER, T., REYNOLDS, D. F., HASENFUSS, G. & SMITH, G. L. (2005). Effects of calsequestrin over-expression on excitation-contraction coupling in isolated rabbit cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **67**, 667-677.
- MILSTEIN, M. L., MCFARLAND, T. P., MARSH, J. D. & CALA, S. E. (2008). Inefficient glycosylation leads to high steady-state levels of actively degrading cardiac triadin-1. *J Biol Chem* **283**, 1929-1935.
- MINETTI, C., SOTGIA, F., BRUNO, C., SCARTEZZINI, P., BRODA, P., BADO, M., MASETTI, E., MAZZOCCO, M., EGEO, A., DONATI, M. A., VOLONTE, D., GALBIATI, F., CORDONE, G., BRICARELLI, F. D., LISANTI, M. P. & ZARA, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**, 365-368.
- MITCHELL, R. D., SIMMERMAN, H. K. & JONES, L. R. (1988). Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* **263**, 1376-1381.
- MONNIER, N., KOZAK-RIBBENS, G., KRIVOSIC-HORBER, R., NIVOCHÉ, Y., QI, D., KRAEV, N., LOKE, J., SHARMA, P., TEGAZZIN, V., FIGARELLA-BRANGER, D., ROMERO, N., MEZIN, P., BENDAHAN, D., PAYEN, J. F., DEPRET, T., MACLENNAN, D. H. & LUNARDI, J. (2005). Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat* **26**, 413-425.
- MONNIER, N., PROCACCIO, V., STIEGLITZ, P. & LUNARDI, J. (1997). Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* **60**, 1316-1325.
- MONNIER, N., ROMERO, N. B., LERALE, J., LANDRIEU, P., NIVOCHÉ, Y., FARDEAU, M. & LUNARDI, J. (2001). Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet* **10**, 2581-2592.
- MONTESANO, R., ROTH, J., ROBERT, A. & ORCI, L. (1982). Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* **296**, 651-653.

MUNDY, D. I., MACHLEIDT, T., YING, Y. S., ANDERSON, R. G. & BLOOM, G. S. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**, 4327-4339.

MUNRO, S. & PELHAM, H. R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.

MURPHY, R. M., MOLLICA, J. P. & LAMB, G. D. (2009). Plasma membrane removal in rat skeletal muscle fibers reveals caveolin-3 hot-spots at the necks of transverse tubules. *Exp Cell Res* **315**, 1015-1028.

N

NAKAI, J., TANABE, T., KONNO, T., ADAMS, B. & BEAM, K. G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **273**, 24983-24986.

NEUHUBER, B., GERSTER, U., DORING, F., GLOSSMANN, H., TANABE, T. & FLUCHER, B. E. (1998). 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* **95**, 5015-5020.

NISHI, M., KOMAZAKI, S., IINO, M., KANGAWA, K. & TAKESHIMA, H. (1998). Mitsugumin23, a novel transmembrane protein on endoplasmic reticulum and nuclear membranes. *FEBS Lett* **432**, 191-196.

NISHI, M., KOMAZAKI, S., KUREBAYASHI, N., OGAWA, Y., NODA, T., IINO, M. & TAKESHIMA, H. (1999). Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking mitsugumin29. *J Cell Biol* **147**, 1473-1480.

O

OBERMAIR, G. J., KUGLER, G., BAUMGARTNER, S., TULUC, P., GRABNER, M. & FLUCHER, B. E. (2005). The Ca²⁺ channel alpha2delta-1 subunit determines Ca²⁺ current kinetics in skeletal muscle but not targeting of alpha1S or excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **280**, 2229-2237.

OHKURA, M., FURUKAWA, K., FUJIMORI, H., KURUMA, A., KAWANO, S., HIRAOKA, M., KUNIYASU, A., NAKAYAMA, H. & OHIZUMI, Y. (1998). Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. *Biochemistry* **37**, 12987-12993.

OHKURA, M., IDE, T., FURUKAWA, K., KAWASAKI, T., KASAI, M. & OHIZUMI, Y. (1995). Calsequestrin is essential for the Ca²⁺ release induced by myotoxin alpha in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 1181-1185.

P

PALADE, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* **1**, 188-211.

- PAN, Z., HIRATA, Y., NAGARAJ, R. Y., ZHAO, J., NISHI, M., HAYEK, S. M., BHAT, M. B., TAKESHIMA, H. & MA, J. (2004). Co-expression of MG29 and ryanodine receptor leads to apoptotic cell death: effect mediated by intracellular Ca²⁺ release. *J Biol Chem* **279**, 19387-19390.
- PAN, Z., YANG, D., NAGARAJ, R. Y., NOSEK, T. A., NISHI, M., TAKESHIMA, H., CHENG, H. & MA, J. (2002). Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking mg29. *Nat Cell Biol* **4**, 379-383.
- PANI, B., ONG, H. L., LIU, X., RAUSER, K., AMBUDKAR, I. S. & SINGH, B. B. (2008). Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *J Biol Chem* **283**, 17333-17340.
- PAOLINI, C., QUARTA, M., NORI, A., BONCOMPAGNI, S., CANATO, M., VOLPE, P., ALLEN, P. D., REGGIANI, C. & PROTASI, F. (2007). Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol* **583**, 767-784.
- PAREKH, A. B. & PENNER, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**, 901-930.
- PARK, H., WU, S., DUNKER, A. K. & KANG, C. (2003). Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem* **278**, 16176-16182.
- PARTON, R. G. & SIMONS, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-194.
- PARTON, R. G., WAY, M., ZORZI, N. & STANG, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* **136**, 137-154.
- PATEL, S., JOSEPH, S. K. & THOMAS, A. P. (1999). Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* **25**, 247-264.
- PENNA, A., DEMURO, A., YEROMIN, A. V., ZHANG, S. L., SAFRINA, O., PARKER, I. & CAHALAN, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116-120.
- PEREZ, C. F., VOSS, A., PESSAH, I. N. & ALLEN, P. D. (2003). RyR1/RyR3 chimeras reveal that multiple domains of RyR1 are involved in skeletal-type E-C coupling. *Biophys J* **84**, 2655-2663.
- PEREZ, P. J., RAMOS-FRANCO, J., FILL, M. & MIGNERY, G. A. (1997). Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**, 23961-23969.
- PEREZ-REYES, E., WEI, X. Y., CASTELLANO, A. & BIRNBAUMER, L. (1990). Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* **265**, 20430-20436.

- PERUTZ, M. F., STADEN, R., MOENS, L. & DE BAERE, I. (1993). Polar zippers. *Curr Biol* **3**, 249-253.
- PISANIELLO, A., SERRA, C., ROSSI, D., VIVARELLI, E., SORRENTINO, V., MOLINARO, M. & BOUCHE, M. (2003). The block of ryanodine receptors selectively inhibits fetal myoblast differentiation. *J Cell Sci* **116**, 1589-1597.
- POPESCU, L. M., DICULESCU, I., ZELCK, U. & IONESCU, N. (1974). Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell Tissue Res* **154**, 357-378.
- POUVREAU, S., ALLARD, B., BERTHIER, C. & JACQUEMOND, V. (2004). Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse. *J Physiol* **560**, 779-794.
- POUVREAU, S., ROYER, L., YI, J., BRUM, G., MEISSNER, G., RIOS, E. & ZHOU, J. (2007). Ca(2+) sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5235-5240.
- POWELL, J. A., CARRASCO, M. A., ADAMS, D. S., DROUET, B., RIOS, J., MULLER, M., ESTRADA, M. & JAIMOVICH, E. (2001). IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* **114**, 3673-3683.
- PRAGNELL, M., DE WAARD, M., MORI, Y., TANABE, T., SNUTCH, T. P. & CAMPBELL, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67-70.
- R**
- RALSTON, E. & PLOUG, T. (1999). Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* **246**, 510-515.
- RAMOS-FRANCO, J., GALVAN, D., MIGNERY, G. A. & FILL, M. (1999). Location of the permeation pathway in the recombinant type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Gen Physiol* **114**, 243-250.
- RAPIZZI, E., PINTON, P., SZABADKAI, G., WIECKOWSKI, M. R., VANDECASTEELE, G., BAIRD, G., TUFT, R. A., FOGARTY, K. E. & RIZZUTO, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* **159**, 613-624.
- RAZZAQ, A., ROBINSON, I. M., MCMAHON, H. T., SKEPPER, J. N., SU, Y., ZELHOF, A. C., JACKSON, A. P., GAY, N. J. & O'KANE, C. J. (2001). Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **15**, 2967-2979.
- REZGUI, S. S., VASSILOPOULOS, S., BROCARD, J., PLATEL, J. C., BOURON, A., ARNOULT, C., ODDOUX, S., GARCIA, L., DE WAARD, M. & MARTY, I. (2005). Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem* **280**, 39302-39308.

- RICHTER, T., FLOETENMEYER, M., FERGUSON, C., GALEA, J., GOH, J., LINDSAY, M. R., MORGAN, G. P., MARSH, B. J. & PARTON, R. G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* **9**, 893-909.
- RIOS, E. & BRUM, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* **325**, 717-720.
- RIZZI, N., LIU, N., NAPOLITANO, C., NORI, A., TURCATO, F., COLOMBI, B., BICCIATO, S., ARCELLI, D., SPEDITO, A., SCELSI, M., VILLANI, L., ESPOSITO, G., BONCOMPAGNI, S., PROTASI, F., VOLPE, P. & PRIORI, S. G. (2008). Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calsequestrin: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* **103**, 298-306.
- ROMERO, N. B., HERASSE, M., MONNIER, N., LEROY, J. P., FISCHER, D., FERREIRO, A., VIOLLET, L., EYMARD, B., LAFORET, P., MONGES, S., LUBIENIECKI, F., TARATUTO, A. L., GUICHENEY, P., LUNARDI, J. & FARDEAU, M. (2005). Clinical and histopathological aspects of central core disease associated and non-associated with RYR1 locus. *Acta Myol* **24**, 70-73.
- ROSEMBLATT, M., HIDALGO, C., VERGARA, C. & IKEMOTO, N. (1981). Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **256**, 8140-8148.
- ROSEMBLATT, M. S. & SCALES, D. J. (1989). Morphological, immunological and biochemical characterization of purified transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* **87**, 57-69.
- ROSS, C. A., DANOFF, S. K., SCHELL, M. J., SNYDER, S. H. & ULLRICH, A. (1992). Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4265-4269.
- ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. & ANDERSON, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- ROTHBERG, K. G., YING, Y. S., KAMEN, B. A. & ANDERSON, R. G. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* **111**, 2931-2938.
- RUDOLF, R., MONGILLO, M., MAGALHAES, P. J. & POZZAN, T. (2004). In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *J Cell Biol* **166**, 527-536.
- RUTH, P., ROHRKASTEN, A., BIEL, M., BOSSE, E., REGULLA, S., MEYER, H. E., FLOCKERZI, V. & HOFMANN, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **245**, 1115-1118.

S

- SACCHETTO, R., VOLPE, P., DAMIANI, E. & MARGRETH, A. (1993). Postnatal development of rabbit fast-twitch skeletal muscle: accumulation, isoform transition and fibre distribution of calsequestrin. *J Muscle Res Cell Motil* **14**, 646-653.
- SAKS, V., DZEJA, P., SCHLATTNER, U., VENDELIN, M., TERZIC, A. & WALLIMANN, T. (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* **571**, 253-273.
- SAKS, V.A., KHUCHUA, Z.A., VASILYEVA, E.V., BELIKOVA, O.Y., KUZNETSOV, A.V. (1994). Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration α synthesis. *Mol Cell Biochem.* **133-134**:155-92.
- SALANOVA, M., PRIORI, G., BARONE, V., INTRAVAIA, E., FLUCHER, B., CIRUELA, F., MCILHINNEY, R. A., PARYS, J. B., MIKOSHIBA, K. & SORRENTINO, V. (2002). Homer proteins and InsP(3) receptors co-localise in the longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. *Cell Calcium* **32**, 193-200.
- SATO, Y., FERGUSON, D. G., SAKO, H., DORN, G. W., 2ND, KADAMBI, V. J., YATANI, A., HOIT, B. D., WALSH, R. A. & KRANIAS, E. G. (1998). Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* **273**, 28470-28477.
- SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. & LISANTI, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 131-135.
- SCHIAFFINO, S., CANTINI, M. & SARTORE, S. (1977). T-system formation in cultured rat skeletal tissue. *Tissue Cell* **9**, 437-446.
- SCHNEIDER, H., FEYEN, J. H. & SEUWEN, K. (1994). A C-terminally truncated human parathyroid hormone receptor is functional and activates multiple G proteins. *FEBS Lett* **351**, 281-285.
- SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-246.
- SCHREDELSEKER, J., DI BIASE, V., OBERMAIR, G. J., FELDER, E. T., FLUCHER, B. E., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & GRABNER, M. (2005). The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17219-17224.
- SCHUBERT, W., SOTGIA, F., COHEN, A. W., CAPOZZA, F., BONUCCELLI, G., BRUNO, C., MINETTI, C., BONILLA, E., DIMAURO, S. & LISANTI, M. P. (2007). Caveolin-1(-/-)- and caveolin-2(-/-)-deficient mice both display numerous skeletal muscle abnormalities, with tubular aggregate formation. *Am J Pathol* **170**, 316-333.

- SCOTT, B. T., SIMMERMAN, H. K., COLLINS, J. H., NADAL-GINARD, B. & JONES, L. R. (1988). Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* **263**, 8958-8964.
- SHARMA, V. K., RAMESH, V., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & SHEU, S. S. (2000). Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 97-104.
- SHEN, X., FRANZINI-ARMSTRONG, C., LOPEZ, J. R., JONES, L. R., KOBAYASHI, Y. M., WANG, Y., KERRICK, W. G., CASWELL, A. H., POTTER, J. D., MILLER, T., ALLEN, P. D. & PEREZ, C. F. (2007). Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem* **282**, 37864-37874.
- SHIN, D. W., MA, J. & KIM, D. H. (2000). The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca(2+) and interacts with triadin. *FEBS Lett* **486**, 178-182.
- SHOSHAN-BARMATZ, V., HADAD, N., FENG, W., SHAFIR, I., ORR, I., VARSANYI, M. & HEILMEYER, L. M. (1996). VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* **386**, 205-210.
- SHOU, W., AGHDASI, B., ARMSTRONG, D. L., GUO, Q., BAO, S., CHARNG, M. J., MATHEWS, L. M., SCHNEIDER, M. D., HAMILTON, S. L. & MATZUK, M. M. (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* **391**, 489-492.
- SORRENTINO, V. & REGGIANI, C. (1999). Expression of the ryanodine receptor type 3 in skeletal muscle. A new partner in excitation-contraction coupling? *Trends Cardiovasc Med* **9**, 54-61.
- SORRENTINO, V. & VOLPE, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci* **14**, 98-103.
- SUPATTAPONE, S., DANOFF, S. K., THEIBERT, A., JOSEPH, S. K., STEINER, J. & SNYDER, S. H. (1988). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8747-8750.
- SZABADKAI, G., BIANCHI, K., VARNAI, P., DE STEFANI, D., WIECKOWSKI, M. R., CAVAGNA, D., NAGY, A. I., BALLA, T. & RIZZUTO, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* **175**, 901-911.
- T**
- TAKAHASHI, M., SEAGAR, M. J., JONES, J. F., REBER, B. F. & CATTERALL, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5478-5482.
- TAKEKURA, H., NISHI, M., NODA, T., TAKESHIMA, H. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1995). Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3381-3385.

- TAKESHIMA, H., IINO, M., TAKEKURA, H., NISHI, M., KUNO, J., MINOWA, O., TAKANO, H. & NODA, T. (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* **369**, 556-559.
- TAKESHIMA, H., IKEMOTO, T., NISHI, M., NISHIYAMA, N., SHIMUTA, M., SUGITANI, Y., KUNO, J., SAITO, I., SAITO, H., ENDO, M., IINO, M. & NODA, T. (1996). Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem* **271**, 19649-19652.
- TAKESHIMA, H., KOMAZAKI, S., HIROSE, K., NISHI, M., NODA, T. & IINO, M. (1998a). Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *Embo J* **17**, 3309-3316.
- TAKESHIMA, H., NISHIMURA, S., MATSUMOTO, T., ISHIDA, H., KANGAWA, K., MINAMINO, N., MATSUO, H., UEDA, M., HANAOKA, M., HIROSE, T. & ET AL. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**, 439-445.
- TAKESHIMA, H., SHIMUTA, M., KOMAZAKI, S., OHMI, K., NISHI, M., IINO, M., MIYATA, A. & KANGAWA, K. (1998b). Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J* **331** (Pt 1), 317-322.
- TAKESHIMA, H., YAMAZAWA, T., IKEMOTO, T., TAKEKURA, H., NISHI, M., NODA, T. & IINO, M. (1995). Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *Embo J* **14**, 2999-3006.
- TANABE, T., BEAM, K. G., POWELL, J. A. & NUMA, S. (1988). Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* **336**, 134-139.
- TANG, Z., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., SONG, K., CHU, C., KOHTZ, D. S., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. & LISANTI, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* **271**, 2255-2261.
- TAREILUS, E., ROUX, M., QIN, N., OLCESE, R., ZHOU, J., STEFANI, E. & BIRNBAUMER, L. (1997). A Xenopus oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1703-1708.
- TARRONI, P., ROSSI, D., CONTI, A. & SORRENTINO, V. (1997). Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **272**, 19808-19813.
- TAYLOR, C. W., GENAZZANI, A. A. & MORRIS, S. A. (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* **26**, 237-251.

- TERENTYEV, D., CALA, S. E., HOULE, T. D., VIATCHENKO-KARPINSKI, S., GYORKE, I., TERENTYEVA, R., WILLIAMS, S. C. & GYORKE, S. (2005). Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ Res* **96**, 651-658.
- TERENTYEV, D., VIATCHENKO-KARPINSKI, S., GYORKE, I., VOLPE, P., WILLIAMS, S. C. & GYORKE, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11759-11764.
- TERRITO, P. R., FRENCH, S. A., DUNLEAVY, M. C., EVANS, F. J. & BALABAN, R. S. (2001). Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering. *J Biol Chem* **276**, 2586-2599.
- THEVENON, D., SMIDA-REZGUI, S., CHEVESSIER, F., GROH, S., HENRY-BERGER, J., BEATRIZ ROMERO, N., VILLAZ, M., DEWAARD, M. & MARTY, I. (2003). Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 669-675.
- TIISKENS, P., JONES, L. R. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2003). Junctin and calsequestrin overexpression in cardiac muscle: the role of junctin and the synthetic and delivery pathways for the two proteins. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 961-974.
- TRAVERSO, M., BRUNO, C., BROCCOLINI, A., SOTGIA, F., DONATI, M. A., ASSERETO, S., GAZZERRO, E., LO MONACO, M., MODONI, A., D'AMICO, A., GASPERINI, S., RICCI, E., ZARA, F., LISANTI, M. & MINETTI, C. (2008). Truncation of Caveolin-3 causes autosomal-recessive Rippling Muscle Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**, 735-737.
- TREVES, S., FERIOTTO, G., MOCCAGATTA, L., GAMBARI, R. & ZORZATO, F. (2000). Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **275**, 39555-39568.
- TREVES, S., FRANZINI-ARMSTRONG, C., MOCCAGATTA, L., ARNOULT, C., GRASSO, C., SCHRUM, A., DUCREUX, S., ZHU, M. X., MIKOSHIBA, K., GIRARD, T., SMIDA-REZGUI, S., RONJAT, M. & ZORZATO, F. (2004). Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP₃ receptors and/or calcium store depletion. *J Cell Biol* **166**, 537-548.
- TUNWELL, R. E., WICKENDEN, C., BERTRAND, B. M., SHEVCHENKO, V. I., WALSH, M. B., ALLEN, P. D. & LAI, F. A. (1996). The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem J* **318** (Pt 2), 477-487.
- ## U
- URSU, D., SEBILLE, S., DIETZE, B., FREISE, D., FLOCKERZI, V. & MELZER, W. (2001). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J Physiol* **533**, 367-377.

V

- VASSILOPOULOS, S., BROCARD, J., GARCIA, L., MARTY, I. & BOURON, A. (2007). Retrograde regulation of store-operated calcium channels by the ryanodine receptor-associated protein triadin 95 in rat skeletal myotubes. *Cell Calcium* **41**, 179-185.
- VASSILOPOULOS, S., THEVENON, D., REZGUI, S. S., BROCARD, J., CHAPEL, A., LACAMPAGNE, A., LUNARDI, J., DEWAARD, M. & MARTY, I. (2005). Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 28601-28609.
- VENTURA-CLAPIER, R., KUZNETSOV, A., VEKSLER, V., BOEHM, E. & ANFLOUS, K. (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* **184**, 231-247.

W

- WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R., BERKOWITZ, J., WIEDERRECHT, G. J., XIN, H. B. & FLEISCHER, S. (1996). Cryoelectron microscopy resolves FK506-binding protein sites on the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biophys J* **70**, 1709-1715.
- WANG, S., TRUMBLE, W. R., LIAO, H., WESSON, C. R., DUNKER, A. K. & KANG, C. H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* **5**, 476-483.
- WANG, Y., LI, X., DUAN, H., FULTON, T. R., EU, J. P. & MEISSNER, G. (2009). Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium* **45**, 29-37.
- WAY, M. & PARTON, R. G. (1995). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* **376**, 108-112.
- WEI, L., GALLANT, E. M., DULHUNTY, A. F. & BEARD, N. A. (2009). Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin. *Int J Biochem Cell Biol*.
- WEISS, R. G., O'CONNELL, K. M., FLUCHER, B. E., ALLEN, P. D., GRABNER, M. & DIRKSEN, R. T. (2004). Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1094-1102.
- WIER, W. G. & BALKE, C. W. (1999). Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res* **85**, 770-776.
- WILLIAMS, T. M. & LISANTI, M. P. (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**, 214.
- WU, M. M., BUCHANAN, J., LUIK, R. M. & LEWIS, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* **174**, 803-813.

X

XIAO, R. P., VALDIVIA, H. H., BOGDANOV, K., VALDIVIA, C., LAKATTA, E. G. & CHENG, H. (1997). The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart. *J Physiol* **500** (Pt 2), 343-354.

XIN, H. B., SENBONMATSU, T., CHENG, D. S., WANG, Y. X., COPELLO, J. A., JI, G. J., COLLIER, M. L., DENG, K. Y., JEYAKUMAR, L. H., MAGNUSON, M. A., INAGAMI, T., KOTLIKOFF, M. I. & FLEISCHER, S. (2002). Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* **416**, 334-338.

Y

YI, M., WEAVER, D. & HAJNOCZKY, G. (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* **167**, 661-672.

YOSHIDA, M., MINAMISAWA, S., SHIMURA, M., KOMAZAKI, S., KUME, H., ZHANG, M., MATSUMURA, K., NISHI, M., SAITO, M., SAEKI, Y., ISHIKAWA, Y., YANAGISAWA, T. & TAKESHIMA, H. (2005). Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. *J Biol Chem* **280**, 3500-3506.

YUAN, Q., FAN, G. C., DONG, M., ALTSCHAFL, B., DIWAN, A., REN, X., HAHN, H. H., ZHAO, W., WAGGONER, J. R., JONES, L. R., JONES, W. K., BERS, D. M., DORN, G. W., 2ND, WANG, H. S., VALDIVIA, H. H., CHU, G. & KRANIAS, E. G. (2007). Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* **115**, 300-309.

YANG, D., PAN, Z., TAKESHIMA, H., WU, C., NAGARAJ, R.Y., MA, J., CHENG, H. (2001). RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* **276**, 40210-40214.

Z

ZHANG, L., FRANZINI-ARMSTRONG, C., RAMESH, V. & JONES, L. R. (2001). Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 233-247.

ZHANG, L., KELLEY, J., SCHMEISSER, G., KOBAYASHI, Y. M. & JONES, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **272**, 23389-23397.

ZHAO, X., YOSHIDA, M., BROTTTO, L., TAKESHIMA, H., WEISLEDER, N., HIRATA, Y., NOSEK, T. M., MA, J. & BROTTTO, M. (2005). Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumenin knockout mice. *Physiol Genomics* **23**, 72-78.

ZORZATO, F., FUJII, J., OTSU, K., PHILLIPS, M., GREEN, N. M., LAI, F. A., MEISSNER, G. & MACLENNAN, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**, 2244-2256.

Résumé:

La triadine est une famille de protéines du muscle squelettique. Quatre isoformes de la triadine ont été clonées: Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32. Ce sont des protéines transmembranaires du reticulum sarcoplasmique (RS). Trisk 95 et Trisk 51 sont localisées dans la triade où elles sont associées au récepteur de la ryanodine (RyR), un canal calcique. Trisk 49 et Trisk 32 sont localisées dans le RS longitudinal. Il a été montré que Trisk 95 régule les relâchements de Ca^{2+} du RyR. L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les fonctions des triadines dans le muscle squelettique grâce à différentes approches et techniques complémentaires. Dans un premier temps, Trisk 95 et de Trisk 51 ont été étudiées par surexpression *in vivo* dans les muscles de souris. La caractérisation de ces muscles a permis de mettre en évidence l'association du RyR avec la cavéoline, une protéine de la membrane plasmique. Dans un second temps, la fonction de Trisk 32 a été étudiée dans le muscle squelettique. L'étude précise de sa localisation a permis de montrer qu'elle est localisée dans la triade, dans le RS longitudinal, et à proximité des mitochondries. Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé qu'elle est associée avec le RyR et avec le récepteur de l' IP_3 . De par ses partenaires, Trisk 32 semble jouer un rôle dans la régulation de nombreux mécanismes impliquant le Ca^{2+} . Enfin, le gène de la triadine a été invalidé chez la souris. Cette souris KO triadine présente une faiblesse musculaire et des défauts dans l'ultrastructure de la triade. Ces résultats indiquent qu'en plus de sa fonction de régulation des relâchements de Ca^{2+} la triadine pourrait avoir un rôle structural.

Mots clefs: calséquestrine, cavéoline, complexe de relâchement du calcium, couplage excitation-contraction, muscle cardiaque, muscle squelettique, récepteur de l' IP_3 , récepteur de la ryanodine, reticulum sarcoplasmique, souris KO, triade, triadine, tubule-transverse.

Abstract:

Triadin is a protein of the skeletal muscle. Four isoforms have been cloned: Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49, and Trisk 32. They are transmembrane proteins of the sarcoplasmic reticulum (SR). Trisk 95 and Trisk 51 are in the triad junction where they are associated with a calcium release channel, the ryanodine receptor (RyR). Trisk 49 and Trisk 32 are localised in the longitudinal SR. It has been shown that Trisk 95 is able to regulate RyR Ca^{2+} releases. The aim of this work was to study triadins functions in the skeletal muscle with different and complementary approaches. In the first part of this work, Trisk 95 and Trisk 51 were over-expressed *in vivo* in mouse muscles. These muscles were then characterised and the results showed an association between RyR and caveolin-3, a protein of the plasma membrane. The second part of this work is related to the study of Trisk 32. I studied more precisely the localisation of Trisk 32 and showed that it is localised in the triad, in the longitudinal SR, and close to mitochondria. Co-immunoprecipitation experiments highlighted new partners for Trisk 32 such as RyR and the IP_3 receptor, another calcium channel of the SR. Thanks to its partners, it can be assumed that Trisk 32 is involved in the regulation of many Ca^{2+} dependent processes. At least, triadin gene has been knocked out in mouse. This mouse model clearly presents an obvious muscle weakness. The muscle presented ultrastructural disorders. These results suggest that in addition to its function as a Ca^{2+} release channel regulator, triadin could have a scaffolding function.

Key words: calcium release complexe, calsequestrin, cardiac muscle, caveolin, excitation-contraction coupling, IP_3 receptor, KO mouse, ryanodine receptor, sarcoplasmic reticulum, skeletal muscle, transverse tubule, triad, triadin.